



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA Y UNIÓN AL ADN DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBRE(II) Y ZINC(II) CON LIGANTES DERIVADOS DE 5-NITROIMIDAZOL

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. EN C. RUBÍ NAVARRO PEÑALOZA

DRA. NORÁH BARBA BEHRENS  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA Y UNIÓN AL ADN DE COMPUESTOS DE  
COORDINACIÓN DE COBRE(II) Y ZINC(II) CON LIGANTES DERIVADOS DE  
5-NITROIMIDAZOL**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. EN C. RUBÍ NAVARRO PEÑALOZA**

**DRA. NORÁH BARBA BEHRENS  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**



**CIUDAD DE MÉXICO, 2024**

## Agradecimientos

A la *Dra. Noráh Barba Behrens* por la asesoría en la realización de este proyecto. Por todo el aprendizaje, los consejos, el apoyo y la motivación que me ha brindado desde mis estudios de Licenciatura y que me han permitido crecer profesional y personalmente.

Al *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas* de la *Universidad Nacional Autónoma de México* por permitirme realizar mis estudios de Doctorado y por la autorización para realizar la Estancia de Investigación en la *Universitat de Barcelona* a través del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al *CONAHCYT* por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado (*CVU 772020*).

A la *DGAPA* por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto *IN206922*.

A los miembros del comité tutor el *Dr. Ronan Le Lagadec* y la *Dra. Angelina Flores Parra* por sus comentarios y sugerencias semestrales que contribuyeron en mi formación y a mejorar el trabajo de investigación.

A la *Dra. Norma Rivera Fernández* y al *Dr. Jhony Anacleto Santos* de la *Facultad de Medicina* de la UNAM, por el apoyo y la confianza brindada para la realización de las pruebas antiparasitarias.

Al *Dr. Patrick Gámez* y a la *Dra. Ana Caballero* de la *Universitat de Barcelona* por la asesoría y el apoyo brindado durante la estancia de investigación.

A la *M. en C. Isabel Gracia Mora* y al *M. en C. Francisco Sánchez Bartéz* de la *Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC)* por facilitar la realización de las pruebas de toxicidad aguda.

Al *Dr. Felipe González Bravo* y al *Dr. Jesús Palacios Ramírez* del *Centro de Investigación y Estudios Avanzados* del *IPN-Zacatenco* por el apoyo en los estudios de voltamperometría cíclica.

Al *Dr. Bruno Landeros Rivera* de la *Facultad de Química* de la UNAM por su colaboración en el estudio teórico y estructural de los compuestos obtenidos.

A los miembros del jurado asignado por la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas el *Dr. Noé Zúñiga Villarreal*, el *Dr. Ronan Marie Le Lagadec*, el *Dr. Felipe de Jesús González Bravo*, el *Dr. Francisco Hernández Luis* y la *Dra. María Elena Bravo Gómez* por la revisión de tesis y las observaciones realizadas para mejorar el proyecto.

A la *Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI)* en particular a la Q. Maricela Gutiérrez Franco, al M. en I. Víctor Lemus Neri, al Dr. Marcos Flores Álamo, a la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y a la M. en C. Nayeli López Balbiaux, por el apoyo en las técnicas de espectroscopía de infrarrojo, análisis elemental, difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear.

A la *Biol. Patricia Fierro* por todo el apoyo técnico otorgado en el Laboratorio 211, por toda la paciencia y el cariño.

Al *Dr. Horacio López Sandoval* por su apoyo para sacar adelante este proyecto y por su amistad.

A todos mis compañeros del *Laboratorio 211* que conocí desde la Licenciatura y se convirtieron en mis amigos, por compartir conmigo grandes experiencias y aprendizaje. En particular al M. en C. Rodrigo Castro y al Q. León Felipe Lozano por su amistad, apoyo y compañía en esta última etapa.

A los alumnos de estancia Jessica Martínez, Alondra Juárez, Mailon Avelar, Gabriela Núñez, Miguel Garza y Eduardo Barrales quienes con su entusiasmo me recordaban mi pasión por la ciencia.

A la *Dra. Karla Salas Martin* y al *M. en C. Adrián Espinoza Guillen* por el apoyo técnico y la disposición que siempre tuvieron para apoyarme.

A mis familiares y amigos que me han acompañado, apoyado y escuchado en este largo camino.

GRACIAS

## Miembros del jurado

**Presidente:** Dr. Noé Zúñiga Villarreal

**Vocal:** Dr. Ronan Marie Le Lagadec

**Vocal:** Dr. Felipe de Jesús González Bravo

**Vocal:** Dr. Francisco Hernández Luis

**Secretaria:** Dra. María Elena Bravo Gómez

### Lugares donde se desarrolló el tema

Laboratorio 211, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear  
Estudios de Posgrado  
Facultad de Química, UNAM

nanoBIC, Departament de Química Inorgànica i Orgànica,  
Secció Química Inorgànica,  
Facultat de Química, Universitat de Barcelona  
Bajo la supervisión del Dr. Patrick Gámez

---

Asesora

Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens

---

Sustentante

M. en C. Rubí Navarro Peñaloza

## **Publicaciones derivadas de este trabajo**

Navarro-Peñaloza R, Anacleto-Santos J, Rivera-Fernández N, Sánchez-Bartez F, Gracia-Mora I, Caballero AB, Gamez P, Barba-Behrens N. Anti-toxoplasma activity and DNA-binding of copper(II) and zinc(II) coordination compounds with 5-nitroimidazole-based ligands. *J. Biol. Inorg. Chem.* (2023).

Navarro-Peñaloza R, Landeros-Rivera B, López-Sandoval H, Castro-Ramírez R, Barba-Behrens N. New insights on transition metal coordination compounds with biological activeazole and nitroimidazole derivatives. *Coord. Chem. Rev.* 493 (2023) 215360.

## **Presentaciones en Congresos**

Décimo Congreso de la Facultad de Ingeniería Química (ConFIQ-10) y XXXIV Foro Científico y Cultural de la Universidad Autónoma de Yucatán, realizado del 18 al 20 de octubre de 2023, en Mérida, Yucatán  
Ganadora del 1er Lugar en modalidad oral.

## **Ponencia invitada**

Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, el 27 de enero de 2023. “Actividad antiparasitaria y anticancerígena de nuevas moléculas con metales”



## Índice

Abreviaturas y símbolos.....	i
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Capítulo 1 Introducción.....	1
Química inorgánica medicinal.....	1
Capítulo 2 Antecedentes.....	3
Importancia biológica del cobre.....	3
Importancia biológica del zinc.....	5
Actividad biológica de los 5-nitroimidazoles.....	7
Mecanismo de acción de los 5-nitroimidazoles.....	9
Resistencia a los fármacos derivados de 5-nitroimidazol y toxicidad.....	11
Compuestos de coordinación con ligantes derivados del 5-nitroimidazol.....	12
Capítulo 3 Justificación e Hipótesis.....	15
Capítulo 4 Objetivos.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares.....	16
Capítulo 5 Desarrollo experimental.....	17
Reactivos y disolventes.....	18
Síntesis del ligante 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz).....	18
Síntesis de los compuestos de coordinación.....	19
Pruebas de estabilidad en disolución.....	22
Ensayos biológicos.....	23
Determinación del coeficiente de distribución ( $\text{Log } D_{7.4}$ ).....	24
Estudios de unión al ADN.....	25
Ensayos de electroforesis en gel.....	26
Estudios electroquímicos por voltamperometría cíclica.....	26



Capítulo 6	Resultados de caracterización estructural .....	27
	Análisis elemental .....	27
	Espectroscopía de infrarrojo .....	28
	Espectroscopía electrónica en estado sólido y momento magnético efectivo .....	32
	Estudios de estabilidad en disolución .....	34
	Resonancia magnética nuclear .....	36
	Estructuras químicas de los compuestos de coordinación obtenidos .....	40
	Difracción de rayos X de monocristal.....	41
Capítulo 7	Actividad contra el parásito <i>Toxoplasma gondii</i> .....	49
	Toxoplasmosis .....	49
	<i>Toxoplasma gondii</i> , ciclo de vida y rutas de transmisión .....	51
	Tratamientos contra <i>Toxoplasma gondii</i> .....	53
	Compuestos de coordinación con actividad anti-toxoplasma .....	54
	Resultados de los ensayos de actividad anti-toxoplasma.....	55
Capítulo 8	Ensayos de toxicidad aguda .....	58
Capítulo 9	Coeficiente de distribución .....	60
Capítulo 10	Estudios de unión al ADN .....	63
	Espectroscopía electrónica UV-Vis .....	63
	Espectroscopía de fluorescencia .....	65
	Dicroísmo circular.....	69
	Electroforesis en gel.....	71
Capítulo 11	Estudios electroquímicos por voltamperometría cíclica .....	75
	Conclusiones .....	80
	Referencias .....	82
	Anexos.....	90
	Publicaciones.....	113



## Abreviaturas y símbolos

$\epsilon_0$	Coefficiente de extinción molar del compuesto completamente unido al ADN
$\epsilon_\alpha$	Coefficiente de extinción molar del compuesto libre en disolución
$\epsilon_a$	Coefficiente de extinción molar en agua
$\epsilon_f$	Coefficiente de extinción molar del compuesto unido al ADN a una concentración definida
$\epsilon_{oc}$	Coefficiente de extinción molar en octanol
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{max}$	Longitud de onda máxima
$\mu_{ef}$	Momento magnético efectivo
1mnz	1-metil-5-nitroimidazol
$^2J$	Constante de acoplamiento a dos enlaces de distancia
$^3J$	Constante de acoplamiento a tres enlaces de distancia
AA	Ácido ascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Anal. Calc.	Análisis elemental calculado
Anal. Exp.	Análisis elemental experimental
$A_{rel}$	Absorbancia relativa
A+T	Adenina y timina
ATR	Reflectancia totalmente atenuada
bpt	Bipirámide trigonal
$C_{agua}$	Concentración en fase acuosa
cenz	1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol
$C_{oc}$	Concentración en fase orgánica (1-octanol)
ct-ADN	Ácido desoxirribonucleico de timo de ternera
CYT	Citocromo
DC	Dicroísmo circular
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPS	Dihidropteroato sintasa
dmz	Dimetridazol; 1,2-metil-5-nitroimidazol





$E_{1/2}$	Potencial de media onda
EA	Electrodo auxiliar
EB	Bromuro de etidio
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico
$E_{pc}$	Potencial de pico catódico
ER	Electrodo de referencia
ET	Electrodo de trabajo
ETD	Enfermedades Tropicales Desatendidas
FAD	Flavin adenina dinucleótido
FMN	Flavin mononucleótido
H2L2	2-(((2-hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)propil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)phenol
hpcinol	1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol
$I_0$	Intensidades de emisión en ausencia del compuesto de coordinación
I	Intensidades de emisión en presencia del compuesto de coordinación
$IC_{50}$	Concentración inhibitoria media
$I_{pa}$	Intensidad de pico anódico
$I_{pc}$	Intensidad de pico catódico
IR	Infrarrojo
$K_b$	Constante de unión intrínseca
$K_{sv}$	Constante de apagamiento de Stern-Volmer
$LD_{50}$	Dosis letal media
$lp$	Par libre
MB	Magnetones de Bohr
MBC	Concentración bactericida mínima
MIC	Concentración inhibitoria media
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mtz	Metronidazol; 1-(2- hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol
mV	milivolt
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato



NHE	Electrodo Normal de Hidrógeno
NTR	Nitroreductasas
onz	Ornidazol; 1-(3-cloro-2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol
pbz	Pirámide de base cuadrada
PBS	Buffer fosfato salino
PFO	Piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa
phen	Fenantrolina
QTAM	Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCE	Electrodo de calomel saturado
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
snz	Secnidazol; 1-(2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol
SOD	Superóxido dismutasa
TBAPF <sub>6</sub>	Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio
tnz	Tinidazol; 1-[2-(etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitroimidazol
UV-Vis	Ultravioleta-visible
VC	Voltamperometría cíclica
VDP	Voltamperometría diferencial de pulsos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana



## Resumen

En este trabajo de investigación se presenta la síntesis y caracterización de nuevos compuestos de coordinación con los centros metálicos de cobre(II) y zinc(II) con los ligantes derivados de 5-nitroimidazol, 1-metil-5-nitroimidazol (1mnz), 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz) y 1-(3-cloro-2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (onz).

La caracterización estructural se realizó mediante las técnicas de análisis elemental, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía electrónica en estado sólido y en disolución, resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X en monocristal.

El interés de este proyecto es el estudio de la actividad antiparasitaria de los compuestos de coordinación contra el parásito *Toxoplasma gondii*, por lo que se realizaron estudios de viabilidad con este patógeno. Los resultados mostraron una buena actividad biológica para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ . Por otro lado, los estudios sobre la determinación de coeficientes de distribución revelaron que todos los compuestos tienen carácter hidrofóbico.

Con el objetivo de elucidar un posible mecanismo de acción se realizaron ensayos de unión y daño al ADN mediante las técnicas espectroscópicas de UV-Vis, fluorescencia y dicroísmo circular, los cuales demostraron que los compuestos de cobre(II) son capaces de unirse al surco menor del ADN; mientras que, los compuestos de zinc(II) presentan interacciones con los grupos fosfato de la biomolécula. Por otro lado, los estudios por electroforesis en gel de agarosa mostraron que los compuestos pueden generar daño al ADN mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, debidas a la reducción del átomo metálico de cobre(II) a cobre(I) y por la formación del anión radical nitro ( $-\text{NO}_2^{\cdot-}$ ) presente en los ligantes.

A través de estudios por voltamperometría cíclica para los ligantes libres y sus compuestos de coordinación se encontraron los potenciales de media onda de los pares  $-\text{NO}_2/-\text{NO}_2^{\cdot-}$  y  $-\text{NO}_2/-\text{NHOH}$  que son capaces de dañar al ADN; así como los potenciales de reducción de  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ .

En este proyecto se encontró que las características estructurales de los compuestos de coordinación (geometría, número de coordinación, interacciones no covalentes) y sus propiedades fisicoquímicas (coeficiente de distribución, potenciales redox) contribuyen en su actividad antiparasitaria y su unión al ADN.



## Abstract

In this work it is presented the synthesis and characterization of coordination compounds of the metal centers copper(II) and zinc(II) with the ligands 1-methyl-5-nitroimidazole (1mnz), 1-(2-chloroethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (cenz) and 1-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (onz).

The structural characterization was carried out through elemental analysis, infrared spectroscopy, solid state and solution electronic spectroscopy, nuclear magnetic resonance and single crystal X-ray diffraction.

The main interest of this project was based on the study of the antiparasitic activity of coordination compounds against *Toxoplasma gondii*, for which viability assays were carried out with this pathogen. The results showed high antiparasitic activity for the compounds [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]. On the other hand, the studies on the determination of distribution coefficients revealed that all compounds are hydrophobic.

With the aim of elucidating a possible mechanism of action, DNA cleavage assays were carried out using UV-Vis, fluorescence and circular dichroism spectroscopies, which demonstrated that copper(II) compounds are capable of binding to the DNA minor groove. While, zinc(II) compounds present interactions with the phosphate groups of the biomolecule. On the other hand, agarose gel electrophoresis studies showed that the compounds can cause DNA damage through the generation of reactive oxygen species, due to the reduction from copper(II) to copper(I) metal atom and by the formation of the nitro radical anion ( $-\text{NO}_2^{\cdot-}$ ) from the ligand.

The cyclic voltammetry studies for the free ligands and their coordination compounds, showed the half-wave potentials of  $-\text{NO}_2/-\text{NO}_2^{\cdot-}$  and  $-\text{NO}_2/-\text{NHOH}$  species capable of damaging DNA; as well as the  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$  reduction potentials.

Throughout the research, it was found that the structural characteristics of the coordination compounds (geometry, coordination number, non-covalent interactions) and their physicochemical properties (distribution coefficient, redox potentials) contributed to the antiparasitic activity and DNA-binding.



## Capítulo 1 Introducción

### *Química inorgánica medicinal*

La química inorgánica medicinal es un área de la química bioinorgánica que comprende el estudio de agentes terapéuticos y de diagnóstico basados en iones metálicos. Esta área ha sido practicada desde hace más de 5000 años; por ejemplo, los egipcios utilizaban cobre para esterilizar agua y aproximadamente en el año 1500 a. C. descubrieron que el zinc promovía la curación de heridas. En la Europa renacentista se descubrió la importancia nutricional del hierro; por otro lado, el cloruro de mercurio era utilizado como diurético. A pesar de que muchas civilizaciones antiguas usaron iones metálicos con fines medicinales, es desde apenas hace 100 años que las investigaciones sobre la actividad del  $K[Au(CN)_2]$  contra la tuberculosis, la actividad de diversos compuestos de antimonio contra la leishmaniasis y la actividad antibacteriana de sales de oro dieron lugar a un desarrollo más racional de la química inorgánica medicinal, destacando la importancia de la actividad biológica de compuestos de coordinación [1,3].

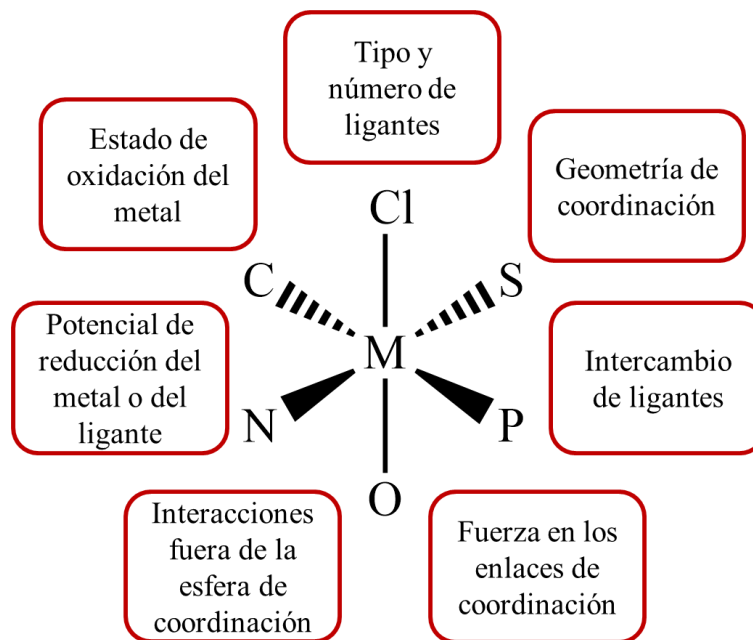
El mayor auge de la química inorgánica medicinal surge a partir de la década de 1960 con el descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino  $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$  y cada vez ha sido de mayor interés la síntesis de compuestos de coordinación con actividad biológica, así como dilucidar sus mecanismos de acción, resaltando la importancia del centro metálico para optimizar y mejorar la actividad de estos compuestos [1,4].

La química inorgánica medicinal abarca diferentes áreas que incluyen: la introducción de un ion metálico en un sistema biológico; estrategias de terapia quelatante para atrapar metales y evitar efectos tóxicos; la inhibición de metaloproteínas para el tratamiento de enfermedades; el uso de iones metálicos con fines diagnósticos, como los agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética ( $Ga^{3+}$ ) y para rayos X ( $BaSO_4$ ); así como el desarrollo de fármacos quimioterapéuticos con actividad radiosensibilizante, antitumoral, antibacteriana, antiviral o antiparasitaria [1,3-5].

El diseño racional de fármacos basados en compuestos de coordinación comprende diferentes etapas, la primera de ellas consiste en la elección de la enfermedad a tratar, seguido de la identificación de la diana biológica sobre la cual es probable que actúe el fármaco [3]. Posteriormente, el diseño de los compuestos de coordinación debe considerar una serie de parámetros debidos tanto a la presencia del metal como del ligante (Figura 1). En la mayoría de los casos es probable que los compuestos de coordinación actúen como profármacos; es decir, el compuesto metálico lleva a cabo una serie de transformaciones antes de llegar a su objetivo. Estas transformaciones pueden incluir cambios en el estado de oxidación del metal; cambios en la primera esfera de coordinación como el número de coordinación, la geometría y la sustitución de ligantes;



cambios en la fuerza de enlace; interacciones con la segunda esfera de coordinación y cambios en los potenciales de reducción [3,6]. La variabilidad de estos parámetros puede aumentar la selectividad hacia distintas dianas biológicas. El éxito de los compuestos de coordinación como agentes terapéuticos para poder llegar a las etapas clínicas, depende en gran medida de la atención que se preste a estos parámetros.



**Figura 1.** Parámetros que involucra el diseño de fármacos [6].

La química inorgánica medicinal, es un área multidisciplinaria que requiere de la colaboración de distintas áreas de la química, biología y medicina para cubrir con éxito todas las etapas necesarias para el desarrollo de nuevos fármacos.

Este proyecto se ha enfocado en la potencial actividad terapéutica de compuestos de coordinación con derivados de 5-nitroimidazol y los metales cobre(II) y zinc(II) contra el parásito *Toxoplasma gondii*. En el siguiente capítulo se abordará la relevancia biológica de los metales y de los ligantes seleccionados.

Para el diseño de los compuestos de coordinación se tomaron en cuenta los parámetros mencionados en la Figura 1. La caracterización estructural permitió seleccionar a los de los compuestos adecuados para el estudio de la actividad biológica, de acuerdo con el número de ligantes y la geometría del centro metálico. Los estudios por espectroscopía electrónica permitieron estudiar la posibilidad de un intercambio de ligantes en disolución. A través de los estudios de difracción de rayos X en monocristal se pudieron estudiar las interacciones presentes fuera de la primera esfera de coordinación, las cuales podrían estar involucradas en la unión de los compuestos con el ADN. Finalmente, mediante estudios de voltamperometría cíclica se encontraron los potenciales de reducción de los ligantes y de los compuestos de coordinación, incluyendo cambios en el estado de oxidación del metal.



## Capítulo 2      Antecedentes

La química bioinorgánica se encarga de estudiar la función biológica de los elementos del grupo principal como Na, K, Mg o Ca y también de los metales de transición como V, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn, los cuales juegan un papel esencial en los sistemas vivos incorporándose a las proteínas o metaloenzimas que facilitan las reacciones químicas necesarias para los ciclos biológicos [1,2]. Por ejemplo, la hemoglobina es una proteína que contiene hierro al cual se une el oxígeno molecular para ser transportado por todo el cuerpo. Los dedos de zinc son proteínas que regulan la función de los genes en los núcleos de las células; además el zinc es un componente de la insulina, una sustancia crucial para la regulación del metabolismo del azúcar [1,3]. La fotosíntesis es un proceso vital, que requiere de la participación de metales como Mn, Fe o Cu en el transporte de electrones [4].

A continuación, se aborda de manera particular la importancia del cobre y del zinc en los sistemas vivos, destacando como ejemplo una enzima relevante para cada metal.

### *Importancia biológica del cobre*

El cobre es un metal traza esencial en el cuerpo humano, debido a sus propiedades redox es un importante cofactor en metaloenzimas llamadas cuproenzimas involucradas en el metabolismo del hierro, síntesis de neurotransmisores, producción de energía y defensa contra el daño oxidativo, entre otras funciones. Un adulto tiene un contenido corporal total de 50 a 120 mg de cobre y es recomendable que la dieta diaria le proporcione una cantidad promedio de 1.4 mg para los hombres y 1.1 mg para las mujeres. La deficiencia de cobre en la dieta puede provocar problemas en el desarrollo del sistema cardiovascular, malformaciones óseas y anomalías neurológicas e inmunológicas [8,9].

La enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson están relacionadas con fallas en el transporte de cobre en el cuerpo. El gen ATP7A localizado en el cromosoma X codifica a la proteína ATP7A cuya función es absorber el cobre en el intestino delgado y transportarlo hacia la célula a través de la membrana celular. La ATP7A libera al cobre en la vena porta del hígado, donde la proteína ATP7B lo toma para unirlo a la ceruloplasmina y liberarlo hacia el torrente sanguíneo, también elimina el exceso de cobre secretándolo en la bilis. El gen ATP7B se localiza en el cromosoma 13 y se sabe que cuando sufre mutaciones las actividades de la proteína son disfuncionales ocasionando una acumulación de cobre en el hígado que da lugar a la enfermedad de Wilson, caracterizada por provocar vómitos, hinchazón de piernas, temblores y dificultad para hablar. Mientras que las mutaciones en el gen ATP7A dan lugar a la enfermedad de Menkes, que produce deterioro mental, retraso en el desarrollo y convulsiones [10,11].

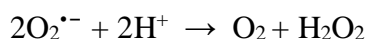
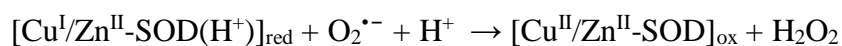
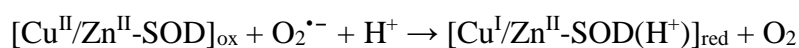


De acuerdo al principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos de Pearson, el cobre(I) prefiere ligandos blandos por lo que en las proteínas es común que el metal tenga coordinados a los residuos de los aminoácidos metionina o cisteína, a través del átomo de azufre; mientras que, el cobre(II) al ser más duro se une a ligandos donadores por nitrógeno como la histidina o a ligandos por oxígeno como el glutamato o la tirosina; adicionalmente es común encontrar moléculas de agua o grupos hidroxilo dentro de la esfera de coordinación. La geometría que adopta el átomo de cobre suele ser tetraédrica distorsionada, aunque también se puede encontrar como plana trigonal, plano cuadrado, pirámide de base cuadrada u octaedro distorsionado [12].

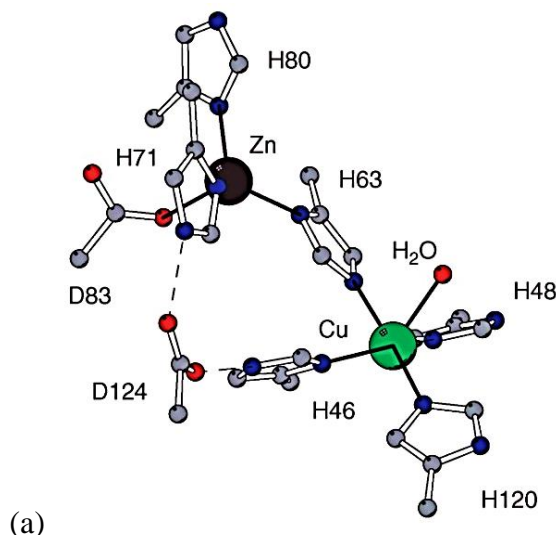
Las proteínas y las enzimas de cobre pueden ser desde mononucleares hasta tetranucleares dependiendo del tipo de reacción que realicen. En general, las proteínas de cobre tienen propiedades redox y actúan como transportadoras de electrones o de oxígeno, mientras que las enzimas de cobre tienen propiedades oxidorreductasas. Durante los procesos de catálisis y transferencia de electrones el cobre cambia entre sus dos estados de oxidación  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ . La naturaleza de los ligandos, la geometría de coordinación y la matriz proteica determinan en conjunto el potencial de reducción del sitio de cobre [12].

Las superóxido dismutasas (SOD) son una familia de metaloenzimas presentes en todos los reinos de la vida, se clasifican en los siguientes cuatro grupos de acuerdo al metal presente como cofactor: cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), hierro (Fe-SOD), manganeso (Mn-SOD) y níquel (Ni-SOD) [13]. Estas metaloenzimas actúan contra el daño oxidativo causado por el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), el cual se puede formar durante el proceso de respiración si el oxígeno toma un electrón y la hemoglobina lo libera como radical [13].

La metaloenzima Cu/Zn-SOD ubicada en el citosol tiene en su sitio activo a los átomos de cobre y de zinc conectados a través del anillo de imidazol de un histidinato, H63 (Figura 2). La esfera de coordinación del átomo de zinc consiste en cuatro residuos de histidina coordinadas en una geometría tetraédrica; mientras que, el átomo de cobre tiene una geometría de pirámide de base cuadrada con cuatro histidinas y una molécula de agua, la cual durante el proceso catalítico se intercambia con el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para su dismutación a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Durante el proceso de reducción de la SOD, el histidinato se protona para permitir que el átomo de cobre(II) se reduzca a cobre(I) y así el radical superóxido se oxide a oxígeno molecular  $\text{O}_2$ . Por otro lado, durante el proceso de oxidación de la SOD, la histidina se desprotona para coordinarse al cobre(I) y facilitar su oxidación a cobre(II) permitiendo la reducción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acuerdo con las siguientes reacciones [7,13]:







**Figura 2.** (a) Sitio activo de la Cu/Zn-SOD [8],

Es importante mencionar que durante este mecanismo el átomo de zinc contribuye en equilibrios ácido-base para la protonación y desprotonación de la histidina, lo cual permite que el cobre tenga las propiedades electrónicas adecuadas para realizar los procesos de óxido reducción.

### ***Importancia biológica del zinc***

El zinc es el segundo metal esencial más abundante en el cuerpo humano, después del hierro. Es necesario para la mejora de la función inmune, la síntesis de proteínas y ADN, la cicatrización de heridas y la señalización y división celular; también favorece el crecimiento y desarrollo durante la infancia y la adolescencia. La cantidad total de zinc en el cuerpo humano promedio es de 1.5 g en mujeres y 2.5 g en hombres, se recomienda que la dieta diaria incluya 11 mg de zinc para mujeres y 8 mg para hombres. La deficiencia de zinc suele provocar daños en el sistema epidérmico, gastrointestinal, nervioso central, inmunológico, esquelético y reproductivo. En bebés y niños la deficiencia de zinc conduce a problemas de desarrollo. Mientras que, un alto contenido de zinc puede provocar una mala absorción de cobre y daño en el sistema nervioso central [14,15].

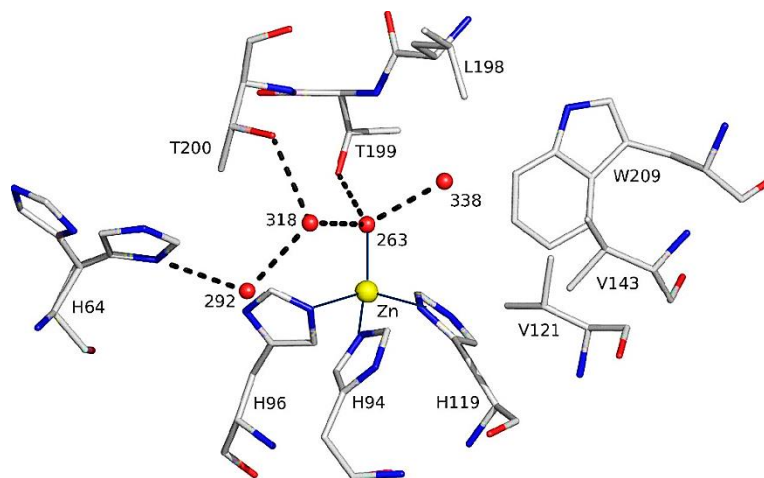
Se sabe que este metal es necesario para la actividad de más de 300 enzimas, con presencia en las seis clases de enzimas que se conocen. En las enzimas de zinc la función del metal es muy versátil, puede ser desde participar directamente en la catálisis mediante equilibrios ácido base hasta mantener la estructura y dar estabilidad a la proteína. Por lo general, en las enzimas catalíticas, el átomo de zinc adopta una geometría tetraédrica unida a tres residuos de aminoácido, comúnmente la histidina; aunque también se coordinan el aspartato o el glutamato. Adicionalmente, en la esfera de coordinación se observa una molécula de agua que



durante los ciclos catalíticos pierde un protón para formar al grupo hidroxilo. En las proteínas donde el zinc cumple funciones estructurales, es más común la unión de residuos de cisteína [16].

La anhidrasa carbónica (CA) fue la primera enzima de zinc en ser descubierta en 1939 (Figura 3). Desde entonces se han descrito cinco familias nombradas como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Las más estudiadas han sido las  $\alpha$ -CA debido a su importante papel en la regulación del pH fisiológico de los seres humanos, según su localización subcelular las  $\alpha$ -CA se dividen en cuatro grupos: citosólica, mitocondrial, secretora y asociada a membrana. Estas enzimas catalizan la hidrolisis reversible del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) al ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y un protón ( $\text{H}^+$ ). Sin esta catálisis la reacción sería muy lenta, impidiendo el transporte de  $\text{CO}_2$  y de los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  a través de la membrana celular y el subsecuente transporte hacia los vasos capilares para amortiguar al plasma sanguíneo en un pH de 7.4. La CA contribuye en la reabsorción del 85% de  $\text{HCO}_3^-$  evitando que se pierda en la orina, lo cual provocaría una acidosis metabólica potencialmente mortal [17].

El primer paso de la catálisis de las CA consiste en el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo unido al átomo de zinc hacia el grupo carbonilo del  $\text{CO}_2$  para formar un ion bicarbonato que queda unido al metal; posteriormente, se da un intercambio de ligante entre del bicarbonato y una molécula de agua. Finalmente, para regenerar a la especie catalíticamente activa ( $\text{OH}^-$ ), ocurre una transferencia de un protón del agua coordinada hacia la histidina H64 de la segunda esfera de coordinación, a través de un canal de agua que puede alcanzar hasta 8 Å de distancia debido al alto poder polarizante del zinc [16-19].



**Figura 3.** (a) Sitio activo de la Cu/Zn-SOD [8], (b) Sitio activo de la anhidrasa carbónica [18].

La naturaleza ha seleccionado a los metales por sus propiedades específicas que permiten llevar a cabo diversos procesos biológicos. Como hemos visto, en el caso de las metaloenzimas de cobre es de esperar mecanismos que involucren la transferencia de electrones debido a su capacidad de cambiar entre sus estados de oxidación  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ . Mientras que, en metaloenzimas de zinc la catálisis se realiza *via* equilibrios ácido-base.

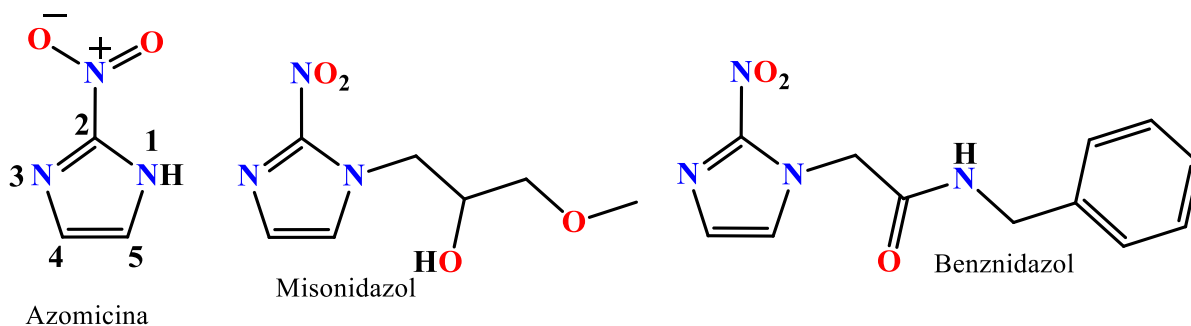


### Actividad biológica de los 5-nitroimidazoles

Las enfermedades infecciosas son definidas como aquellas enfermedades causadas por un agente biológico patógeno mediante la transmisión de una persona infectada, un animal infectado o un objeto contaminado hacia un hospedero susceptible. Los agentes infecciosos pueden ser parásitos (helmintos o protozoos), hongos, bacterias o virus. Estas enfermedades impactan gravemente a los sistemas de salud pública y a las economías de todo el mundo, principalmente a las poblaciones económicamente más vulnerables [20].

Es importante tener un adecuado control sobre estas enfermedades, principalmente diseñando fármacos que puedan actuar de manera específica sobre los patógenos. Los nitroimidazoles son una familia de moléculas que presentan actividad de amplio espectro contra diversos protozoos, helmintos y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [21-25]. Su estructura química base consiste en un heterociclo aromático de 5 miembros con dos átomos de nitrógeno anulares denominado imidazol, sustituido en las posiciones 2, 4 o 5 con un grupo nitro,  $-\text{NO}_2$ .

En la década de 1950 se aisló por primera vez el compuesto 2-nitroimidazol (Figura 4), denominado azomicina, a partir de bacterias del género *Streptomyces* [22,26]. Al poco tiempo, investigadores de los laboratorios Rhône-Poulenc en Francia descubrieron que presentaba actividad contra el parásito *Trichomonas vaginalis* [22]. Este descubrimiento marcó el inicio de la investigación en fármacos derivados de nitroimidazol con actividad antiparasitaria, principalmente en organismos anaerobios; sin embargo, en ese momento la síntesis de derivados del 2-nitroimidazol involucraba complicadas rutas sintéticas, donde la mayoría de las veces terminaban fracasando [27]. Hoy en día, existe un amplio grupo de estos derivados con gran utilidad farmacéutica (Figura 4) como el benznidazol, que presenta actividad contra el parásito *Trypanosoma cruzi* que produce la enfermedad de chagas, aunque son utilizados principalmente como agentes radiosensibilizadores, tal es el caso del misonidazol y el pimonidazol [22,28-30].

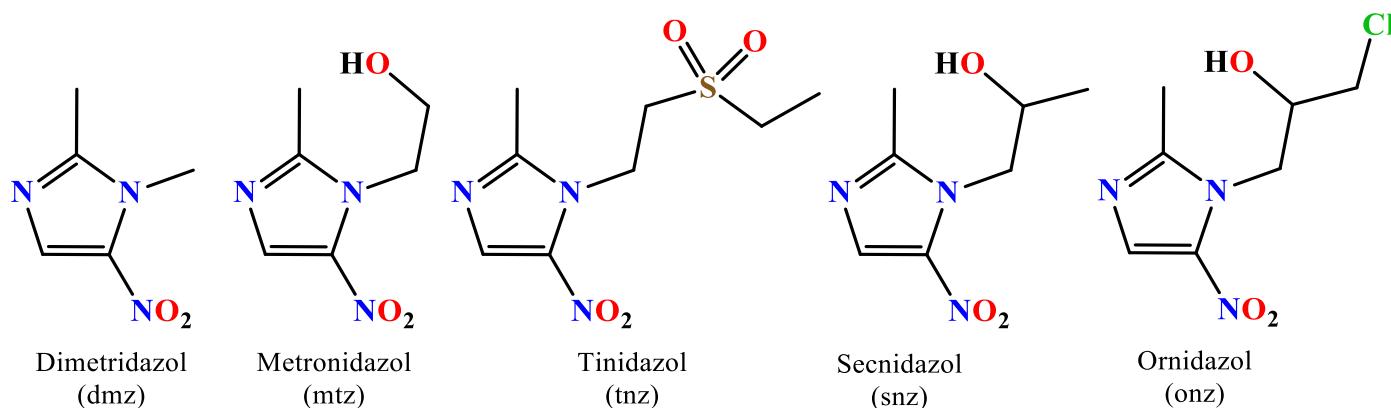


**Figura 4.** Estructura química de 2-nitroimidazoles de uso farmacéutico.



En el intento por obtener derivados de la azomicina, Cosar y Julou descubrieron en 1959 un derivado de 5-nitroimidazol, el 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol denominado metronidazol (mtz), un fármaco más efectivo y cuya actividad no se limitaba a *Trichomonas vaginalis*, ya que también actuaba contra la gingivitis ulcerosa [22,31]. Este derivado consiste en un grupo hidroxietilo en la posición 1 y un grupo metilo en la posición 2 del anillo de imidazol, además del grupo nitro en la posición 5 (Figura 5). A finales de la década de 1960 el metronidazol era el fármaco de elección contra la bacteria *Helicobacter pylori* y los protozoos *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* [32,33].

Debido a la relevancia biológica que presentó el metronidazol, durante la década de 1970 se sintetizó una segunda y tercera generación de derivados de 5-nitroimidazol que incluyen al dimetridazol (dmz), tinidazol (tnz), secnidazol (snz) y ornidazol (onz). Estos derivados continuaron presentando una actividad biológica de amplio espectro contra parásitos y bacterias, al día de hoy siguen aprobados para su uso contra la mayoría de los patógenos anaerobios [22-24,34,35]. Todos estos derivados presentan un grupo metilo en la posición 2, la diferencia se presenta en la cadena de la posición 1; el dimetridazol contiene un grupo metilo, el tinidazol presenta un grupo etil sulfona, el secnidazol tiene un grupo isopropanol, al igual que el ornidazol que además contiene un átomo de cloro terminal (Figura 5). Estos dos últimos derivados, snz y onz, presentan un centro quiral en el carbono que contiene el grupo alcohol.



**Figura 5.** Estructura química de 5-nitroimidazoles de uso farmacéutico.

En estos derivados los sustituyentes del anillo de imidazol han ido variando a lo largo del tiempo. Sin embargo, el grupo nitro ha permanecido, debido a que es fundamental para la actividad biológica. En la siguiente sección se discute la influencia de este grupo en el mecanismo de acción.



### *Mecanismo de acción de los 5-nitroimidazoles*

Desde la década de 1980 se ha estudiado ampliamente el mecanismo de acción de los derivados de 5-nitroimidazol [36]. Actualmente se sabe que estas moléculas son profármacos que requieren de una bioactivación dentro de la célula a través de tres pasos esenciales [22,23, 36-38]:

#### 1) Ingreso del 5-nitroimidazol a la célula.

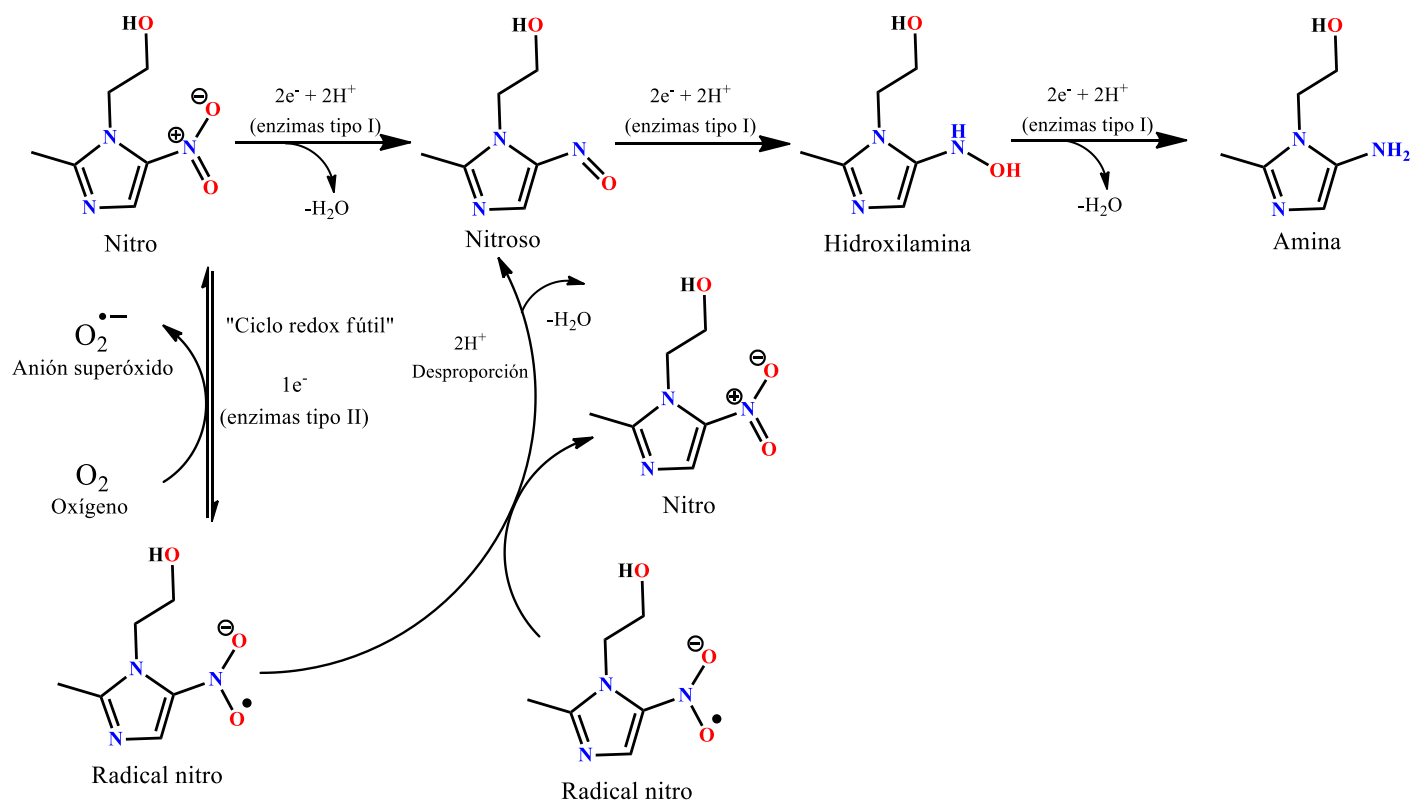
En primer lugar, los 5-nitroimidazoles atraviesan la membrana celular por difusión pasiva, la subsecuente reducción del grupo nitro, permite el ingreso de más fármaco mediante un gradiente de concentración favorable a medida que la reducción avanza [21].

#### 2) Reducción del grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) favorecida por enzimas nitroreductasas.

Las nitroreductasas (NTR) son una familia de enzimas que catalizan la bioactivación del grupo nitro por mecanismos de transferencia de uno o dos electrones (Tipo I, Tipo II). Tienen como grupos prostéticos al flavin mononucleótido (FMN) o a la flavin adenina dinucleótido (FAD) que a su vez aprovechan el poder reductor de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) o de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para reducir al grupo nitro [39-40].

El mecanismo Tipo I (Figura 6) es insensible al oxígeno, las enzimas involucradas contienen FMN y llevan a cabo una transferencia de dos electrones desde la NADH o NADPH al grupo nitro, en presencia o ausencia de oxígeno, generando como intermediarios a los grupos nitroso (-N=O) e hidroxilamina (-NHOH) para finalmente producir la amina correspondiente (-NH<sub>2</sub>). La hidroxilamina es una especie estable que se ha podido detectar mediante estudios redox [38-42].

El mecanismo Tipo II (Figura 6) es sensible al oxígeno, las enzimas que catalizan la reducción son FAD dependientes y actúan por la transferencia de un solo electrón, generando a la especie anión radical nitro (-NO<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el cual en condiciones aerobias puede reaccionar inmediatamente con el oxígeno molecular para formar al radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y regenerar al 5-nitroimidazol, dando lugar al proceso conocido como “ciclo redox fútil”. El anión radical nitro también puede llevar a cabo una reacción de desproporción en la cual se oxida para regenerar al grupo nitro y se reduce para formar al intermediario nitroso y continuar por el mecanismo Tipo I [38-42].



**Figura 6.** Mecanismos de reducción del grupo nitro Tipo I y Tipo II catalizado por nitroreductasas, se muestra como ejemplo el proceso para el metronidazol.

La familia de las ferredoxinas son un ejemplo de metaloenzimas NTR en organismos anaerobios, cuyo potencial de reducción del cúmulo  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{3+/2+}$  es de aproximadamente  $-420$  mV (NHE) [43]. Esta enzima puede reducir al grupo nitro de los derivados del 2-nitroimidazol que tienen potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ) entre  $-270$  y  $-400$  mV (NHE), como a los derivados del 5-nitroimidazol cuyos valores de  $E_{1/2}$  se encuentran alrededor de  $-400$  mV (NHE). Por otro lado, tanto las enzimas de los microorganismos aeróbicos como las de los humanos poseen potenciales de reducción más positivos, por ejemplo, la  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  de mamíferos posee un potencial de  $-320$  mV (NHE), por lo que los derivados de 5-nitroimidazol se encuentran más allá de la capacidad de reducción de las metaloenzimas en sistemas aeróbicos. Se ha propuesto que por esta razón los 5-nitroimidazoles presentan una actividad biológica más selectiva que los 2-nitroimidazoles [21,37,44-45].

### 3) Daño o ruptura de la doble hélice del ADN y la subsecuente muerte celular.

Se ha observado que los intermediarios generados por el mecanismo redox (radical nitro, nitroso, hidroxilamina) inhiben la síntesis de ADN y también generan la ruptura de la doble hélice que conduce a la muerte celular programada [41]. Algunos estudios han encontrado que los 5-nitroimidazoles suelen ser más activos contra organismos cuyo contenido de adenina (A) y timina (T) en la doble hélice del ADN es superior al 70%, tal es el caso del parásito *T. vaginalis* o la ameba *E. histolytica*. Mientras que en organismos donde el



contenido de A+T es inferior al 35% como en la bacteria *R. acidophila*, estos fármacos no presentan buena actividad [21]. Esto puede sugerir que los derivados de 5-nitroimidazol actúan de manera específica sobre estructuras de ADN con un alto contenido de A+T.

### ***Resistencia a los fármacos derivados de 5-nitroimidazol y toxicidad***

A pesar de que durante los últimos 60 años los derivados de 5-nitroimidazol han sido los fármacos de elección para una gran cantidad de enfermedades bacterianas y parasitarias, existen diversos factores que pueden intervenir en las fallas del tratamiento, entre ellos se incluye la falta de adherencia al tratamiento por parte del paciente que da lugar a una medicación irregular y con ello a las reinfecciones. Además, si bien los procesos de reducción del grupo nitro son esenciales para la actividad antibacteriana y antiparasitaria, también son los causantes de los problemas de resistencia y toxicidad. Se han reportado dos tipos de resistencia relacionadas con el mecanismo de acción, la resistencia aerobia y la resistencia anaerobia [41].

La resistencia aerobia es la observada con más frecuencia, en la cual se presenta un incremento en la concentración de oxígeno intracelular del microorganismo, que conlleva a la reoxidación del radical nitro y por medio del “ciclo redox fútil” interfiere en la generación de las especies nitroso e hidroxilamina que dañan al patógeno [41].

El segundo tipo de resistencia es la anaerobia que ha sido relacionada con mutaciones genéticas observadas en bacterias, como en la *H. pylori*, en la cual se observó una disminución intracelular en los niveles de la enzima piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa PFO, que es capaz de reducir al grupo nitro hasta la amina [24,41]. Un estudio realizado en el protozoo *T. vaginalis* mostró que las cepas resistentes al metronidazol tienen un 50% menos de PFO intracelular y que el nivel de transcripción del gen de la ferredoxina está reducido entre un 40 y 65% comparado con las cepas sensibles [46].

Además de la resistencia a los derivados de 5-nitroimidazol se ha observado que suelen generar efectos secundarios como problemas gastrointestinales que incluyen náuseas, vómitos y diarrea; así como efectos en el sistema nervioso central ya sea neuropatía, vértigo, ataxia, irritabilidad o insomnio [47].

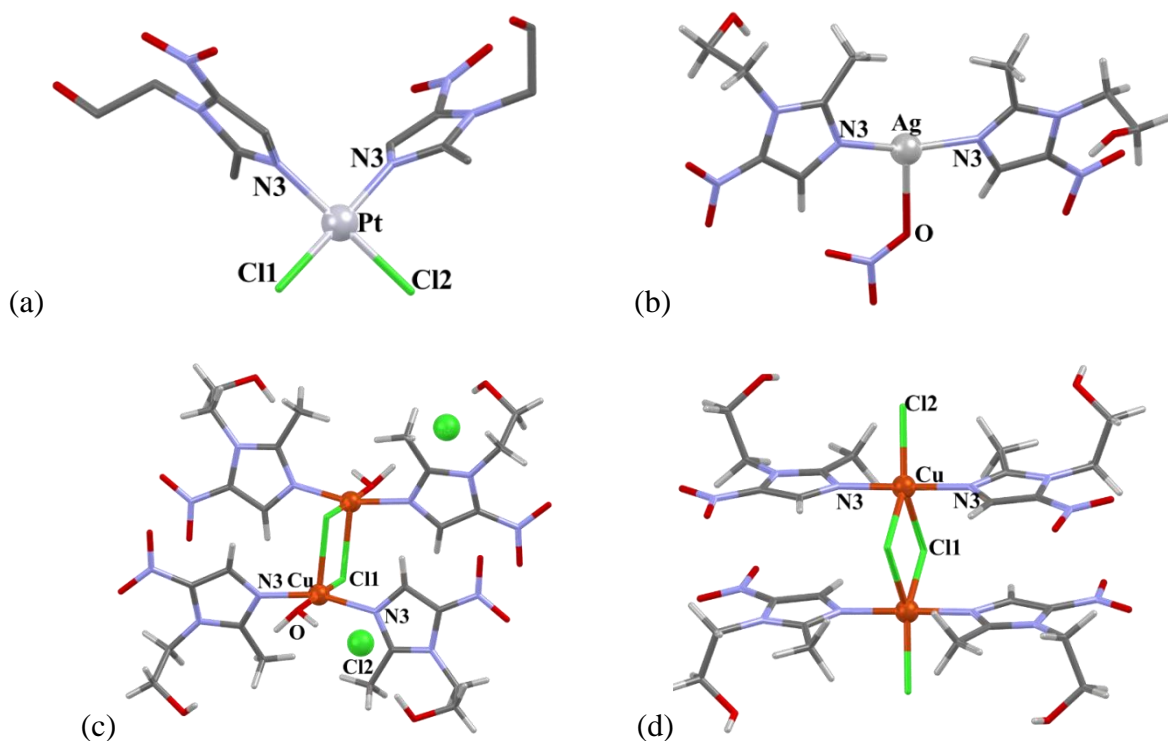
Debido a los problemas de resistencia que presentan los parásitos y bacterias hacia estos fármacos y los problemas de toxicidad que generan en los seres humanos se han buscado alternativas para potenciar su actividad biológica y reducir los efectos secundarios. El uso de estas moléculas como ligantes en la síntesis de compuestos de coordinación ha resultado efectivo para el estudio de nuevas propiedades biológicas. En la siguiente sección se discutirán algunos ejemplos destacables.



### Compuestos de coordinación con ligantes derivados del 5-nitroimidazol

Desde la década de 1980 se han sintetizado compuestos de coordinación con 5-nitroimidazoles y metales de transición como cobalto(II), níquel(II), cobre(II), zinc(II), plata(I) y platino(II) que adoptan diversos números de coordinación y geometrías [42]. A continuación, se describen los compuestos que han presentado actividad biológica.

Con el ligante metronidazol se obtuvieron los compuestos de coordinación  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2(\text{NH}_3)_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{I}_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Br}_2]$ , y  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  (Figura 7a), en los cuales el platino(II) adquiere una geometría de *cis*-plano cuadrado. En particular, el compuesto  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  presentó una mejor actividad como agente radiosensibilizador, comparado con el ligante libre [48-49].



**Figura 7.** Estructura química de compuestos de coordinación con mtz (a) *cis*- $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$ , (b)  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{NO}_3)]$ , (c)  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{H}_2\text{O})]_2\text{Cl}_2$  y (d)  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  con actividad biológica.

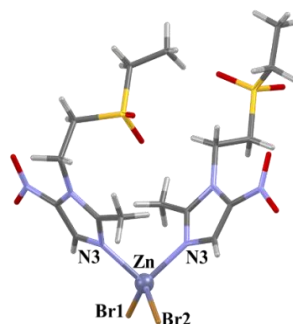
Por otro lado, en compuestos de plata(I)  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{ClO}_4)]$ ,  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{CF}_3\text{COO})]$ ,  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{SO}_3\text{CH}_3)]$  y  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{NO}_3)]$  (Figura 7b) el metal adquiere una geometría en forma de “T”. En estudios de actividad contra las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, el ligante mtz libre exhibió una concentración bactericida mínima (MBC) mayor a 1168  $\mu\text{M}$ . Mientras que en los compuestos  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{ClO}_4)]$  y  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{SO}_3\text{CH}_3)]$  la actividad contra *S. epidermidis*, aumentó mostrando valores de  $\text{MBC} = 73$  y  $37 \mu\text{M}$ , respectivamente. Contra *P. aeruginosa* los compuestos  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{NO}_3)]$  y  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2\text{CF}_3\text{COO}]$  presentaron valores de  $\text{MBC} = 17$  y  $19 \mu\text{M}$ , respectivamente [50].





También se ha obtenido el compuesto dinuclear  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  que consiste en dos átomos de cobre(II) con geometría de bipirámide trigonal (bpt), en la esfera de coordinación hay dos ligantes mtz, un átomo de cloro que se coordina de forma puente y otro terminal [51]. En el compuesto análogo  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{H}_2\text{O})]_2\text{Cl}_2$  el metal tiene geometría de pirámide de base cuadrada (pbc) donde los átomos de cloro terminales se intercambian por moléculas de agua (Figura 7c y d) [52]. En disolución los puentes de cloro se rompen para formar los compuestos mononucleares tetraédricos. Estudios de actividad antimicrobiana mostraron que el compuesto  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  es activo contra la bacteria *Bacillus cereus* y el hongo *Candida albicans*, mientras que el compuesto  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{H}_2\text{O})]_2\text{Cl}_2$  tiene actividad contra *Klebsiella pneumoniae*, con valores de concentración inhibitoria media (MIC) menores a  $31.3 \mu\text{g/mL}$ ; el ligante libre no mostró actividad [53].

En el grupo de investigación se ha sintetizado una serie de compuestos de coordinación de fórmula mínima  $[\text{M}(\text{tnz})_2\text{X}_2]$  ( $\text{M}^{2+} = \text{Co}, \text{Cu}, \text{Zn}$ ;  $\text{X}^- = \text{Cl}, \text{Br}$ ) con el ligante tinidazol, en los cuales el centro metálico adquiere una geometría tetraédrica con dos moléculas de tinidazol coordinadas a través del nitrógeno del anillo de imidazol y dos átomos de halógeno completan la esfera de coordinación, en la Figura 8 se muestra como ejemplo la estructura de  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  [54].



**Figura 8.** (a) Estructura del compuesto  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  con actividad antiparasitaria.

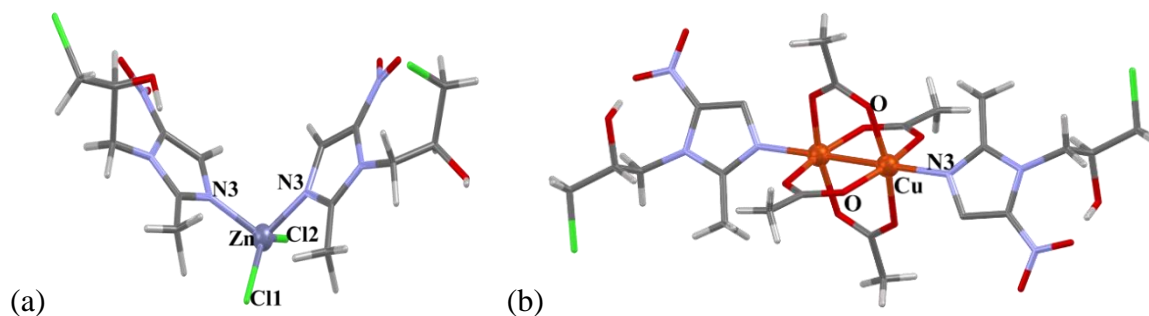
Los helmintos de la familia *Dactylogyridae* suelen infestar peces pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) de consumo humano representando un problema de salud pública en la acuicultura de México. Por esta razón, se estudió la actividad antihelmíntica *in vitro* del tnz libre y de sus los compuestos de coordinación en los helmintos *Euryhaliotrema perezponcei* de esta familia, aislados de las branquias de los peces infestados. Después de 5 h de exposición se encontró que los compuestos  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  fueron los más activos, exhibiendo una mortalidad del parásito de 80 y 100%, respectivamente. Posteriormente, se realizaron estudios *in vivo* disolviendo los compuestos de coordinación en el agua del estanque que contenía a los peces infestados. Al disolver  $25 \text{ mg/L}$  del compuesto  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  la mortalidad de los parásitos fue del 95% después de 8 h de exposición, mientras que en los peces no se encontraron problemas de toxicidad relacionadas con el compuesto. Es importante mencionar que el ligante libre no presentó ninguna actividad durante los estudios realizados [55].



En la búsqueda de un posible mecanismo de acción para estos compuestos se ha estudiado su capacidad de unión y daño al ADN mediante experimentos de UV-Vis y espectroscopía de fluorescencia mostrando que el compuesto  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  presenta interacciones electrostáticas y de unión al surco menor de la biomolécula. Adicionalmente, experimentos de voltamperometría cíclica (VC) y diferencial de pulsos (VDP) mostraron que los potenciales de reducción de cobre(II) a cobre(I) se encuentran dentro de la ventana electroquímica para ser reducidos biológicamente [56].

Finalmente, se efectuaron estudios teóricos de Dinámica Molecular y de Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAM) los cuales coinciden con los datos experimentales, corroborando la existencia de un mecanismo de acción concertado, donde la interacción de uno o dos grupos fosfato con el compuesto de coordinación es el primer sitio de reconocimiento del ADN, seguida por una intercalación parcial al surco menor, para finalizar con la reducción del cobre(II) a cobre(I), lo cual implica un cambio de geometría del metal, de tetraedro a plana trigonal [57].

Finalmente, con el ligante ornidazol se han obtenido los compuestos tetraédricos  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  (Figura 9) formados por dos moléculas de onz y dos átomos de halógeno [58,59]. Así como el compuesto dinuclear  $[\text{Cu}(\text{onz})(\mu\text{-OAc})_2]_2$  donde cada átomo de cobre(II) adquiere una geometría de pbc con una molécula de onz coordinada en la posición apical y cuatro moléculas de acetato puente en las posiciones ecuatoriales [60]. Los estudios de actividad antimicrobiana mostraron que el compuesto  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  tiene mejor actividad contra la ameba *E. histolytica* ( $\text{MIC} = 6.25 \mu\text{M}$ ) que el ligante libre ( $\text{MIC} = 12.5 \mu\text{M}$ )[59-60].



**Figura 9.** Estructura de los compuestos de coordinación con el ligante onz (a)  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ .

Como se puede observar los derivados de 5-nitroimidazol han mostrado un uso potencial como ligantes en compuestos de coordinación con actividad antimicrobiana. A lo largo del diseño de estos fármacos se ha hecho énfasis en la importancia del grupo  $-\text{NO}_2$  en la posición 5 para la actividad biológica; sin embargo, poco se ha hablado de la influencia del grupo metilo en la posición 2 del anillo de imidazol y no se ha hecho énfasis en explicar la relevancia en la actividad biológica de la cadena alquílica en la posición 1.



## Capítulo 3

### Justificación

Los fármacos derivados de 5-nitroimidazol siguen siendo de primera elección para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por parásitos y bacterias, principalmente anaerobios. Sin embargo, la capacidad de estos organismos para generar resistencia, así como el uso clínico inadecuado de estos medicamentos ha ido reduciendo su efectividad. Con la finalidad de investigar la contribución de la cadena alquílica en interacciones no covalentes, en la actividad antiparasitaria y en el daño al ADN se seleccionaron los siguientes ligantes:

- 1-metil-5-nitroimidazol (1mnz) por la ausencia del grupo metilo en la posición 2.
- 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz) debido a su similitud con el metronidazol se buscó estudiar efectos en la solubilidad de los compuestos debido al intercambio de un grupo alcohol por un átomo de cloro.
- 1-(3-cloro-2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (onz) de los tres ligantes es el único derivado que se utiliza actualmente como fármaco.

Los compuestos de coordinación han arrojado luz en la búsqueda de solucionar los problemas que generan los antibióticos actuales, a través de un efecto sinérgico entre la actividad biológica de los ligantes y las propiedades de los centros metálicos biocompatibles: cobre(II) capaz de realizar mecanismos de óxido-reducción y zinc(II) que debido a su poder polarizante lleva a cabo reacciones ácido-base.

Es importante el estudio de los posibles mecanismos de acción de estos compuestos para establecer la relevancia del centro metálico y de los parámetros estructurales y fisicoquímicos que ayudan a interactuar con las biomoléculas para generarles daño y potenciar la actividad biológica. Los nuevos compuestos de coordinación contribuirán al estudio de la relación entre la estructura química y la actividad biológica.

### Hipótesis

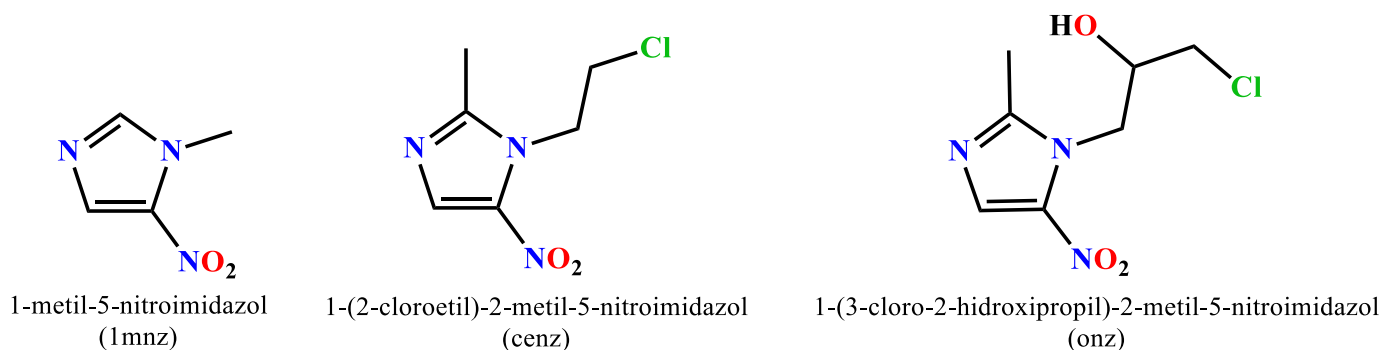
Los compuestos de coordinación con los metales cobre(II) y zinc(II) presentarán una mejor actividad biológica contra el parásito *Toxoplasma gondii* comparadas con los ligantes libres derivados de 5-nitroimidazol. Dado que, estos metales tienen diferentes propiedades químicas y estructurales, se espera que el mecanismo de acción sea diferente dependiendo del centro metálico. Así pues, los compuestos de cobre(II) favorecerán procesos de óxido-reducción; mientras que los compuestos de zinc(II) debido a sus propiedades ácido-base presentará afinidad a los grupos fosfato del ADN.



## Capítulo 4 Objetivos

### Objetivo general

Sintetizar y caracterizar compuestos de coordinación de cobre(II) y zinc(II) con los derivados de 5-nitroimidazol (Figura 10); 1-metil-5-nitroimidazol (1mnz), 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz) y 1-(3-cloro-2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (onz) a partir de las sales metálicas de cloruros y bromuros. Evaluar el efecto de su geometría, coeficientes de distribución, potenciales de reducción e interacciones con el ADN en la actividad antiparasitaria.



**Figura 10.** Estructura de los ligantes utilizados en este proyecto.

### Objetivos particulares

- ✓ Optimizar la ruta de síntesis del ligante cenz.
- ✓ Sintetizar y caracterizar compuestos de coordinación de cobre(II) y zinc(II) con los ligantes propuestos a partir de las sales metálicas de cloruros y bromuros.
- ✓ Realizar estudios de espectroscopía electrónica en disolución para corroborar que se conserva la geometría del centro metálico.
- ✓ Evaluar y comparar la actividad antiparasitaria *in vitro* mediante la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) en taquizoítos de *Toxoplasma gondii* de los compuestos de coordinación y los ligantes libres.
- ✓ Determinar la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de los compuestos de coordinación activos contra *T. gondii*.
- ✓ Obtener los coeficientes de distribución.
- ✓ Estudiar el tipo de interacción de los compuestos de coordinación con ADN mediante las técnicas espectroscópicas de UV-Vis, fluorescencia y dicroísmo circular.
- ✓ Investigar por electroforesis en gel el posible daño oxidativo al ADN de compuestos de coordinación.
- ✓ Analizar por estudios de voltamperometría cíclica la generación de especies redox.
- ✓ Establecer la importancia de los átomos metálicos en el daño al ADN, los procesos redox y la actividad antitoxoplasma.



## Capítulo 5 Desarrollo experimental

En este capítulo se describen las características de los reactivos y disolventes empleados en este proyecto, así como la información de los equipos utilizados y los detalles de la síntesis del ligante *ceenz* y de todos los compuestos de coordinación, así como las técnicas utilizadas para la obtención de los parámetros fisicoquímicos y de la actividad biológica de los compuestos estudiados.

La caracterización estructural por análisis elemental, espectroscopía de IR, RMN y difracción de rayos X en monocristal, se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la UNAM.

La caracterización por espectroscopía electrónica, las mediciones de susceptibilidad magnética y conductividad molar eléctrica se realizaron en el Laboratorio 211 del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química en la UNAM. A continuación, se describen las características de cada equipo utilizado:

**Analizador elemental:** El análisis elemental se llevó a cabo utilizando una balanza “Sartorius” modelo M2P y un analizador elemental Perkin Elmer 2400 Serie II CHNS/O, usando cistina, acetanilida y ácido sulfámico como compuestos de calibración.

**Espectrofotómetros:** La espectroscopía de infrarrojo se realizó en un espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin Elmer en un intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  para infrarrojo cercano y de 600-50  $\text{cm}^{-1}$  para infrarrojo lejano, por la técnica de reflectancia totalmente atenuada (ATR). Los espectros electrónicos por reflectancia difusa se obtuvieron en un intervalo de 40000-4000  $\text{cm}^{-1}$  y en disolución de 1600-250 nm en el espectrofotómetro Varian CARY 5000 Scan.

**Resonancia magnética nuclear:** Se utilizó un espectrómetro de RMN de 9.4 T (400 MHz), marca Varian Modelo VNMRS con Sonda Broad Band Switchable de dos canales de radiofrecuencia ( $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ ) ( $^{31}\text{P}/^{15}\text{N}$ ).

**Difractómetro de rayos X:** Se utilizó el difractómetro de rayos X de monocristal Oxford Gemini con detector de área de 135 mm Atlas  $\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0.71073$ , equipado con un sistema criogénico Cryojet.

**Balanza de susceptibilidad magnética:** El momento magnético efectivo se calculó a partir del método de Gouy a temperatura ambiente, en una balanza de susceptibilidad magnética marca Sherwood Scientific MK1.

**Conductímetro:** La conductividad eléctrica molar se determinó con un conductímetro marca HANNA, modelo HI 8633, calibrado con una disolución estándar HANNA instruments 12880  $\mu\text{S}/\text{cm}$  70030.



### ***Reactivos y disolventes***

Los siguientes reactivos fueron distribuidos por Sigma Aldrich: 1-(2- hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (mtz), 1-metil-5-nitroimidazol (1mnz), 1-(3-cloro-2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (onz), cloruro de tionilo, sulfadiazina, Hoechst 33258, ácido cacodílico, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno, SYBR<sup>TM</sup> Safe, SYTOX® Green y ácido desoxiribonucleico de timo de ternera (ct-ADN, Fibroso Tipo I). Las sales metálicas: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, CuBr<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, ZnBr<sub>2</sub>, y los disolventes: acetonitrilo, acetato de etilo, hexano, etanol, 1-octanol y dimetilsulfóxido, fueron de grado analítico distribuidos por J. T. Baker. El NaCl fue obtenido de Fisher, el TBE 10X de Invitrogen, el plásmido de ADN pBR322 (4361 bp, 0.25 mgmL<sup>-1</sup>) de Thermo Scientific, la agarosa de Ecogen y el bromuro de etidio (10 mg mL<sup>-1</sup>) de Promega.

### ***Síntesis del ligante 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz)***

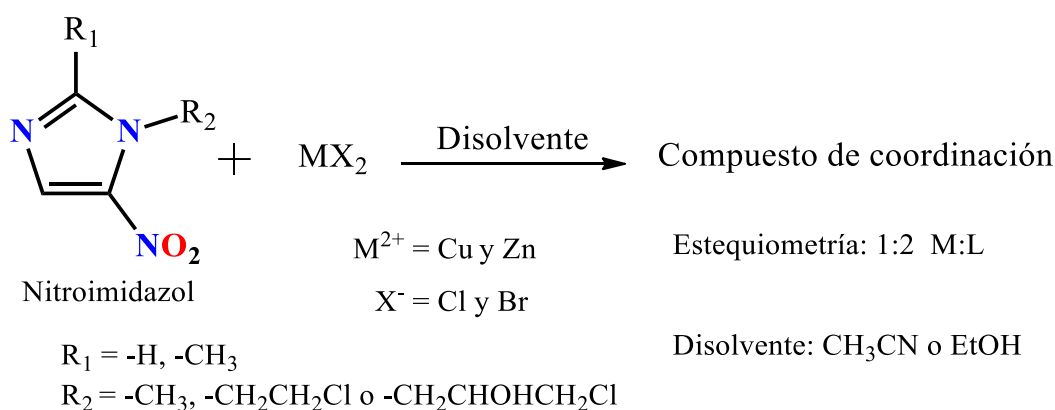
La síntesis del ligante 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz) ha sido previamente reportada a partir de metronidazol [61,62]. Sin embargo, para su obtención en este proyecto se realizaron algunas modificaciones.

En condiciones anhidras y atmósfera inerte se añadieron gota a gota 35 mmol (2.5 mL) de cloruro de tionilo a 5.85 mmol (1.0 g) de metronidazol en un baño de hielo. Al terminar la adición la reacción se mantuvo en agitación y calentamiento en un baño de arena a 65°C durante 4 h. La reacción se fue monitoreando mediante cromatografía de placa fina, usando como eluyente una mezcla 4:1 de AcOEt y hexano. Después del tiempo de reacción se añadió gota a gota una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta alcanzar un pH = 9 en un baño de hielo. Posteriormente, se realizaron extracciones (3 × 15 mL) con AcOEt, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró la disolución hasta un volumen de 5 mL de disolvente para favorecer la precipitación del producto, el cual se obtuvo por filtración y se le realizaron tres lavados con AcOEt y hexano. Se obtuvo un producto beige con punto de fusión de 75°C. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ/ppm = 8.02 (s, 1H, Iz-H); 4.62 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.96 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ/ppm = 152.28; 138.93; 133.69; 47.36; 43.64; 14.77 (ANEXO III). FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3017 v(CH<sub>3</sub>), 2930 v(CH<sub>2</sub>), 1520 v(C=N), 1458 v<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1422 v(N-C-N), 1366 v<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1259 v(C-N), 1190 v(N-O) (Fig. 11). Anal. Calc. C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Cl: C, 38.10; H, 4.28; N, 22.16%. Anal Exp. C, 38.56; H, 4.35; N, 21.82%. Rendimiento=85%.



### Síntesis de los compuestos de coordinación

Los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  se han reportado previamente [58,59], las modificaciones realizadas a la ruta de síntesis y la caracterización se incluyen en la discusión de resultados. De forma general, los compuestos de coordinación se sintetizaron de acuerdo a la reacción mostrada en la Figura 11. El ligante y la sal metálica se disolvieron por separado en 10 mL de disolvente caliente, posteriormente se mezclaron y se mantuvieron en condiciones de reflujo o en agitación, utilizando en todos los casos una estequiometría 1:2 metal:ligante. Después del tiempo de reacción se concentraron las disoluciones para favorecer la precipitación del producto. A continuación, se describe la síntesis detallada de cada uno de los compuestos obtenidos.



**Figura 11.** Síntesis general de los compuestos de coordinación.

#### Compuestos de coordinación con el ligante 1-metil-5-nitroimidazol (1mnz).

- **$[\text{Cu}(\mathbf{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  (1):** Se disolvieron 0.8 mmol (100 mg) del ligante 1mnz en 10 mL de acetonitrilo caliente y se le añadieron 0.4 mmol (67 mg) de la sal metálica  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo caliente. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo durante 3 h, después de este tiempo se concentró la disolución hasta un volumen de 3 mL para favorecer la precipitación del compuesto color azul a temperatura ambiente, aislándolo por filtración. 50 mg del compuesto obtenido se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo y se colocó en un tubo de ensayo, el cual se mantuvo en un recipiente cerrado con 10 mL de éter, por difusión fue posible obtener cristales óptimos para su estudio por difracción de rayos X. FT-IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1535  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , 1492  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1476  $\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$ , 1365  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1271  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , 1156  $\nu(\text{N}-\text{O})$ . Anal. Calc. para  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Cu}$ : C, 27.95; H, 2.93; N, 24.44%. Anal Exp. C, 27.51; H, 2.85; N, 24.97%. R% = 82.

- **$[\text{Cu}(\mathbf{1mnz})_3\text{Br}_2]$  (2):** Se disolvieron 0.8 mmol (100 mg) del ligante 1mnz en 10 mL de acetonitrilo caliente y se le añadieron 0.4 mmol (90 mg) de la sal metálica  $\text{CuBr}_2$ , previamente disuelta en 10 mL de



acetonitrilo caliente. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo durante 3 h, después de este tiempo se concentró la disolución hasta un volumen de 3 mL para favorecer la precipitación del compuesto color verde olivo a temperatura ambiente, aislándolo por filtración. 50 mg del compuesto obtenido se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo y se colocó en un tubo de ensayo, el cual se mantuvo en un recipiente cerrado con 10 mL de éter, por difusión fue posible obtener cristales óptimos para su estudio por difracción de rayos X. FT-IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1536  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , 1493  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1474  $\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$ , 1363  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1273  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , 1159  $\nu(\text{N}-\text{O})$ . Anal. Calc. para  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_4\text{Br}_2\text{Cu}$ : C, 23.83; H, 2.50; N, 20.84%. Anal Exp. C, 23.09; H, 2.18; N, 20.11%. R% = 83.

- **[Zn(1mnz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (3):** Se disolvieron 0.8 mmol (100 mg) del ligante 1mnz en 10 mL de acetonitrilo caliente y se le añadieron 0.4 mmol (55 mg) de la sal metálica  $\text{ZnCl}_2$ , previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo caliente. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo durante 3 h, después de este tiempo un compuesto blanco precipitó a temperatura ambiente y fue aislado por filtración. FT-IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1537  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , 1493  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1467  $\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$ , 1371  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1274  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , 1163  $\nu(\text{N}-\text{O})$ . Anal. Calc. para  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Zn}$ : C, 24.61; H, 2.58; N, 21.52%. Anal Exp. C, 24.55; H, 2.62; N, 21.28%. R% = 78.

- **[Zn(1mnz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (4):** Se disolvieron 0.8 mmol (100 mg) del ligante 1mnz en 10 mL de acetonitrilo caliente y se le añadieron 0.4 mmol (90 mg) de la sal metálica  $\text{ZnBr}_2$ , previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo caliente. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo durante 3 h, después de este tiempo la disolución se colocó en un vaso de precipitados y se mantuvo en evaporación lenta del disolvente a temperatura ambiente, esto permitió la formación de monocristales óptimos para la difracción de rayos X, el producto fue aislado por filtración. FT-IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1535  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , 1495  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1467  $\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$ , 1371  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1273  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , 1163  $\nu(\text{N}-\text{O})$ . Anal. Calc. para  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_4\text{Br}_2\text{Zn}$ : C, 20.04; H, 2.10; N, 17.53%. Anal Exp. C, 20.08; H, 2.12; N, 17.30%. R% = 86.

#### ***Compuestos de coordinación con el ligante 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz)***

- **[Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (5):** Se disolvieron 0.52 mmol (100 mg) del ligante cenz en 10 mL de acetonitrilo y se le añadieron 0.26 mmol (45 mg) de la sal metálica  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo por 3 h, después de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad en vacío dando lugar a la precipitación de un compuesto de coordinación verde. 50 mg del compuesto se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo y colocó en un tubo de ensayo, el cual se mantuvo en un recipiente que contenía 10 mL de éter, por difusión fue posible obtener cristales óptimos para su estudio por difracción de rayos X. FT-IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1560  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , 1481  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1425  $\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$ , 1363  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1271  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , 1186  $\nu(\text{N}-\text{O})$ . Anal. Calc. para  $\text{CuCl}_4\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_4$ : C, 28.05; H, 3.14; N, 16.36%. Anal Exp. C, 27.95; H, 3.20; N, 15.86%. R% = 90.





- **[Cu(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (6):** Se disolvieron 0.52 mmol (100 mg) del ligante cenz en 10 mL de etanol caliente y se le añadieron 0.26 mmol (60 mg) de la sal metálica CuBr<sub>2</sub>, previamente disuelta en 10 mL de etanol caliente. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo durante 3 horas, después de este tiempo se detuvo la reacción y se evaporó el disolvente a sequedad en vacío dando lugar a la precipitación de un compuesto de coordinación marrón. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1548 ν(C=N), 1470 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1435 ν(N-C-N), 1361 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1271 ν(C-N), 1194 ν(N-O). Anal. Calc. para CuBr<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 23.92; H, 2.68; N, 13.95%. Anal Exp. C, 23.73; H, 2.69; N, 13.68%. R% =94.

- **[Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (7):** Se disolvieron 0.52 mmol (100 mg) del ligante cenz en 10 mL de acetonitrilo y se le añadieron 0.26 mmol (36 mg) de la sal metálica ZnCl<sub>2</sub>, previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo durante 3 horas, después de este tiempo la disolución se colocó en un vaso de precipitados y se mantuvo en evaporación lenta del disolvente a temperatura ambiente, esto permitió la formación de monocristales óptimos para la difracción de rayos X, el producto fue aislado por filtración. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1554 ν(C=N), 1480 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1420 ν(N-C-N), 1360 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1269 ν(C-N), 1188 ν(N-O). Anal. Calc. para ZnCl<sub>4</sub>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: C, 27.96; H, 3.13; N, 16.30%. Anal Exp. C, 27.71; H, 3.47; N, 15.66%. R% = 91.

- **[Zn(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (8):** Se disolvieron 0.52 mmol (100 mg) del ligante cenz en 10 mL de acetonitrilo y se le añadieron 0.26 mmol (60 mg) de la sal metálica ZnBr<sub>2</sub>, previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantuvo en condiciones de reflujo durante 3 horas, después de este tiempo la disolución se llevó a temperatura ambiente dando lugar a la precipitación de un compuesto de coordinación blanco, aislado por filtración. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1558 ν(C=N), 1478 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1422 ν(N-C-N), 1375 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1269 ν(C-N), 1188 ν(N-O). Anal. Calc. para ZnBr<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 23.85; H, 2.67; N, 13.90%. Anal Exp. C, 23.49; H, 2.90; N, 13.35%. R% =88.

#### ***Compuestos de coordinación con el ligante 1-(3-cloro-2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (onz)***

- **[Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (9):** Se disolvieron 0.46 mmol (100 mg) del ligante onz en 10 mL de acetonitrilo caliente y se le añadieron 0.23 mmol (43 mg) de la sal metálica CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo caliente. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y calentamiento durante 1 h, directamente en la parrilla de calentamiento. Después de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad en vacío dando lugar a un producto viscoso que se precipitó al realizar lavados con 10 mL de hexano, aislando por filtración un compuesto de coordinación verde. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1556 ν(C=N), 1478 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1425 ν(N-C-N), 1367 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1272 ν(C-N), 1191 ν(N-O). Anal. Calc. para CuCl<sub>4</sub>C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>: C, 29.31; H, 3.51; N, 14.65%. Anal Exp. C, 29.45; H, 3.61; N, 14.86%. R% = 83.



- **[Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (I0):** Se disolvieron 0.46 mmol (100 mg) del ligante onz en 10 mL de acetonitrilo caliente y se le añadieron 0.23 mmol (50 mg) de la sal metálica CuBr<sub>2</sub>, previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo caliente. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y calentamiento durante 1 h, directamente en la parrilla de calentamiento. Después de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad en vacío dando lugar a un producto viscoso que se precipitó realizando un lavado con 10 mL de hexano un compuesto de coordinación verde bandera se aisló por filtración. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1556 v(C=N), 1476 v<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1425 v(N-C-N), 1365 v<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1270 v(C-N), 1189 v(N-O). Anal. Calc. para CuBr<sub>2</sub>C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 25.38; H, 3.04; N, 12.68%. Anal Exp. C, 25.53; H, 3.59; N, 12.40%. R% = 87.

- **[Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (I1):** Se disolvieron 0.46 mmol (100 mg) del ligante onz en 10 mL de acetonitrilo y se le añadieron 0.23 mmol (31 mg) de la sal metálica ZnCl<sub>2</sub>, previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h, directamente en la parrilla de calentamiento. Después de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad en vacío dando lugar a un producto viscoso que se precipitó realizando un lavado con 10 mL de hexano, un compuesto de coordinación blanco fue aislado por filtración. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1559 v(C=N), 1480 v<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1427 v(N-C-N), 1369 v<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1272 v(C-N), 1192 v(N-O). Anal. Calc. para ZnCl<sub>4</sub>C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>: C, 29.22; H, 3.50; N, 14.60%. Anal Exp. C, 28.99; H, 3.85; N, 14.52%. R% = 82.

- **[Zn(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (I2):** Se disolvieron 0.46 mmol (100 mg) del ligante onz en 10 mL de acetonitrilo y se le añadieron 0.23 mmol (60 mg) de la sal metálica ZnBr<sub>2</sub>, previamente disuelta en 10 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h, directamente en la parrilla de calentamiento. Después de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad en vacío dando lugar a producto viscoso que se precipitó realizando un lavado con 10 mL de hexano, un compuesto de coordinación blanco fue aislado por filtración. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1558 v(C=N), 1480 v<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1427 v(N-C-N), 1368 v<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1270 v(C-N), 1191 v(N-O). Anal. Calc. para ZnBr<sub>2</sub> C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 25.31; H, 3.03; N, 12.65%. Anal Exp. C, 25.52; H, 3.28; N, 12.80%. R% = 81.

### ***Pruebas de estabilidad en disolución***

Para estudiar la estabilidad en disolución de los compuestos de coordinación de cobre [Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], [Cu(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>], [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] y [Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>], se prepararon disoluciones 5x10<sup>-3</sup> M en 1-octanol y en los buffers utilizados para los ensayos de coeficiente de distribución (MOPS 10<sup>-2</sup> M, pH = 7.4), actividad antiparasitaria (buffer fosfato salino, PBS, pH = 7.4) e interacciones con ADN (cacodilato 1 mM / NaCl 20mM, pH = 7.25), y se determinaron los espectros electrónicos de 400 a 1400 nm en un intervalo de 0 a 24 h para estudiar la banda de transición electrónica d-d del metal.



Adicionalmente, se prepararon disoluciones 500  $\mu\text{M}$  en 1-octanol y en el buffer MOPS  $10^{-2}$  M,  $\text{pH} = 7.4$  de los compuestos de coordinación de cobre y de los compuestos de zinc  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  para estudiar la banda de transferencia de carga entre 200 y 400 nm. Los compuestos de coordinación con el ligante 1mnz  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$  no se utilizaron para los estudios en disolución debido a no fueron solubles en las disoluciones de los buffers utilizados.

### ***Ensayos biológicos***

Los ensayos de actividad anti-toxoplasma se realizaron en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM y los estudios de toxicidad aguda se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química de la UNAM.

#### *Modelos murinos*

Para los estudios con el parásito *Toxoplasma gondii* se trabajó con una cepa de ratones machos CD1 de 4 semanas de vida (peso aproximado 30 g) provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de acuerdo a las directrices internacionales y aprobado por el comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM (proyecto 052/2017).

En los ensayos de toxicidad aguda se utilizaron ratones machos de la cepa ICR con peso promedio de 30 g y tres semanas de vida, se manipularon como lo indica el Comité para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM (acuerdo CS/1/2/17).

#### *Parásitos*

Para los ensayos biológicos se utilizaron taquizoítos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH, los cuales se mantuvieron mediante pases intraperitoneales en ratones macho CD1, inoculando al ratón con un millón de taquizoítos contenidos en 200 mL del buffer PBS. La enfermedad se desarrolló después de tres días de la inoculación, lo cual se vio reflejado en fatiga respiratoria y en su pelo hirsuto, la eutanasia se realizó por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una incisión de la piel en condiciones estériles con la finalidad de exponer el peritoneo, se realizaron dos lavados intraperitoneales con 5 y 3 mL de una solución de PBS. Una vez extraídos los taquizoítos se centrifugaron durante 10 min a 250g, se decantó el PBS para eliminar restos de macrófagos y se conservaron los taquizoítos purificados suspendidos en 1 mL de PBS. Los parásitos se contabilizaron en una cámara de Neubauer a partir de una dilución 1:100 en PBS. Los ensayos se realizaron dentro de las 4 h posteriores al aislamiento del parásito.



### *Viabilidad celular en taquizoítos de *Toxoplasma gondii**

La viabilidad de los parásitos fue determinada por microscopía de fluorescencia a partir de la tinción con SYTOX™ Green, utilizando sulfadiazina como referencia. Un millón de taquizoítos purificados se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con disoluciones en PBS de los compuestos de coordinación, las sales metálicas de partida o los ligantes libres en concentraciones de 40, 20, 10, 5 y 2.5  $\mu\text{M}$ , en un volumen final de 1 mL. Después del tiempo de incubación las muestras se centrifugaron durante 10 min a 250g, se retiró el medio y se añadió el colorante SYTOX™ Green para teñir y contabilizar a los parásitos muertos. A partir de las gráficas de viabilidad vs concentración se realizó una regresión de Boltzmann para determinar los valores de concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### *Perfil farmacológico y toxicidad aguda*

De acuerdo con los resultados de viabilidad de los taquizoítos de *T. gondii* se determinó la dosis letal media ( $\text{LD}_{50}$ ) de los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , a partir de una disolución madre de 25 mg/mL en agua para inyectables. En el caso del compuesto  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  se añadió 1% de DMSO.

Se realizó un perfil farmacológico aplicando dosis de 1, 10 y 100 mg/Kg a cuatro ratones por dosis. Para los ensayos de toxicidad aguda se utilizaron cinco ratones para cada dosis de 10, 50, 75, 100 y 200 mg/Kg por compuesto, todos los animales se observaron por lo menos dos veces al día para determinar dolor o mortalidad. Las siguientes categorías fueron utilizadas como signos del dolor en el criterio de eutanasia, utilizando la escala Grimace: peso corporal, apariencia, constantes vitales, comportamiento espontáneo y comportamiento en respuesta a estímulos, considerando valores de corte de 10 para el punto final humanitario. Con los datos obtenidos se realizó un estudio estadístico de sobrevivencia Probit para calcular los valores de  $\text{LD}_{50}$  utilizando el programa estadístico Prism 13.0 y SPSS 29.0 [63-64]. Se realizaron observaciones clínicas detalladas de los ratones a las 24 h, 7 y 14 días después de la administración.

### *Determinación del coeficiente de distribución (Log $D_{7.4}$ )*

Se prepararon disoluciones entre 100 y 10  $\mu\text{M}$  de los ligantes libres (cenz, onz) y entre 1000 y 100  $\mu\text{M}$  de sus respectivos compuestos de coordinación de cobre(II) y zinc(II) en un buffer de MOPS pH = 7.4 como fase acuosa y en 1-octanol como fase orgánica. Para cada disolución se obtuvieron los máximos de absorción por espectroscopía electrónica (UV-Vis) en  $\lambda_{\text{max}}$  de 320 y 310 nm para las fases acuosa y orgánica, respectivamente. A partir de estos máximos se trazaron curvas de calibración (absorbancia vs concentración) para obtener los coeficientes de extinción molar en agua ( $\epsilon_a$ ) y en octanol ( $\epsilon_{oc}$ ) de acuerdo a la ley de Beer-Lambert.



Para obtener los valores de Log  $D_{7.4}$  se determinó el máximo de absorción de disoluciones 50  $\mu\text{M}$  de los ligantes libres y 500  $\mu\text{M}$  de los compuestos de coordinación en 1-octanol y en buffer. Posteriormente, para permitir el reparto, ambas fases se mezclaron y se mantuvieron en agitación durante 3 h a 25°C. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 400g y se determinó la concentración de compuesto en cada fase por espectroscopía electrónica. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### *Estudios de unión al ADN*

Los estudios de interacción de los compuestos con ADN se realizaron en el Departament de Química Inorgànica i Orgànica, Secció Química Inorgànica en la Universitat de Barcelona.

Para los estudios de unión al ADN se utilizaron las técnicas de espectroscopía electrónica (UV-Vis), fluorescencia y dicroísmo circular (DC). La concentración de ADN de timo de ternera (ct-ADN) se determinó a partir de su absorción a 260 nm y su coeficiente de absortividad molar 6600  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (concentración de nucleobases).

Se prepararon disoluciones madre 1 mM de cada compuesto de coordinación de cenx y onz en un buffer de cacodilato/NaCl (1 mM de ácido cacodílico y 20 mM de NaCl) a pH = 7.25. Las muestras finales contenían DMSO al 0.2%.

### *Espectroscopía electrónica UV-Vis*

Se realizaron titulaciones con incrementos en la concentración de ct-ADN (0 - 25  $\mu\text{M}_b$ ) a disoluciones de los compuestos de coordinación 10  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 2 mL. Cada muestra fue incubada durante 1 h a 37 °C, después de este periodo se colectaron los espectros electrónicos en un espectrofotómetro Varian CARY 100 Scan. A partir de los máximos de absorción de la transferencia de carga a 320 nm se obtuvieron los valores de la constante de unión intrínseca  $K_b$ .

### *Espectroscopía de fluorescencia*

Para los estudios por espectroscopía de fluorescencia, se prepararon muestras que contenían ct-ADN (15  $\mu\text{M}_b$ ) con los aglutinantes bromuro de etidio (EB) o Hoechst 33258 (75  $\mu\text{M}$ ) en un buffer de cacodilato/NaCl. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C para permitir la unión del respectivo colorante al ADN. Posteriormente, se añadieron cantidades crecientes de compuestos de coordinación (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) en un volumen final de 2 mL, las muestras finales se incubaron a 37 °C durante 1 h. Los espectros de fluorescencia se colectaron en un espectrofotómetro iHR320 HORIBA JOBIN YVON a temperatura



ambiente con una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 514 nm para los ensayos con EB y de 350 nm para las muestras que contenían Hoechst 33258.

### *Dicroísmo circular*

Para los estudios de dicroísmo circular (DC) se prepararon muestras de ct-ADN ( $25 \mu M_b$ ) en un buffer de cacodilato/NaCl y se incubaron durante 1 h a  $37^\circ C$  con concentraciones crecientes (0 -  $50 \mu M$ ) de compuestos de coordinación. Los espectros de DC se colectaron a temperatura ambiente en un espectropolarímetro JASCO-815 con una lámpara de arco de xenón de 450 W utilizando celdas de cuarzo con un paso óptico de 5 mm. El compartimento de la celda se purgó con  $N_2$  antes de cada uso.

### *Ensayos de electroforesis en gel*

Los ensayos de electroforesis se realizaron en gel de agarosa 1.5% disuelta en un buffer de TBE 1X, utilizando el plásmido de ADN pBR322 ( $15 \mu M_{pb}$ ). El plásmido se incubó durante 1 h a  $37^\circ C$  con concentraciones de 10 y  $50 \mu M$  de los compuestos de coordinación en presencia y ausencia de ácido ascórbico ( $50 \mu M$ ) como agente reductor y  $H_2O_2$  como generador de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un volumen final de  $20 \mu L$ . Las muestras se cargaron en el gel con  $4 \mu L$  de tampón de carga (5 mM de xilencianol y 30% glicerol) y se realizó la electroforesis usando TBE 1X a 100 V durante 1 h con un tanque horizontal Bio-Rad  $6,25 V cm^{-1}$  conectado a una fuente de poder CONSORT EV231. Posteriormente, el gel se tiñó con SYBR<sup>TM</sup> Safe durante una noche y las imágenes se adquirieron al día siguiente en un reproductor Gel Doc EZ (Bio-Rad), los resultados se trataron en el programa Image Lab 6.1. El compuesto de corte de ADN  $[Cu(phen)_2(H_2O)](NO_3)_2$  se utilizó como referencia.

### *Estudios electroquímicos por voltamperometría cíclica*

Los análisis de voltamperometría cíclica se llevaron a cabo en el Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

Para las mediciones de voltamperometría cíclica se utilizó una celda de tres electrodos. El electrodo de trabajo fue de carbón vítreo de 3 mm de diámetro, pulido a espejo con alúmina en polvo  $0.05 \mu m$ ; el electrodo auxiliar fue una malla de platino y como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de calomel saturado (SCE) que se conectó a la solución de trabajo a través de un puente salino que contenía acetonitrilo anhidro y TBAPF<sub>6</sub> 0.1 M como electrolito soporte. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente manteniendo una atmósfera de argón sobre las disoluciones de trabajo.



## Capítulo 6 Resultados de caracterización estructural

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización estructural por análisis elemental, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía electrónica en estado sólido y en disolución acuosa, momento magnético efectivo, conductividad eléctrica molar, resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ , y difracción de rayos X de monocristal, de los compuestos de coordinación sintetizados con los ligantes 1-metil-5-nitroimidazol (1mnz), 1-(2-cloroetil)-2-metil-5-nitroimidazol (cenz) y 1-(3-cloro-2-hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (onz).

### *Análisis elemental*

En la Tabla 1, se presenta la fórmula mínima propuesta a partir de los resultados del análisis elemental para cada uno de los compuestos de coordinación sintetizados. Se puede observar que para los compuestos de cobre(II) con el ligante 1mnz los valores ajustan para tres ligantes y dos átomos de halógeno por metal. Para el resto de los compuestos los valores ajustan para dos ligantes de 5-nitroimidazol y dos átomos de halógeno por centro metálico.

**Tabla 1.** Análisis elemental experimental y calculado de los compuestos de coordinación.

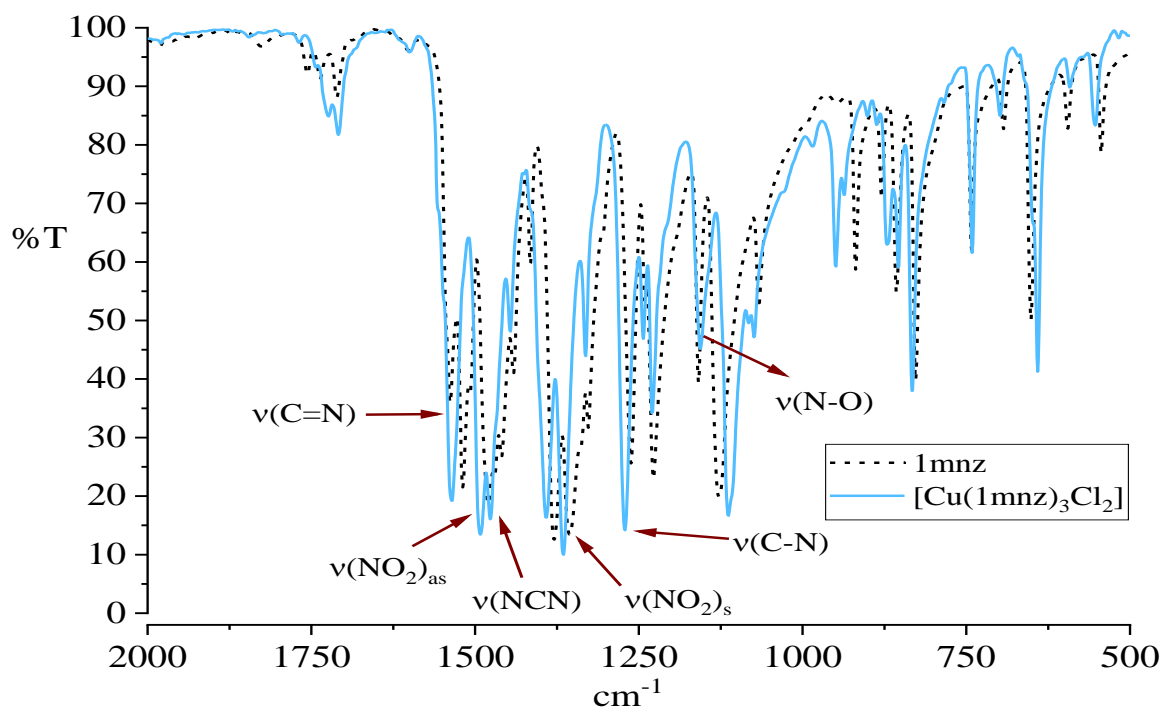
No.	Fórmula	Fórmula mínima	%C <sub>exp</sub> /%C <sub>calc</sub>	%H <sub>exp</sub> /%H <sub>calc</sub>	%N <sub>exp</sub> /%N <sub>calc</sub>
1	[Cu(1mnz) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> Cu	27.51/27.95	2.85/2.93	24.97/24.44
2	[Cu(1mnz) <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> ]	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> Cu	23.09/23.83	2.18/2.50	20.11/20.84
3	[Zn(1mnz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> Zn	24.55/24.61	2.62/2.58	21.28/21.52
4	[Zn(1mnz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> Zn	20.08/20.04	2.12/2.10	17.30/17.53
5	[Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>4</sub> Cu	27.95/28.05	3.20/3.14	15.86/16.36
6	[Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> Cu	23.73/23.92	2.69/2.68	13.68/13.95
7	[Zn(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>4</sub> Zn	27.71/27.96	3.47/3.13	15.66/16.30
8	[Zn(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> Zn	23.49/23.85	2.90/2.67	13.35/13.90
9	[Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> Cu	29.45/29.31	3.61/3.51	14.86/14.65
10	[Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> Cu	25.53/25.38	3.59/3.04	12.40/12.68
11	[Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> Zn	28.99/29.22	3.85/3.50	14.52/14.60
12	[Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> Zn	25.52/25.31	3.28/3.03	12.80/12.65



## *Espectroscopía de infrarrojo*

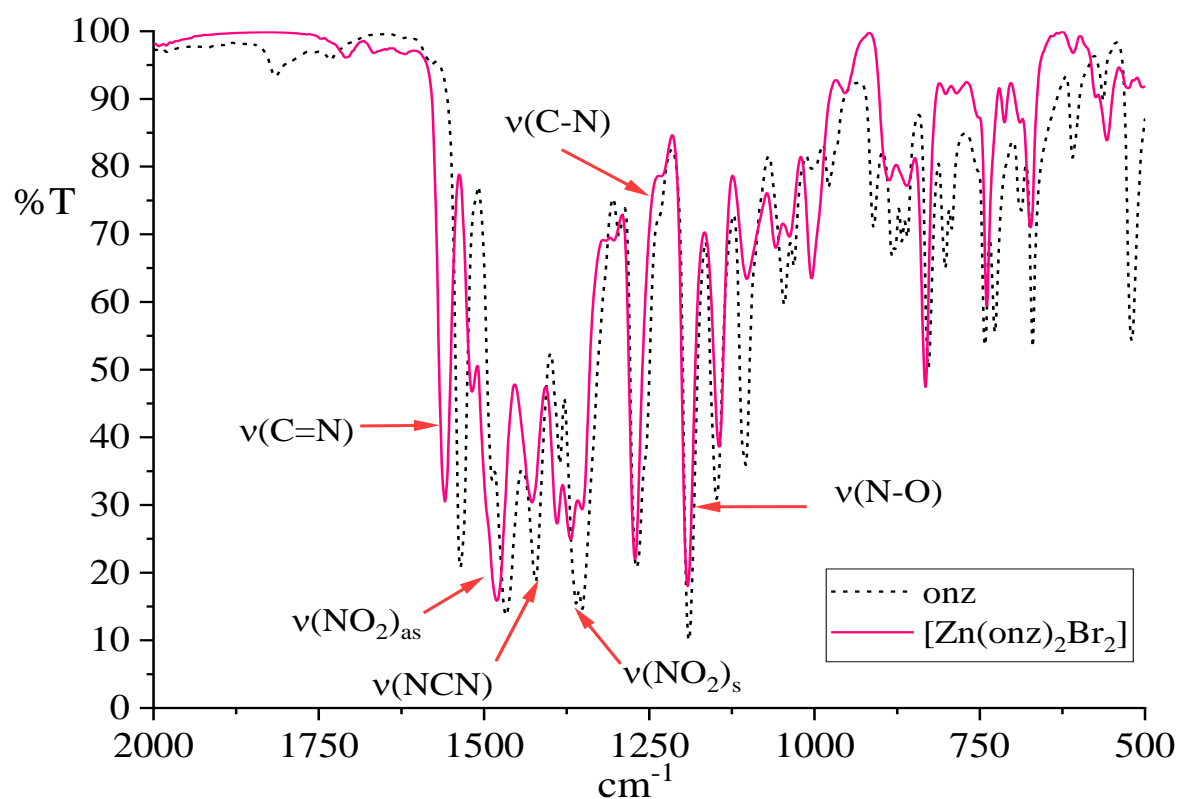
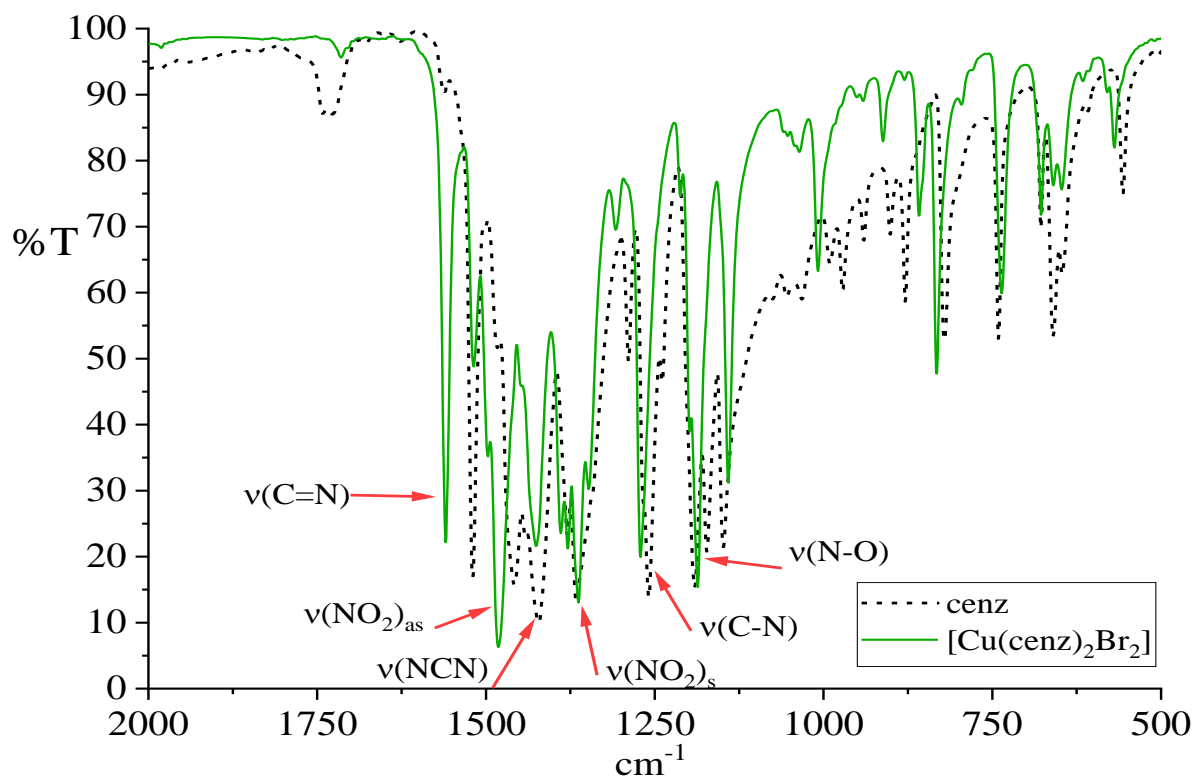
En los espectros de infrarrojo de los compuestos de coordinación el desplazamiento de la banda de vibración  $\nu(\text{C}=\text{N})$  fue indicativo de la coordinación de cada ligante al centro metálico a través del nitrógeno del anillo de imidazol. Para el ligante 1mnz esta banda se observó en  $1518\text{ cm}^{-1}$  y entre  $1535\text{-}1537\text{ cm}^{-1}$  para sus compuestos de coordinación, en el caso del ligante cenz esta banda se presentó en  $1520\text{ cm}^{-1}$  y entre  $1548\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$  para sus derivados, finalmente el ligante onz mostró esta vibración en  $1536\text{ cm}^{-1}$  y sus compuestos de coordinación entre  $1552\text{-}1559\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas de vibración  $\nu(\text{NCN})$  y  $\nu(\text{C-N})$  exhiben desplazamientos que corroboran la coordinación del ligante observados entre  $1425\text{-}1476\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu(\text{NCN})$  y entre  $1270\text{-}1274\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu(\text{C-N})$ . Por otro lado, para los ligantes 1mnz, cenz y onz la banda de vibración asimétrica del grupo nitro  $\nu(\text{NO}_2)_{\text{as}}$  se observó en  $1480$ ,  $1458$  y  $1466\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, en los compuestos de coordinación se obtuvieron desplazamientos mayores a  $12\text{ cm}^{-1}$ , lo cual se debe a interacciones no covalentes que se corroboraron a través de difracción de rayos X (pag. 42-49).

En la Figura 12 se muestran como ejemplo los espectros de infrarrojo de los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  comparados con los respectivos ligantes, indicando en cada caso la posición de las bandas más importantes. Los espectros de todos los compuestos de coordinación se presentan en el ANEXO I. En la Tabla 2 se comparan las vibraciones observadas para los ligantes libres y los compuestos de coordinación.



**Figura 12.** Espectros de infrarrojo por ATR representativos de cada ligante estudiado (línea discontinua) y sus compuestos de coordinación (línea continua). (Continúa)





**Figura 12.** (Continuación) Espectros de infrarrojo por ATR representativos de cada ligante estudiado (línea discontinua) y sus compuestos de coordinación (línea continua).



**Tabla 2.** Comparación de las vibraciones relevantes observadas en espectroscopía de IR en  $\text{cm}^{-1}$  para los ligantes y los compuestos de coordinación.

No.	Compuesto	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{as}}$	$\nu(\text{NCN})$	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{s}}$	$\nu(\text{C}-\text{N})$	$\nu(\text{N}-\text{O})$
	<b>1mnz</b>	1518	1480	1460	1355	1261	1158
<b>1</b>	<b>[Cu(1mnz)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	1535	1492	1476	1365	1271	1156
<b>2</b>	<b>[Cu(1mnz)<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	1536	1493	1474	1363	1273	1159
<b>3</b>	<b>[Zn(1mnz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	1537	1493	1467	1371	1274	1163
<b>4</b>	<b>[Zn(1mnz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	1535	1495	1467	1371	1273	1163
	<b>cenx</b>	1520	1458	1422	1366	1259	1190
<b>5</b>	<b>[Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	1560	1481	1425	1363	1271	1186
<b>6</b>	<b>[Cu(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	1548	1470	1435	1361	1271	1194
<b>7</b>	<b>[Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	1554	1480	1420	1360	1269	1188
<b>8</b>	<b>[Zn(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	1558	1478	1422	1375	1269	1188
	<b>onz</b>	1536	1466	1422	1360	1269	1190
<b>9</b>	<b>[Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	1556	1478	1425	1367	1272	1191
<b>10</b>	<b>[Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	1556	1476	1425	1365	1270	1189
<b>11</b>	<b>[Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	1559	1480	1427	1369	1272	1192
<b>12</b>	<b>[Zn(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	1558	1480	1427	1368	1270	1191

En los espectros de infrarrojo lejano de los compuestos de coordinación se pudo apreciar la banda de vibración  $\nu(\text{M}-\text{N})$  por debajo de  $250 \text{ cm}^{-1}$  debida a la coordinación del átomo de nitrógeno del anillo de imidazol al centro metálico, para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{cenx})_2\text{Br}_2]$  está banda se traslapa con la banda de vibración  $\nu(\text{Cu}-\text{Br})$  en  $212 \text{ cm}^{-1}$ . En la Tabla 3 se resume la posición de las bandas de todos los compuestos de coordinación.

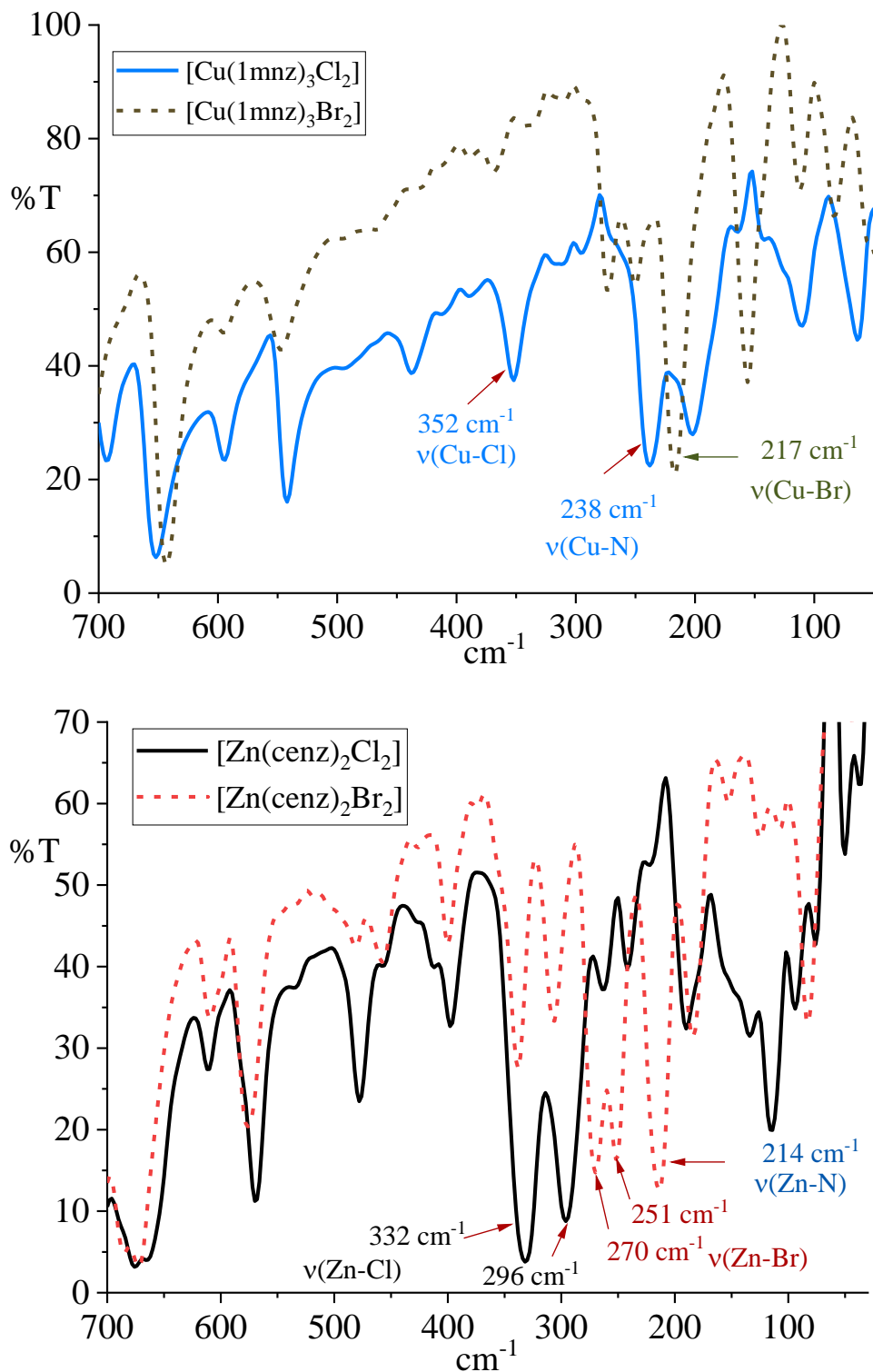
**Tabla 3.** Bandas de vibración en  $\text{cm}^{-1}$  observadas por espectroscopía de infrarrojo lejano.

Compuesto	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$	Compuesto	$\nu(\text{M}-\text{Br})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$
<b>[Cu(1mnz)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	352	237	<b>[Cu(1mnz)<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	250	237
<b>[Zn(1mnz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	334, 311	247	<b>[Zn(1mnz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	261, 245	202
<b>[Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	326, 276	231	<b>[Cu(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	212, 199	212
<b>[Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	332, 296	242	<b>[Zn(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	270, 251	213
<b>[Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	317, 273	228	<b>[Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	224, 185	250
<b>[Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	331, 294	238	<b>[Zn(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	275, 249	244

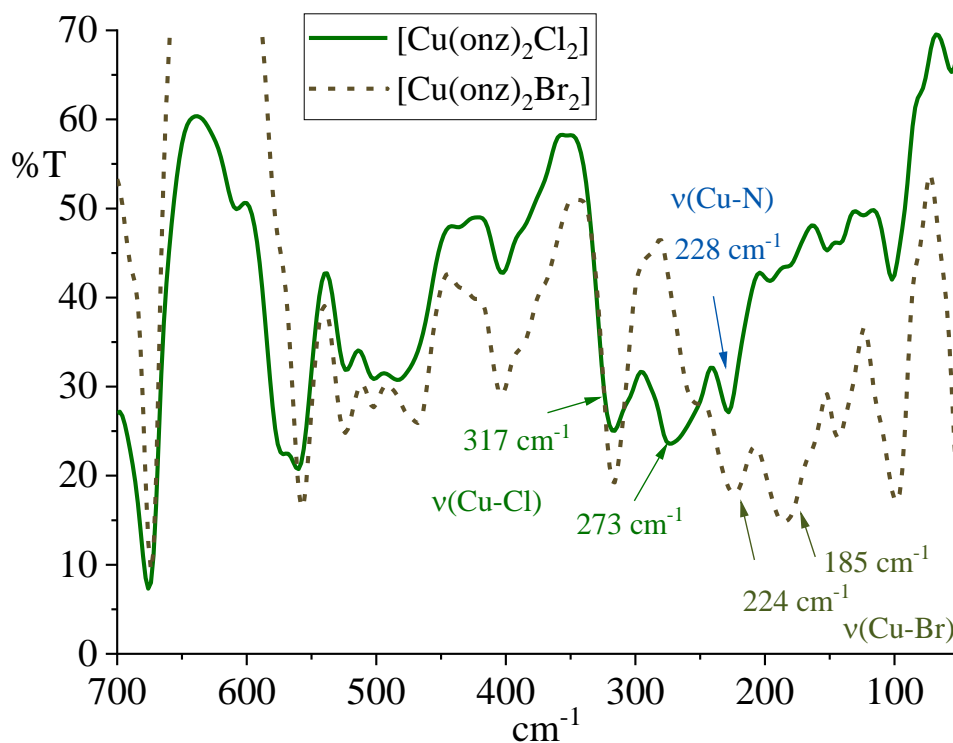
En  $352 \text{ cm}^{-1}$  y  $250 \text{ cm}^{-1}$  se observó una banda para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ , respectivamente, debida a la presencia de la vibración permitida para el enlace metal-halógeno  $\nu(\text{M}-\text{X})$  en la geometría de pirámide de base cuadrada con isomería *trans* [65,66].



Para el resto de los compuestos de coordinación se observaron los modos normales de vibración permitidos debidos a los enlaces metal-halógeno  $\nu(\text{M-X})$  en una geometría tetraédrica [65,67]. En la Figura 13 se muestran ejemplos de los espectros de infrarrojo lejano y en el ANEXO II se presentan los espectros restantes.



**Figura 13.** Espectros de infrarrojo lejano por ATR representativos de los compuestos de coordinación (Continúa).



**Figura 13.** (Continuación) Espectros de infrarrojo lejano por ATR representativos de los compuestos de coordinación.

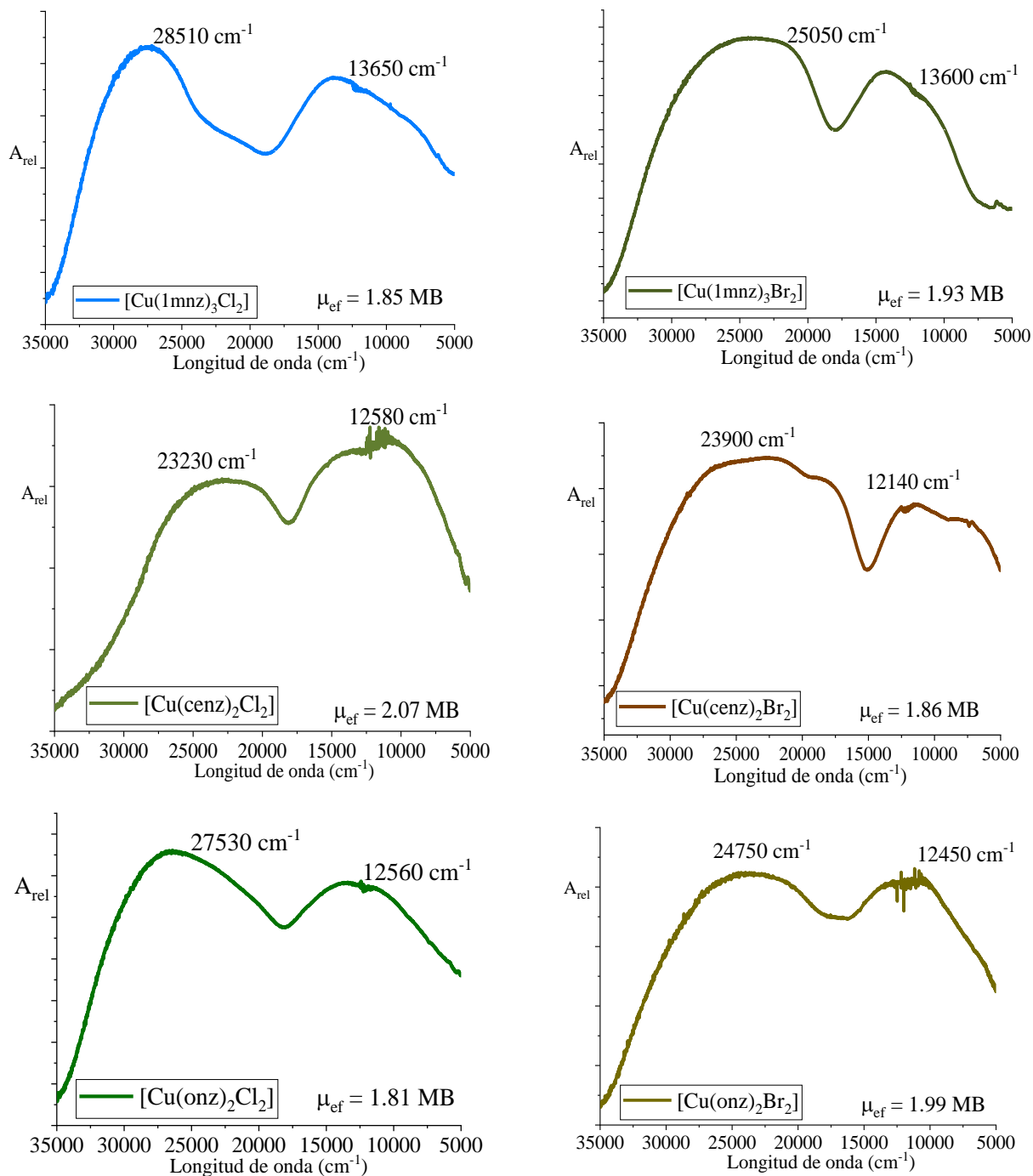
### *Espectroscopía electrónica en estado sólido y momento magnético efectivo*

Para todos los compuestos de cobre(II) se determinaron los espectros electrónicos por reflectancia difusa (Figura 14). Para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$  se observó una transición electrónica centrada en  $13650\text{ cm}^{-1}$  y  $13600\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, la cual corresponde a un átomo de cobre(II) pentacoordinado. Mediante la técnica de difracción de rayos X en monocristal que se describirá más adelante, fue posible determinar que la geometría corresponde a un intermedio entre una bipirámide trigonal y una pirámide de base cuadrada. En los espectros también se pueden observar las respectivas bandas de transferencia de carga centradas en  $28510\text{ cm}^{-1}$  y  $25050\text{ cm}^{-1}$ .

Los compuestos de coordinación con el ligante *cen**z*,  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$ , presentaron una banda centrada en  $12580\text{ cm}^{-1}$  y  $12140\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, las cuales corresponden a un átomo de cobre(II) en una geometría tetraédrica. Las bandas de transferencia de carga se observan en  $23230\text{ cm}^{-1}$  para el compuesto con cloro y en  $23900\text{ cm}^{-1}$  para el compuesto bromado. Los compuestos con el ligante *onz*,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  también presentaron la banda de transición electrónica del cobre(II) tetraédrico en  $12560\text{ cm}^{-1}$  y en  $12450\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Las bandas de transferencia de carga para cada compuesto fueron asignadas en  $27530\text{ cm}^{-1}$  y  $24750\text{ cm}^{-1}$ .



En la Figura 14 se puede observar que las bandas de los espectros electrónicos presentan hombros, esto se debe a que por lo general, los compuestos de coordinación tetra coordinados de cobre(II) presentan una distorsión en la geometría entre un tetraedro y un plano cuadrado [68]. Esta distorsión geométrica se corroboró mediante la técnica de difracción de rayos X en monocristal para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ .



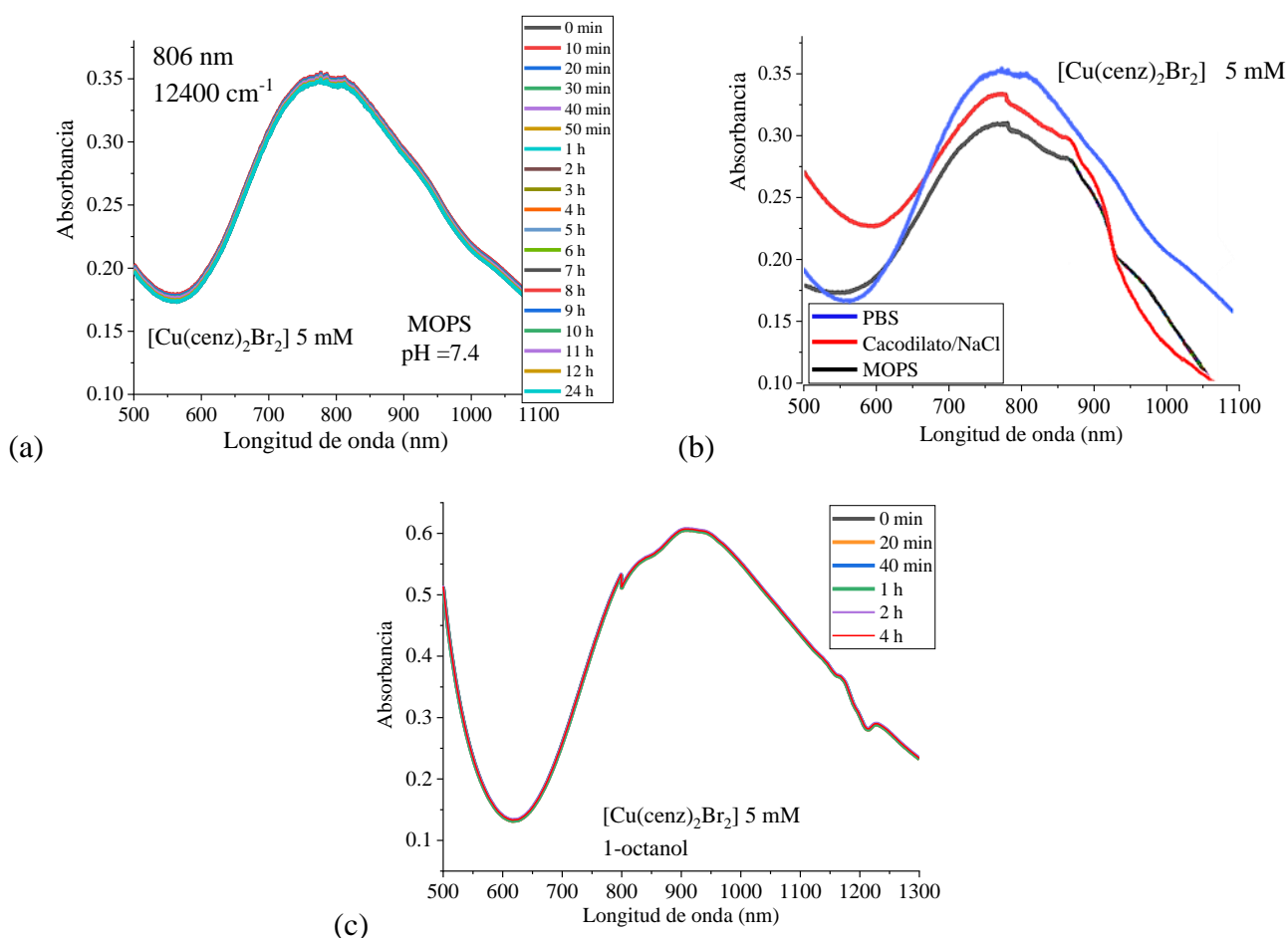
**Figura 14.** Espectros electrónicos por reflectancia difusa de los compuestos de coordinación de cobre(II).



El momento magnético efectivo obtenido para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  (1.85 MB),  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$  (1.93 MB),  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (2.07 MB),  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (1.86 MB),  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  (1.81 MB) y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  (1.99 MB), se encuentra dentro del intervalo esperado para compuestos de cobre(II), debido a la presencia de un solo electrón desapareado [69].

### Estudios de estabilidad en disolución

Se realizaron estudios de estabilidad en disolución mediante espectroscopía electrónica para los compuestos de cobre(II)  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  en los buffer utilizados para los ensayos de actividad antiparasitaria (PBS, pH = 7.4), coeficiente de distribución (MOPS  $10^{-2}$  M, pH = 7.4) y unión al ADN (ácido cacodílico 1 mM / NaCl 20 mM, pH = 7.25) en un intervalo de tiempo de 0 a 24 h y manteniendo una concentración de 5 mM de compuesto. De igual manera, se realizó un estudio por 4 h en el disolvente 1-octanol. En la Figura 15 se muestra como ejemplo el estudio para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  y la comparación de las bandas en los diferentes buffer.



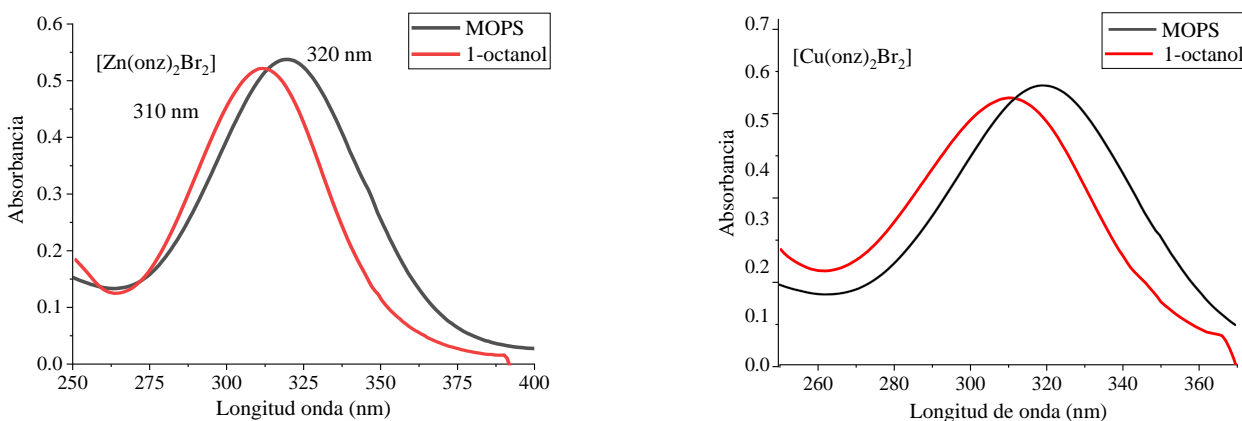
**Figura 15.** Espectros electrónicos en disolución obtenidos para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  5 mM, (a) en MOPS  $10^{-2}$  M pH = 7.4 durante 24 h, (b) comparación en de las bandas obtenidas en PBS, cacodilato y MOPS, (c) espectros obtenidos en 1-octanol durante 4 h.



Los espectros electrónicos obtenidos en los buffer mostraron una banda centrada entre 800-810 nm ( $12500-12340\text{ cm}^{-1}$ ) debida a la transición electrónica d-d del átomo de cobre(II), la cual se mantuvo constante en todo el intervalo de tiempo estudiado (Figura 15). El comportamiento observado nos indica que la geometría tetraédrica observada en estado sólido se conserva en disolución durante 24 h, por lo que estos compuestos son óptimos para su estudio en disolución para cada técnica.

Adicionalmente, se realizó el estudio en una disolución de 1-octanol; en este caso, las señales se encontraron desplazadas entre 880-890 nm ( $11235-11363\text{ cm}^{-1}$ ) este comportamiento se debe a efectos solvatocrómicos por la presencia del disolvente. Sin embargo, la geometría del metal sigue siendo tetraédrica.

Debido a que el átomo de zinc(II) no presenta transiciones electrónicas d-d, los estudios de determinación de coeficiente de distribución y unión al ADN por UV-Vis se realizaron estudiando la banda de transferencia de carga, al igual que para los compuestos de cobre(II) con la finalidad de hacer una comparación adecuada (Figura 16). Para los compuestos de cobre(II)  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  y los compuestos de zinc(II)  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  la transferencia de carga se obtuvo centrada en 320 nm para las disoluciones en MOPS y en 310 nm para las disoluciones en 1-octanol



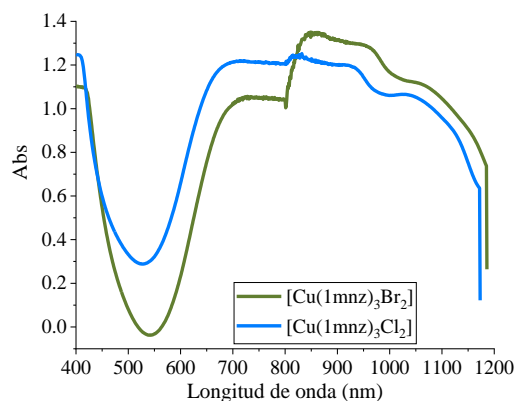
**Figura 16.** Espectros electrónicos en disolución de MOPS  $10^{-2}\text{ M}$  pH = 7.4 y en 1-octanol de los compuestos ( $500\text{ }\mu\text{M}$ ) a)  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  y b)  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ .

Los compuestos de cobre(II) y zinc(II) con los ligantes cenz y onz fueron seleccionados para continuar con el estudio sobre la actividad antiparasitaria, los coeficientes de distribución, unión al ADN y voltamperometría cíclica; debido a la estabilidad que presentaron en disolución de los diferentes buffers y en 1-octanol.

Por otro lado, los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$  no mostraron ser estables en disolución, ya que durante el estudio se observó más de una banda, posiblemente por cambios en el número de coordinación del centro metálico, de un compuesto pentacoordinado a un compuesto tetraédrico (Figura 17). Además,



después de un periodo de tiempo las disoluciones preparadas comenzaban a mostrar la presencia de precipitado. Finalmente, los compuestos de  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$  no fueron solubles en agua, debido a este comportamiento no se continuó con el análisis biológico y fisicoquímico de los derivados del ligante 1mnz.



**Figura 17.** Espectros electrónicos en disolución acuosa (5 mM) para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ .

### *Resonancia magnética nuclear*

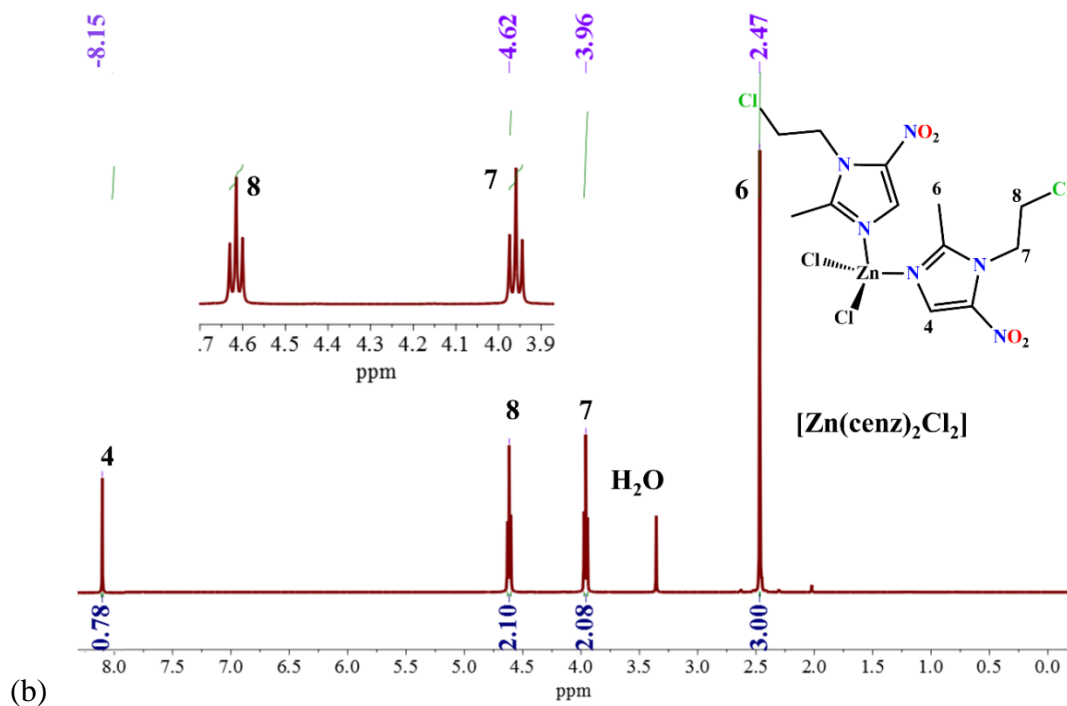
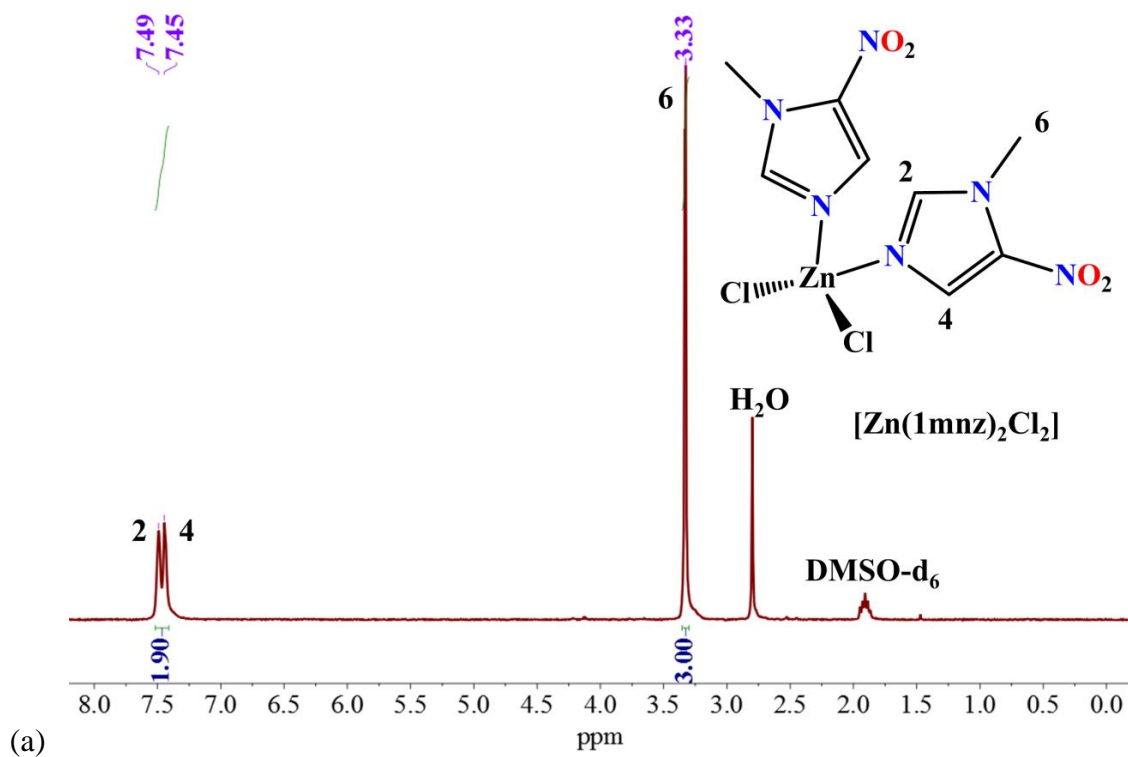
Se realizaron estudios de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) en  $\text{DMSO-d}_6$  a 400 MHz de los tres ligantes libres 1mnz, cenz y onz, y de sus respectivos compuestos de coordinación con zinc(II)  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ .

En el espectro del ligante 1mnz se observó un singulete en 3.30 ppm que corresponde al grupo metilo (H6), en 7.42 ppm se observó un singulete que integra para dos protones que corresponden a los dos hidrógenos aromáticos H2 y H4 (ANEXO III). En la Figura 18 se puede observar que para el compuesto de coordinación  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$  es posible distinguir las dos señales para cada protón, lo mismo sucede con el compuesto  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$  (ANEXO III).

Para el ligante cenz (ANEXO III) se observaron cuatro señales; en 2.47 ppm se encuentra un singulete que integra para tres protones correspondiente al grupo metilo del imidazol (H6), en 3.96 y 4.62 ppm se observan los dos tripletes del grupo etilo H8 y H7, respectivamente, con constantes de acoplamiento a tres enlaces de distancia  $^3J = 3.96$  Hz y en 8.02 ppm se observa la señal de singulete del protón del imidazol (H4).

En ambos casos, el desplazamiento del protón aromático H4 fue indicativo de la coordinación de los ligantes 1mnz y cenz al centro metálico, en la Tabla 4 se comparan los desplazamientos observados en los compuestos de coordinación y en la Figura 18 se muestran como ejemplo los espectros de los compuestos  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  los espectros de RMN de los ligantes libres y de los compuestos de coordinación con bromo se presentan en el ANEXO III.





**Figura 18.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de para los compuestos de coordinación (a)  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$  y (b)  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  en  $\text{DMSO-d}_6$  a 400 MHz.



**Tabla 4.** Desplazamiento químico encontrado en  $^1\text{H}$ -RNM en DMSO- $d_6$  a 400 MHz para el protón H4, de los ligantes libres y sus compuestos de coordinación de zinc(II).

Compuesto	H4 (ppm)	Compuesto	H4 (ppm)	Compuesto	H4 (ppm)
<b>1mnz</b>	7.42	<b>cenz</b>	8.02	<b>onz</b>	8.03
<b>[Zn(1mnz)<math>_2</math>Cl<math>_2</math>]</b>	7.49	<b>[Zn(cenz)<math>_2</math>Cl<math>_2</math>]</b>	8.15	<b>[Zn(onz)<math>_2</math>Cl<math>_2</math>]</b>	7.97
<b>[Zn(1mnz)<math>_2</math>Br<math>_2</math>]</b>	7.50	<b>[Zn(cenz)<math>_2</math>Br<math>_2</math>]</b>	8.17	<b>[Zn(onz)<math>_2</math>Br<math>_2</math>]</b>	7.98

Para el ligante onz las asignaciones de los protones (Figura 19) se realizaron con ayuda de un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN y un espectro en dos dimensiones de HSQC presentados en el ANEXO III. En 2.453 ppm se puede observar un singulete que integra para tres protones (H6) correspondientes al grupo metilo en el imidazol.

Los dos protones de la posición 9 se pudieron distinguir y fueron etiquetados como H9A y H9B. El protón H9A se observan como un doble de dobles; el doblete que corresponde a su acoplamiento con H9B se encuentra centrado en 4.205 y 4.182 ppm y su constante de acoplamiento corresponde a  $^2J = 9.2$  Hz, cada una de estas señales se desdobla debido a la interacción con el protón H8 con una constante a 3 enlaces de distancia de  $^3J = 3.2$  Hz. El protón H9B también es un doble de dobles centrado en 4.554 y 4.530 ppm con un valor de  $^2J = 9.6$  Hz debido a su acoplamiento con H9A, mientras que la constante de acoplamiento con el protón H8 es de  $^3J = 1.6$  Hz.

Por otro lado, los dos protones de la posición 7 también fueron distinguibles y etiquetados como H7A y H7B. El protón H7A es un doblete centrado en 3.6805 y 3.6615 ppm y para el protón H7B se centra en 3.7285 y 3.7095 ppm el valor de la constante de acoplamiento debido a la interacción entre ambos protones corresponde a  $^2J = 7.6$  Hz. Cada una de estas señales presenta un desdoblamiento debido al acoplamiento de H7A y H7B con H8, la constante de acoplamiento a tres enlaces de distancia es  $^3J = 3.6$  Hz.

La señal del protón del grupo alcohol  $-\text{OH}$  se observa como un doblete centrado en 5.659 ppm con un valor de  $^3J = 3.6$  Hz por su acoplamiento con H8. En 8.026 se encuentra el singulete del protón H4 del anillo del imidazol, el cual fue indicativo de la coordinación del ligante onz al centro metálico de zinc(II) desplazándose a menor frecuencia para los compuestos de coordinación (Tabla 4, ANEXO III).

En la zona de 4.005 y 3.968 ppm se ubica un multiplete que integra para uno correspondiente al protón H8, en este caso no es posible distinguir todos sus acoplamientos con los protones H9<sub>A</sub>, H9<sub>B</sub>, H7<sub>A</sub>, H7<sub>B</sub> y con el grupo  $-\text{OH}$ , debido a que las señales se encuentran traslapadas.

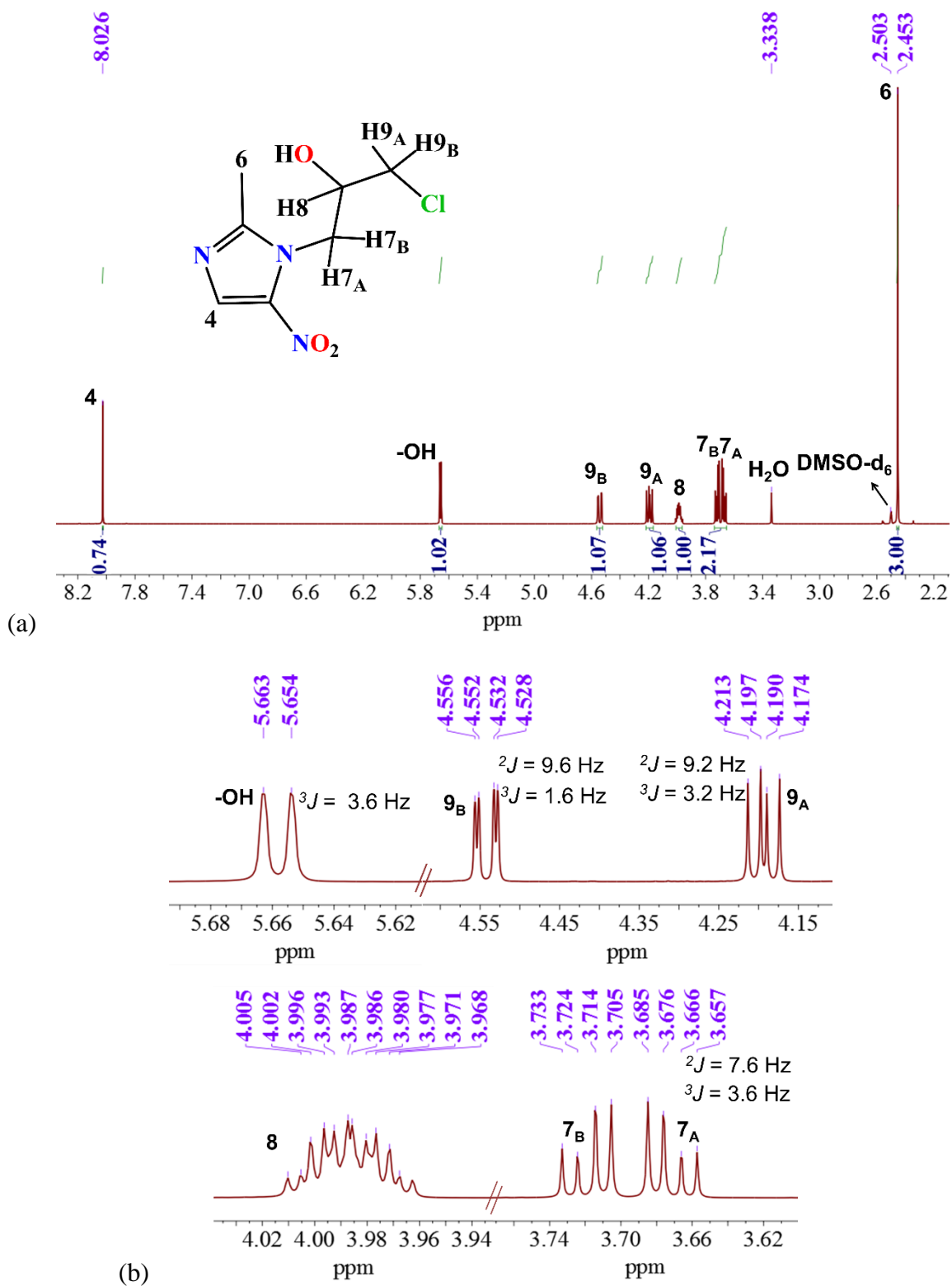


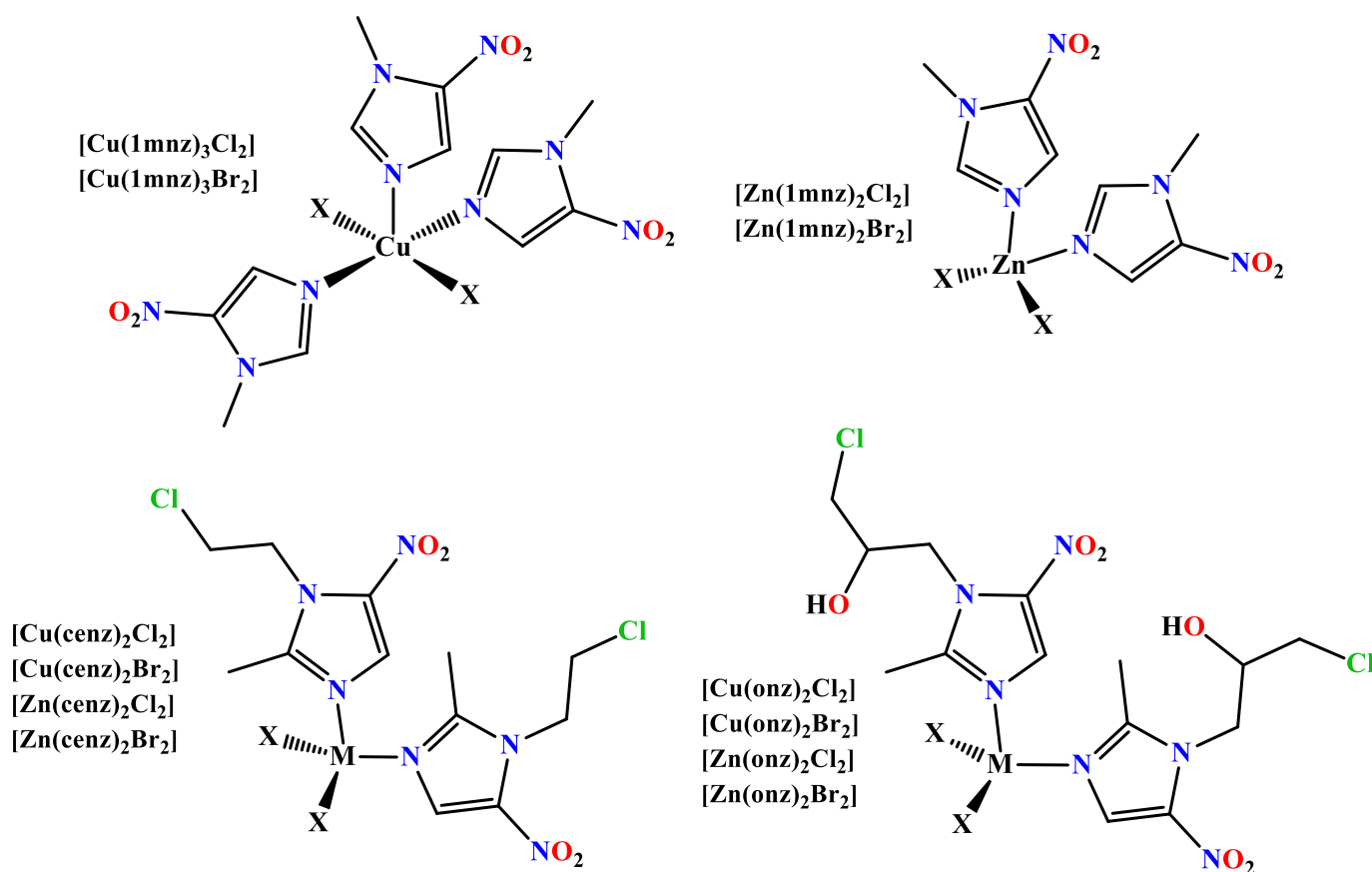
Figura 19. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ligante onz en  $\text{DMSO-d}_6$  a 400 MHz (a) completo y (b) acercamientos.



### Estructuras químicas de los compuestos de coordinación obtenidos

De acuerdo con los resultados de caracterización estructural por análisis elemental, espectroscopía de IR, espectroscopía electrónica en estado sólido y disolución, susceptibilidad magnética y  $^1\text{H-RMN}$  se propone que los compuestos de coordinación  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  presentan una geometría tetraédrica para cada centro metálico. En todos los casos, la esfera de coordinación consiste en dos átomos de halógeno (Cl o Br) y dos moléculas de ligante 5-nitroimidazol coordinados a través del átomo de nitrógeno aromático como se muestra en la Figura 20.

Para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$  la esfera de coordinación consiste en dos átomos de halógeno (Cl o Br) y tres moléculas de ligante 1mniz coordinadas a través del átomo de nitrógeno del imidazol.



**Figura 20.** Estructuras propuestas para los compuestos de coordinación obtenidos.

Las estructuras de los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  se corroboraron a partir de la técnica de difracción de rayos X en monocristal discutida en la siguiente sección.

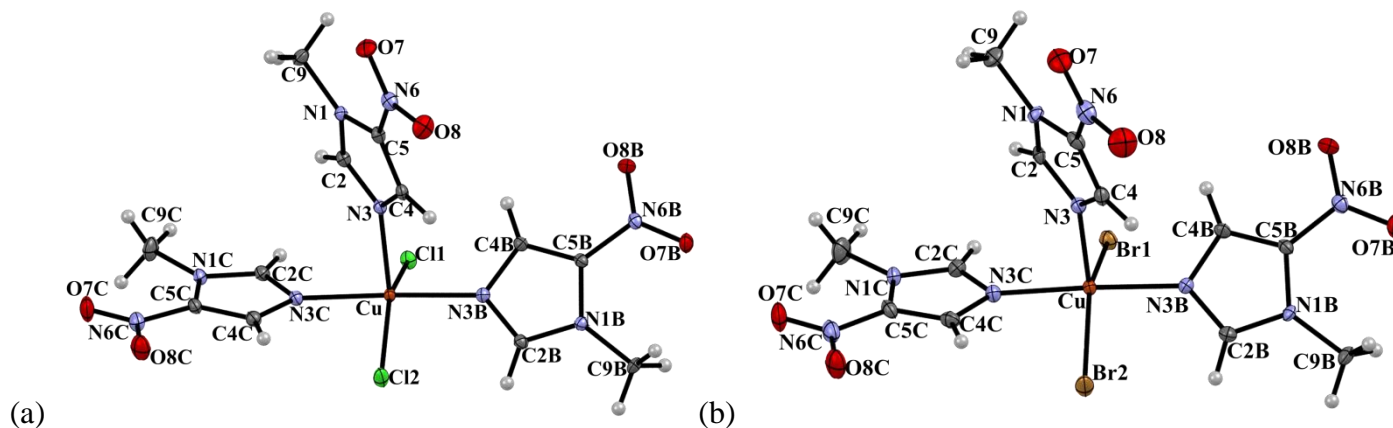


## Difracción de rayos X de monocristal

En esta sección se describe el análisis de las estructuras cristalinas obtenidas mediante difracción de rayos X en monocristal para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ , los datos cristalográficos completos se presentan en el ANEXO IV. Para el análisis de las interacciones  $lp \cdots \pi$  y  $lp \cdots \text{hueco } \pi$  que estabilizan la red cristalina, se consideró que las distancias estuvieran por debajo de la suma de radios de van der Waals de los siguientes átomos involucrados: carbono (1.70 Å), nitrógeno (1.55 Å), oxígeno (1.52 Å), cloro (1.75 Å) y bromo (1.85 Å) [70], los puentes de hidrógeno se asignaron de acuerdo a las distancias y ángulos reportados en la literatura [71].

### Compuestos pentacoordinados $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$ y $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ :

Los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$  son isoestructurales, ambos se obtuvieron en un sistema cristalino triclinico con grupo espacial  $P\bar{1}$  y dos moléculas en la celda unitaria. En cada compuesto se tiene un átomo de cobre(II) pentacoordinado, donde la esfera de coordinación consiste en dos átomos de halógeno (Cl o Br) y tres moléculas de 1mnz unidas a través del átomo de nitrógeno del anillo de imidazol, dos de ellas se encuentran en posición *trans* (Figura 21).



**Figura 21.** Representación ORTEP al 50% de probabilidad para las estructuras cristalinas de los compuestos (a)  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y (b)  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ .

Para determinar la geometría presente en compuestos pentacoordinados se realiza el cálculo del parámetro  $\tau$  a partir de la ecuación 1; donde  $\beta$  y  $\alpha$  corresponden a los dos ángulos más grandes en torno al centro metálico (Tabla 5):

$$\tau = \frac{(\beta - \alpha)}{60} \quad \text{Ecuación 1}$$



Cuando este parámetro es cercano a 1 es indicativo de una geometría de bipirámide trigonal (bpt), mientras que un valor cercano a 0 se debe a una geometría de pirámide de base cuadrada (pbc) [72]. Para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  se obtuvo un valor de  $\tau = 0.51$  ( $\beta = 177.3$ ,  $\alpha = 147.0$ ) y para  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$   $\tau = 0.47$  ( $\beta = 177.5$ ,  $\alpha = 149.03$ ), lo cual indica la presencia de una geometría intermedia entre bpt y pbc.

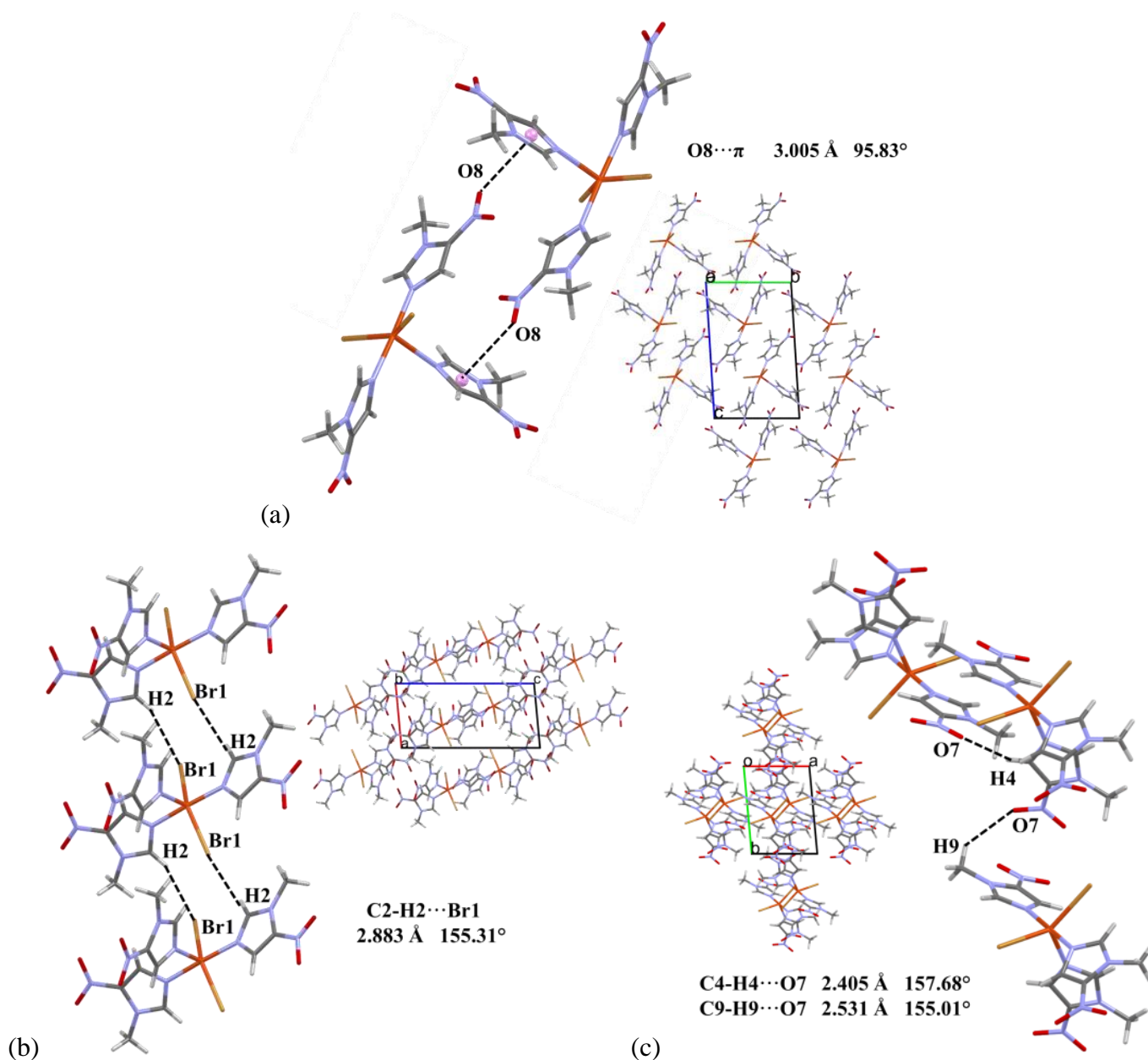
En la Tabla 5 se enlistan las distancias de enlace en torno al metal para ambos compuestos, se observa que los átomos de nitrógeno que se encuentran en posiciones *trans* son los más cercanos al cobre(II) (2.008(2) Å) mientras que el tercer anillo está más alejado (2.153(3) Å). En cuanto a los halógenos presentes, como es de esperarse los átomos de cloro (2.3320(5) Å) presentan menor distancia de enlace que los átomos de bromo (2.4956(6) Å).

**Tabla 5.** Distancias de enlace (Å) y ángulos (°) alrededor del átomo de cobre(II) para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ , la desviación estándar se indica entre paréntesis.

Distancias	$[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$	$[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$	Ángulos	$[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Cl}_2]$	$[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$
<b>Cu1-N3</b>	2.181(2)	2.153(3)	<b>N3-Cu1-N3B</b>	90.4(1)	90.62(6)
<b>Cu1-N3B</b>	2.003(1)	2.005(2)	<b>N3-Cu1-N3C</b>	92.1(1)	90.32(6)
<b>Cu1-N3C</b>	2.008(1)	2.008(2)	<b>N3-Cu1-X1</b>	107.33(7)	108.17(4)
<b>Cu1-X1</b>	2.3018(5)	2.4515(5)	<b>N3-Cu1-X2</b>	105.53(7)	102.73(4)
<b>Cu1-X2</b>	2.3320(5)	2.4956(6)	<b>N3B-Cu1-N3C</b>	177.3(1)	177.50(6)
			<b>X1-Cu1-X2</b>	147.00(2)	149.03(2)

(X = Cl o Br)

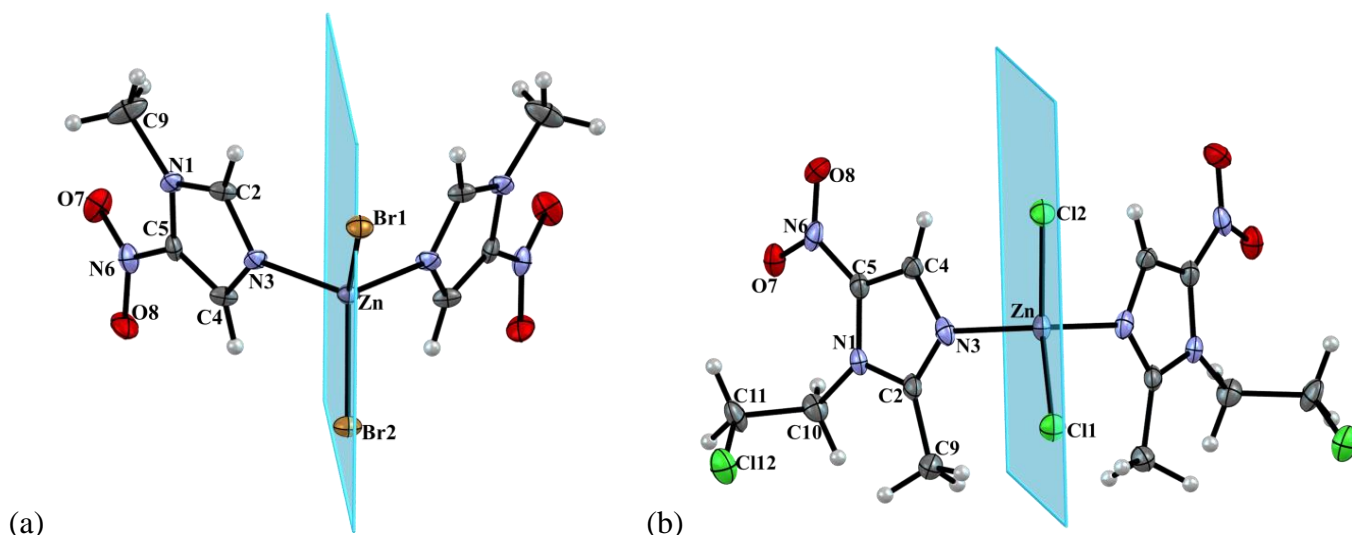
El empaquetamiento cristalino para ambos compuestos es similar, por lo que se discute únicamente el análisis para  $[\text{Cu}(\text{1mnz})_3\text{Br}_2]$ . En la Figura 22 se puede observar que hay una interacción intermolecular por libre $\cdots\pi$  ( $lp\cdots\pi$ ) entre un oxígeno del grupo nitro y un anillo de imidazol de la molécula vecina, esta interacción es fuerte debido a que se encuentra por debajo de la suma de radios de van der Waals del átomo de oxígeno y el átomo de carbono o el átomo de nitrógeno [70]. Por otro lado, el compuesto también estabiliza puentes de hidrógeno débiles entre un átomo de bromo coordinado y el hidrógeno de la posición 2 del imidazol; así como, entre un oxígeno del grupo nitro y el hidrógeno aromático H4.



**Figura 22.** Interacciones no covalentes y arreglos supramoleculares del compuesto  $[Cu(1mnz)_3Br_2]$  vistos desde los diferentes ejes, en cada caso se indica la distancia y el ángulo de la interacción.

**Compuestos tetracoordinados  $[Zn(1mnz)_2Br_2]$ ,  $[Zn(cenz)_2Cl_2]$  y  $[Cu(cenz)_2Cl_2]$ :**

El compuesto  $[Zn(1mnz)_2Br_2]$  cristalizó en un sistema monoclinico con grupo espacial  $Cm$  y dos moléculas en la celda unitaria. Por otro lado, el compuesto  $[Zn(cenz)_2Cl_2]$  se obtuvo en un sistema cristalino ortorrómbico con grupo espacial  $Cmc2_1$  y cuatro moléculas en la celda unitaria. Ambos compuestos son tetracoordinados en los cuales hay dos átomos de halógeno (Br o Cl) coordinados al metal y dos moléculas de 5-nitroimidazol (1mnz o cenz) se unen mediante los átomos de nitrógeno del imidazol y están reflejadas a través de un plano de simetría (Figura 23).



**Figura 23.** Representación ORTEP de las estructuras cristalinas para los compuestos (a)  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$ , y (b)  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  con elipsoides al 50% de probabilidad.

Para compuestos tetracoordinados el cálculo del parámetro  $\tau_4$  nos permite distinguir entre las geometrías; tetraédrica ( $\tau_4 = 1$ ) y plano cuadrado ( $\tau_4 = 0$ ) alrededor del metal a partir de ecuación 2, donde  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden a los dos ángulos más grandes [73]:

$$\tau_4 = \frac{360 - (\alpha + \beta)}{141} \quad \text{Ecuación 2}$$

Para el compuesto  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$  se obtuvo un valor de  $\tau_4 = 0.92$  ( $\beta = 118.89$ ,  $\alpha = 110.8$ ) y para  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$   $\tau_4 = 0.90$  ( $\beta = 122.45$ ,  $\alpha = 109.98$ ), los cuales son indicativos de una geometría tetraédrica regular. En cuanto a las distancias de enlace, la más pequeña corresponde al enlace de los átomos de nitrógeno hacia el metal, seguidas por los átomos de cloro para el compuesto  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  y por bromo para  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$ . En la Tabla 6 se resumen los ángulos de enlace y las distancias alrededor del átomo de zinc(II) para ambos compuestos.

**Tabla 6.** Distancias de enlace ( $\text{\AA}$ ) y ángulos ( $^\circ$ ) alrededor del átomo de zinc(II) para los compuestos  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ , la desviación estándar se indica entre paréntesis.

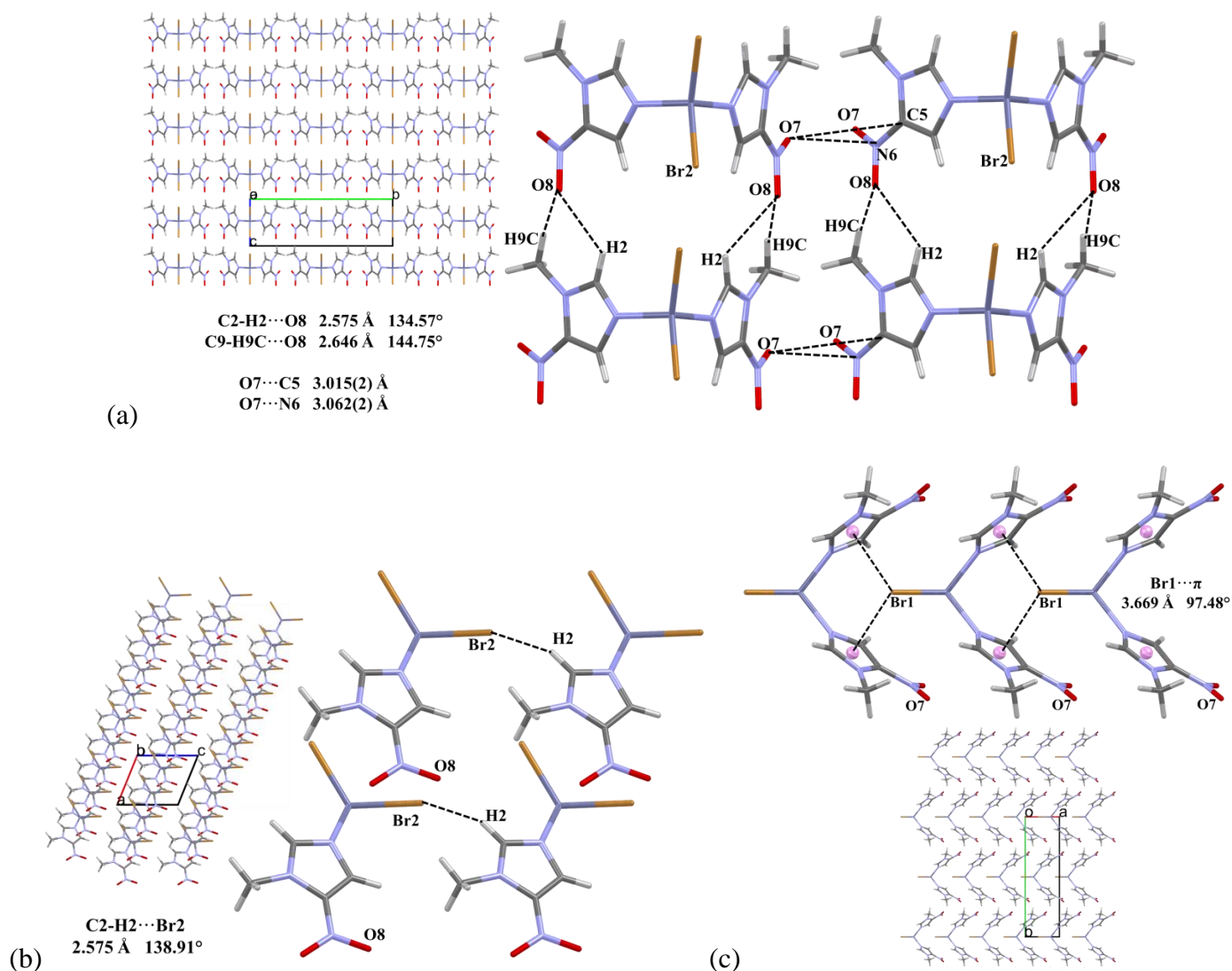
Distancias	$[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$	$[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$	Ángulos	$[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$	$[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$
<b>Zn1-N3</b>	2.024(12)	2.046(5)	<b>N3-Zn1-N3</b>	98.2(7)	106.3(3)
<b>Zn1-X1</b>	2.334(3)	2.215(2)	<b>X1-Zn1-X1</b>	118.89(11)	122.45(10)
<b>Zn1-X2</b>	2.331(3)	2.240(2)	<b>N3-Zn1-X1</b>	110.8(4)	109.98(15)
			<b>N3-Zn1-X2</b>	108.1(3)	103.45(15)

(X = Cl o Br)





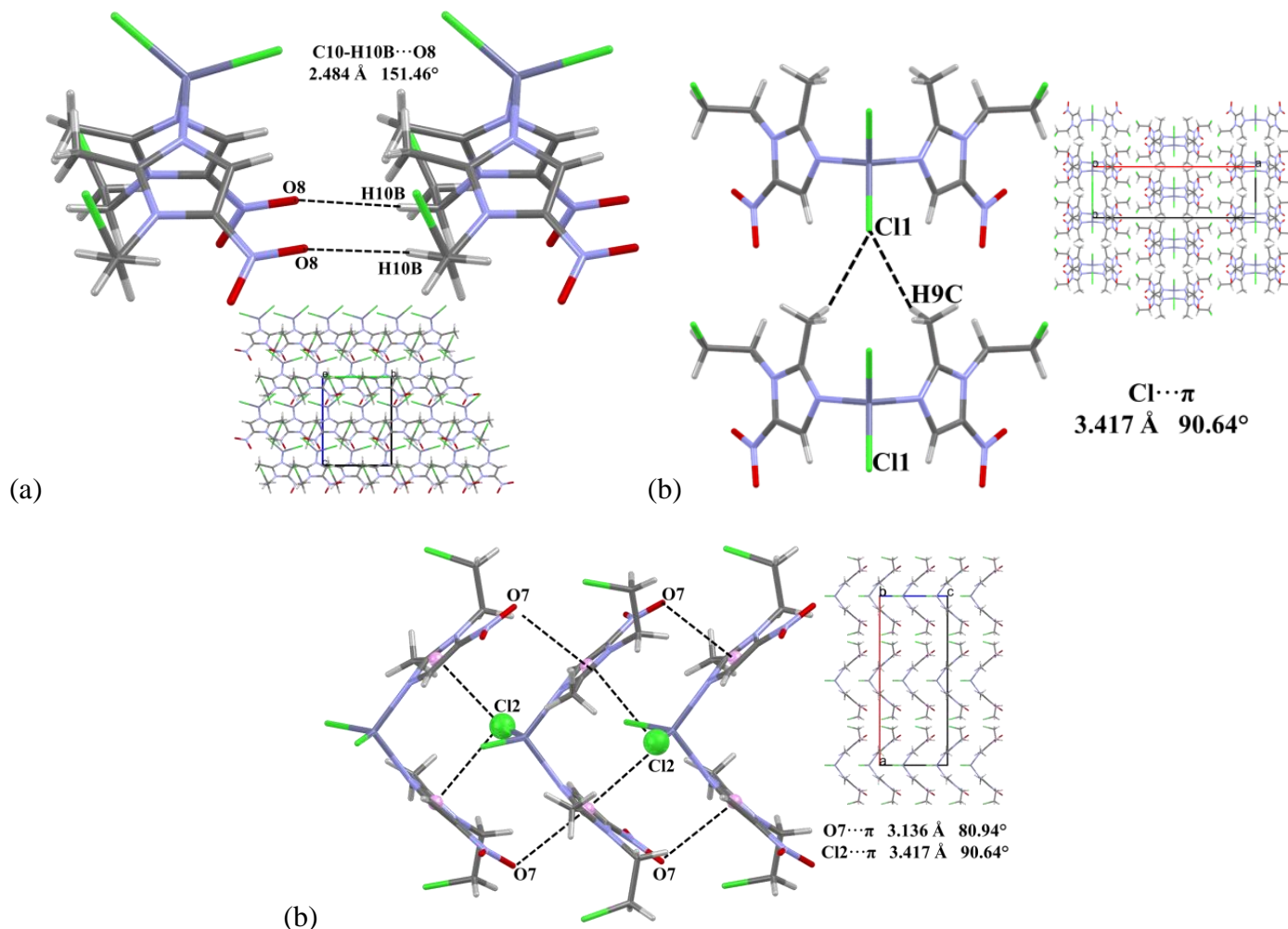
En la Figura 24c se observa que el empaquetamiento cristalino de  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$  se estabiliza por medio de una interacción  $lp \cdots \pi$  moderada entre el átomo de bromo coordinado (Br1) y los anillos de imidazol vecinos. Por otro lado, se observaron interacciones  $lp \cdots$  hueco  $\pi$  fuertes (Figura 24a) entre los grupos nitro de moléculas vecinas ( $\text{O7} \cdots \text{C5}$ ,  $\text{O7} \cdots \text{N6}$ ), esta interacción se conserva desde el empaquetamiento del ligante libre [74]. Estudios teóricos del mapa de potencial electrostático han demostrado que estas interacciones son posibles debido a la capacidad del grupo nitro para actuar como nucleófilo a través de los pares libres de los átomos de oxígeno y como electrófilo debido al hueco  $\pi$  formado entre el átomo de nitrógeno y el átomo de carbono al que se encuentra unido [42]. Finalmente, el oxígeno O8 del grupo nitro estabilizó interacciones débiles de puente de hidrógeno bifurcadas con el grupo metilo ( $\text{H9C}$ ) y el hidrógeno aromático H2 (Figura 24a); este último también interactúa con el átomo de Br2 (Figura 24b). Todas las interacciones observadas son intermoleculares.



**Figura 24.** Interacciones no covalentes y arreglos supramoleculares del compuesto  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$  vista desde los diferentes ejes, en cada caso se indica la distancia y el ángulo de la interacción.

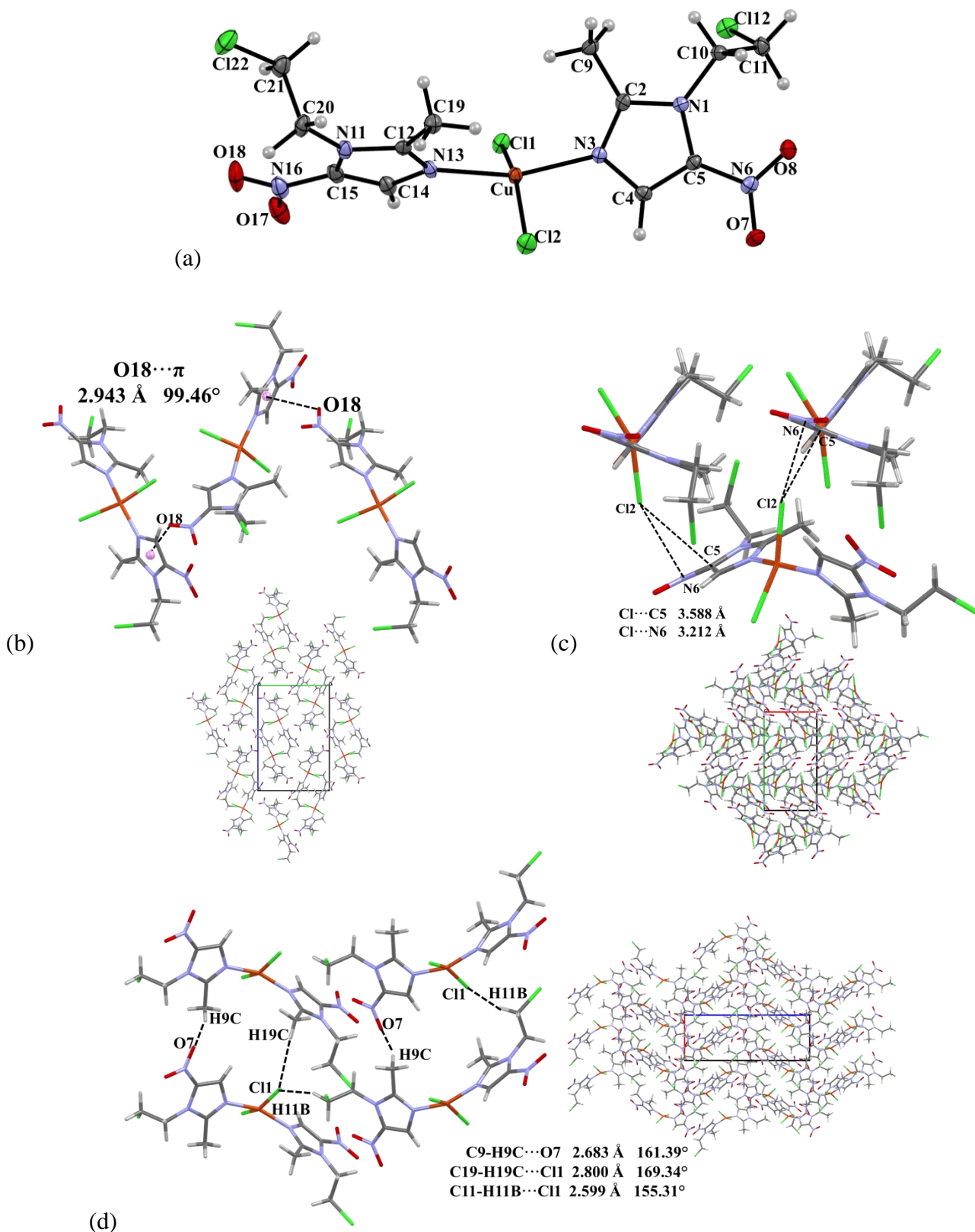


Por otro lado, en el empaquetamiento del  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  no se observaron interacciones  $lp \cdots \text{hueco } \pi$  debido a que tiene una cadena más larga en la posición 1 del imidazol que no permite a los grupos nitro interactuar entre ellos. Sin embargo, esta diferencia entre los ligantes, permite que el compuesto  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  tenga una fuerte interacción  $lp \cdots \pi$  intermolecular entre el oxígeno O7 del grupo nitro y el sistema  $\pi$  del anillo de imidazol (Figura 25b). El resto de las interacciones son muy similares a las observadas en el compuesto  $[\text{Zn}(\text{1mnz})_2\text{Br}_2]$ , hay una interacción  $lp \cdots \pi$  formada por el átomo de cloro coordinado y el anillo de imidazol; así como puentes de hidrógeno (Figura 25).



**Figura 25.** Interacciones no covalentes y arreglos supramoleculares del compuesto  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  vista desde los diferentes ejes, en cada caso se indica la distancia y el ángulo de la interacción.

Finalmente, el compuesto  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (Figura 26a) cristalizó en un sistema cristalino ortorrómbico con grupo espacial  $P2_12_12_1$  y cuatro moléculas en la celda unitaria. La esfera de coordinación para este compuesto es similar a su análogo con zinc(II) descrito anteriormente. Los ángulos de enlace al metal indican una clara distorsión en la geometría (Tabla 7), el cálculo del parámetro  $\tau_4$  dio un valor de 0.33 ( $\beta = 158.8$ ,  $\alpha = 155.24$ ) lo cual corresponde a una geometría que tiende a plano cuadrado distorsionado.



**Figura 26.** (a) Representación ORTEP de la estructura cristalina para el compuesto [Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] con elipsoides al 50% de probabilidad, (b-d) interacciones no covalentes y arreglos supramoleculares, en cada caso se indica la distancia y el ángulo de la interacción.



**Tabla 7.** Distancias de enlace (Å) y ángulos (°) alrededor del átomo de cobre(II) para el compuesto [Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], la desviación estándar se indica entre paréntesis.

Distancias	[Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Ángulos	[Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]
<b>Cu1-N3</b>	1.982(7)	<b>N3-Cu1-N3A</b>	158.8(3)
<b>Cu1-N3A</b>	1.991(7)	<b>Cl1-Cu1-Cl2</b>	155.24(10)
<b>Cu1-Cl1</b>	2.242(2)	<b>N3-Cu1-Cl1</b>	92.5(2)
<b>Cu1-Cl2</b>	2.243(2)	<b>N3-Cu1-Cl2</b>	89.8(2)
		<b>N3A-Cu1-Cl1</b>	91.7(2)
		<b>N3A-Cu1-Cl2</b>	94.97(19)

El empaquetamiento cristalino de este compuesto se estabiliza por interacciones intermoleculares  $lp \cdots \pi$  fuertes entre el átomo de oxígeno O18 del grupo nitro y un anillo de imidazol vecino, también se observan interacciones de  $lp \cdots$  hueco  $\pi$  entre uno de los átomos de cloro coordinados al metal y un grupo nitro de la molécula vecina (Figura 26). Finalmente, en el arreglo se pueden observar puentes de hidrógeno débiles entre un grupo nitro o un átomo de cloro coordinado hacia el grupo metilo de la posición 2 del anillo de imidazol.

El estudio de las estructuras cristalinas de los compuestos de coordinación con los ligantes 1mnz y cenz nos permitió corroborar que los compuestos de zinc(II) presentan una geometría más regular y un arreglo más simétrico comparados con los compuestos de cobre(II) que tienden a ser más planos cuando son tetracoordinados, o intermedios (pbc o bpt) para los compuestos pentacoordinados. Como se mencionó en el Capítulo 2, este fenómeno ha sido ampliamente observado en proteínas y enzimas, estas características geométricas les confieren diferentes actividades biológicas.

Con el análisis de los empaquetamientos cristalinos se pudo observar la versatilidad del grupo nitro para actuar como aceptor o donador de electrones en interacciones relevantes como  $lp \cdots$  hueco  $\pi$  o  $lp \cdots \pi$ , además de los puentes de hidrógeno clásicos. Estas interacciones son relevantes al momento de que un compuesto interactúe con biomoléculas, tanto para estabilizar la estructura como para inhibir su función [68].



## Capítulo 7 Actividad contra el parásito *Toxoplasma gondii*

En este capítulo se abordan los detalles sobre la morfología, el ciclo de vida y las rutas de transmisión del parásito *Toxoplasma gondii*; así como los detalles de la enfermedad toxoplasmosis, generada por este patógeno. Por otro lado, se describen los resultados de las pruebas biológicas realizadas para los ligantes cenx y onz y sus compuestos de coordinación.

### *Toxoplasmosis*

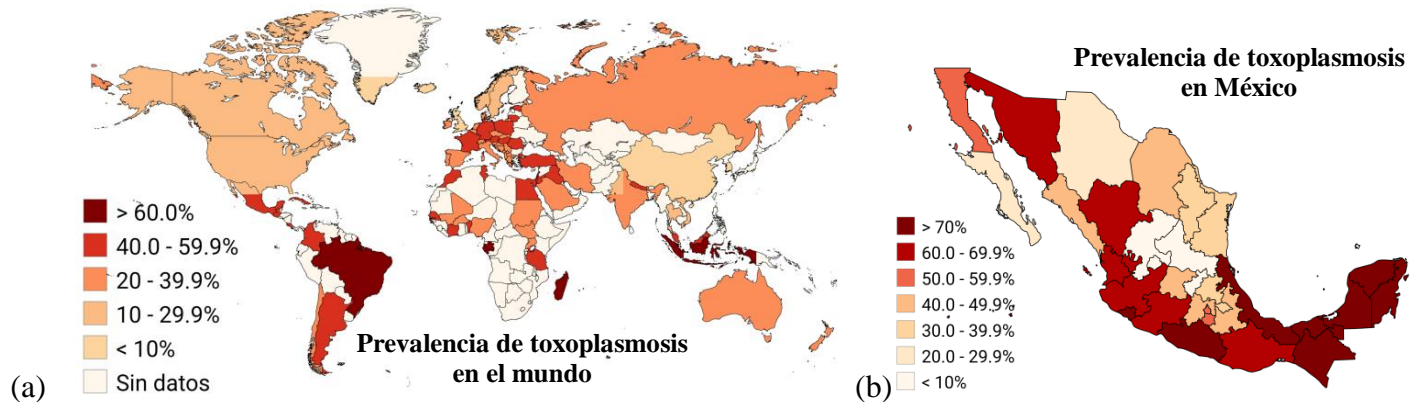
La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica infecciosa ocasionada por el parásito *Toxoplasma gondii* que afecta a humanos y animales de sangre caliente, como aves, gatos, ovejas, perros, vacas y cerdos [75]. Se estima que más de un tercio de la población mundial está infectada con este parásito, lo cual genera un gran impacto clínico, social y económico alrededor del mundo. En la Figura 27a podemos observar que la prevalencia varía dependiendo la región, siendo los países de bajos y medios ingresos ubicados en zonas tropicales o subtropicales los más afectados. Existe una gran prevalencia en países de América latina principalmente en Brasil, Argentina y Colombia, en países de Europa Central y Oriental y partes del sudeste asiático y en África [76-79].

En México la prevalencia promedio de toxoplasmosis es de alrededor del 40%; en la Figura 27b se observa que en las zonas de la costa del Golfo de México y del pacífico sur la prevalencia aumenta a más del 70%, debido a que el clima incrementa el periodo de vida de los ooquistes. Se estima que en la Ciudad de México dos de cada mil recién nacidos presentan toxoplasmosis congénita. Pese al riesgo que representa la enfermedad en el país, actualmente no existe un programa de control de toxoplasmosis y los estudios sobre los factores de riesgo son insuficientes; se sabe que existen zonas dónde la principal fuente de infección puede ser el agua contaminada, mientras que en otras zonas el parásito se puede obtener por el consumo de carne mal cocida [80]. Esta enfermedad ha sido incluida en el grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD), debido a que escasamente aparece en los programas de salud mundial y se le destinan muy pocos recursos económicos para su atención, siendo prácticamente ignorada por las agencias de financiación mundiales [76,81].

Por lo general, la toxoplasmosis es una enfermedad asintomática en personas inmunocompetentes, se estima que menos del 20% de las personas infectadas muestran signos de contagio como fiebre, inflamación de ganglios linfáticos o inflamación intraocular. Un paciente contagiado puede vivir con toxoplasmosis latente por el resto de su vida; sin embargo, algunos estudios indican que la infección latente puede conducir a desordenes psiquiátricos (ansiedad, esquizofrenia, depresión), disminución de peso, enfermedades autoinmunes de la tiroides e infertilidad [82-85]. Existen tres formas clínicas principales de toxoplasmosis,



congénita, cerebral y ocular, los principales grupos en riesgo de manifestar toxoplasmosis son las mujeres en edad reproductiva y los pacientes con sistema inmune comprometido [86].



**Figura 27.** Mapa de prevalencia de toxoplasmosis (a) mundial y en (b) México (imágenes modificadas de Ref. [77] y [80]).

La toxoplasmosis congénita es una de las principales causas de mortalidad infantil. El primer trimestre del embarazo es el de mayor riesgo, pues en este periodo pueden ocurrir mayores manifestaciones clínicas graves, conforme avanza el embarazo el riesgo disminuye, aproximadamente 5 de cada 1000 mujeres embarazadas que son inmunológicamente competentes adquieren esta infección [78]. Una mujer embarazada puede transmitir la infección a su hijo si adquiere al parásito durante el periodo de gestación o por la reactivación de la enfermedad latente. Esta vía de transmisión vertical ocurre porque el *T. gondii* puede atravesar directamente la placenta o ingresar con ayuda de células inmunes infectadas que actúan como “caballos de Troya”, induciendo una respuesta inflamatoria exacerbada que compromete la salud de la madre y del bebé, provocando complicaciones graves como calcificación cerebral, anomalías cardiovasculares, neuropatías ópticas, microcefalia y en muchos casos la muerte fetal [76,87]. Los recién nacidos que fueron contagiados durante el embarazo presentan síntomas severos como enfermedades oculares y falta de desarrollo en las actividades motoras.

Es poco común que las mujeres embarazadas se sometan a pruebas de detección de toxoplasmosis. En países como México, Estados Unidos o Canadá solo se recomienda realizar la prueba cuando se obtiene una ecografía fetal anormal que podría sugerir una infección congénita o cuando se tiene una enfermedad previa que podría aumentar la susceptibilidad al parásito. En algunos países europeos como Francia, Italia, Portugal, Austria y Eslovenia se han implementado programas de detección temprana de toxoplasmosis. Particularmente en Francia a todas las mujeres embarazadas se les realizan pruebas mensuales desde que comienza el embarazo hasta el parto, con el objetivo de identificar la infección materna y prevenir el contagio al feto o disminuir las secuelas [88-90].



El *T. gondii* es un parásito oportunista que aprovecha las bajas defensas del hospedero para causar daño severo en pacientes con el sistema inmune comprometido como en personas con trastornos de inmunodeficiencia, incluyendo a los ancianos, receptores de trasplantes, personas con cáncer o pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [76,87]. El parásito puede propagarse a través de diversos órganos; sin embargo, persiste en las neuronas, propagándose a través de la sangre e invadiendo células cerebrovasculares que permiten la transferencia hacia el cerebro, por esta razón en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es común observar lesiones en el cerebro debidas a toxoplasmosis cerebral, cuyos principales signos y síntomas son dolor de cabeza, anomalías visuales, fiebre, confusión mental, convulsiones y cambios de conducta. Estas lesiones cerebrales conducen a encefalitis o ventriculitis y subsecuentemente a la muerte [79,86,91,92].

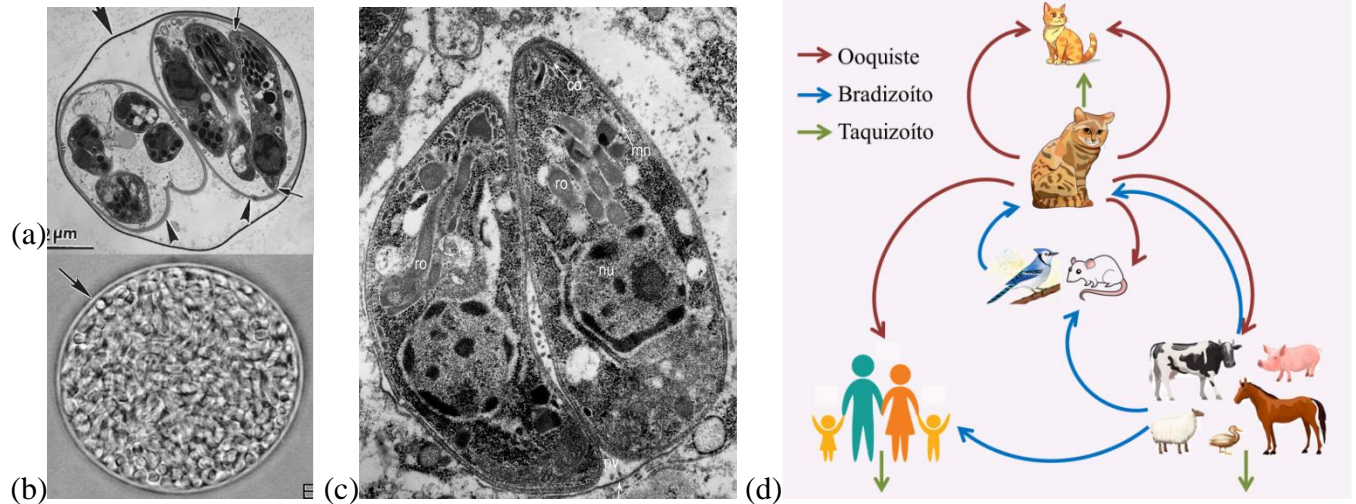
### ***Toxoplasma gondii, ciclo de vida y rutas de transmisión***

El filo Apicomplexa está constituido por un amplio grupo de patógenos protistas con más de 6000 especies descritas y posiblemente un millón de especies no descritas [93,94]. Los organismos pertenecientes a este filo son capaces de causar diversas enfermedades como: malaria por organismos del género *Plasmodium*, babesiosis provocada por el género *Babesia*, criptosporidiosis ocasionada por el parásito *Cryptosporidium parvum* y la toxoplasmosis causada por *Toxoplasma gondii* [76].

El *Toxoplasma gondii* es un patógeno intracelular obligado; es decir, requiere de una célula hospedera para completar su ciclo de vida sexual y asexual en hospederos específicos (intermedio y definitivo). Como parásito apicomplejo se caracteriza por tener un complejo de orgánulos secretores apicales que le permiten invadir fácilmente a la célula hospedera. Adicionalmente, poseen un apicoplasto involucrado en rutas metabólicas esenciales como la biosíntesis de ácidos grasos y grupos hemo, los cuales son cruciales para la replicación del parásito y el desarrollo de la enfermedad [76].

El parásito *T. gondii* presenta tres morfologías diferentes durante su ciclo de vida los ooquistes, los quistes tisulares (bradizoítos) y los taquizoítos, los cuales se pueden transmitir mediante diversas vías [75,86,95-98], en la Figura 28 se muestran las morfologías del parásito y un esquema de las rutas de transmisión.





**Figura 28.** Morfologías del *T. gondii* (94) (a)ooquiste, (b) bradizoíto, (c) taquizoíto y (c) rutas de transmisión del parásito *Toxoplasma gondii*.

- Los ooquistes son el producto final de la reproducción sexual que se realiza exclusivamente en el intestino de los hospederos definitivos que son animales miembros de la familia *Felidae*, principalmente gatos. Durante los días 7 a 21 de la infección aguda varios millones de ooquistes son eliminados a través de las heces de los gatos, por lo que los humanos pueden infectarse fácilmente por contacto con el área contaminada.
- Los taquizoítos tienen una forma característica de media luna, realizan una replicación asexual rápida dentro de las células de los hospederos intermedios (humanos, animales de sangre caliente), provocando que esta se infeste rápidamente y se rompa liberando millones de taquizoítos que pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo hacia los diferentes tejidos del hospedero, principalmente hacia el sistema nervioso central, los ojos y en mujeres embarazadas hacia la placenta. Esta morfología provoca una fuerte respuesta inflamatoria y destrucción de los tejidos dando lugar a las manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis.
- Los bradizoítos realizan una forma de reproducción asexual lenta dentro de los hospederos intermedios, estos permanecen inactivos y protegidos dentro de un quiste, alojados principalmente en el cerebro y en los músculos esquelético y cardíaco. Los quistes tisulares pueden evadir la respuesta inmune del hospedero y producir una infección a largo plazo que da lugar a la toxoplasmosis latente durante toda la vida del hospedero. En personas con el sistema inmune comprometido los bradizoítos pueden liberarse del quiste y transformarse en taquizoítos produciendo principalmente daño cerebral. Los humanos pueden adquirir bradizoítos a través del consumo de carne mal cocida o agua contaminada. Al igual que los taquizoítos pueden transmitirse por trasplante de órganos y transfusión sanguínea o de manera vertical de una madre embarazada a su hijo.

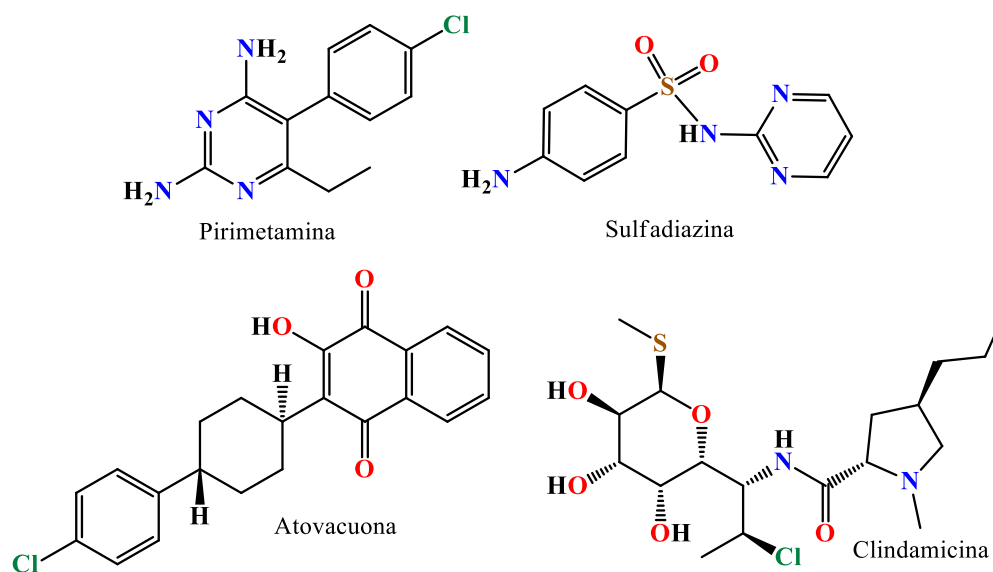




## Tratamientos contra *Toxoplasma gondii*

Los fármacos actuales para atacar al parásito *T. gondii* (Figura 29) se pueden clasificar en tres categorías dependiendo de su mecanismo de acción [87,99]:

1. Inhibición del ácido fólico: La quimioterapia actual recomendada para pacientes con toxoplasmosis consiste en una combinación de pirimetamina (5-(4-clorofenil)-6-etil-2,4-pirimidindiamina) y sulfadiazina (4-amino-N-pirimidin-2-ilbencenosulfonamida) que por acción sinérgica inhiben a las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y dihidropteroato sintasa (DHPS) involucradas en la biosíntesis de ácido fólico. Sin embargo, la enzima DHFR también está presente en humanos por lo que esta terapia podría generar problemas hematológicos en los pacientes y ser fatal en mujeres embarazadas ya que la deficiencia de folatos ocasiona malformaciones en el embrión (embriopatía); aunque, estos efectos se pueden prevenir administrando ácido folínico [87,99-101]. En muchos casos, los pacientes presentan sensibilidad a la sulfadiazina en cuyo caso se recomienda una combinación de pirimetamina con clindamicina [87].



**Figura 29.** Estructura de los medicamentos con actividad contra *T. gondii*.

2. Inhibición de la síntesis de proteínas: El *T. gondii* es sensible a la azitromicina y a la clindamicina que intervienen en la síntesis de las proteínas en los organelos mitocondriales. Sin embargo, se ha encontrado resistencia a estos fármacos codificada en los genes del parásito [100].

3. Inhibición del transporte de electrones en la cadena respiratoria: El citocromo (CYT)  $bc_1$  es una enzima ubicada en la membrana mitocondrial, esta enzima participa en la cadena respiratoria de transferencia de electrones en el *T. gondii*, con la ubiquinona como cofactor. La atovacuna es un medicamento que, por similitud con la ubiquinona, interfiere en el gradiente electroquímico del CYT  $bc_1$  inhibiendo su actividad. Sin embargo, también se han encontrado mutaciones involucradas con la resistencia a la atovacuna [100,101].



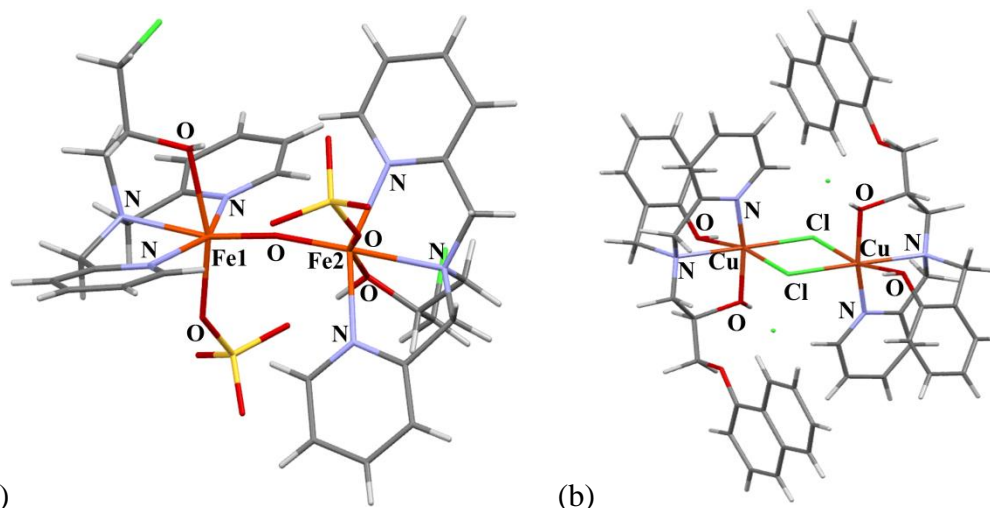
La eficiencia de estos medicamentos contra *T. gondii* no es tan alta debido a que están diseñados para atacar otras enfermedades infecciosas [100]. En la mayoría de los casos, estos fármacos actúan evitando la replicación del taquizoíto, pero no lo eliminan por completo ya que tienen la capacidad de reorganizarse en bradizoítos, sobre los cuales los medicamentos no son eficientes, este proceso conlleva a que la toxoplasmosis pueda manifestarse en cuanto el sistema inmune quede expuesto. Por esta razón es de importancia comprender el ciclo de vida del parásito y su morfología para el diseño de fármacos que actúen selectivamente contra el *T. gondii* y con menos efectos tóxicos en los seres humanos.

### ***Compuestos de coordinación con actividad anti-toxoplasma***

Una alternativa poco explorada para el desarrollo de medicamentos con actividad anti-toxoplasma han sido los compuestos de coordinación.

En la literatura se han descrito compuestos de hierro(III) y cobre(II) con potencial actividad contra *T. gondii*. Los compuestos  $[\text{Fe}(\text{hpcinol})(\text{SO}_4)]_2\text{-}\mu\text{-oxo}$  (hpcinol = [1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol] y  $[\text{Cu}(\text{H2L2})\text{-}\mu\text{-Cl}]_2\text{Cl}_2$  (H2L2 = 2-(((2-hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)propil)(piridin-2-ilmetil)amino metil)phenol) son dinucleares, donde cada átomo de hierro(III) y de cobre(II) presentan una geometría octaédrica (Figura 30), aunque en disolución los puentes cloro y oxo se rompen para formar los compuestos mononucleares [102-103].

Para estudiar la actividad anti-toxoplasma de estos compuestos se infestaron células hospederas epiteliales de riñón de mono (LLC-MK2) con *T. gondii* (RH) y se expusieron durante 48 h a disoluciones de los compuestos de hierro(III) y cobre(II). A partir de los resultados de viabilidad del parásito se obtuvieron los valores de  $\text{IC}_{50}$  de 3.6  $\mu\text{M}$  y de 0.78  $\mu\text{M}$  para  $[\text{Fe}(\text{hpcinol})(\text{SO}_4)]_2\text{-}\mu\text{-oxo}$  y  $[\text{Cu}(\text{H2L2})\text{-}\mu\text{-Cl}]_2\text{Cl}_2$ , respectivamente, estos resultados fueron mucho mejores que el medicamento sulfadiazina (26  $\mu\text{M}$ ). Adicionalmente, el estudio en células hospederas sanas demostró que los compuestos son más tóxicos para el parásito que para las células. A través de imágenes por microscopía electrónica se encontró que después de 6 días de tratamiento estos compuestos reorganizan a los taquizoítos para formar bradizoítos, tal como lo hacen los medicamentos estándares y por medio de microscopía confocal se observó que ambos compuestos actúan contra el parásito debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [104,105].



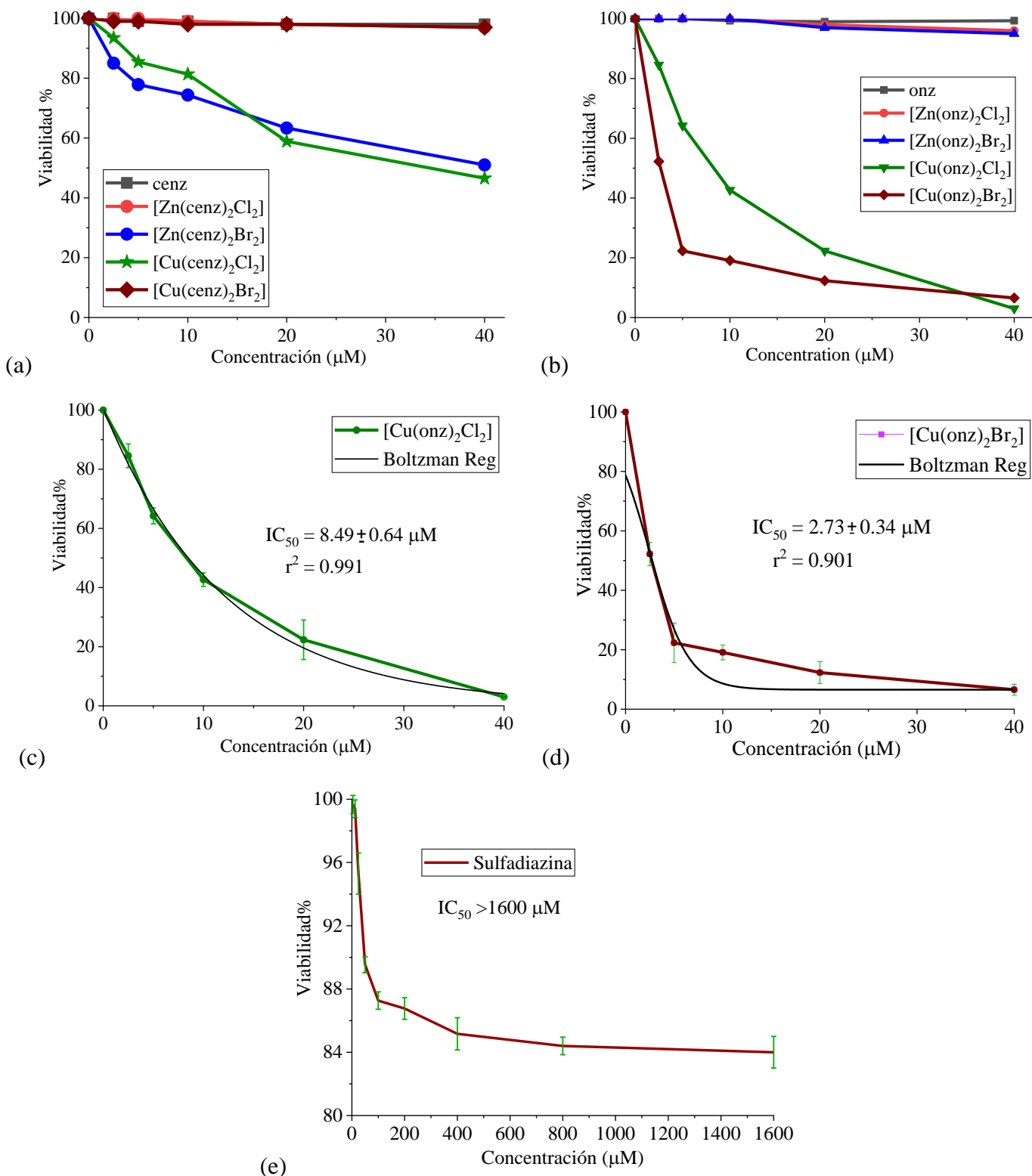
**Figura 30.** Estructuras cristalinas de los compuestos (a)  $[\text{Fe}(\text{hpcinol})(\text{SO}_4)]_2\text{-}\mu\text{-oxo}$  y (b)  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)\text{-}\mu\text{-Cl}]_2\text{Cl}_2$  con actividad antitoxoplasma.

Debido a que la toxoplasmosis representa un serio problema de salud pública y a la poca exploración en la actividad de compuestos de coordinación contra *T. gondii*, para este proyecto se evaluó la actividad antitoxoplasma de los compuestos de coordinación con los ligantes *cen*z y *onz*. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

### ***Resultados de los ensayos de actividad anti-toxoplasma***

Para estudiar la viabilidad del parásito *Toxoplasma gondii*, se utilizaron taquizoítos debido a que esta morfología es la que da lugar a la manifestación de la enfermedad toxoplasmosis, la cepa RH ha sido ampliamente utilizada como referencia para estos estudios.

Los taquizoítos fueron expuestos a diferentes concentraciones de los ligantes libres *cen*z y *onz*, los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  y las sales metálicas de partida, usando sulfadiazina como control positivo. Después de 1 h de exposición los parásitos se tiñeron con el colorante fluorescente SYTOX<sup>TM</sup> Green, el cual permite distinguir a los parásitos muertos de los vivos, ya que una vez que el parásito muere la membrana celular queda expuesta, permitiendo la entrada del colorante a la célula y su subsecuente unión específica a los ácidos nucleicos, esta unión da lugar a una señal verde brillante cuando se excita con una lámpara de argón a 488 nm [106-107]. En la Figura 31 se muestran las gráficas de viabilidad obtenidas, a partir de las cuales se determinó la concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) de los compuestos mediante una regresión de Boltzman

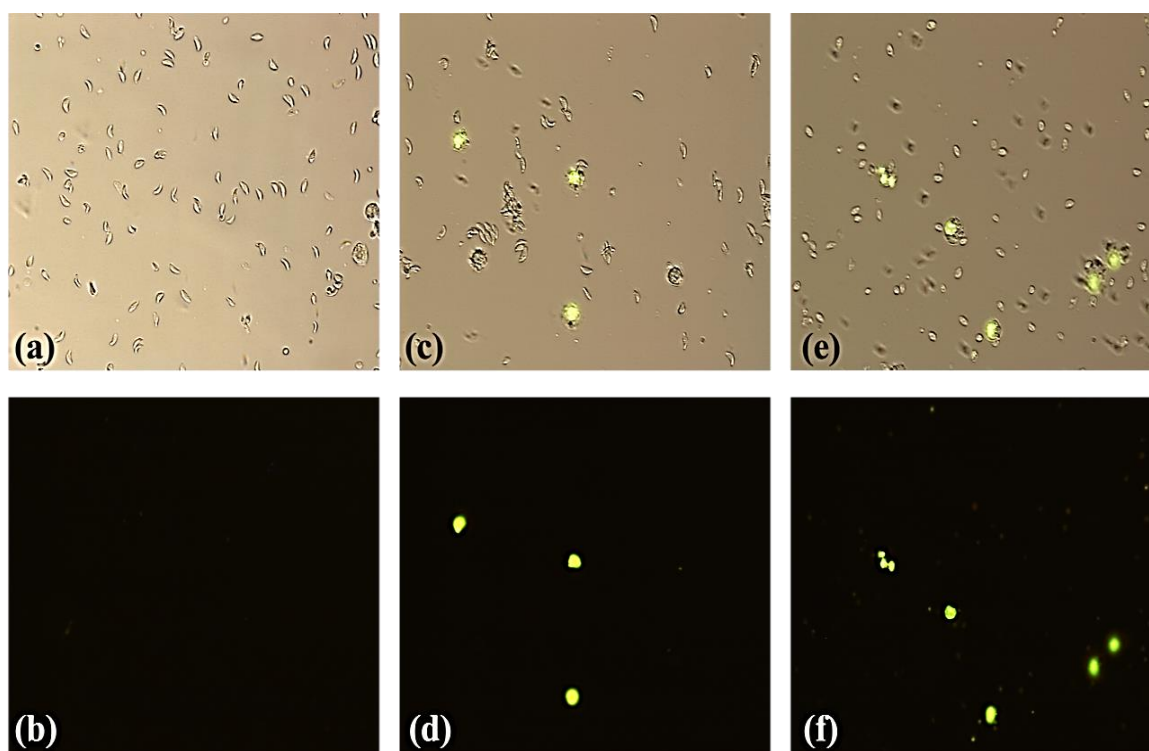


**Figura 31.** Porcentaje de viabilidad de taquizoítos *T. gondii* (RH) expuestos a (a) *cen* y (b) *onz* y sus compuestos de coordinación (0 – 40  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h en PBS pH =7.4. Distribución de Boltzmann para los compuestos más activos (c)  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y (d)  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , (f) comportamiento de la sulfadiazina.



En los estudios realizados se encontró que los ligantes libres *cen*z y *onz* no presentan actividad contra el parásito *T. gondii* ya que la viabilidad se mantuvo en 100% en las concentraciones utilizadas al igual que las sales metálicas de partida; sin embargo, podemos observar en la Figura 31 que sus compuestos de coordinación sí son activos. La disminución en la viabilidad es más evidente para los compuestos de coordinación de cobre(II) con el ligante *onz*. Los compuestos con el ligante *cen*z [ $\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2$ ] y [ $\text{Zn}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2$ ] presentaron actividad significativa contra *T. gondii*, exhibiendo valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $30.55 \pm 0.25 \mu\text{M}$  y  $40.0 \pm 0.96 \mu\text{M}$ , respectivamente; sin embargo, los compuestos más activos fueron [ $\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2$ ] con un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $8.49 \pm 0.64 \mu\text{M}$  y [ $\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2$ ] con  $\text{IC}_{50}$  de  $2.73 \pm 0.34 \mu\text{M}$ . Durante los ensayos se utilizó a la sulfadiazina como control positivo, el valor de  $\text{IC}_{50}$  es mayor a  $1600 \mu\text{M}$  en las condiciones de trabajo, lo cual indica que los compuestos de coordinación son mucho más activos contra el parásito que el fármaco estándar.

En la Figura 32 se pueden observar como ejemplo las imágenes de los taquizoítos obtenidas en campo claro y por microscopía de fluorescencia después de ser expuestos a los compuestos [ $\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2$ ] y [ $\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2$ ]  $20 \mu\text{M}$ . Los taquizoítos muertos por exposición a los compuestos se distinguen por su fluorescencia en color verde debido a la entrada del colorante SYTOX<sup>TM</sup> Green y su unión a los ácidos nucleicos. Dados los resultados, se considera que los compuestos de coordinación son buenos candidatos para continuar con su estudio debido a la gran actividad biológica que presentaron contra *Toxoplasma gondii*, por lo que en el siguiente capítulo se abordarán los estudios de toxicidad realizados.



**Figura 32.** Imágenes de *T. gondii* (arriba campo claro, abajo microscopía de fluorescencia) para (a) y (b) control; (c) y (d) expuestos a [ $\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2$ ] ( $20 \mu\text{M}$ ); (e) y (f) expuestos a [ $\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2$ ] ( $20 \mu\text{M}$ ).



## Capítulo 8 Ensayos de toxicidad aguda

La toxicidad aguda es el estudio de los efectos adversos que se presentan después de la exposición a un fármaco en una sola administración dentro de un intervalo de tiempo que no exceda las 24 h. Por lo general, se realiza en las especies de prueba: conejos, ratas o ratones; usando como vías de administración oral, tópica, intravenosa o inhalación. Los estudios de toxicidad aguda son necesarios para los productos farmacéuticos destinados al consumo humano y la información obtenida es útil para la elección de dosis repetidas [108-110]. Uno de los índices utilizados para definir la toxicidad aguda es la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) de la sustancia, la cual indica la cantidad requerida para matar el 50% de la población de prueba, este parámetro puede variar dependiendo de la especie de prueba y la *vía* de administración [108,109].

El valor de  $LD_{50}$  por sí mismo no es indicativo de la sintomatología y los cambios patológicos que puede sufrir el animal por la exposición al fármaco, si bien estos efectos no provocan la muerte pueden resultar graves y por ello deben ser tomados en cuenta. Por esta razón la estimación de  $LD_{50}$  debe ser considerada para proporcionar información valiosa sobre la toxicidad de un compuesto e ir de la mano con observaciones clínicas debidamente reportadas [108].

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad anti-toxoplasma, se determinó la toxicidad aguda en ratones machos (ICR) por *vía* intravenosa para los compuestos de coordinación más activos  $[Cu(onz)_2Cl_2]$  y  $[Cu(onz)_2Br_2]$ .

En primer lugar, se realizó un perfil farmacológico administrando dosis únicas de 1, 10 y 100 mg/Kg a 3 ratones vivos por dosis, después de 24 h se determinó la cantidad de ratones que estaban muertos. Este ensayo fue de utilidad para encontrar el intervalo en el que se encuentra la dosis letal media, permitiéndonos ahorrar vidas animales al momento de calcular el valor de  $LD_{50}$ . En la Tabla 8 se muestran los datos obtenidos a partir de los cuales se estableció como intervalo de trabajo dosis entre 10 y 100 mg/Kg.

**Tabla 8.** Resultados obtenidos después de 24 h para el perfil farmacológico realizado *vía* intravenosa en ratones ICR con los compuestos de coordinación  $[Cu(onz)_2Cl_2]$  y  $[Cu(onz)_2Br_2]$ .

Dosis (mg/Kg)	Ratones	$[Cu(onz)_2Cl_2]$		$[Cu(onz)_2Br_2]$	
		Vivos	Muertos	Vivos	Muertos
1	3	3	0	3	0
10	3	3	0	3	0
100	3	0	3	1	2



Posteriormente, se realizaron los estudios de toxicidad aguda administrando dosis únicas de 10, 50, 75, 90 y 100 mg/Kg a 5 ratones por dosis. Después de 24 h de la administración se observó clínicamente a los ratones realizando una evaluación de la piel, el pelaje, los ojos, las orejas, la nariz, la cavidad bucal, el tórax, el abdomen, los genitales externos, las extremidades y los pies; también se revisaron los efectos respiratorios y circulatorios, los efectos autonómicos como la salivación, los efectos en el sistema nervioso que incluyen temblores, convulsiones, reactividad a la manipulación y comportamiento atípico. Posteriormente, las observaciones se realizaron a los 7 y 14 días después de la administración.

En la Tabla 9 se presentan los datos obtenidos de ratones vivos y muertos con las diferentes dosis. Los valores de LD<sub>50</sub> se obtuvieron mediante un análisis estadístico de sobrevida Probit, en el ANEXO V se muestran los datos para cada compuesto. El valor obtenido de LD<sub>50</sub> para [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] fue de 49.35 mg/Kg (83.02 μmol/Kg) y para [Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] fue de 83.24 mg/Kg (125.62 μmol/Kg). Previamente, se ha reportado que la sulfadiazina tiene un valor de LD<sub>50</sub> 180 mg/Kg (719.22 μmol/Kg) *vía* intravenosa en ratones [111]. En principio, se puede observar que los compuestos de coordinación presentan una mayor toxicidad que la sulfadiazina; sin embargo, los tres valores se consideran como toxicidad moderada debido a que se encuentran dentro del intervalo de 50 a 500 mg/Kg [112]. Además, es importante mencionar que durante las observaciones clínicas realizadas dentro de los 7 y 14 días después de la exposición no se encontraron daños en las extremidades, como lesiones o necrosis que sí suele causar la sulfadiazina y que después se manifiestan como efectos secundarios (síndrome de Steve Johnson) en pacientes a los que se les administra este fármaco. Tampoco se observaron daños en el sistema nervioso de los ratones estudiados. Por estos motivos, se considera que los compuestos son óptimos para continuar con su estudio biológico.

**Tabla 9.** Datos obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda *via* intravenosa en ratones con los compuestos de coordinación [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] y [Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>].

Dosis (mg/Kg)	Administrados	[Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]		[Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	
		Vivos	Muertos	Vivos	Muertos
10	5	5	0	5	0
50	5	4	1	4	1
75	5	3	2	3	2
90	5	2	3	3	2
100	5	0	5	1	4



## Capítulo 9 Coeficiente de distribución

Como ya se ha mencionado, el parásito *Toxoplasma gondii* es un organismo intracelular obligado por lo que se requiere que los fármacos de elección para su tratamiento tengan un fácil ingreso a la célula a través de la membrana celular. También hemos mencionado que el primer paso en el mecanismo de acción de los 5-nitroimidazoles es el acceso a la célula por difusión pasiva. En general, cuando se tiene la propuesta de un nuevo fármaco, es importante estudiar su absorción a través de las membranas y su distribución en el cuerpo humano; en este sentido, el transporte más común suele ser por difusión pasiva. Los fármacos de elección deben ser lo suficientemente lipofílicos para penetrar a través de la membrana lipídica, pero no tanto como para quedar atrapados en ella. Por esta razón se suele estudiar el carácter lipofílico de nuevos fármacos que nos indica la relación entre las propiedades biológicas, farmacocinéticas y metabólicas [113].

El carácter lipofílico se puede medir a través del coeficiente de distribución D, que se refiere a la distribución de un compuesto entre un disolvente orgánico, generalmente 1-octanol y una fase acuosa en un pH definido. Los intervalos de concentración en cada disolvente pueden variar de acuerdo al experimento, por lo que el coeficiente de distribución suele reportarse como su logaritmo Log D [114]. Experimentalmente se puede obtener mediante métodos cromatográficos, potenciométricos, agitación en matraz (shake flask), entre otros.

Para determinar la lipofilidad de los ligantes libres *cenx* y *onz*, y de sus compuestos de coordinación se utilizó el método shake flask con 1-octanol como fase orgánica y un buffer de MOPS  $10^{-2}$  M a pH = 7.4 como fase acuosa, ya que este buffer no es extraíble a la fase orgánica [115]. A partir de la ecuación 3 se calculó el valor de Log  $D_{7.4}$  para cada compuesto, donde  $C_{oc}$  y  $C_{agua}$  representan la concentración final en la fase orgánica y en la fase acuosa (buffer MOPS  $10^{-2}$  M, pH = 7.4), respectivamente [114]:

$$\text{Log } D_{7.4} = \frac{C_{oc}}{C_{agua}} \quad \text{Ecuación 3}$$

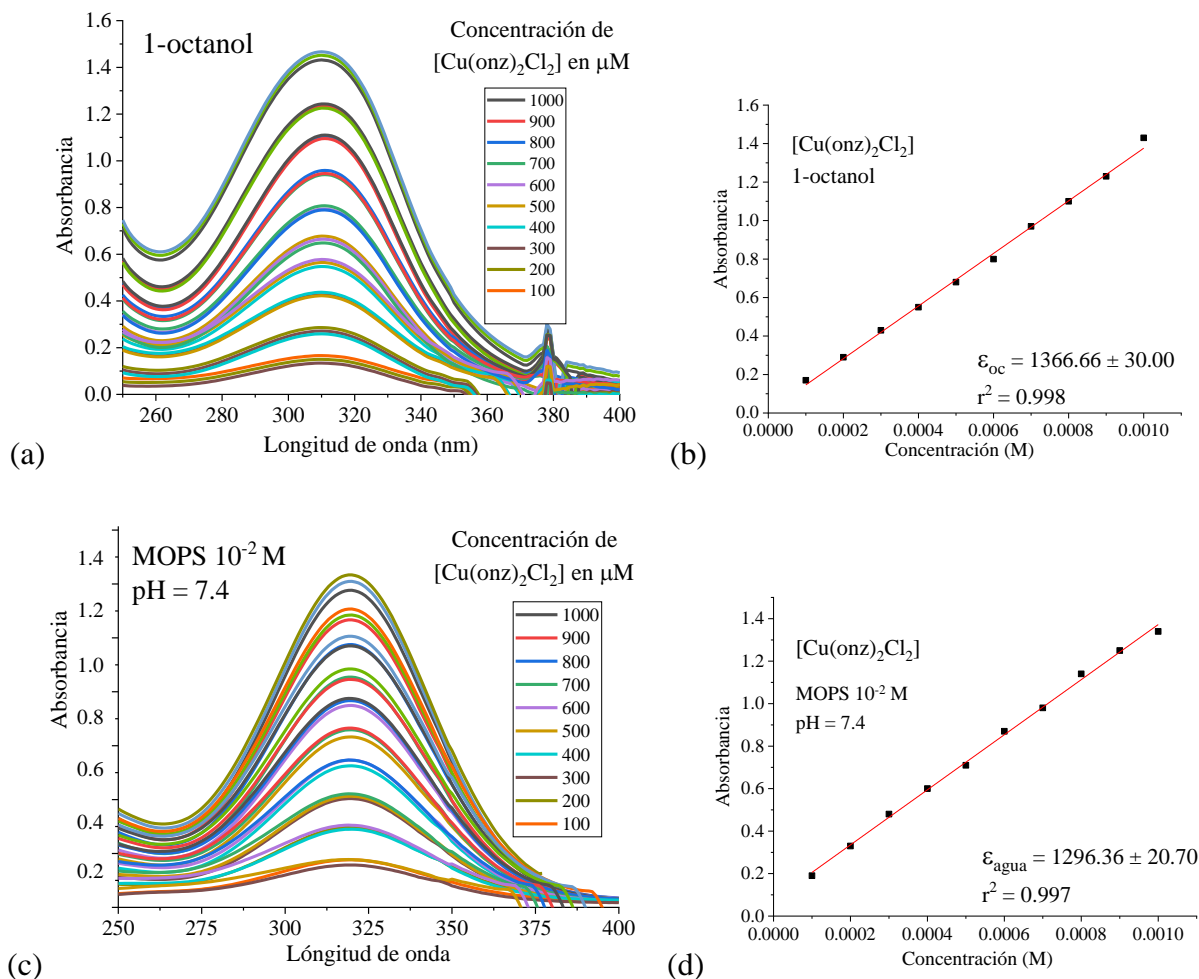
Todos los compuestos estudiados por esta técnica presentaron una banda de absorción en la región ultravioleta asignadas en  $\lambda_{\max} = 320$  nm para la fase acuosa y en  $\lambda_{\max} = 310$  nm para la fase orgánica. Por lo que se seleccionaron estos máximos para realizar las determinaciones.

Para obtener la linealidad del método, se prepararon curvas de calibración por triplicado empleando concentraciones entre 100 y 10  $\mu\text{M}$  para los ligantes *cenx* y *onz*. Mientras que para los compuestos de coordinación se usaron concentraciones entre 1000 y 100  $\mu\text{M}$ . Obteniendo valores de absorción entre 1.4 y 0.1 unidades. En la Figura 33 se presentan como ejemplo las curvas de calibración obtenidas en la fase orgánica y en la fase acuosa para el compuesto de coordinación  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ . A partir de estas curvas de calibración y



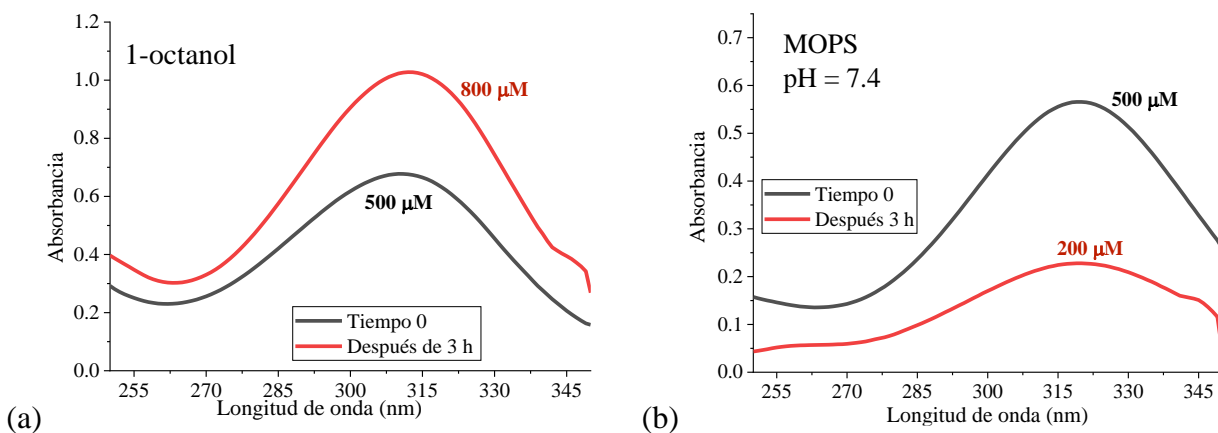


aplicando la Ley de Beer-Lambert se obtuvieron los valores de coeficiente de extinción molar para cada uno de los compuestos probados Tabla 10.



**Figura 33.** Espectros electrónicos en (a) 1-octanol y en (c) agua (buffer MOPS  $10^{-2}$  M, pH = 7.4) para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y (b) y (d) curvas de calibración obtenidas.

Después de obtener las curvas de calibración se pusieron en contacto disoluciones en buffer y en 1-octanol para permitir el reparto y las fases se separaron por centrifugación. Se determinó el espectro electrónico de cada disolución antes y después del reparto para calcular la concentración de compuesto y de acuerdo con la Ecuación 3 se obtuvieron los valores de  $\text{Log } D_{7.4}$ . En la Figura 34 se muestran como ejemplo los espectros electrónicos del compuesto  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  obtenidos en cada fase, antes y después del reparto.



**Figura 34.** Espectros electrónicos obtenidos para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  en (a) 1-octanol y en (b) agua (buffer MOPS  $10^{-2}$  M,  $\text{pH} = 7.4$ ); negro-antes y rojo-después del reparto.

En la literatura se han establecido los intervalos de  $\text{Log } D_{7.4}$  de acuerdo a las implicaciones que tendrá sobre la permeabilidad y el metabolismo del fármaco. En general, los fármacos con valores menores a 0 presentan problemas de permeabilidad intestinal y en el sistema nervioso central; entre 0 y 1 tienen un buen equilibrio entre su permeabilidad y solubilidad; entre 1 y 3 se considera el intervalo óptimo para la administración por *vía* oral; entre 3 y 5 la solubilidad del fármaco tiende a disminuir; por encima de 5 la solubilidad es muy baja y la absorción errática [114]. En la Tabla 10 se resumen los valores de  $\text{Log } D_{7.4}$  obtenidos para cada compuesto. Observamos que en todos los casos el  $\text{Log } D_{7.4}$  se encuentra entre 0 y 1, lo cual es indicativo de que estos compuestos tienen una buena solubilidad y podrían permear fácilmente a la célula.

**Tabla 10.** Coeficientes de extinción molar en 1-octanol  $\epsilon_{oc}$ , y en agua,  $\epsilon_{\text{agua}}$  (MOPS  $10^{-2}$  M a  $\text{pH} = 7.4$ ) para los ligantes y los compuestos de coordinación y su respectivo valor de  $\text{Log } D_{7.4}$ .

Compuesto	$\epsilon_{oc}$	$\epsilon_{\text{agua}}$	$\text{Log } D_{7.4}$
	( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$	( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$	
<b>cen</b>	$8236.23 \pm 46.50$	$9846.14 \pm 16.50$	0.72
<b>[Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	$1246.51 \pm 15.58$	$1346.55 \pm 45.35$	0.69
<b>[Cu(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	$1365.65 \pm 13.26$	$1465.15 \pm 46.56$	0.62
<b>[Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	$1249.85 \pm 32.89$	$1194.46 \pm 16.50$	0.86
<b>[Zn(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	$1246.56 \pm 34.50$	$1148.69 \pm 34.55$	0.82
<b>onz</b>	$7945.45 \pm 25.43$	$9702.98 \pm 67.69$	0.64
<b>[Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	$1296.36 \pm 20.70$	$1366.66 \pm 30.00$	0.61
<b>[Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	$1359.36 \pm 45.80$	$1489.64 \pm 15.80$	0.56
<b>[Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	$1274.74 \pm 35.40$	$1036.86 \pm 16.50$	0.90
<b>[Zn(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]</b>	$1289.53 \pm 41.79$	$1044.84 \pm 14.25$	0.95



## Capítulo 10 Estudios de unión al ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) juega un papel importante en los procesos biológicos ya que contiene los códigos de información hereditaria para la síntesis de todas las proteínas y enzimas que los organismos requieren; además controla de forma directa o indirecta los procesos celulares. Desde el descubrimiento de su estructura ha sido el objetivo principal para tratar de explicar el mecanismo de acción de moléculas pequeñas con actividad antibiótica o anticancerígena [116,117].

Las interacciones que los compuestos de coordinación pueden llevar a cabo con el ADN son del tipo covalentes o no covalentes. En el caso de las interacciones covalentes se involucra la unión del ADN a través de los átomos de nitrógeno de las bases púricas al átomo metálico por enlaces de coordinación; mientras que, las interacciones no covalentes se clasifican como [116-119]:

- Electrostáticas: Debidas a la interacción entre la carga negativa de la cadena de fosfatos del ADN y la carga positiva de las moléculas pequeñas.
- Unión a los surcos del ADN: Estas interacciones pueden ser con el surco menor o el surco mayor del ADN a través de puentes de hidrógeno o interacciones de van der Waals entre los compuestos y las bases púricas.
- Intercalación: Suceden cuando el compuesto se introduce entre los pares de bases, en la mayoría de los casos por interacciones de apilamiento  $\pi \cdots \pi$ .

Existen diversas técnicas mediante las cuales es posible identificar el tipo de interacción que lleva a cabo una molécula con el ADN, para este proyecto se utilizaron las técnicas espectroscópicas de UV-Vis, fluorescencia y dicroísmo circular.

### *Espectroscopía electrónica UV-Vis*

Los espectros electrónicos de los compuestos de coordinación de cobre(II) y zinc(II) sintetizados en este proyecto presentaron un máximo de absorción a 320 nm debido a transferencias de carga, por lo que esta banda fue seleccionada para estudiar los cambios que presenta el compuesto al ir incrementando la concentración de ADN de timo de ternera (ct-ADN). A través de este estudio fue posible obtener el valor de la constante de unión intrínseca  $K_b$  al ADN a partir de ecuación 4 [118]:

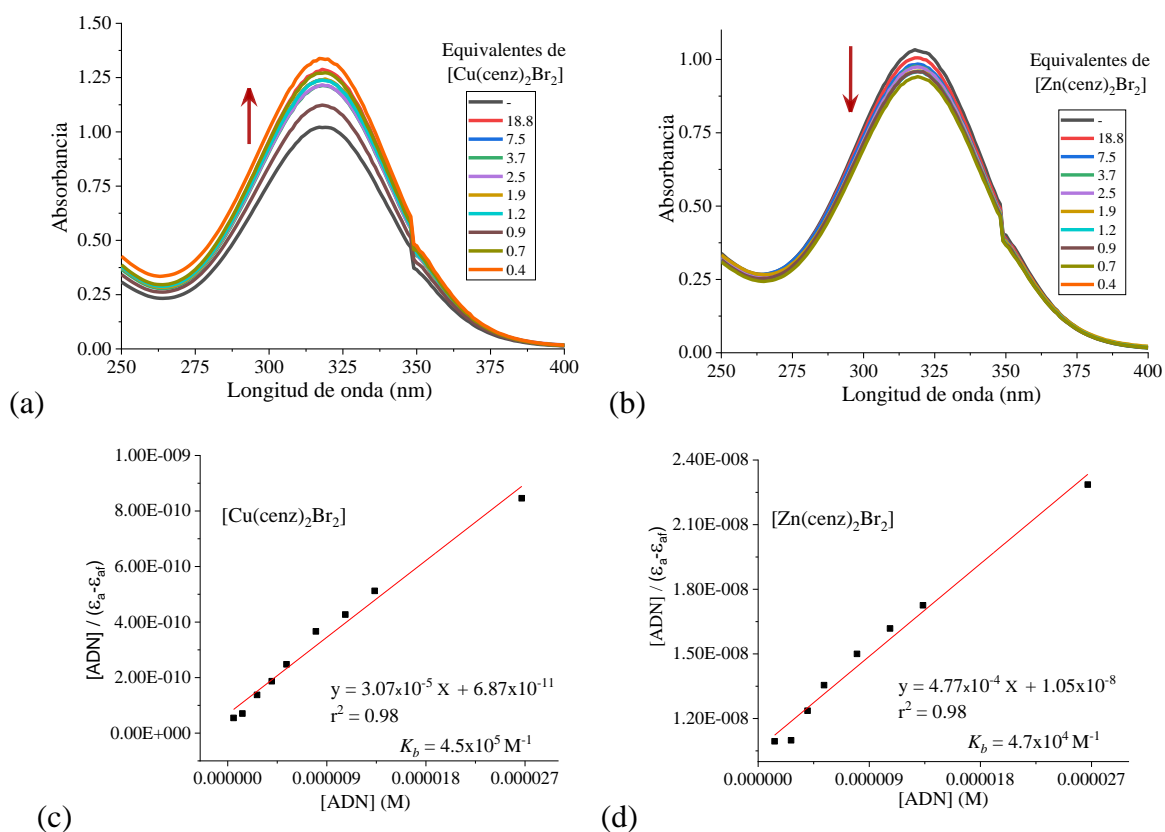
$$\frac{[ADN]}{\varepsilon_{\alpha} - \varepsilon_f} = \frac{[ADN]}{\varepsilon_0 - \varepsilon_f} + \frac{[ADN]}{K_b(\varepsilon_{\alpha} - \varepsilon_f)} \quad \text{Ecuación 4}$$



Donde,  $\epsilon_\alpha$ ,  $\epsilon_0$  y  $\epsilon_f$  corresponden respectivamente a los coeficientes de extinción molar del compuesto libre en disolución, del compuesto completamente unido al ADN y del compuesto unido al ADN a una concentración definida. A partir de esta ecuación y la gráfica  $[\text{ADN}]/(\epsilon_\alpha - \epsilon_0)$  vs  $[\text{ADN}]$  se obtiene el valor de  $K_b$  [118].

Durante estos estudios se mantuvo constante la concentración de compuesto ( $10 \mu\text{M}$ ) y se incrementó la concentración de ct-ADN de 0 a  $25 \mu\text{M}$  en un buffer de cacodilato  $\text{pH} = 7.25$  y una incubación de 1 h.

Los compuestos de coordinación de cobre(II)  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , presentaron un comportamiento hiperocrómico significativo; es decir, al ir incrementando la concentración de ct-ADN aumentaba la absorbancia del compuesto (Figura 35a). Por otro lado, los compuestos de zinc(II)  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  presentaron un comportamiento hipocrómico (disminución de la absorbancia), en la Figura 35b se puede observar que los cambios en los máximos fueron menos significativos que en los compuestos de cobre(II). En el ANEXO VI se presentan todos los espectros obtenidos.



**Figura 35.** Espectros de absorción de una disolución  $10 \mu\text{M}$  de (a)  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  y (b)  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  con incrementos en la concentración de ct-ADN<sub>b</sub> (0-25  $\mu\text{M}$ ), en buffer de cacodilato ( $\text{pH} = 7.25$ ) después de 1 h de incubación; (c) y (d) ajustes lineales de las gráficas  $[\text{ADN}]/(\epsilon_\alpha - \epsilon_0)$  vs  $[\text{ADN}]$ .

En la Tabla 11 se observa que los valores de  $K_b$ , obtenidos a partir de los ajustes lineales (Figura 35c y d), para los compuestos de coordinación de cobre(II) se obtuvieron en un intervalo de  $7.4 \times 10^4 - 4.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  y para



los compuestos de zinc(II) el intervalo fue un orden de magnitud menor entre  $2.3 \times 10^4$  -  $4.7 \times 10^4$   $M^{-1}$ . De acuerdo con reportes en la literatura sobre  $K_b$  para compuestos de coordinación de níquel(II), cobre(II) y zinc(II) se ha encontrado que las interacciones más fuertes son las de apilamiento cuyos valores suelen estar en el orden de  $\sim 10^6$   $M^{-1}$ , seguidas por las interacciones con el surco menor ( $K_b \sim 10^5$   $M^{-1}$ ) y las interacciones electrostáticas son las más débiles ( $K_b \sim 10^4$   $M^{-1}$ ) [117,120]. El comportamiento observado durante este estudio fue el primer indicativo de interacciones con el surco menor del ADN para los compuestos de cobre(II) e interacciones electrostáticas para los compuestos de zinc(II).

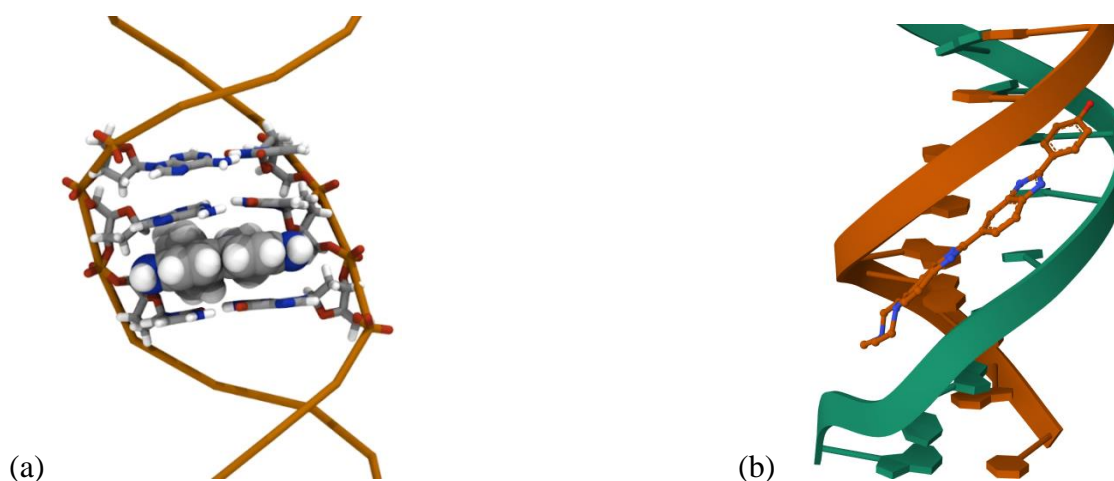
**Tabla 11.** Constantes de unión intrínseca  $K_b$  ( $M^{-1}$ ) para los compuestos de coordinación (10  $\mu M$ ), buffer cacodilato (pH = 7.25), 1 h de incubación; [ct-ADN]<sub>b</sub> (0-27  $\mu M$ ).

Compuesto	$K_b$	Compuesto	$K_b$
[Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	$7.3 \times 10^4$	[Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	$1.2 \times 10^5$
[Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$4.5 \times 10^5$	[Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$4.2 \times 10^5$
[Zn(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	$2.3 \times 10^4$	[Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	$3.5 \times 10^4$
[Zn(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$4.7 \times 10^4$	[Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$4.2 \times 10^4$

Los modos de unión de todos los compuestos se corroboraron por medio de espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular.

### *Espectroscopía de fluorescencia*

A través de la técnica de espectroscopía de fluorescencia se realizaron ensayos de desplazamiento competitivo con los aglutinantes bromuro de etidio (BE) y Hoechst 33258. Se sabe que el BE al intercalarse entre los pares de bases del ADN presenta una intensidad en fluorescencia a  $\lambda_{em} = 610$  nm cuando es excitado a  $\lambda_{ex} = 514$  nm, formando el aducto EB-ADN (Figura 36a). Por otro lado, el Hoechst 33258 se une de forma específica al surco menor del ct-ADN (Figura 36b) con una secuencia rica en A+T, emitiendo a  $\lambda_{em} = 458$  nm al ser excitado a  $\lambda_{ex} = 350$  nm [116,121,122].

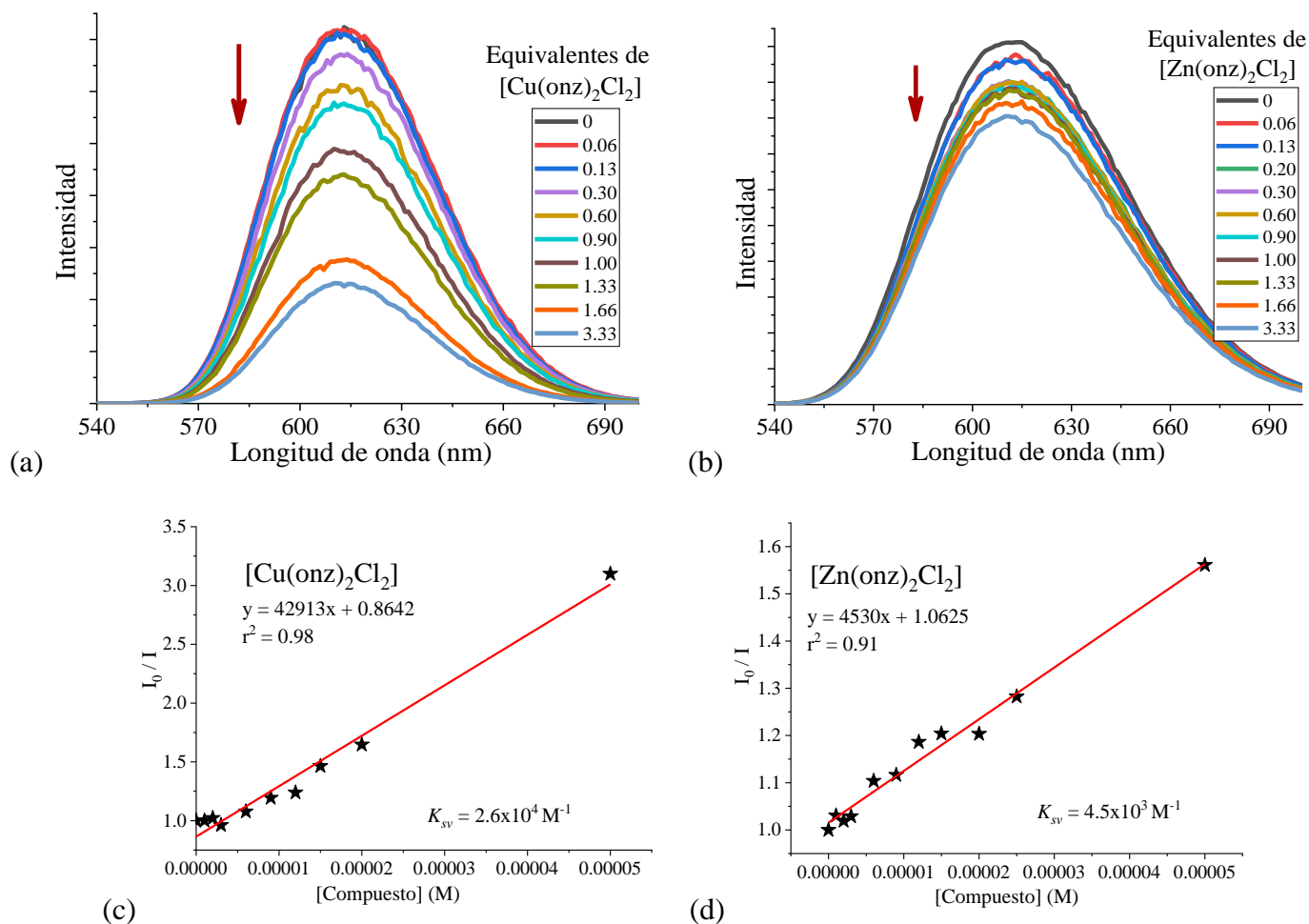


**Figura 36.** Formas de unión de: (a) bromuro de etidio [123] y (b) Hoechst 33258 [124] con ADN.

Para los ensayos competitivos se incubaron durante 30 min los respectivos aglutinantes ( $EB = 75 \mu M$  y  $Hoechst = 1.9 \mu M$ ) con ct-ADN ( $15 \mu M_b$ ); posteriormente, se añadieron concentraciones crecientes de los compuestos de coordinación ( $0-50 \mu M$ ). A partir de los espectros de fluorescencia obtenidos después de 1 h de incubación se calculó la constante de apagamiento de Stern-Volmer  $K_{sv}$  por medio de la ecuación 5; donde  $I_0$  e  $I$  corresponden a las intensidades de emisión en ausencia y presencia del compuesto de coordinación, respectivamente [116]. La grafica de linealidad indica el tipo de unión que se lleva a cabo entre la molécula y el ADN.

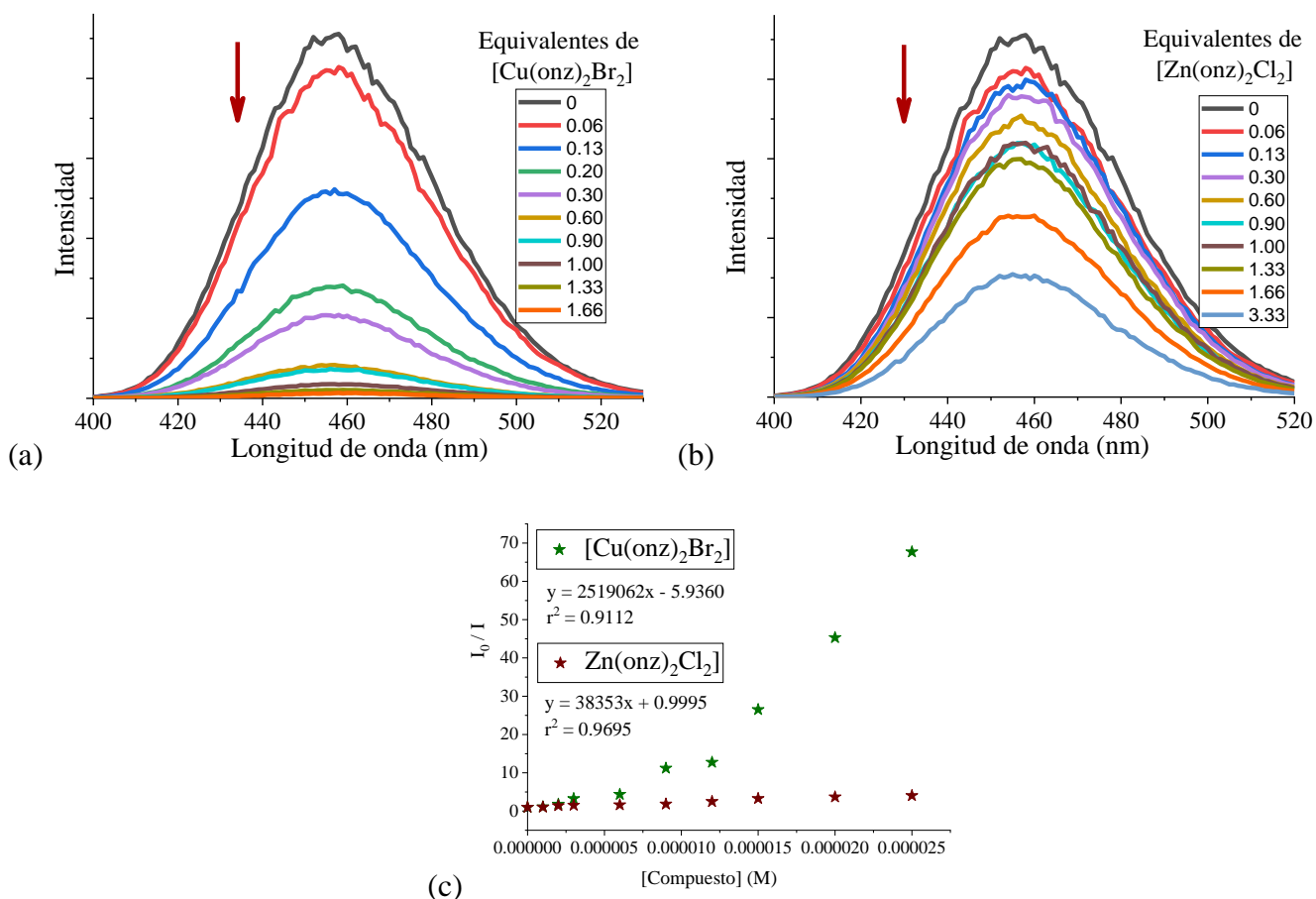
$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[\text{compuesto}] \quad \text{Ecuación 5}$$

En todos los espectros de emisión obtenidos (ANEXO VII) se observó que al incrementar la concentración de los compuestos de coordinación disminuía la fluorescencia del agente intercalante BE con ADN, en la Figura 37 se observa que para los compuestos de cobre(II) la disminución fue más significativa que para los compuestos de zinc(II). Este comportamiento se ve reflejado en las constantes de Stern-Volmer (Tabla 12) obtenidas a partir de las gráficas de  $I_0/I$  vs concentración (Figura 37c y d). Un mayor apagamiento de la fluorescencia indicaría un desplazamiento fuerte del BE, esto sucedería si los compuestos actuaran como intercalantes ocupando las mismas posiciones que el BE. Sin embargo, en este estudio la disminución de la fluorescencia ocasionada por los compuestos de cobre(II) indica un desplazamiento moderado, debido a que su modo de unión es con el surco menor del ADN lo que provoca deformaciones estructurales en la biomolécula que conducen a la expulsión del BE. Mientras que para los compuestos de zinc(II) el desplazamiento es menor porque no logran entrar a los surcos, quedando en el exterior del ADN interactuando con los grupos fosfato, lo cual no logra deformar lo suficiente su estructura para desplazar fuertemente al BE. Para los compuestos  $[Cu(\text{cenz})_2Cl_2]$  y  $[Zn(\text{cenz})_2Cl_2]$  no fue posible obtener las constantes  $K_{sv}$  debido a que no presentaron un comportamiento lineal.



**Figura 37.** Ensayos de desplazamiento competitivo para los aductos de BE-ADN con concentraciones crecientes de los compuestos (a)  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y (b)  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ ; (c) y (d) gráficas de Stern-Volmer  $I_0/I$  vs. [compuesto] (Incubación 1 h,  $[\text{EB}] = 75 \mu\text{M}$ ,  $\text{ct-DNA}_b = 15 \mu\text{M}$ ,  $[\text{compuesto}] = 0\text{-}50 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ , en buffer de cacodilato  $\text{pH} = 7.25$ ).

Por otro lado, en los ensayos con el aglutinante Hoechst 33258 (ANEXO VII) se observó que el apagamiento de la fluorescencia fue mucho mayor que con el BE, Figura 38. Los valores de  $K_{sv}$  para los compuestos de cobre(II) están en el intervalo de  $1.2 - 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (Tabla 12), lo cual nos ayuda a corroborar la propuesta de que el modo de unión para estos compuestos es a través de la interacción con el surco menor del ADN. Mientras que, los compuestos de zinc(II) al presentar valores dos órdenes de magnitud menores ( $3.8 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) indicando interacciones con los grupos fosfato.



**Figura 38.** Ensayos de desplazamiento competitivo para el aducto de Hoechst 33258 con ADN con concentraciones crecientes de los compuestos (a) [Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] y (b) [Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; (c) gráficas de Stern-Volmer  $I_0/I$  vs [compuesto] (Incubación 1h, [Hoechst] = 75  $\mu$ M, ct-DNA<sub>b</sub> = 30  $\mu$ M, [compuesto] = 0-50  $\mu$ M,  $\lambda_{exc}$  = 350 nm y  $\lambda_{em}$  = 458 nm en buffer de cacodilato pH = 7.25).

**Tabla 12.** Constante de apagamiento de fluorescencia Stern-Volmer  $K_{SV}$  ( $M^{-1}$ ) para los compuestos de coordinación con BE (75  $\mu$ M) y Hoechst 33258 (1.9  $\mu$ M), buffer cacodilato (pH = 7.25), 1 h de incubación; [ADN]<sub>b</sub> = 15  $\mu$ M.

Compuesto	Bromuro de etidio $K_{SV}$	Hoechst 33258 $K_{SV}$	Compuesto	Bromuro de etidio $K_{SV}$	Hoechst 33258 $K_{SV}$
[Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	---	$1.6 \times 10^6$	[Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	$2.6 \times 10^4$	$1.2 \times 10^6$
[Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$3.5 \times 10^4$	$2.1 \times 10^6$	[Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$4.3 \times 10^4$	$2.5 \times 10^6$
[Zn(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	---	$6.1 \times 10^4$	[Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	$4.5 \times 10^3$	$3.8 \times 10^4$
[Zn(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$1.1 \times 10^3$	$1.2 \times 10^5$	[Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	$2.6 \times 10^3$	$4.8 \times 10^4$

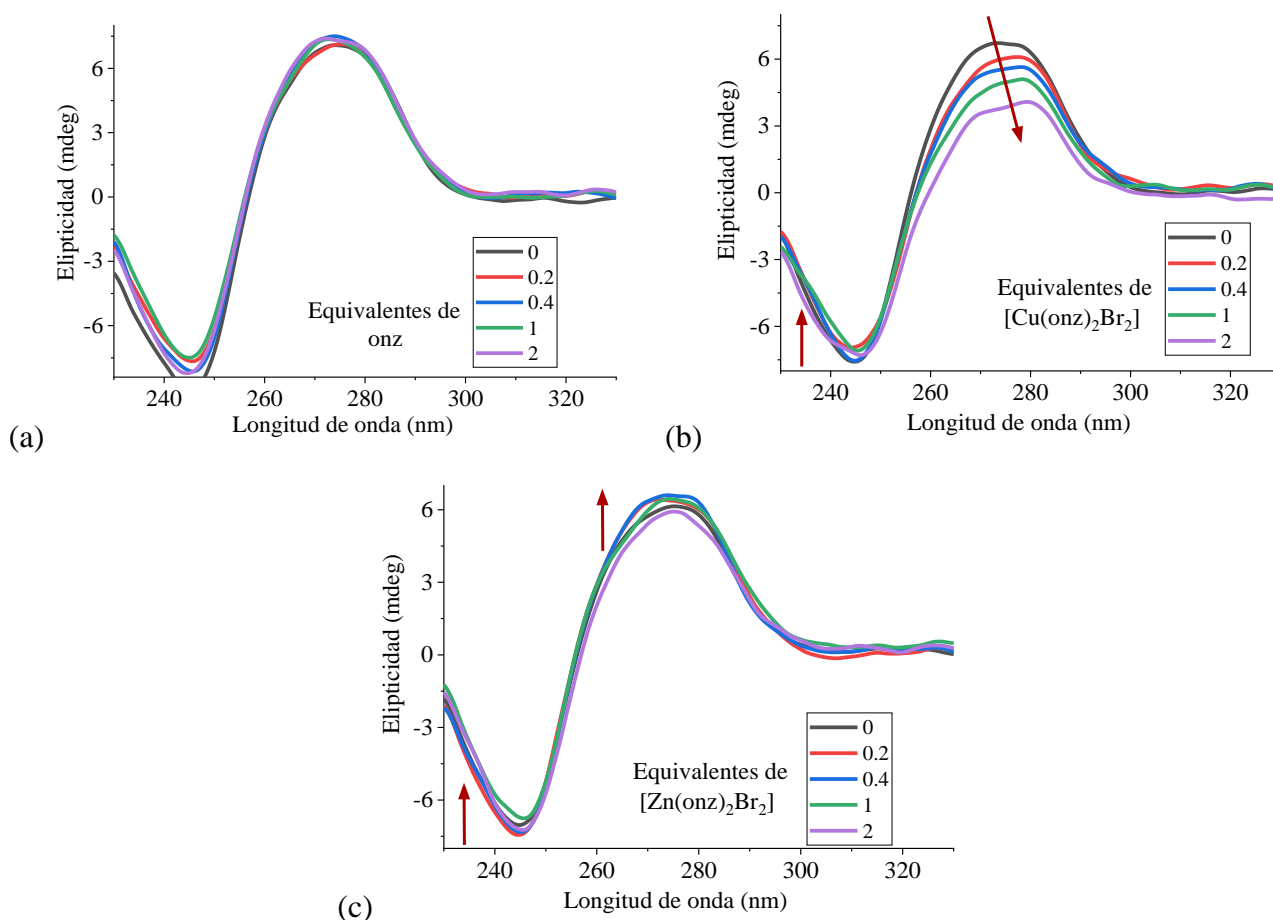




### Dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) es una técnica sensible utilizada para analizar los cambios conformacionales que presenta el ADN en presencia de los compuestos de coordinación. El espectro de DC del ct-ADN libre muestra una banda positiva a 275 nm debida a sus interacciones de apilamiento, y una banda negativa a 245 nm correspondiente al movimiento helicoidal dextrógiro de la forma B del ADN. Estas bandas se modifican dependiendo del tipo de interacción que presenten con las moléculas. Las interacciones por intercalación incrementan la intensidad de ambas bandas debido a un incremento en la estabilidad de la doble hélice; mientras que interacciones electrostáticas o con el surco menor tienden a disminuir la intensidad, debido a la pérdida de la forma helicoidal y de los apilamientos entre bases [116,118,121].

Los espectros de DC para los ligantes *onz* y *onz* libres y para los compuestos de coordinación (Figura 39, ANEXO VIII) fueron obtenidos manteniendo la concentración de ct-ADN constante ( $50 \mu\text{M}_b$ ) y con una relación  $[\text{compuesto}]/[\text{ADN}] = 0, 0.2, 0.4, 1$  y  $2$ .



**Figura 39.** Espectros de dicroísmo circular de ct-ADN ( $50 \mu\text{M}_b$ ) con incrementos en la concentración de (a) *onz*, (b)  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  y (c)  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  en buffer de cacodilato ( $\text{pH} = 7.25$ ), incubación 1 h a  $37^\circ\text{C}$ .



Durante el estudio se observó que los ligantes *cen*z y *onz* no provocaron cambios significativos en el espectro del ct-ADN, lo cual se debe a que no existen interacciones que modifiquen su estructura. Sin embargo, se observó que al incrementar la concentración de compuestos de cobre(II) disminuyó la intensidad de las bandas negativa y positiva, esta última también presentó un efecto batocrómico importante, es decir un desplazamiento en la posición de la banda. En el ANEXO VIII se presentan los espectros de dicroísmo circular de los compuestos.

Debido a los ensayos realizados por las técnicas de espectroscopía de UV-Vis, fluorescencia (desplazamiento competitivo) y dicroísmo circular fue posible determinar que el modo de unión de los compuestos de coordinación depende del átomo metálico, ya que los compuestos de cobre(II)  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$   $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  tienen una preferencia de unión al surco menor del ADN, independientemente del ligante (*cen*z, *onz*). Mientras que los compuestos de zinc(II)  $[\text{Zn}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$   $[\text{Zn}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  se unen mediante interacciones con los grupos fosfato del ADN.

Se propone que las diferencias en los modos de unión entre cobre(II) y zinc(II) se deban a que, como se explicó en los estudios de difracción de rayos X, la geometría que adopta el centro metálico en el compuesto  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$  tiende a plano cuadrado, generando que los ligantes *cen*z y *onz* adquieran una conformación extendida. Esto le permite al compuesto entrar más fácilmente a los surcos y interactuar con el ADN a través de las interacciones  $lp \cdots \pi$ ,  $lp \cdots$  hueco  $\pi$  y puentes de hidrógeno observadas en el estudio estructural. Por el contrario, en la estructura del compuesto  $[\text{Zn}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$  se observó para el átomo de zinc(II) una geometría tetraédrica regular que obliga a los ligantes a estar en una conformación menos extendida, por impedimento estérico estos compuestos permanezcan en el exterior del ADN interactuando con los grupos fosfato. Estudios de Dinámica Molecular para compuestos de coordinación de cobre con el ligante tinidazol han demostrado que el primer sitio de reconocimiento son los grupos fosfato y posteriormente su interacción con los surcos [57].

Es importante mencionar que en metaloenzimas de zinc(II) la capacidad de polarización del átomo metálico y sus propiedades ácido base son cruciales para los ciclos catalíticos. Por ejemplo, en la enzima fosfatasa alcalina estas propiedades del átomo de zinc(II) son importantes para favorecer la ruptura de los enlaces fosfodiéster en el ADN [7,16]. Por lo cual, los grupos fosfato son de forma natural importantes sitios de reconocimiento para el zinc(II).

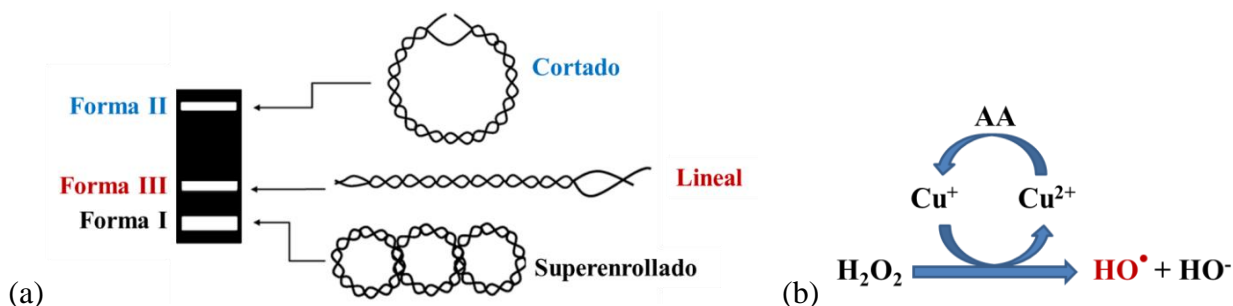
Los estudios por espectroscopía electrónica y RMN realizados en este proyecto demuestran que las geometrías se conservan en disolución. Sin embargo, sería de interés realizar estudios de Dinámica Molecular que ayuden a corroborar los datos experimentales y la propuesta del mecanismo.



## Electroforesis en gel

La electroforesis en gel de agarosa es un método eficaz para identificar fragmentos de ADN de distintos tamaños, debidos a escisiones provocadas por moléculas pequeñas y como método para investigar los modos de unión de compuestos al ADN. La cadena de fosfatos de la biomolécula se encuentra cargada negativamente; por lo cual, al cargar la muestra en el gel y aplicar una corriente eléctrica los fragmentos migran hacia el ánodo cargado positivamente. Además, esta migración se debe a factores como el tamaño y conformación del ADN, así como la concentración de agarosa, el voltaje aplicado, el tipo de agarosa y el tampón utilizado. Después de la separación, los fragmentos pueden visualizarse bajo luz ultravioleta al teñir el gel con un colorante [125].

Para este estudio se utilizó un plásmido de ADN; es decir, con una conformación superenrollada, en la cual los extremos de la cadena de doble hélice están unidos. Este plásmido puede presentar diferentes formas dependiendo del daño que le provoqué la exposición a un compuesto (Figura 40a). La Forma I del plásmido corresponde a su conformación superenrollada, la cual migra con mayor facilidad a través del gel; la Forma II permanece circular aunque no superenrollada, se observa cuando la interacción con el compuesto ha provocado un corte en una hebra del plásmido otorgándole la migración más lenta a través del gel por lo que se observa en la parte superior; finalmente, la Forma III es lineal y se presenta cuando se cortan ambas hebras del plásmido, su migración a través del gel se encuentra entre las formas I y II [117].

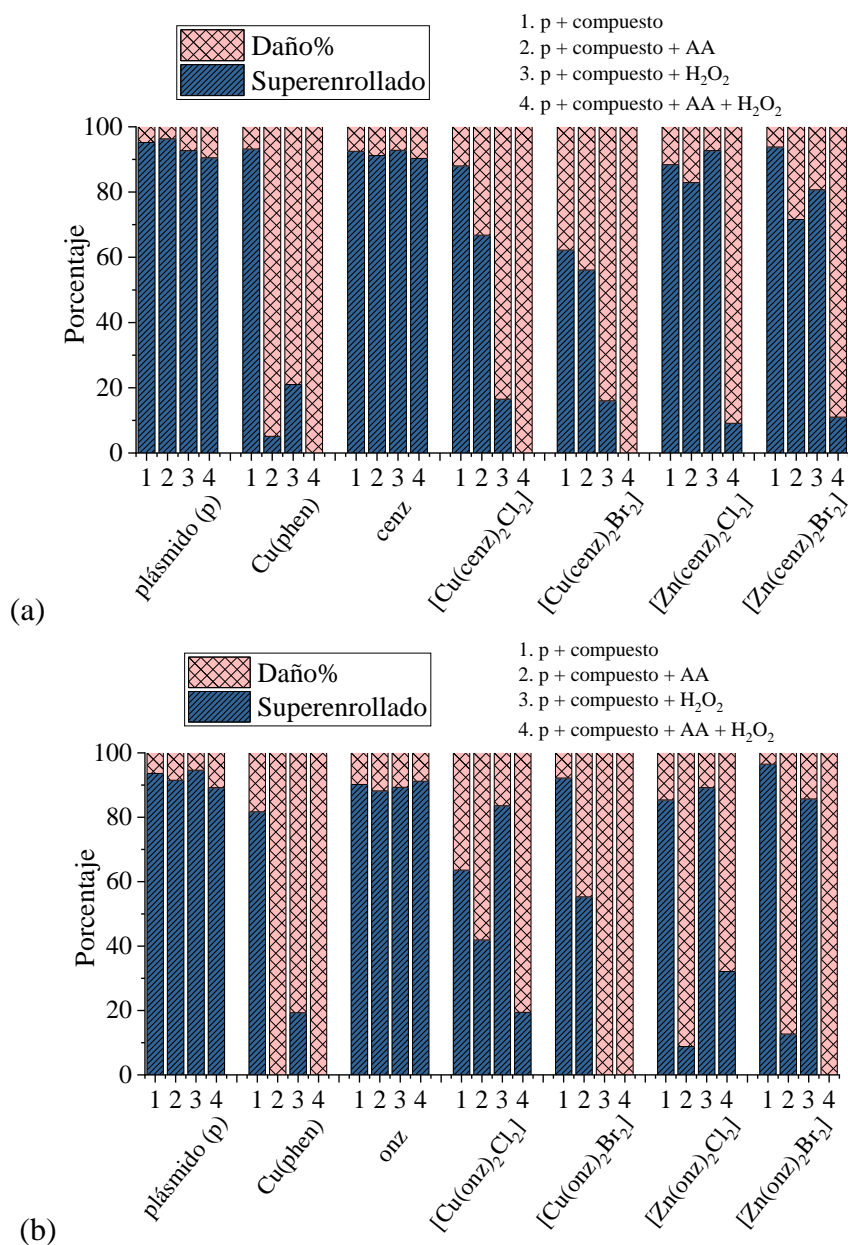


**Figura 40.** (a) Formas observadas del plásmido pBR322 mediante electroforesis en gel y b) reacciones esperadas para un compuesto de cobre en presencia de ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno.

Durante este ensayo se utilizó el plásmido pBR322 a una concentración de  $15 \mu\text{M}_{\text{pb}}$  incubado durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con disoluciones en cacodilato ( $\text{pH} = 7.5$ ) de los ligantes *cen*, *onz* y sus compuestos de coordinación de cobre(II) y zinc(II) ( $10$  y  $50 \mu\text{M}$ ). El compuesto  $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$  se usó como referencia debido a su capacidad de ruptura al ADN [121]. Adicionalmente, se añadió ácido ascórbico (AA)  $50 \mu\text{M}$  para favorecer la reducción de cobre(II) a cobre(I) y peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente generador de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la reoxidación de cobre(I) a cobre(II) de acuerdo al esquema presentado en la Figura 40b. Estos estudios se realizaron con la finalidad de estudiar un posible mecanismo de acción *via* redox para los compuestos de cobre(II) mediante una reacción tipo Fenton que pudiera contribuir en la actividad biológica comparado con los compuestos de zinc(II) que no poseen esas propiedades redox.



Durante los ensayos, el control de plásmido de ADN presentó un porcentaje de 93.60% de Forma I y alrededor de 5.9% de Forma II. Además, se utilizaron tres controles que corresponden al plásmido en presencia de AA o de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en presencia de ambos (AA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en todos los casos el porcentaje de ADN superenrollado se mantuvo por encima del 89% por lo que se considera que estos reactivos no dañan significativamente al plásmido en las condiciones utilizadas. En el ANEXO IX se presentan los porcentajes de Forma I y de Forma II de ADN observados en presencia de todos los compuestos de coordinación y de AA y/o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cada porcentaje se calculó con respecto al control correspondiente, en la Figura 41 se muestra una gráfica con los datos obtenidos a 10 μM.



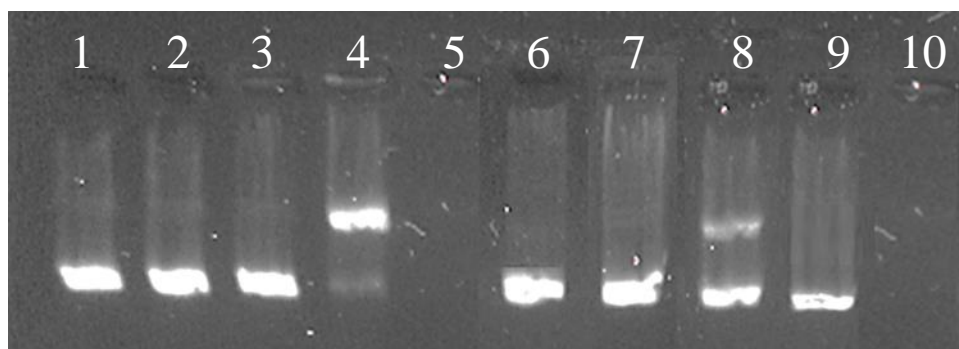
**Figura 41.** Porcentajes de ADN superenrollado y dañado en presencia de los ligantes (a) cenz y (b) onz y sus compuestos de coordinación a una concentración 10 μM, en presencia de ácido ascórbico (50 μM) y peróxido de hidrógeno (50 μM).



Los ligantes *cen*z y *onz* se estudiaron a una concentración de 50  $\mu$ M, en ambos casos se encontró que el porcentaje de ADN superenrollado se mantuvo por encima de 89.30%, por lo que se concluye que los ligantes libres no son capaces de dañar al plásmido por sí mismos.

Por otro lado, se encontró que los compuestos de cobre(II) sí dañan considerablemente al ADN en una concentración de 10  $\mu$ M; por ejemplo, con  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$  se obtuvo un porcentaje de Forma I de ADN de 63.60% y 62.20%, respectivamente. El resto de ADN ha sido dañado por cortes en las hebras debidos a los compuestos de coordinación, este comportamiento se puede relacionar con los resultados obtenidos por las técnicas de UV-Vis, fluorescencia y dicroísmo circular, en los cuales se encontró que los compuestos son capaces de dañar a la biomolécula a través de uniones con el surco menor.

Cuando se añade ácido ascórbico al medio la cantidad de Forma I de ADN disminuye a 41.90% y 56.10% para  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$ , respectivamente. Finalmente, en presencia tanto de AA como de  $\text{H}_2\text{O}_2$  solo se observa el 19.20% de la Forma I para  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ ; mientras que, con  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$  ya no se observa al ADN, lo cual indica que el compuesto lo ha dañado por completo (Figura 41). Este comportamiento fue similar para  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$  (Figura 41 y ANEXO IX). Se propone que el incremento en el daño al ADN se debe a la reducción de cobre(II) a cobre(I). Para la concentración de 50  $\mu$ M se observa ~66.20% de Forma I cuando solo se añaden los compuestos de cobre(II); sin embargo, al añadir AA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al medio el porcentaje de daño es de 100%. En la Figura 42 se muestra el gel que corresponde al estudio del compuesto  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  (10  $\mu$ M).



**Figura 42.** Imagen de electroforesis en gel de agarosa del plásmido pBR322 15  $\mu$ M incubado 1 h a 37°C en cacodilato (pH = 7.25) con *onz* (50  $\mu$ M),  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  10  $\mu$ M, AA 50  $\mu$ M,  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu$ M.

Carril 1: plásmido (p); Carril 2: p + AA; Carril 3: p + AA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Carril 4: p +  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$  + AA;

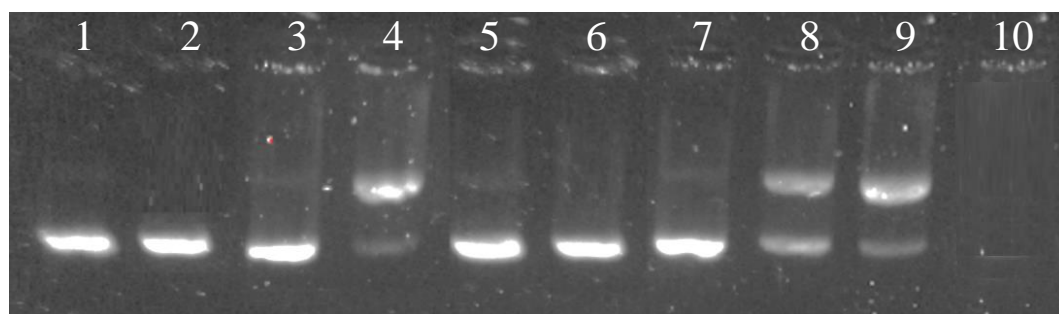
Carril 5: p +  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$  + AA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Carril 6: p + *onz*; Carril 7: p + *onz* + AA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;

Carril 8: p +  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ ; Carril 9: p +  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  + AA; Carril 10: p +  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  + AA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Para los compuestos de zinc(II), a una concentración de 50  $\mu\text{M}$   $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  fueron capaces de dañar al plásmido por sí mismos exhibiendo un porcentaje de Forma I de 67.10% y 79.20%, respectivamente. Es importante mencionar que los compuestos de cobre(II) muestran este daño desde 10  $\mu\text{M}$ ; mientras que para los derivados de zinc(II) se requiere una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , esto se debe a que las interacciones electrostáticas con ADN que se observaron por las técnicas espectroscópicas son más débiles y se requiere una mayor concentración de compuesto para provocar un daño significativo.

Inesperadamente, al añadir ácido ascórbico con los compuestos de zinc(II) se observó un incremento en el daño al plásmido. Con el compuesto  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  el ADN solo mostró 19.40% de Forma I y para  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  ya no fue posible observarlo; en ambos casos al añadir AA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  el daño al plásmido fue del 100%. Comportamientos similares se observaron para  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  (ANEXO IX). En la Figura 43 se presenta como ejemplo el gel obtenido en el estudio del compuesto  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ .



**Figura 43.** Imagen de electroforesis en gel de agarosa del plásmido pBR322 15  $\mu\text{M}$  incubado 1 h a 37°C en cacodilato (pH = 7.25) con cenz (50  $\mu\text{M}$ ),  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  50  $\mu\text{M}$ , AA 50  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$ . Carril 1: plásmido (p); Carril 2: p + AA; Carril 3: p +  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$ ; Carril 4: p +  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$  + AA; Carril 5: p + cenz; Carril 6: p + cenz + AA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Carril 7: p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ; Carril 8: p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  + AA; Carril 9: p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Carril 10: p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  + AA +  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Se propone que el daño al ADN observado por electroforesis se debe a la formación del radical  $-\text{NO}_2^{\cdot-}$  presente en los ligantes cenz y onz en los compuestos de coordinación. Para corroborar esta hipótesis se realizaron estudios de voltamperometría cíclica, los cuales se discuten en la siguiente sección.



## Capítulo 11 Estudios electroquímicos por voltamperometría cíclica

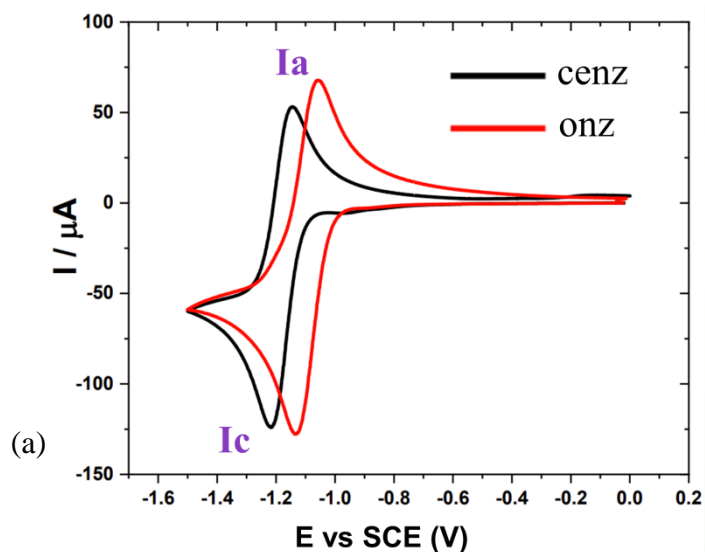
Desde el descubrimiento de la actividad biológica de los derivados orgánicos del 5-nitroimidazol ha sido de interés estudiar su mecanismo de acción. Como se mencionó en el Capítulo 2, hoy en día sabemos que el mecanismo involucra la reducción del grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ) hasta la amina correspondiente ( $-\text{NH}_2$ ) pasando por los intermediarios anión radical nitro ( $-\text{NO}_2^{\cdot-}$ ), nitroso ( $-\text{N}=\text{O}$ ) e hidroxilamina ( $-\text{NHOH}$ ) los cuales son capaces de dañar el ADN de las bacterias o parásitos provocando la muerte celular [38,44].

En estudios previos ha sido posible determinar los potenciales de reducción del grupo nitro para la formación de la especie  $-\text{NO}_2^{\cdot-}$  en los ligantes libres tinidazol ( $-1.32 \text{ V vs NHE}$ ) y ornidazol ( $-1.024 \text{ V vs NHE}$ ), también se ha observado que estos potenciales no varían considerablemente en sus compuestos de coordinación de cobalto(II), cobre(II) y zinc(II) [56,60].

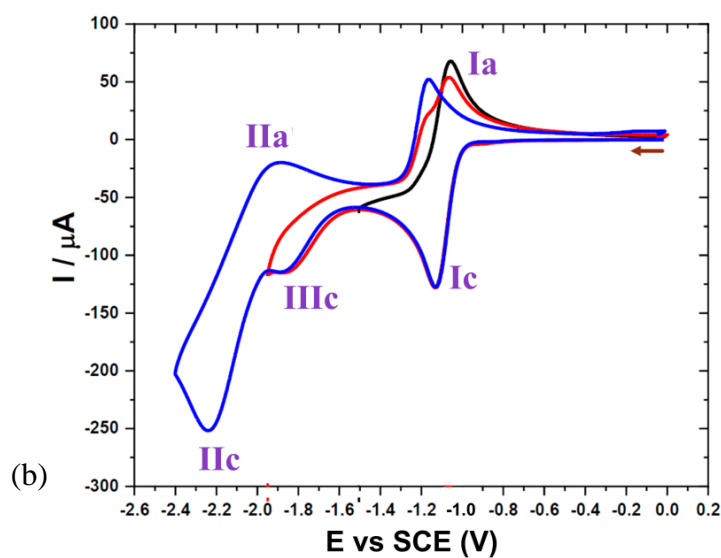
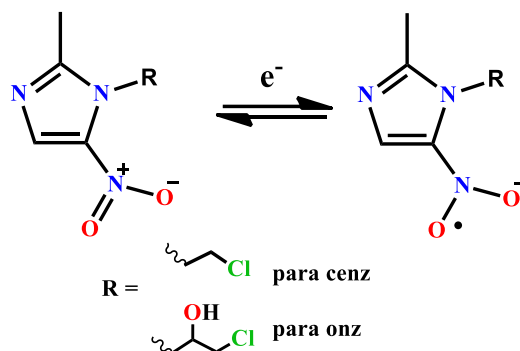
Para analizar el comportamiento redox de los ligantes *cen*z, *onz* y de sus compuestos de coordinación con cobre(II) y zinc(II) se realizaron estudios de voltamperometría cíclica en una celda de tres electrodos; electrodo auxiliar (EA) de platino, electrodo de trabajo (ET) de carbón vítreo y electrodo de referencia (ER) de calomel saturado. Los experimentos se realizaron utilizando hexafluorofosfato de tetrabutilamonio ( $\text{TBAPF}_6$  0.1 M) como electrolito soporte y acetonitrilo anhidro como disolvente. A continuación, se describen los resultados obtenidos con respecto al electrodo de calomel saturado (SCE), entre paréntesis se indican los valores con respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE).

En la Figura 44a se comparan los voltamperogramas obtenidos de los ligantes libres *cen*z y *onz* con respecto al SCE. Los picos indicados como  $I_a$  corresponden al potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) y como  $I_c$  al potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ). Para el ligante *cen*z estos valores se obtuvieron en  $E_{pa} = -1.145 \text{ V}$  y  $E_{pc} = -1.218 \text{ V}$ , con un potencial de media onda  $E_{1/2} = -1.182 \text{ V}$  ( $-1.423 \text{ V vs NHE}$ ) del par  $-\text{NO}_2/-\text{NO}_2^{\cdot-}$  en un sistema químicamente reversible y electroquímicamente cuasi reversible, esto último se debe a que la diferencia entre el potencial de pico catódico y el potencial de pico anódico ( $\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa}$ ) es mayor a 58 mV, como se muestra en la Tabla 13. El cociente de las intensidades de pico anódico y pico catódico ( $I_{pa}/I_{pc}$ ) dio un valor de 0.784 lo cual nos indica la presencia de otros procesos que están ocurriendo en el medio. Para el ligante *onz* se obtuvo un comportamiento similar para el par  $-\text{NO}_2/-\text{NO}_2^{\cdot-}$ , obteniendo un valor de  $E_{1/2} = -1.095 \text{ V}$  ( $-1.336 \text{ V vs NHE}$ ) y de  $I_{pa}/I_{pc} = 0.814$ , los valores obtenidos se comparan en la Tabla 13.

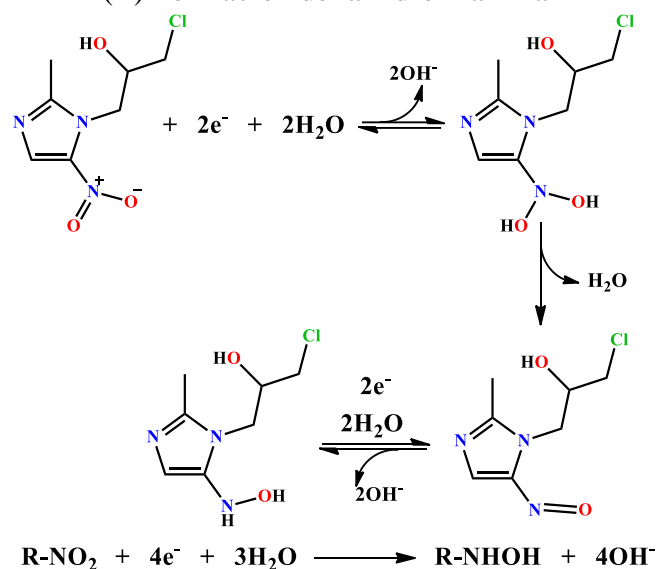




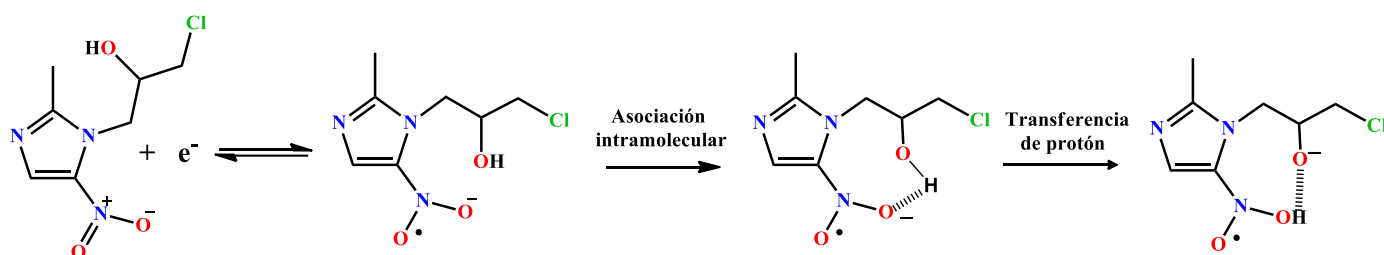
(I) Formación del radical anión nitro



(II) Formación de la hidroxilamina



(III) Asociación intramolecular



**Figura 44.** Voltamperogramas obtenidos en acetonitrilo anhidro con TBAPF<sub>6</sub> (0.1 M), EA: Platino, ET: carbón vítreo, ER: calomel saturado, para (a) el par -NO<sub>2</sub>/<sup>-</sup>NO<sub>2</sub> en cenz (4.22 mM) y onz (5.05 mM), (b) el par -NO<sub>2</sub>/<sup>-</sup>NHOH y asociación intramolecular del onz.



**Tabla 13.** Valores de potencial vs SCE encontrados por voltamperometría cíclica para los ligantes *cen*z y *onz* y sus compuestos de coordinación de cobre(II).

Especie	Pico	<i>cen</i> z			[Cu( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]			[Cu( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]		
		E <sub>p</sub> (V)	ΔE <sub>p</sub> (mV)	E <sub>1/2</sub> (V)	E <sub>p</sub> (V)	ΔE <sub>p</sub> (mV)	E <sub>1/2</sub> (V)	E <sub>p</sub> (V)	ΔE <sub>p</sub> (mV)	E <sub>1/2</sub> (V)
-NO <sub>2</sub> /-NO <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ia	-1.145	73	-1.182	-1.146	82	-1.187	-1.146	87	-1.189
	Ic	-1.218			-1.228			-1.233		
-NO <sub>2</sub> /-NHOH	IIa	-1.792	415	-1.999	-1.893	429	-2.108	-1.921	424	-2.133
	IIc	-2.207			-2.322			-2.345		
Cu <sup>II</sup> /Cu <sup>I</sup>	IVa	---	---	---	0.548	104	0.496	0.597	117	0.539
	IVc	---			0.444			0.480		
Especie	Pico	<i>onz</i>			[Cu( <i>onz</i> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]			[Cu( <i>onz</i> ) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]		
		E <sub>p</sub> (V)	ΔE <sub>p</sub> (mV)	E <sub>1/2</sub> (V)	E <sub>p</sub> (V)	ΔE <sub>p</sub> (mV)	E <sub>1/2</sub> (V)	E <sub>p</sub> (V)	ΔE <sub>p</sub> (mV)	E <sub>1/2</sub> (V)
-NO <sub>2</sub> /-NO <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ia	-1.057	76	-1.095	-1.158	88	-1.202	-1.155	83	-1.197
	Ic	-1.133			-1.246			-1.238		
-NO <sub>2</sub> /-NHOH	IIa	-1.894	347	-2.068	-2.015	276	-2.153	-1.918	367	-2.102
	IIc	-2.241			-2.291			-2.285		
Cu <sup>II</sup> /Cu <sup>I</sup>	IVa	---	---	---	0.552	116	0.494	0.565	79	0.525
	IVc	---			0.436			0.486		

E<sub>p</sub>:Potencial del pico; E<sub>1/2</sub>: Potencial de media onda; ΔE<sub>p</sub> = E<sub>pc</sub>-E<sub>pa</sub>



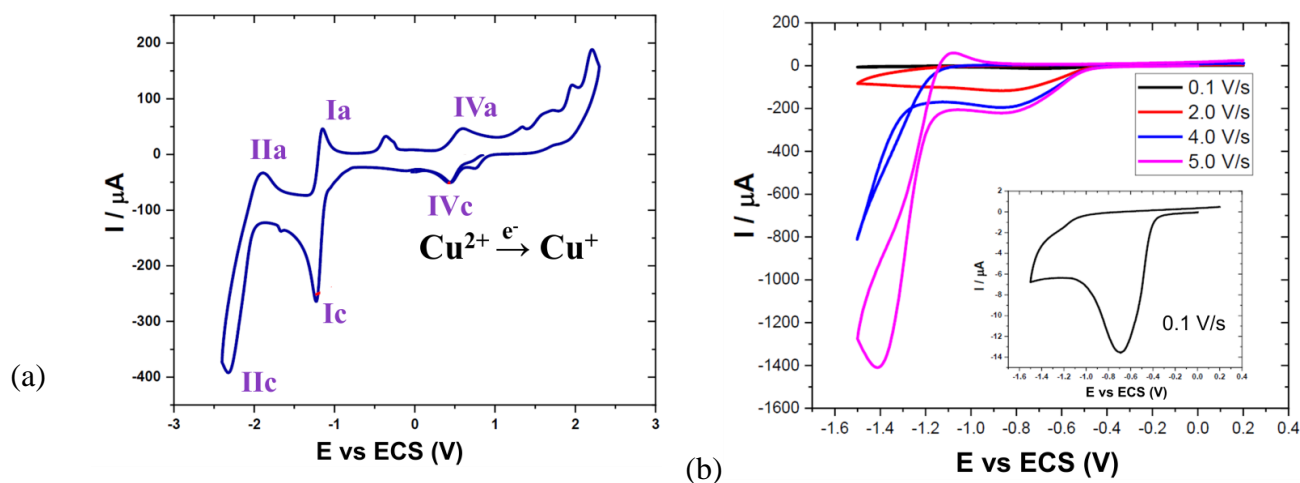


Con la finalidad de encontrar los otros procesos que se llevan a cabo, se realizaron experimentos hacia potenciales más negativos. En la Figura 44b se muestran tres voltamperogramas para el onz con diferentes ventanas electroquímicas, se indican como IIa y IIc los picos anódico y catódico que corresponden al proceso global de formación de la hidroxilamina  $-\text{NO}_2^-/\text{NHOH}$  *via* 4 electrones y 4 protones que provienen de las trazas de agua del disolvente a un potencial  $E_{1/2} = -2.068$  V. Para el ligante *cen*z se observó un comportamiento similar para el par  $-\text{NO}_2^-/\text{NHOH}$  con un potencial  $E_{1/2} = -2.240$  V, en la Tabla 13 se muestran los valores obtenidos.

Adicionalmente, para el ligante *onz* se observó un pico catódico IIIc en  $-1.884$  V que corresponde a una asociación intramolecular entre el radical  $-\text{NO}_2^{\cdot-}$  y el grupo alcohol de la cadena alquílica (Figura 44b). Esto sucede porque una vez que se forma el radical  $-\text{NO}_2^{\cdot-}$  se favorecen las condiciones electrónicas para que la cadena alquílica pueda girar y formar un puente de hidrógeno intramolecular entre el protón del alcohol y el átomo de oxígeno del grupo nitro. Esta asociación le confiere una estabilidad adicional al radical, lo cual puede explicar que los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  hayan presentado una mayor actividad antiparasitaria comparada con los compuestos de *cen*z, ya que mediante este mecanismo se estaría favoreciendo la generación y estabilidad del radical nitro que daña a las biomoléculas del *Toxoplasma gondii*.

En el caso de los compuestos de coordinación de cobre(II) se encontró que la presencia del metal no modifica considerablemente los potenciales de media onda del radical nitro, ni de la hidroxilamina con respecto a los ligantes libres (Tabla 13). En la Figura 45a se observa el voltamperograma obtenido para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$ , al igual que en el ligante libre se observan los picos Ic-Ia que corresponden al par  $-\text{NO}_2^-/\text{NO}_2^{\cdot-}$  y los picos IIc-IIa corresponden al proceso global de formación de la hidroxilamina  $-\text{NO}_2^-/\text{NHOH}$ . Adicionalmente, se obtuvieron los picos anódico y catódico IVc y IVa que corresponden a la reducción del centro metálico  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ . En la Tabla 13 se presentan los potenciales de media onda para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cen}z)_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  asociados a la reducción del metal los cuales se encuentran en el intervalo de  $0.539 - 0.588$  V ( $0.253 - 0.347$  V *vs* NHE). El efecto sinérgico entre la reducción del grupo nitro y la reducción del cobre(II) estaría favoreciendo el daño al ADN observado por electroforesis en gel y la actividad contra *T. gondii*.

Finalmente, para los compuestos de zinc(II) se encontró que la reducción del grupo nitro está acoplada a la reducción del  $\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Zn}^0$ , posiblemente por fenómenos de nucleación del metal por electrodeposición de  $\text{Zn}^0$  en el electrodo de carbón vítreo [126]. Esta reacción se puede desacoplar aumentando la velocidad de barrido entre 5 y 10 V/s para todos los compuestos de zinc(II).



**Figura 45.** Voltamperogramas obtenidos en acetonitrilo anhidro con TBAPF<sub>6</sub> (0.1 M); EA: Platino, ET: carbón vítreo, ER: calomel saturado, para (a) [Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (4.0 mM), (b) [Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (4.0 mM) a diferentes velocidades de barrido.

En la Figura 45b se muestran los voltamperogramas obtenidos para [Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] a diferentes velocidades de barrido; se puede observar que a 5 V/s es posible desacoplar la reducción del grupo nitro y obtener el valor del potencial de media onda para -NO<sub>2</sub>/-NO<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Al igual que en los compuestos de cobre(II) se encontró que este potencial no se modifica considerablemente en comparación con el ligante libre para [Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (-1.227 V), [Zn(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (-1.223 V), [Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (-1.171 V) y [Zn(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (-1.170 V). Sin embargo, como se observa en metaloenzimas oxidorreductasas, los potenciales de reducción están influenciados no solo por el par redox, sino también por los ligantes y toda la matriz proteica, por lo que no se descarta la posibilidad de que en presencia de ADN o de alguna proteína del *T. gondii* los potenciales de los pares -NO<sub>2</sub>/-NO<sub>2</sub><sup>•-</sup>, -NO<sub>2</sub>/-NHOH y Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup> se vean modificados, favoreciendo los procesos de reducción y con ello la actividad biológica.

A través de los estudios realizados por voltamperometría cíclica se encontró que el grupo nitro presente en los ligantes cenz y onz puede ser reducido para formar el anión radical -NO<sub>2</sub>/-NO<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Si bien los potenciales de estos ligantes no varían en su forma libre o coordinada es posible que por efecto sinérgico de la reducción de Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup> la actividad biológica aumente en los compuestos de coordinación [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] y [Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]. De igual forma fue posible encontrar los potenciales para la formación de la hidroxilamina -NO<sub>2</sub>/-NHOH, tanto en los ligantes libres como en los compuestos de cobre(II), lo cual también contribuye en el daño al ADN.

Como perspectivas sobre estos estudios, es de interés realizar un análisis electroquímico profundo para poder explicar de manera más detallada el mecanismo de reducción que estarían favoreciendo los compuestos de zinc(II). También es importante hacer un análisis sobre los demás picos que se observaron en los voltamperogramas, los cuales podrían estar asociados a la oxidación del imidazol, la oxidación de los halógenos (Br<sup>-</sup>/Br<sub>2</sub>) y otros procesos de reducción del átomo metálico (Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>0</sup>, Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>0</sup>).



## Conclusiones

De acuerdo con la hipótesis planteada en este proyecto, la formación de compuestos de coordinación con los metales cobre(II) y zinc(II) sí mejoró la actividad biológica contra el *T. gondii* comparada con los ligantes libres y las sales metálicas de partida, debido a efectos sinérgicos entre las propiedades de los ligantes y de los metales.

El átomo de cloro y el grupo alcohol de la cadena alquílica en los ligantes *cenz* y *onz* contribuyeron en la solubilidad de los compuestos de coordinación; mientras que, con los compuestos derivados del ligante *1mnz* no se pudo continuar con el estudio biológico debido a la insolubilidad que presentaron. Adicionalmente, el grupo alcohol en el *onz* permite una interacción intramolecular por puente de hidrógeno con el grupo nitro que favorece la estabilidad del radical  $\text{-NO}_2^{\cdot-}$ .

La caracterización por difracción de rayos X permitió observar la versatilidad del grupo nitro para actuar como donador o aceptor de electrones en la formación de interacciones no covalentes por  $\text{libre}\cdots\pi$  o  $\text{libre}\cdots\text{hueco } \pi$ . Se propone que es a través de estas interacciones que los compuestos de coordinación interactúan con el ADN. En este análisis también se observó que la cadena alquílica contribuye en la formación de puentes de hidrógeno débiles.

Los valores de  $\text{Log } D_{7.4}$  para los compuestos de coordinación en el intervalo de 0.56 – 0.95 indicaron un buen equilibrio entre la solubilidad del compuesto y su permeabilidad a la membrana celular. Estos datos son de gran interés ya que el *T. gondii* es un parásito intracelular obligado y los fármacos activos deben ser capaces de atravesar la membrana de la célula hospedera; además, el parásito posee cuatro membranas que en general resultan difíciles de permear por los fármacos actuales. Es posible que los compuestos de coordinación puedan interactuar con las proteínas de membrana del parásito y causar daño oxidativo, como perspectiva del proyecto es de interés realizar estudios con proteínas que puedan favorecer la reducción del grupo nitro; por ejemplo, los citocromos o las ferredoxinas. Además, es importante que durante las observaciones clínicas realizadas en los estudios de toxicidad aguda los compuestos de coordinación no produjeron efectos secundarios como el fármaco estándar contra la toxoplasmosis.

En los estudios de interacción con el ADN se observó que independientemente del ligante, los compuestos de cobre(II) se unen al surco menor de la biomolécula; esto se debe a la geometría que adopta el centro metálico, que tiende a cuadrado plano, permitiendo a los ligantes adquirir una conformación extendida. Mientras que, los compuestos de zinc(II) tienen una gran afinidad por los grupos fosfato, debido al carácter ácido base del metal y por el impedimento estérico de la geometría tetraédrica.



El daño oxidativo observado mediante los estudios de electroforesis en gel se debe principalmente a la generación del radical  $\text{-NO}_2^{\bullet}$ . Los estudios de voltamperometría cíclica mostraron que los potenciales de reducción del par  $\text{-NO}_2/\text{-NO}_2^{\bullet}$  no se modifican en los ligantes libres y en los compuestos de coordinación. Sin embargo, es posible que en medios biológicos si existen variaciones, por lo que se debe realizar un estudio electroquímico profundo, a un pH fisiológico y en presencia de ADN.

Finalmente, se propone que la actividad de los compuestos de coordinación se debe a un mecanismo concertado entre el reconocimiento de los compuestos de coordinación por el ADN a través de interacciones no covalentes y la subsecuente reducción del grupo nitro para la formación del radical  $\text{-NO}_2^{\bullet}$ ; adicionalmente, en el caso de los compuestos de coordinación de cobre(II), la reducción del átomo metálico también influye en la actividad. Estudios teóricos de dinámica molecular permitirían corroborar la propuesta de este mecanismo de acción.

Debido a este mecanismo propuesto y a la actividad biológica que presentaron los compuestos de coordinación es importante investigar su potencial actividad contra otros patógenos e incluso contra células cancerosas, esto último debido a las interacciones que se encontraron entre los compuestos de coordinación y el ADN



## Referencias

- [1] Orvig C, Abrams MJ. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chem. Rev.* 99 (1999) 2201-2205.
- [2] Reedijk J. Bioinorganic Chemistry, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *Elsevier*, 2013.
- [3] Mjos KD, Orvig C. Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem. Rev.* 114 (2014) 4540-4563.
- [4] Guo Z, Sadler PJ. Medicinal inorganic chemistry. *Adv. Inorg. Chem.* 49 (1999) 183-306.
- [5] Lengacher R, Marlin A, Smiłowicz D, Boros E. Medicinal inorganic chemistry – challenges, opportunities and guidelines to develop the next generation of radioactive, photoactivated and active site inhibiting metal-based medicines. *Chem. Soc. Rev.* 51 (2022) 7715-7731.
- [6] Alessio E. Bioinorganic Medicinal Chemistry. *Wiley-VCH*, (2011).
- [7] Farrer BT, Pecoraro VL. Bioinorganic Chemistry, Encyclopedia of Physical Science and Technology. *Academic Press*, 3ra ed. 2003, 117-139.
- [8] Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 35 (2016) 107-115.
- [9] National Institutes of Health. Copper, Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements. 2022 [En línea] <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-HealthProfessional/>
- [10] Petris MJ, Mercer JF. The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal di-leucine endocytic signal. *Hum. Mol. Genet.* 11 (1999) 2107-2115.
- [11] Chaudhry HS, Anilkumar AC. Wilson Disease. 2023 [En línea]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441990/>
- [12] Messerschmidt A. Copper Metalloenzymes. *Comprehensive Natural Products II.* 8 (2010) 489-545.
- [13] Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8 (2004) 162-168.
- [14] Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci.* 8 (2013) 144–157.
- [15] National Institutes of Health. Zinc, Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements. 2022 [En línea] <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>
- [16] McCall KA, Huang C, Fierle C. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *J. Nutr.* 130 (2000) 1437-1446.
- [17] Occhipinti R, Boron WF. Role of Carbonic Anhydrases and Inhibitors in Acid-Base Physiology: Insights from Mathematical Modeling. *Int J Mol Sci.* 15 (2019) 3841.
- [18] Sjöblom B, Polentarutti M, Djinović-Carugo F. Structural study of X-ray induced activation of carbonic anhydrase of carbonic anhydrase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106 (2009) 10609-10613.
- [19] Ferraroni M, Gaspari R, Scozzafava A, Cavalli A, Supuran CT. Dioxygen, an unexpected carbonic anhydrase ligand. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33 (2018) 999-1005.
- [20] van Seventer JM. Principles of Infectious Diseases: Transmission, Diagnosis, Prevention and control. International Encyclopedia of Public Health. *Academic Press*, 2da. ed. (2017) 22-39.



- [21] Edwards, DI. Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms I. Mechanisms of action. *J Antimicrob. Chemother.* 31 (1993) 9-20.
- [22] Ang CW, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT. Nitroimidazoles: molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases. *J. Med. Chem.* 60 (2017) 7636–7657.
- [23] Nepali K, Lee HY, Liou JP. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* 62 (2019) 2851–2893.
- [24] Riches A, Hart CJS, Trenholme KR, Skinner-Adams TS. Anti-Giardia Drug Discovery: Current Status and Gut Feelings. *J. Med. Chem.* 63 (2020) 13330–13354.
- [25] Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 157 (2011) 3-9.
- [26] Nakamura S. Structure of Azomycin, a New Antibiotic. *Pharm. Bull.* 3 (1955) 379–383.
- [27] Beaman AG, Tautz W, Gabriel T, Duschinsky R. The Synthesis of Azomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 389–390.
- [28] Sharma R. Nitroimidazole radiopharmaceuticals in hypoxia: part II cytotoxicity and radiosensitization applications. *Curr. Radiopharm.* 4 (2011) 379-393.
- [29] Koch CJ, Parliament MB, Brown JM, Urtasun RC. Leibel and Phillips Textbook of Radiation Oncology. Chapter 4 - Chemical Modifiers of Radiation Response. *W.B. Saunders* 3ra ed. (2010) 55-68.
- [30] Labiano S, Serrano-Mendioroz I, Rodriguez-Ruiz ME. Radiation Oncology and Radiotherapy Part A. Chapter 12 - Assessment of hypoxia by pimonidazole staining following radiotherapy. *Academic Press.* (2022) 179-189.
- [31] Cosar C, Julou L. The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections. *Ann. Inst. Pasteur.* 96 (1959) 238-241.
- [32] Samuelson J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1533-1541.
- [33] Leitsch D, Schlosser S, Burgess A, Duchêne M. Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia Lambia*. *Int. J. Parasit.* 2 (2012) 166–170.
- [34] Hori T, Owusu YB, Sun D. US FDA-Approved Antibiotics During the 21st Century. *Encyclopedia of Infection and Immunity. Elsevier* 4 (2022) 556-585.
- [35] Kuhlmann FM, Fleckenstein JM. Infectious Diseases. Chapter 157 - Antiparasitic Agents. *Elsevier* 4ta ed. 2 (2017) 1345-1372.
- [36] Edwards DI. Reduction of nitroimidazoles and DNA damage. *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 53-58.
- [37] Schmid A, Schmid H. Pharmacotoxicological Mode of Action of Antimicrobial 5-Nitroimidazole Derivatives. *J. Vet. Med.* 46 (1999) 517-522.
- [38] Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends. Parasitol.* 30 (2014) 289-298.
- [39] Roldan MD, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *Microbiol. Rev.* 32 (2008) 474–500.
- [40] Kim SH, Park1 S, Park E, Kim JH, Ghatge S, Hur HG, Rhee S. Structure and substrate specificity determinants of NfnB, a dinitroaniline herbicide–catabolizing nitroreductase from *Sphingopyxis* sp. strain HMH. *J. Biol. Chem.* 297 (2021) 101143.



- [41] Marques de Oliveira L, Bonatto D, Pêgas Henriques JA. Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* (2010) 1008–1019.
- [42] Navarro-Peñaloza R, Landeros-Rivera B, López-Sandoval H, Castro-Ramírez R, Barba-Behrens N. New insights on transition metal coordination compounds with biological activeazole and nitroimidazole derivatives. *Coord. Chem. Rev.* 493 (2023) 215360.
- [43] Zanello P. Structure and electrochemistry of proteins harboring iron-sulfur clusters of different nuclearities. Part I. [4Fe-4S] + [2Fe-2S] iron-sulfur proteins.
- [44] Smith MA, Edwards DI. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 35 (1995) 751-764.
- [45] Mukherjee T, Boshoff H. Nitroimidazoles for the treatment of TB: past, present and future. *Future Med. Chem.* 3 (2011) 1427–1454.
- [46] Quon D, d'Oliveira C, Johnson P. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad.* 89 (1992) 4402-4406.
- [47] Jenks PJ. Antibiotic and Chemotherapy. Chapter 24. Nitroimidazole. 9na ed. *Elsevier*, (2010) 292-300.
- [48] Bale JR, Sadler PJ, Coulson CJ, Laverick M, Nias AH. Hypoxic Cell Sensitization to Radiation Damage by a New Radiosensitizer: Cis-Dichloro- Bis(1-(2-Hydroxyethyl)-2-Methyl-5-Nitroimidazole-N)Platinum(II). *Br. J. Cancer.* 46 (1982) 701-705.
- [49] Bale JR, Mazid MA, Sadler PJ, Aggarwal A, Kuroda R, Neidle S, Gilmour DW, Peart BJ, Ramsden CA. Platinum(II) Complexes of Nitroimidazoles: Synthesis, Characterisation, and X-Ray Crystal Structures of cis-Dichlorobis[1-(2'-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole]platinum(II) and trans-Dichlorobis-[1-(2'-hydroxy-3'methoxypropyl)-2-nitroimida. *Dalton Trans.* (1985) 795-802.
- [50] Kalinowska-Lis U, Felczak A, Chęcińska L, Zawadzka K, Patyna E, Lisowska K, Ochocki J. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water-soluble silver(I) complexes of metronidazole drug and selected counter-ions. *Dalton Trans.* 44 (2015) 8178-8189.
- [51] Galván-Tejada N, Bernés S, Castillo-Blum SE, Nöth H, Vicente R, Barba-Behrens N. Supramolecular structures of metronidazole and its copper(II), cobalt(II) and zinc(II) coordination compounds. *J. Inorg. Biochem.* 91 (2002) 339-348.
- [52] Barba-Behrens N, Mutio-Rico AM, Joseph-Nathan P, Contreras R. Preparation and characterization of new transition metal complexes of nitroimidazoles. X-Ray crystal structures of two copper complexes: Bis-[(μ-chloro)chloro-bis-(1-(2-hydroxyethyl)-2methyl-5-nitroimidazole)copper(II)] and dichloro-bis-(2-methyl-5-nitroimidazole)copper(II)]. *Polyhedron* 10 (1991) 1333-1341.
- [53] Gordon AT, Abosede OO, Ntsimango S, van Vuuren S, Hosten EC, Ogunlaj AS. Synthesis, characterization, molecular docking and antimicrobial activity of copper(II) complexes of metronidazole and 1,10 phenanthroline. *Inorg. Chim. Acta.* 510 (2020) 119744.
- [54] Alfaro-Fuentes I, López-Sandoval H, Mijangos E, Duarte-Hernández AM, Rodríguez-López G, Bernal-Uruchurtu MI, Contreras R, Flores-Parra A, Barba-Behrens N. Metal coordination compounds derived from tinidazole and transition metals. Halogen and oxygen lone pair...π interactions. *Polyhedron* 67 (2014) 373.
- [55] Alfaro-Fuentes I, Castro-Ramírez R, Ortiz-Pastrana N, Medina-Guerrero RM, Soler-Jiménez LC, Martínez-Rodríguez I, Betancourt-Lozano M, Ibarra-Castro L, Barba-Behrens N, Fajer-Ávila EJ. Novel anthelmintic activity of tinidazole coordination compounds. Relevance of the metal ion and structural properties. *J. Inorg. Biochem.* 176 (2017) 159–167.





- [56] Castro-Ramírez R, Ortiz-Pastrana N, Caballero AB, Zimmerman MT, Stadelman BS, Gaertner AAE, Brumaghim JL, Korrodi-Gregório L, Pérez-Tomás R, Gamez P, Barba-Behrens N. DNA interaction of non-chelating tinidazole-based coordination compounds. Structural, redox and cytotoxic properties. *Dalton Trans.* 47 (2018) 7551–7560.
- [57] Ramírez-Palma LG, Castro-Ramírez R, Lozano-Ramos L, Galindo-Murillo R, Barba-Behrens N, Cortés-Guzmán F. DNA recognition site of anticancer tinidazole copper(II) complexes. *Dalton Trans.* 52 (2023) 2087–2095.
- [58] Nandy P, Das S. In situ reactivity of electrochemically generated nitro radical anion on Ornidazole and its monomeric Cu(II) complex with nucleic acid bases and calf thymus DNA. *Inorg. Chim. Acta* 501 (2020) 119267.
- [59] Nandy P, Singha S, Banyal N, Kumar S, Mukhopadhyay K, Das S. A ZnII complex of ornidazole with decreased nitro radical anions that is still highly active on *Entamoeba histolytica*. *RSC Adv.* 10 (2020) 23286.
- [60] Santra RC, Ganguly D, Singh J, Mukhopadhyay K, Das S. A study on the formation of the nitro radical anion by ornidazole and its significant decrease in a structurally characterized binuclear Cu(II)-complex: impact in biology. *Dalton Trans.* 44 (2015) 1992–2000.
- [61] Pi WX, Yang YM, Li HQ, Zhu HL. Chlorometronidazole. *Acta Cryst.* E61 (2005) o2880–o2881.
- [62] Kumar L, Sarswat A, Lal N, Sharm VL, Jain A, Kumar R, Verma V, Maikhuri JP, Kuma A, Shukla PK, Gupta G. Imidazole derivatives as possible microbicides with dual protection. *Europ. J. Med. Chem.* 45 (2010) 817–824.
- [63] Test No. 423. Acute Oral Toxicity. Acute Toxic Class Method, Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, *OECD*, Paris, (2001).
- [64] FDA. Guidance for Industry: Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals in Center for Drug Evaluation and Research FDA. 3 (1996)
- [65] Clark RJH, Williams CS. The Far-Infrared Spectra of Metal-Halide Complexes of Pyridine and Related Ligands. *Inorg. Chem.* 4 (1965) 350–357.
- [66] Nakamoto K. Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds. *John Wiley and Sons*. 4th ed. USA (1986) 324.
- [67] Goldstein M, Unsworth WD. The Far-infrared Spectra (450 - 80  $\text{cm}^{-1}$ ) of Octahedral Halogen-bridged Transition Metal Complexes. *Inorg. Chim. Acta* 4 (1970) 342–346.
- [68] Lever ABP. Inorganic Electronic Spectroscopy. *Elsevier* 2nd ed. Amsterdam (1968).
- [69] Gliemann G, Wang Y. The Ligand Field Concept, Encyclopedia of Physical Science and Technology. *Academic Press* 3rd ed. (2003) 523–538.
- [70] Mooibroek TJ, Gamez P, Reedijk J. *Cryst. Eng. Comm.* 10 (2008) 1501–1515.
- [71] J. W. Steed, *Supramolecular Chemistry*, 2nd. ed., United Kingdom: John Wiley and Sons, 2009.
- [72] Addison AW, Rao TN, Reedijk J, van Rijn J, Verschoor GC. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen–sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1984) 1349–1356.
- [73] Yang L, Powell DR, Houser RP. Structural variation in copper(I) complexes with pyridylmethylamide ligands: structural analysis with a new four-coordinate geometry index,  $\tau_4$ . *Dalton Trans.* (2007) 955–964 .



- [74] Ying D, Wen-Yan W, Zhi-Hua W, Jian-Long W. 1-Methyl-5-nitro-1H-imidazole. *Acta Crystallogr. Sec. E* 67 (2011) o3072.
- [75] Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Health Res. Rev.* 6 (2005) 41-61.
- [76] Rojas-Pirela M, Medina L, Rojas MV, Liempi AI, Castillo C, Pérez-Pérez E, Guerrero-Muñoz J, Araneda S, Kemmerling U. Congenital transmission of Apicomplexan parasites: A Review. *Front. Microbiol.* 12 (2021) 751648.
- [77] Zhou Z, Ortiz HIA, Pérez GE, Burgos LM, Farina JM, Saldarriaga C, López-Santi R, Cotella JI, Sauce Pérez AL, Baranchuk A. Neglected Tropical Diseases and other Infectious Diseases affecting the Heart. Chapter 17. *Toxoplasmosis & Hart. Elsevier* (2022) 179-194.
- [78] Rostami A, Riahi SM, Gamble HR, Fakhri Y, Nourollahpour M, Danesh M, Behniafar H, Paktinat S, Foroutan M, Mokdad AH, Hotez PJ, Gasser RB. Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 26 (2020) 673-683.
- [79] Vidal JE. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *Int. Assoc. Provid. AIDS Care* 18 (2019) 1-20.
- [80] Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H, Canedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Correa D. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106 (2012) 656-659.
- [81] World Health Organization. Neglected tropical diseases. 2023 [En línea] [https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1)
- [82] Zhang Y, Träskman-Bendz L, Janelidze S, Langenberg P, Saleh A, Constantine N, Okusaga O, Bay-Richter C, Brundin L, Postolache T. *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies and nonfatal suicidal self-directed violence. *J. Clin. Psychiatry* 73 (2012)1069-1076.
- [83] Pedersen MG, Stevens H, Pedersen CB, Nørgaard-Pedersen B, Mortensen PB. *Toxoplasma* infection and later development of schizophrenia in mothers. *Am. J. Psychiatry* 168 (2011) 814-821.
- [84] Groer MW, Yolken RH, Xiao JC, Beckstead JW, Fuchs D, Mohapatra SS, Seyfang S, Postolache TT. Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii*-positive women. *Am. J. Obstetr. Gynecol.* 204 (2011) 433.
- [85] Shiadeh MN, Niyiyati M, Fallahi S, Rostami A. Human parasitic protozoan infection to infertility: a systematic review. *Parasitol. Res.* 115 (2016) 469-477.
- [86] Elsheikha HM, Marra CM, Zhu XQ. Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Management of Cerebral Toxoplasmosis. *Clinical Microbiol. Rev.* 34 (2021) 115-119.
- [87] Antczak M, Dzitko K, Długowska K. Human toxoplasmosis—Searching for novel chemotherapeutics. *Biomed. Pharmacother.* 82 (2016) 677–684.
- [88] Peyron F, McLeod R, Ajzenberg D, Contopoulos-Ioannidis D, Kieffer F, Mandelbrot L, Sibley LD, Pelloux H, Villena I, Wallon M, Montoya JG. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *Plos Negl Trop Dis.* 11 (2017) e0005222.
- [89] Sawers L, Wallon M, Mandelbrot L, Villena I, Stillwaggon E, Kieffer F. Prevention of congenital toxoplasmosis in France using prenatal screening: A decision-analytic economic model. *Plos one* 17 (2022) e0273781.



- [90] Robinson E, de Valk H, Villena I, Le Strat Y, Tourdjman M. National perinatal survey demonstrates a decreasing seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in France, 1995 to 2016: impact for screening policy. *Euro Surveill.* 26 (2021) 1900710.
- [91] Diana S, Ganiema AR, Ekawardhan S. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients: a review. *Pathog. Glob. Health* 117 (2023) 14-23.
- [92] Matta SK, Rinkenberger N, Dunay IR, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (2021) 467-480.
- [93] Votýpka J, Modrý D, Oborník M, Šlapeta J, Lukeš J. Apicomplexa. Handbook of the Protist. *Springer*, (2016) 1-58.
- [94] Francia ME, Dubremetz JF, Morrissette NS. Basal body structure and composition in the apicomplexans *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Cilia* 5 (2015) 1-7.
- [95] Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*, 363 (2004) 1965-1976.
- [96] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasit.* 30 (2000) 1217-1258.
- [97] Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites Vectors* 13 (2020) 1-13.
- [98] Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiol. Rev.* 11 (1998) 267-299.
- [99] Donald RGK. *Toxoplasma* as a Model System for Apicomplexan Drug Discovery. *Elsevier* (2007) 505.
- [100] Montazeri M, Mehrzadi S, Sharif M, Sarvi S, Tanzifi A, Aghayan SA, Daryani A. Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1-15.
- [101] Deng Y, Wu T, Zhai SQ, Li CH. Recent progress on anti-*Toxoplasma* drugs discovery: Design, synthesis and screening. *Europ. J. Med. Chem.* 183 (2019) 111711.
- [102] Fernandes C, Horn A, Lopes BF, Bull ES, Azeredo NFB, Kanashiro MM, Borges FV, Bortoluzzi AJ, Szpoganicz B, Pires AB, Franco RWA, Alm JCA, Maciel LLF, Resende J, Schenk G. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. *J. Inorg. Biochem.* 153 (2015) 68-87.
- [103] Parrilha GL, Fernandes G, Bortoluzzi AJ, Szpoganicz B, Silva MS, Pich C, Terenzi H, Horn A. A new l-oxo di-iron complex with suitable features to mimic metallohydrolase activity: X-ray molecular structure, aqua solution behavior and nuclease activity of the complex [Fe(HPCINOL)(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]-l-oxo. *Inorg. Chem. Comm.* 11 (2008) 643-647.
- [104] Portes JA, Souza TG, dos Santos TAT, da Silva LLR, Ribeiro TP, Pereira MD, Horn A, Fernandes C, DaMatta RA, de Souza W, Seabra SH. Reduction of *Toxoplasma gondii* Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron(III) Compound. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 7374-7386.
- [105] Portes JA, Motta CS, Azeredo NF, Fernandes C, Horn A, De Souza W, DaMatta RA, Seabra SH. In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper(II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. *Vet. Parasitol.* 245 (2017) 141-152.
- [106] Anacleto-Santos J. Evaluación de las fracciones del extracto metanólico de las frondas de *Pleopeltis crassinervata* en modelos in vitro de *Toxoplasma gondii*. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de Doctorado en Biología y Ciencias de la Salud (2021).



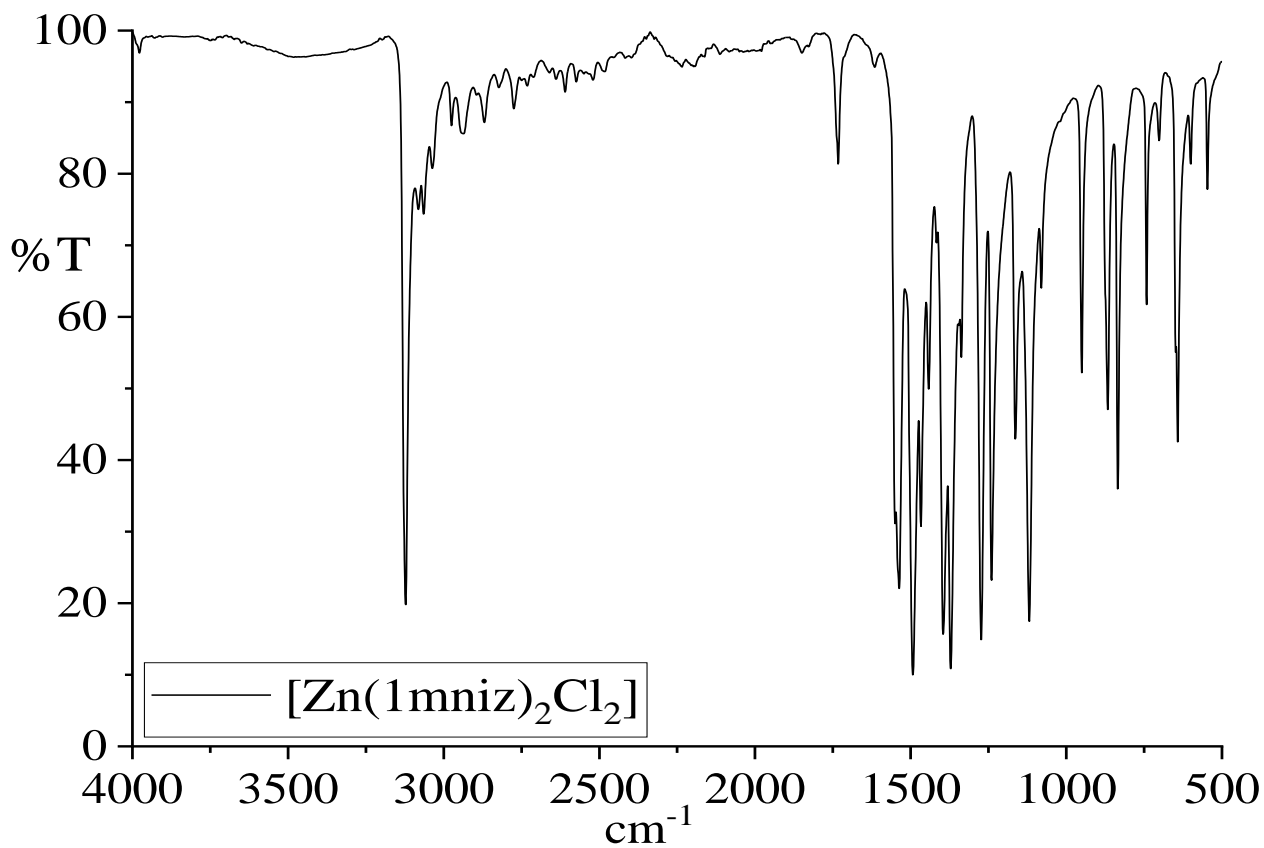
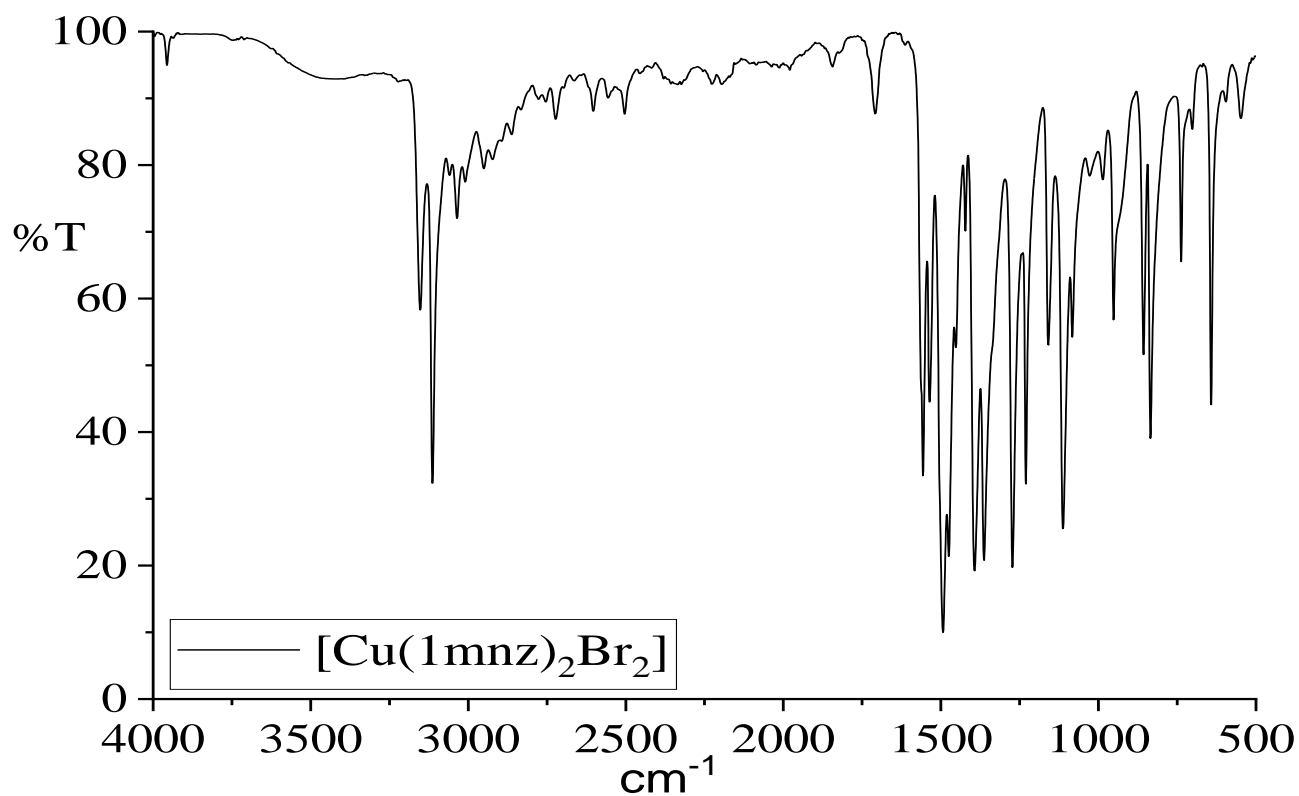
- [107] Haase SB, Reed SI. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle*. 1 (2002) 132-136.
- [108] Gadaga LL, Tagwireyi D. Toxicological Survey of African Medicinal Plants. Chapter 3 - Critical Review of the Guidelines and Methods in Toxicological Research in Africa. *Elsevier* (2014) 43-52.
- [109] DiPasquale LC, Hayes AW. Principles and methods of toxicology. *Taylor and Francis*, 4ta. ed. (2001). 853-906.
- [110] Harlemann JH. The Laboratory Mouse. Chapter 7-The Mouse in Preclinical Safety Studies. *Elsevier* (2004) 111-114.
- [111] Crespo M, Quereda C, Pascual J, Rivera M, Clemente L, Cano T, Patterns of sulfadiazine acute nephrotoxicity. *Clin. Nephrol.* 54 (2000) 68-72.
- [112] Erhirhie EO, Ihekwereme CP, Ildigwe EE, Advances in acute toxicity testing strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdiscip. Toxicol.* 11 (2018) 5-12.
- [113] Comer JEA. Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. Chapter 2- High-Throughput Measurement of log D and pKa. *Wiley-VCH* (2003).
- [114] Andrés A, Rosés M, Ràfols C, Bosch E, Espinosa S, Segarra V, Huerta JM. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* 76 (2015) 181-191.
- [115] Bravo-Gómez ME. Estudio QSAR de quelatos mixtos de cobre(II) [Cu(N-N)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub> y [Cu(N-N)(glicinato)]NO<sub>3</sub>. Facultad de Química, UNAM, Tesis de Doctorado 2009.
- [116] Rehman AU, Sarwar T, Husain MA, Ishqi HM, Tabish M. Studying non-covalent drug–DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 576 (2015) 49-60.
- [117] Kumar N, Kaushal R, Awasthi P. Non-covalent binding studies of transition metal complexes with DNA: A review. *J. Mol. Struct.* 1288 (2023) 135751.
- [118] Shahabadi N, Moghadam NH. Determining the mode of interaction of calf thymus DNA with the drug sumatriptan using voltammetric and spectroscopic techniques. *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 99 (2012) 18-22.
- [119] Bischoff G, Hoffmann S. DNA-Binding of Drugs Used in Medicinal Therapies. *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 321-348.
- [120] Baronea G, Terenzi A, Lauriaa A, Almericoa AM, Leal JM, Busto N, García B. DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships. *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 2848-2862.
- [121] Censi V, Caballero AB, Pérez-Hernández M, Soto-Cerrato V, Korrodi-Gregório L, Pérez-Tomás R, Dell'Anna MM, Mastrorilli P, Gamez P. DNA-binding and in vitro cytotoxic activity of platinum(II) complexes of curcumin and caffeine. *J. Inorg. Biochem.* 198 (2019) 110749.
- [122] Barrera-Guzmán VA, Rodríguez-Hernández EO, Ortíz-Pastrana N, Domínguez-González R, Caballero AB, Gamez P, Barba-Behrens N. Efficient copper-based DNA cleavers from carboxylate benzimidazole ligands. *J. Biol. Inorg. Chem.* 23 (2018) 1165-1183.
- [123] Galindo-Murillo R, Cheatham TE. Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA–ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) 3735-3747.

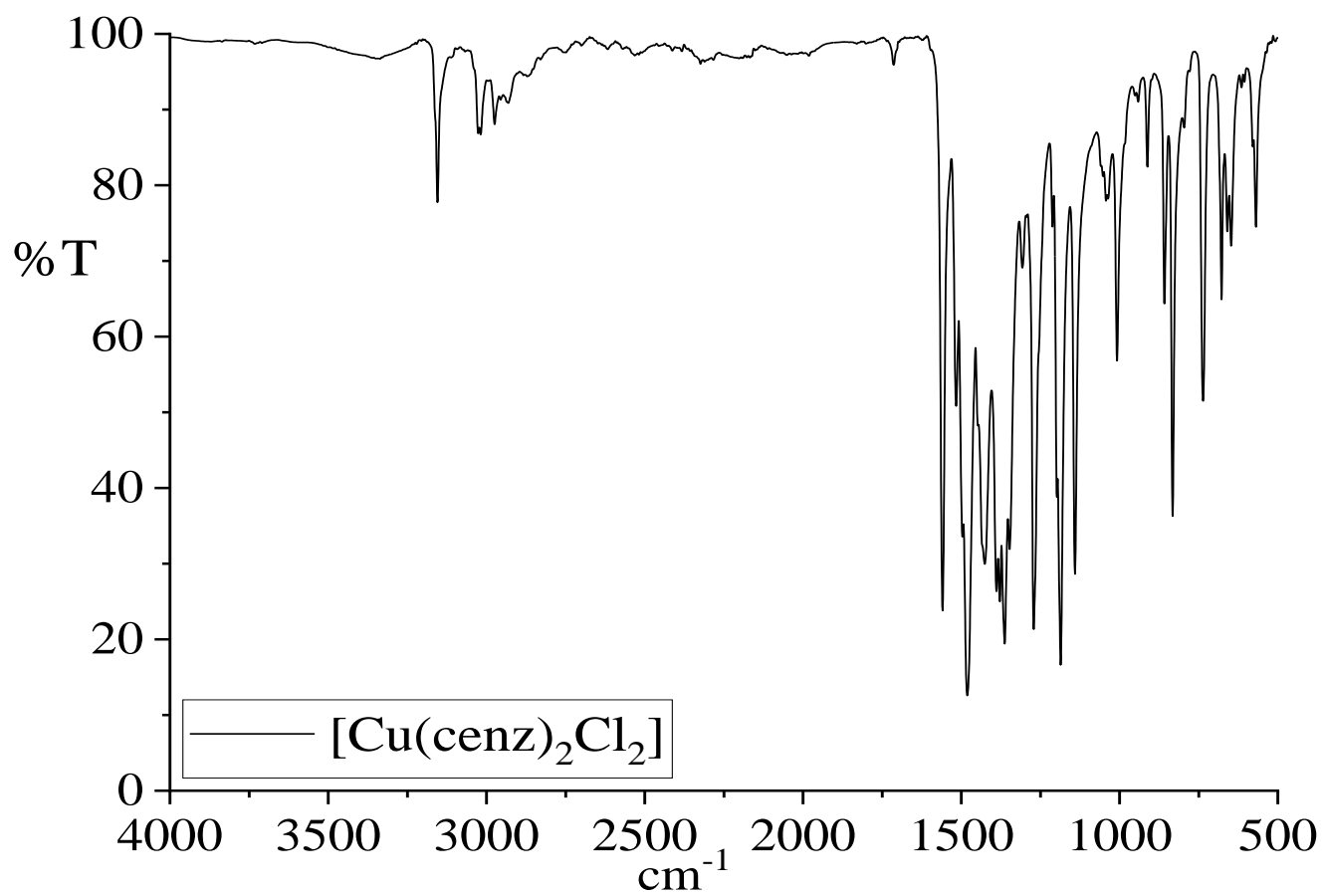
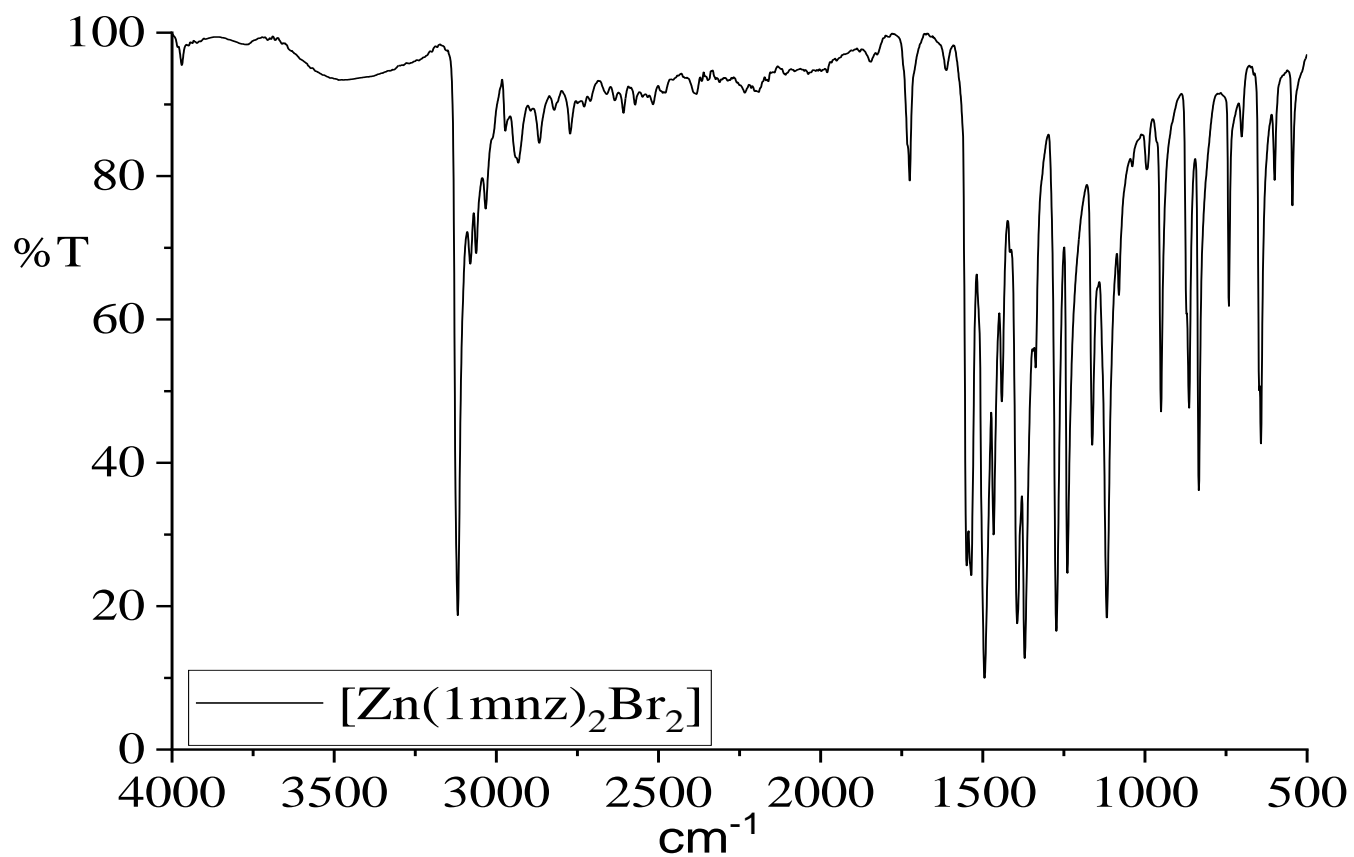


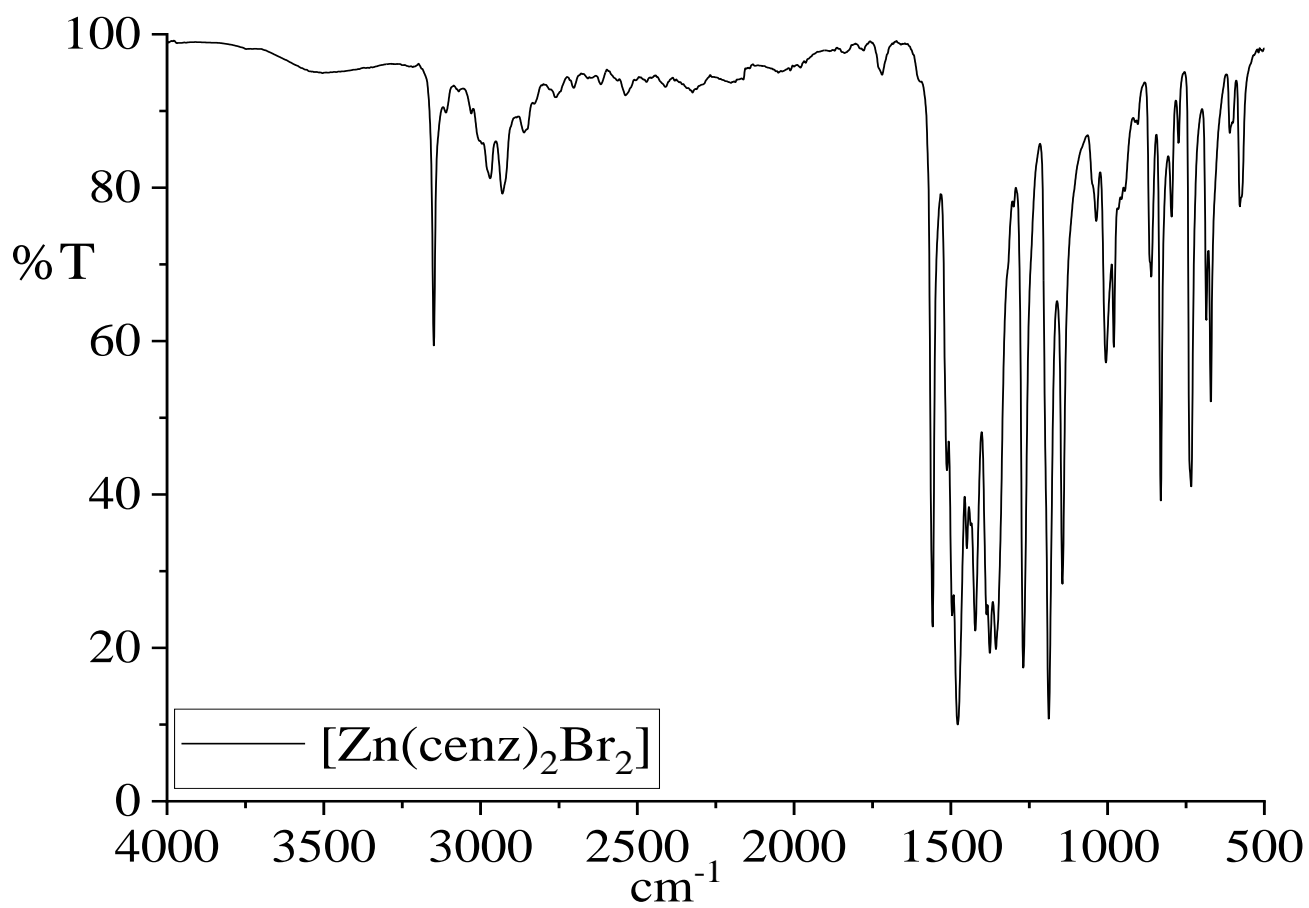
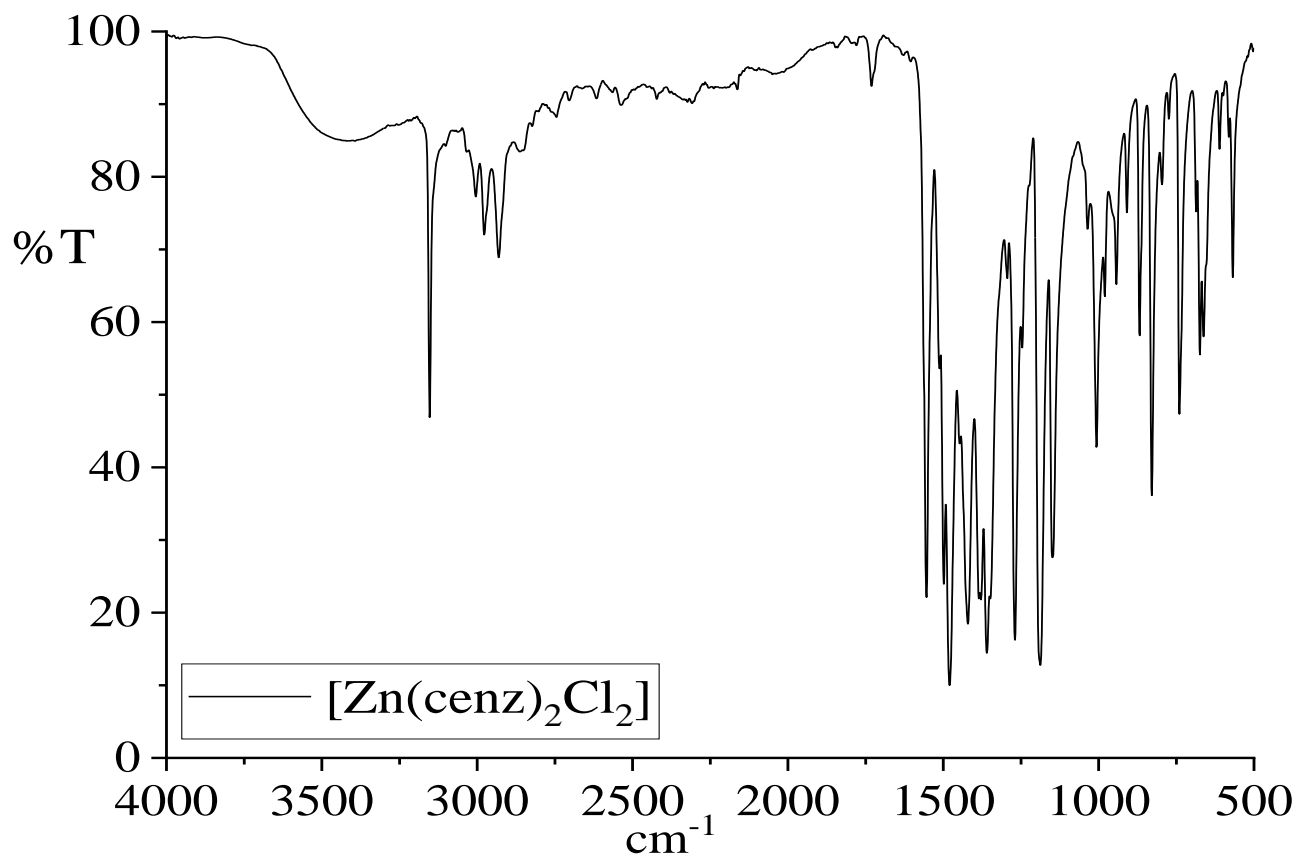
- [124] Quintana JR, Lipanov AA, Dickerson RE. Low-temperature crystallographic analyses of the binding of Hoechst 33258 to the double-helical DNA dodecamer C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G. *Biochemistry* 30 (1991) 10294-10306.
- [125] Lee PY, Costumbrado J, Hsu C, Kim Y. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* 62 (2012) 3923.
- [126] McBreen J, Gannon E. Electrodeposition of Zinc on Glassy Carbon from  $ZnCl_2$  and  $ZnBr_2$  Electrolytes. *J. Electrochem. Soc.* 130 (1983) 1667.



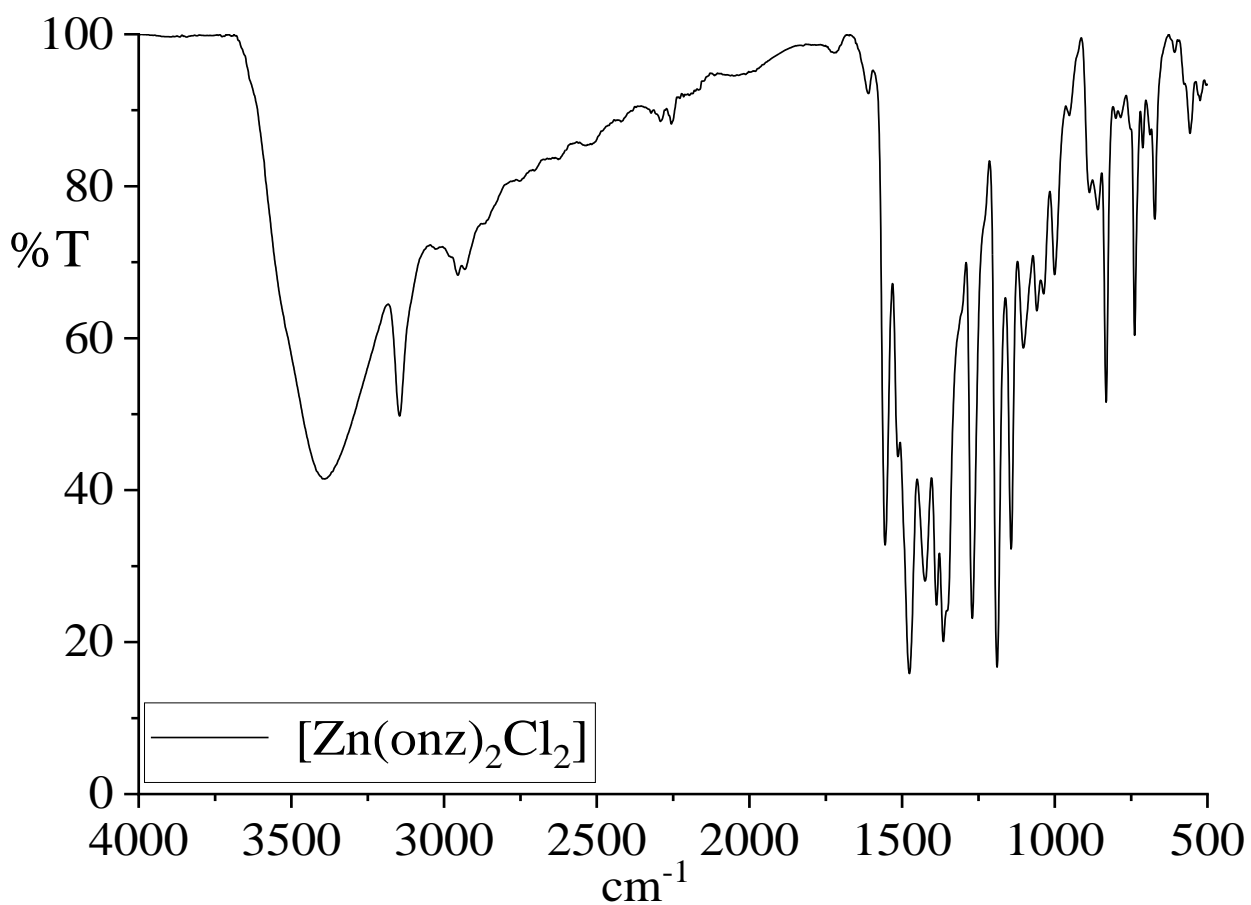
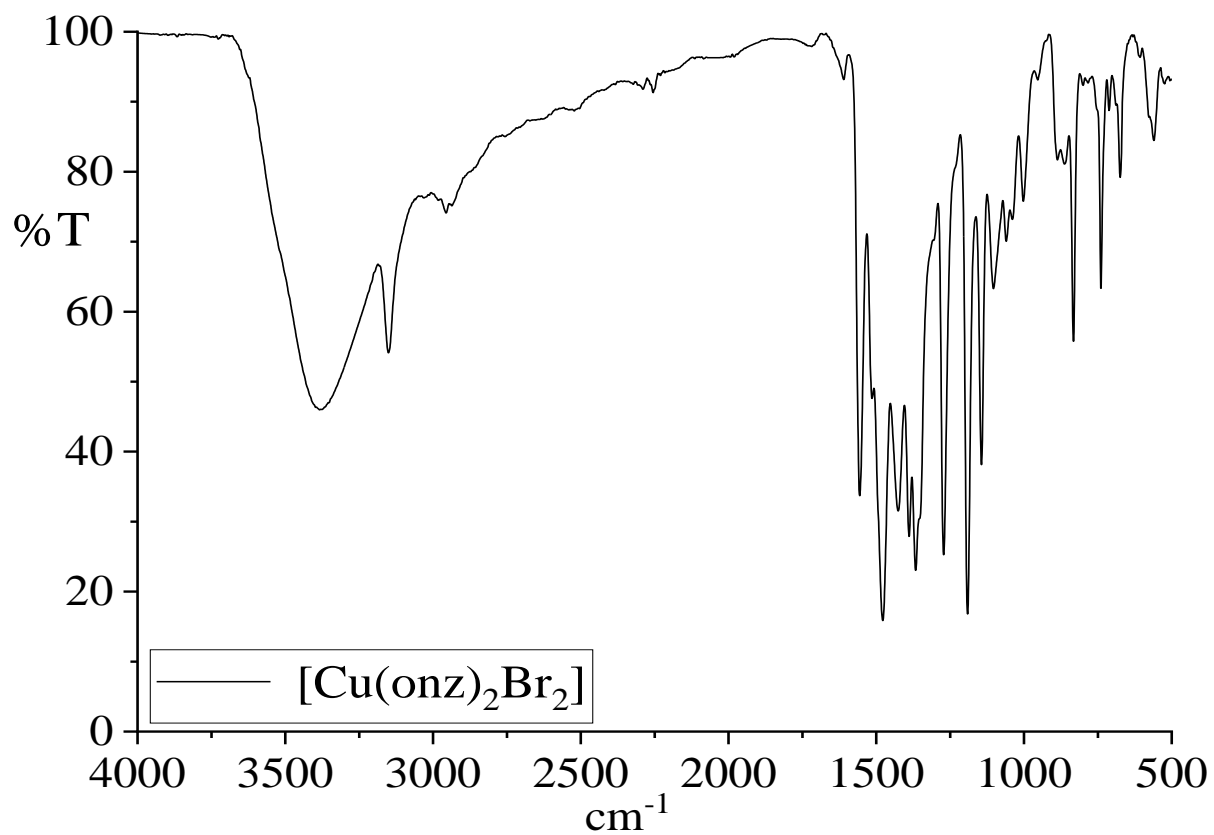
**ANEXO I. Espectros de infrarrojo de los compuestos de coordinación**

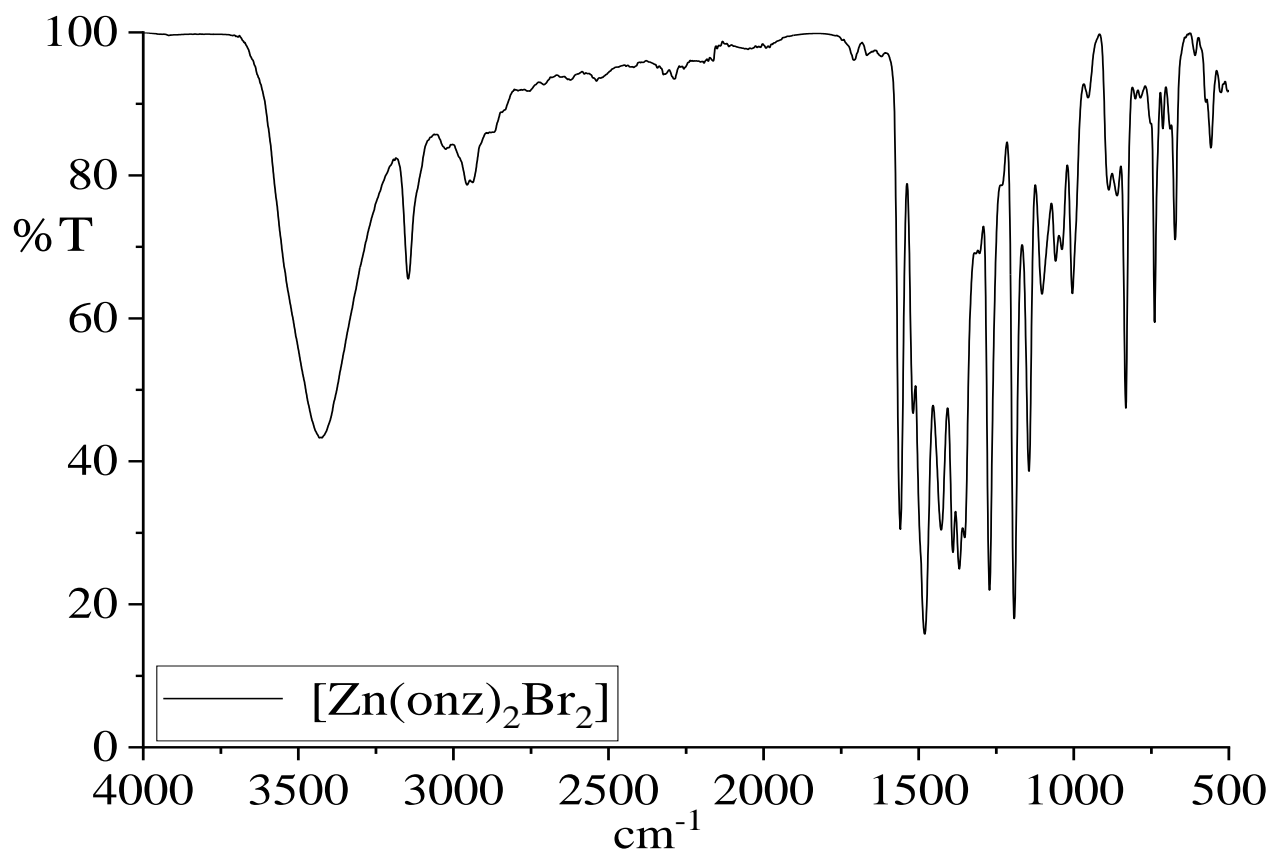






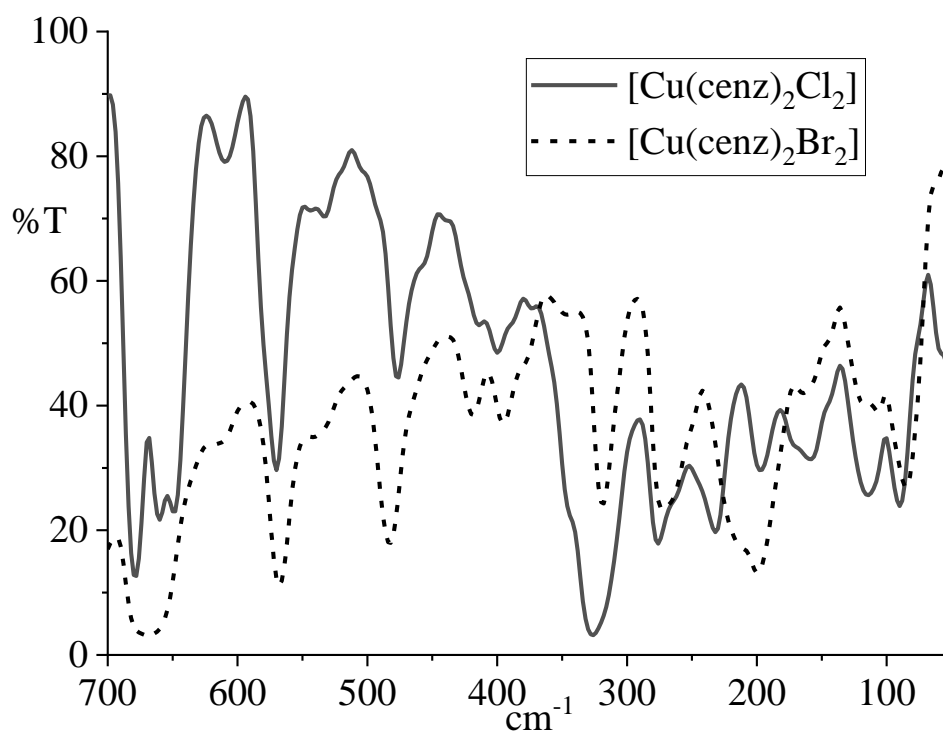
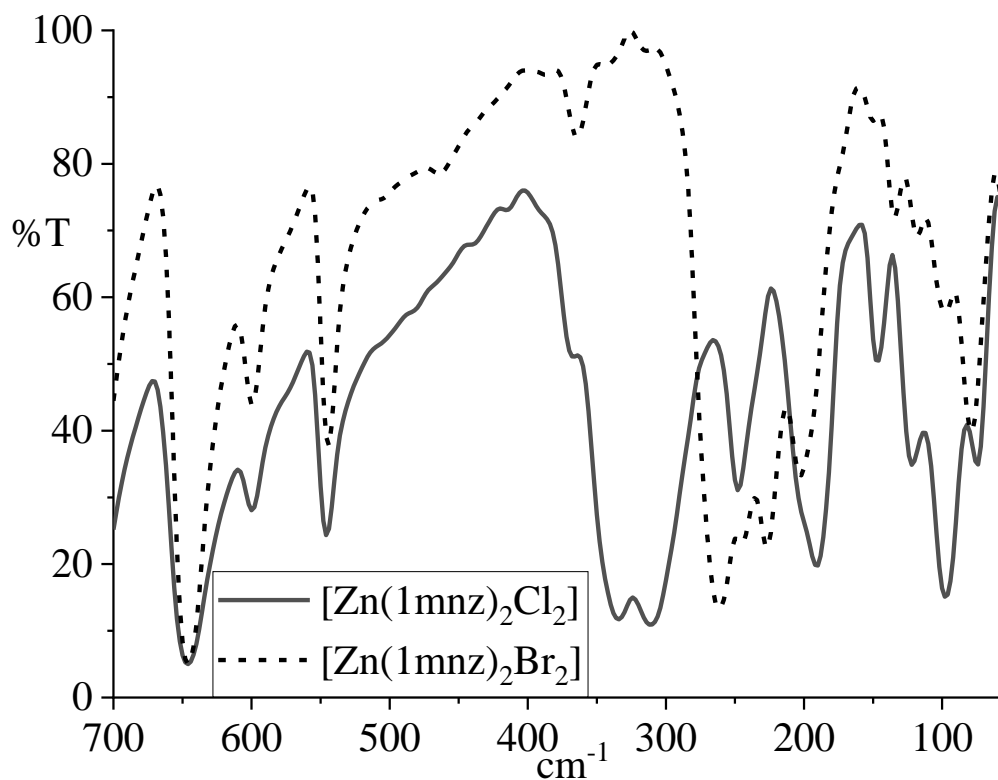


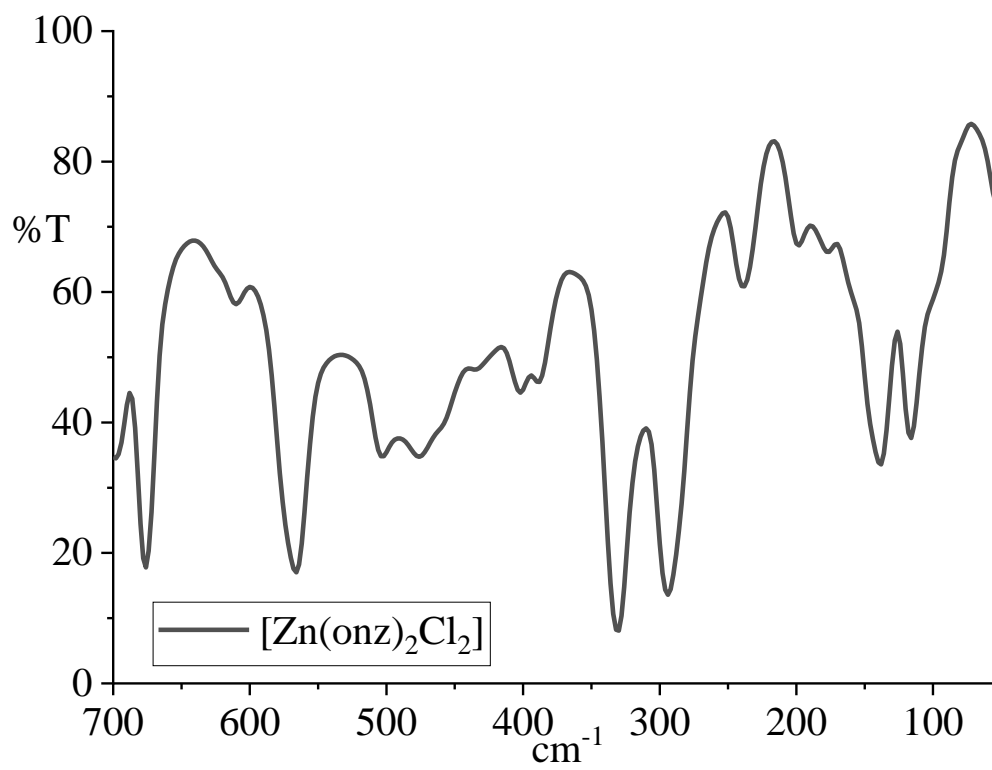






## ANEXO II. Espectros de infrarrojo lejano de los compuestos de coordinación

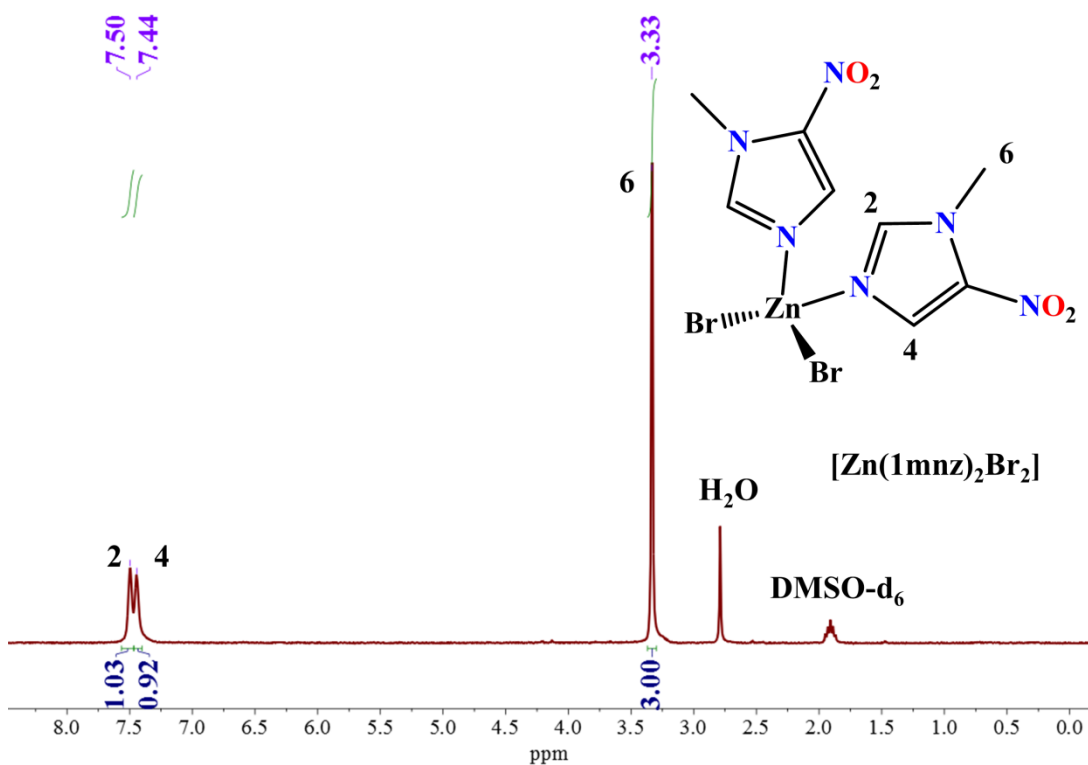
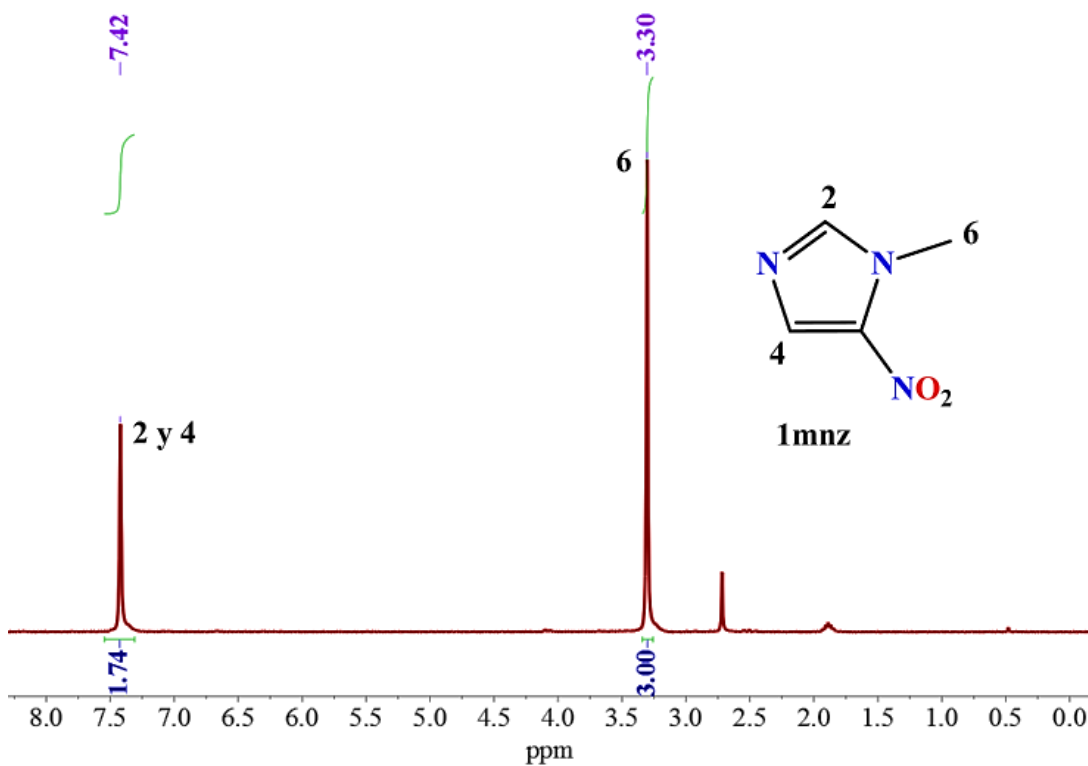






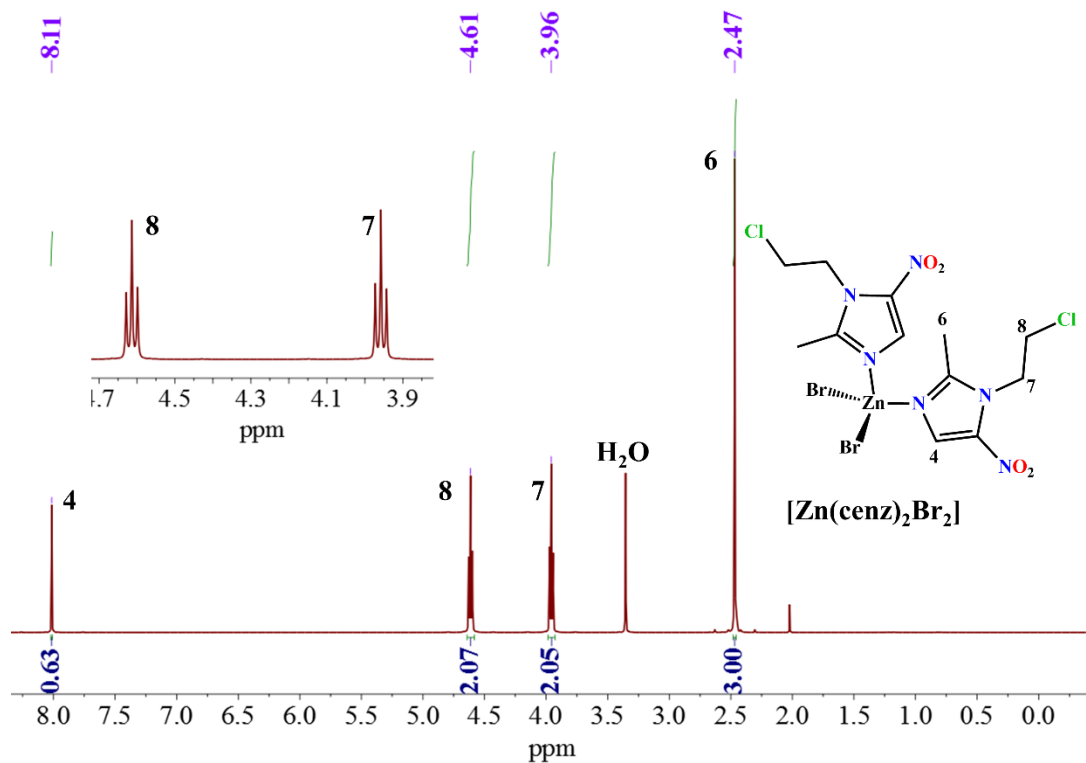
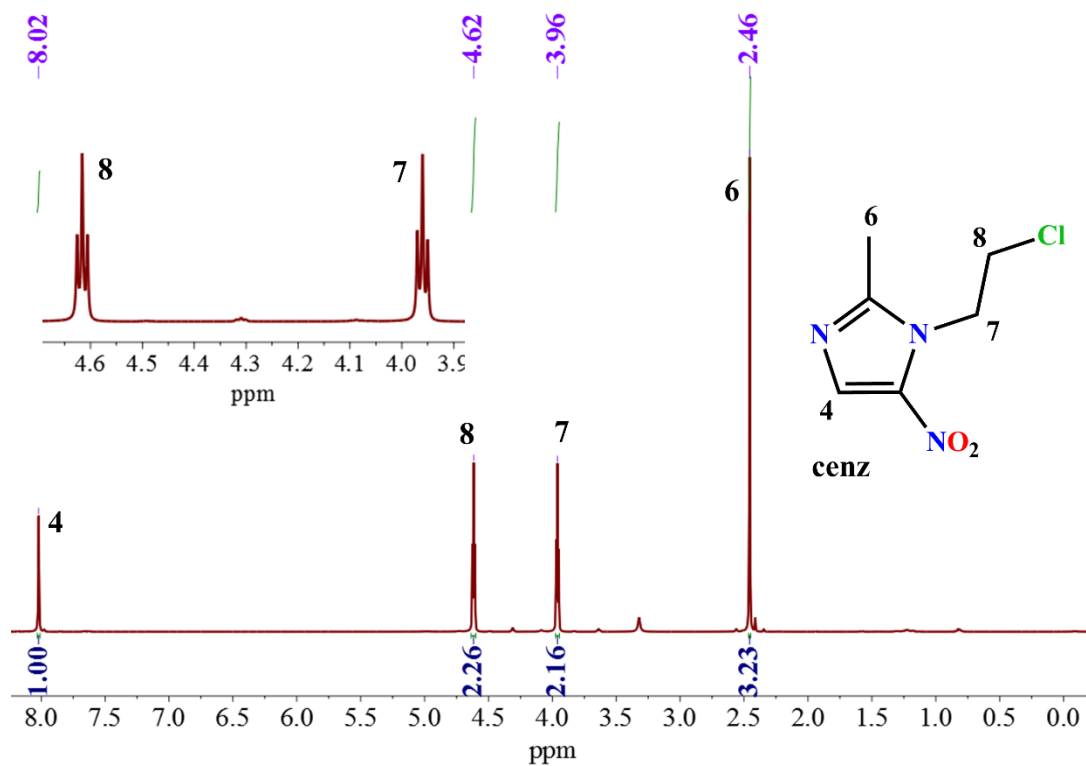
### ANEXO III. Espectros de RNM en DMSO-d<sub>6</sub> a 400 MHz

Espectros de <sup>1</sup>H-RMN en DMSO-d<sub>6</sub> para el ligante 1mnz y el compuesto [Zn(1mnz)Br<sub>2</sub>].



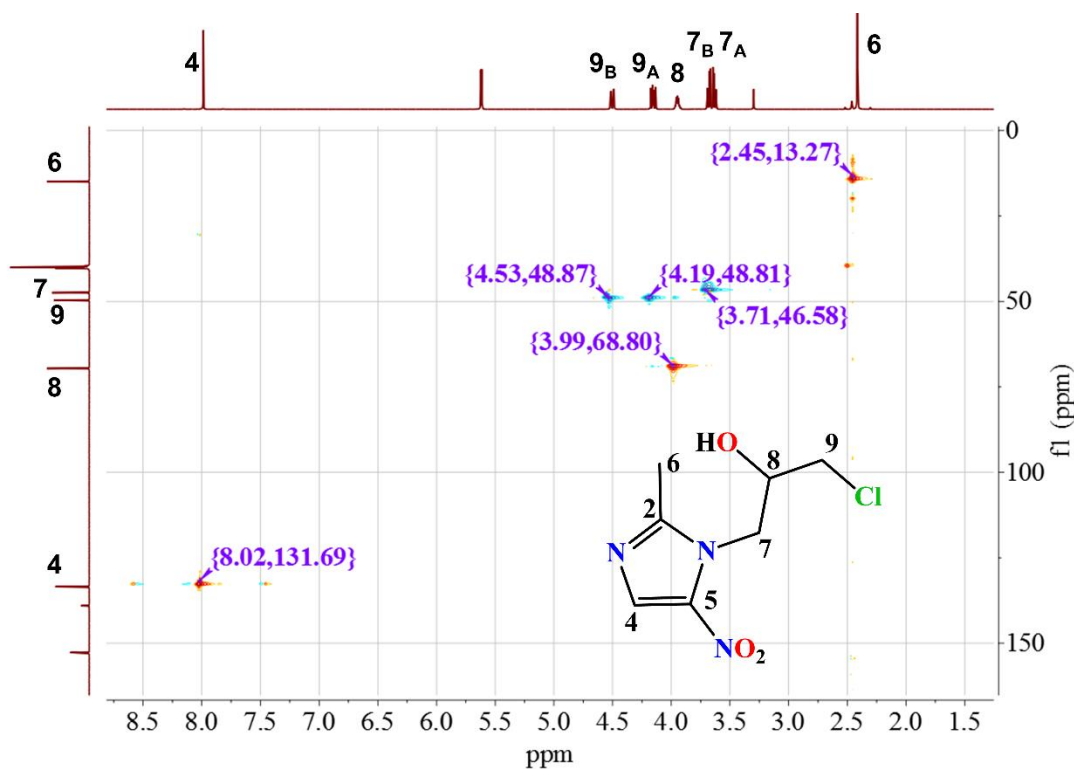
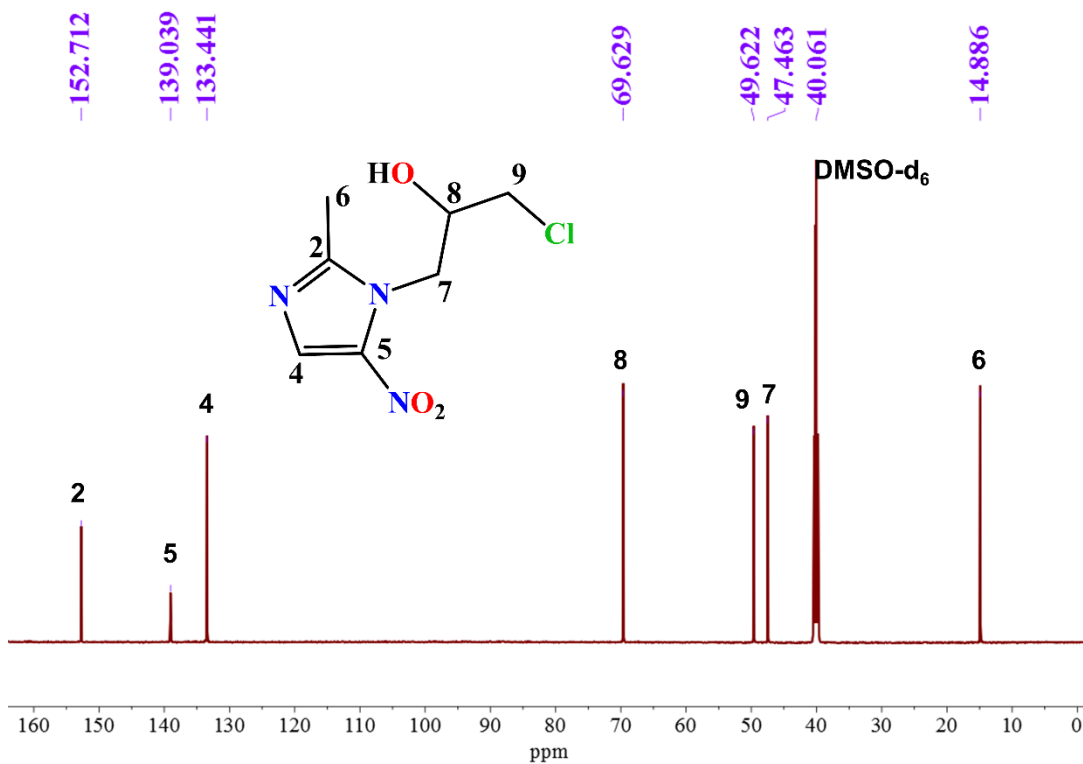


Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{DMSO-d}_6$  para el ligante cenz y el compuesto  $[\text{Zn}(\text{cenz})\text{Br}_2]$



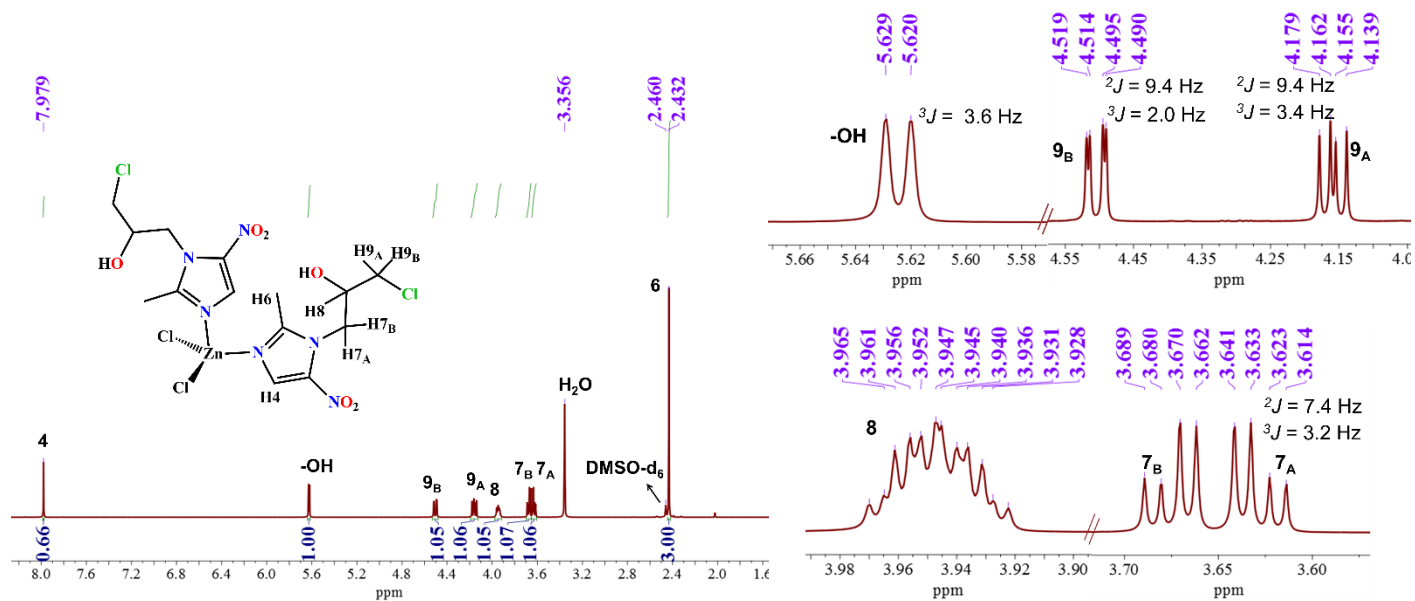


Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN y HSQC en  $\text{DMSO-d}_6$  para el ligante onz

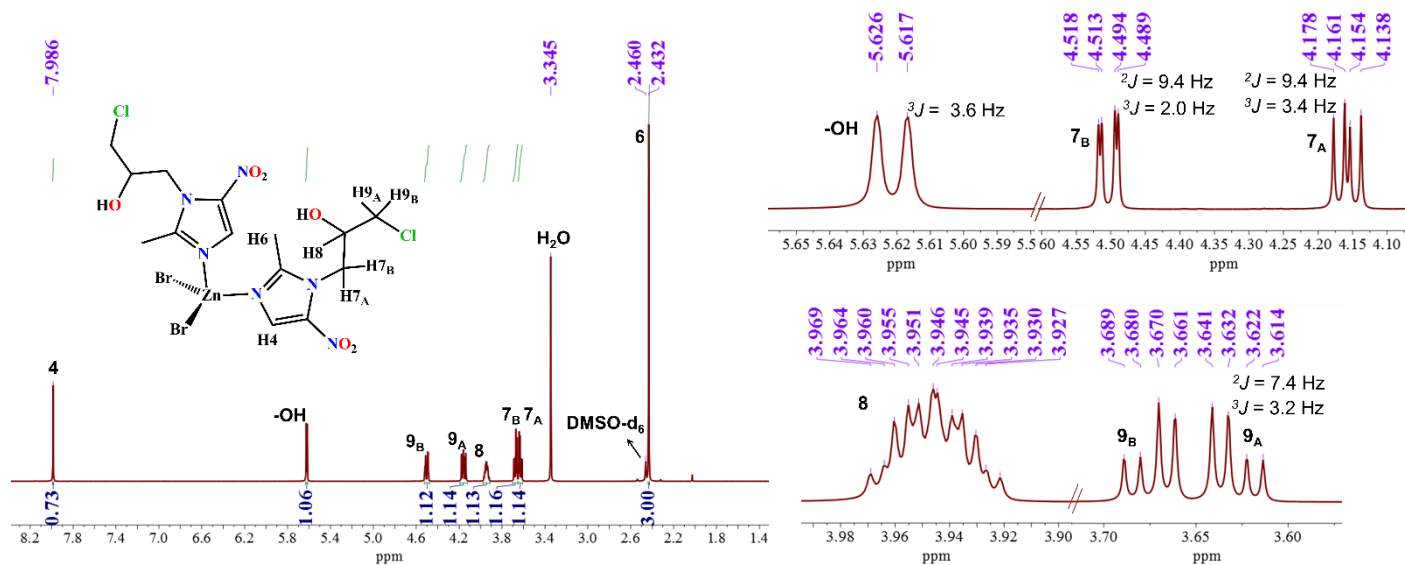




### Espectros de $^1\text{H}$ -RMN en DMSO- $d_6$ para el compuesto $[\text{Zn}(\text{onz})\text{Cl}_2]$



### Espectros de $^1\text{H}$ -RMN en DMSO- $d_6$ para el compuesto $[\text{Zn}(\text{onz})\text{Br}_2]$







#### ANEXO IV. Datos cristalográficos

Compuesto	[Cu(1mnz) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> ]	[Cu(1mnz) <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> ]	[Zn(1mnz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]
Fórmula química	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> Br <sub>2</sub> CuN <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Zn
PM (g mol <sup>-1</sup> )	515.77	604.69	479.41
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P -1	P -1	C m
a (Å)	6.9237(4)	7.1065(6)	5.9508(12)
b (Å)	9.3507(7)	9.4987(14)	19.240(3)
c (Å)	15.1889(13)	15.1833(11)	6.8134(11)
α (°)	86.645(6)	85.934(9)	90
β (°)	84.300(6)	84.393(7)	112.10(2)
γ (°)	83.568(5) <sup>o</sup>	84.432(9)	90
V (Å <sup>3</sup> )	971.21(12)	1013.24(19)	722.8(2)
Z	2	2	2
D <sub>calc</sub> (mg cm <sup>-3</sup> )	1.764	1.982	2.203
μ (mm <sup>-1</sup> )	1.453	5.073	7.251
F (000)	522	594	464
Temp (K)	130(2)	130(2)	130(2)
θ range (°)	3.503 a 29.262	3.556 a 29.559	3.844 a 28.944
Intervalo de índices	-9 ≤ h ≤ 9 -11 ≤ k ≤ 12 -20 ≤ l ≤ 18	-7 ≤ h ≤ 9 -12 ≤ k ≤ 12 -19 ≤ l ≤ 19	-7 ≤ h ≤ 6 -12 ≤ k ≤ 25 -9 ≤ l ≤ 9
Reflexiones medidas	7964	8122	1472
Parámetros	274	274	89
Índices R finales [I > 2σ(I)]	0.0358	0.0472	0.0723
wR <sub>2</sub>	0.0661	0.0805	0.1213
F <sup>2</sup>	1.043	1.036	1.030
Δρ <sub>max</sub> (e Å <sup>-3</sup> )	0.410	0.720	1.569
Δρ <sub>min</sub> (e Å <sup>-3</sup> )	-0.519	-0.835	-1.509



<b>Compuesto</b>	<b>[Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	<b>[Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>
Fórmula química	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cu	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Zn
PM (g mol <sup>-1</sup> )	513.65	515.48
Sistema cristalino	Ortorrómbico	Ortorrómbico
Grupo espacial	P 21 21 21	C m c 21
a (Å)	7.1965(10)	24.725(2) Å
b (Å)	13.4806(17)	7.7268(7) Å
c (Å)	19.782(12)	9.9383(7) Å
α (°)	90	90
β (°)	90	90
γ (°)	90	90
V (Å <sup>3</sup> )	1919.1(12)	1898.6(3) Å <sup>3</sup>
Z	4	4
D <sub>calc</sub> (mg cm <sup>-3</sup> )	1.778	1.803
μ (mm <sup>-1</sup> )	1.727	1.889
F (000)	1036	1040
Temp (K)	130(2)	130(2)
θ range (°)	3.370 a 29.574°	3.440 a 29.547°
Intervalo de índices	-9 ≤ h ≤ 7 -13 ≤ k ≤ 18 -15 ≤ l ≤ 25	-31 ≤ h ≤ 34 -7 ≤ k ≤ 10 -8 ≤ l ≤ 13
Reflexiones medidas	7352	3038
Parámetros	246	128
Índices R finales [I>2sigma(I)]	0.0625	0.0389
wR <sub>2</sub>	0.1169	0.1166
F <sup>2</sup>	1.039	1.067
Δρ <sub>max</sub> (e Å <sup>-3</sup> )	1.130	1.404
Δρ <sub>min</sub> (e Å <sup>-3</sup> )	-0.964	-1.031

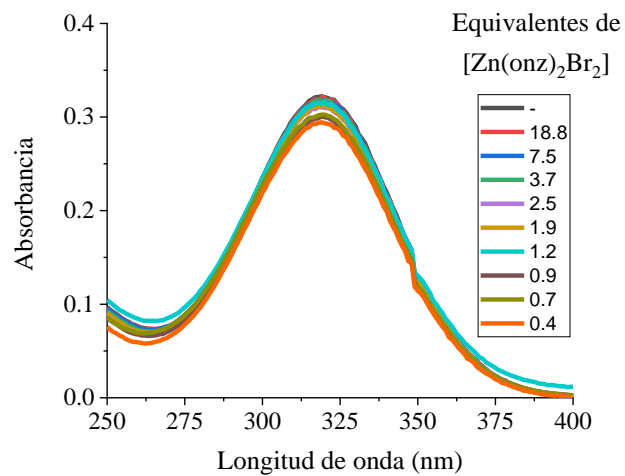
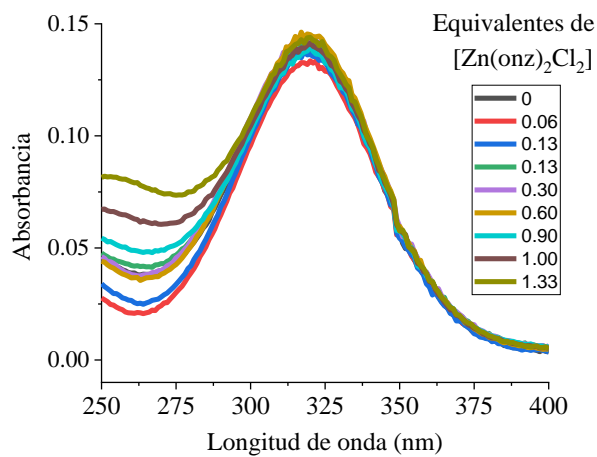
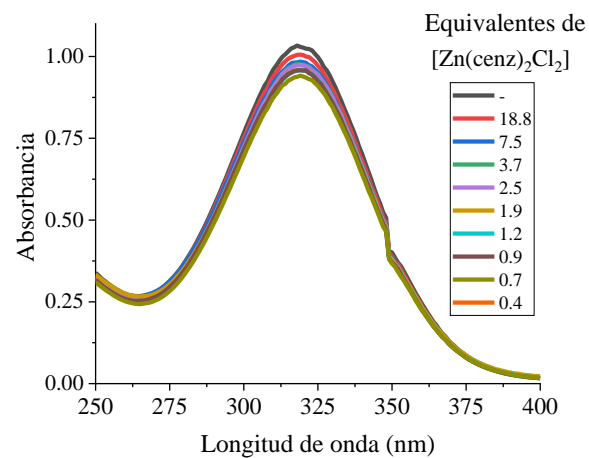
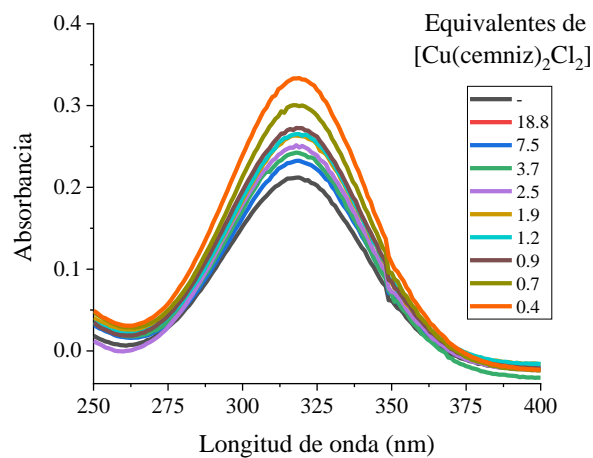


## ANEXO V. Análisis estadístico de sobrevida Probit

Probabilidad	Límites de confianza					
	95% Límites de confianza para dosis en [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]			95% Límites de confianza para dosis en [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]		
	Estimado	Límite inferior	Límite superior	Estimado	Límite inferior	Límite superior
.010	-11.096	-101.095	17.591	22.798	-53.824	46.938
.020	-4.014	-85.494	22.625	29.881	-38.183	51.932
.030	0.48	-75.652	25.874	34.374	-28.322	55.162
.040	3.86	-68.283	28.354	37.755	-20.945	57.634
.050	6.61	-62.314	30.396	40.504	-14.975	59.675
.060	8.95	-57.255	32.155	42.845	-9.92	61.439
.070	11.002	-52.837	33.716	44.897	-5.511	63.008
.080	12.84	-48.896	35.128	46.734	-1.583	64.433
.090	14.511	-45.326	36.426	48.405	1.972	65.747
.100	16.049	-42.052	37.634	49.943	5.226	66.974
.150	22.417	-28.649	42.784	56.312	18.482	72.272
.200	27.479	-18.214	47.096	61.373	28.685	76.816
.250	31.821	-9.465	50.998	65.715	37.107	81.044
.300	35.721	-1.811	54.704	69.615	44.329	85.183
.350	39.334	5.073	58.348	73.228	50.66	89.38
.400	42.763	11.383	62.028	76.657	56.291	93.738
.450	46.08	17.248	65.828	79.975	61.353	98.341
<b>.500</b>	<b>49.345</b>	<b>22.759</b>	<b>69.829</b>	<b>83.24</b>	<b>65.951</b>	<b>103.255</b>
.550	52.61	27.986	74.114	86.504	70.177	108.542
.600	55.927	32.987	78.778	89.822	74.12	114.263
.650	59.356	37.822	83.933	93.251	77.871	120.502
.700	62.97	42.556	89.726	96.864	81.526	127.375
.750	66.869	47.278	96.365	100.764	85.194	135.067
.800	71.212	52.116	104.178	105.106	89.018	143.895
.850	76.273	57.29	113.75	110.167	93.214	154.444
.900	82.642	63.246	126.348	116.536	98.21	168.003
.910	84.18	64.611	129.465	118.074	99.38	171.313
.920	85.851	66.066	132.878	119.745	100.639	174.923
.930	87.688	67.636	136.661	121.582	102.009	178.907
.940	89.74	69.355	140.92	123.635	103.522	183.372
.950	92.081	71.278	145.817	125.975	105.23	188.482
.960	94.83	73.489	151.616	128.725	107.215	194.508
.970	98.211	76.148	158.806	132.105	109.627	201.945
.980	102.704	79.596	168.45	136.599	112.793	211.871
.990	109.787	84.872	183.807	143.681	117.708	227.589



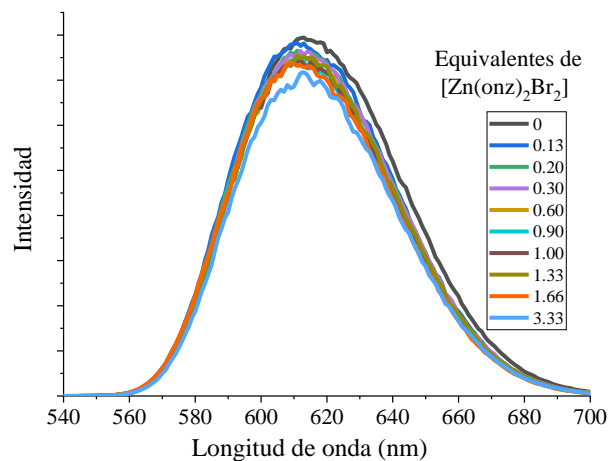
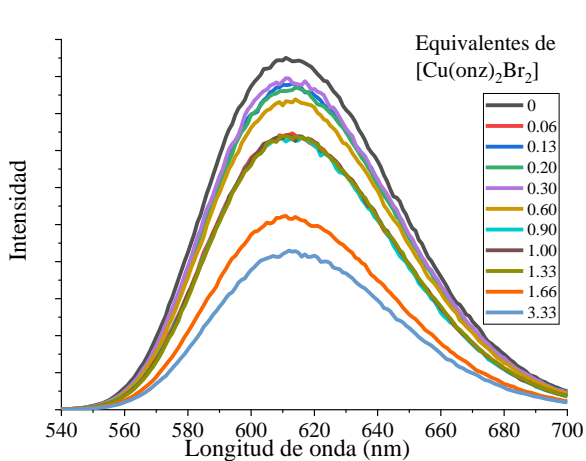
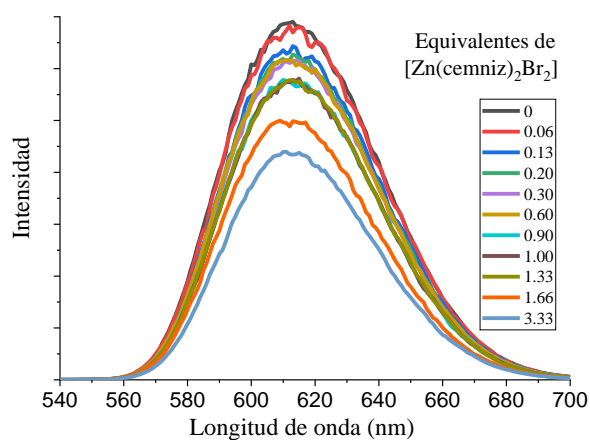
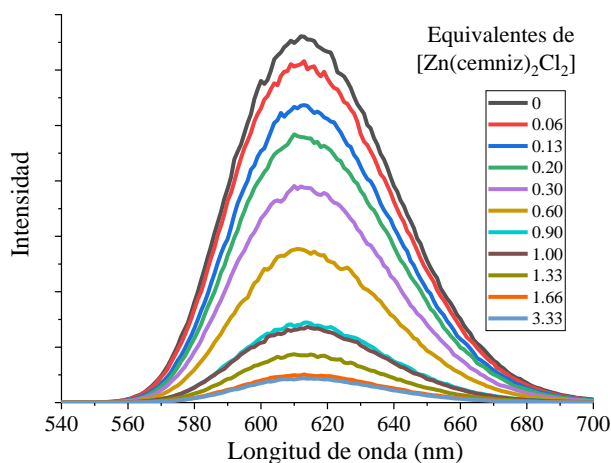
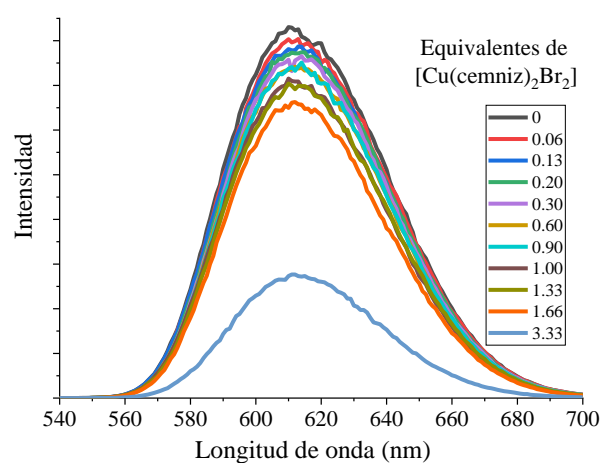
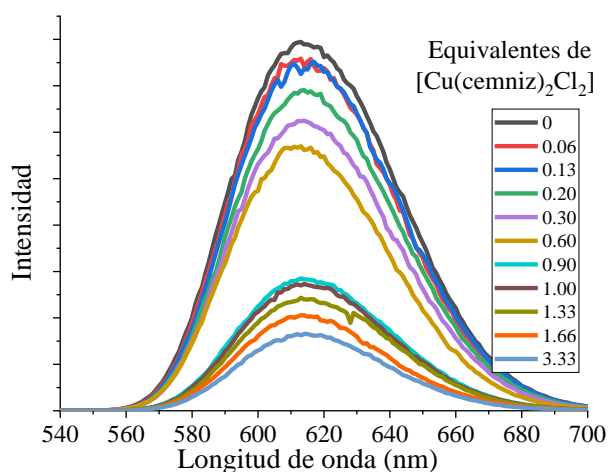
## ANEXO VI. Espectros de UV-Vis obtenidos para los estudios con ADN





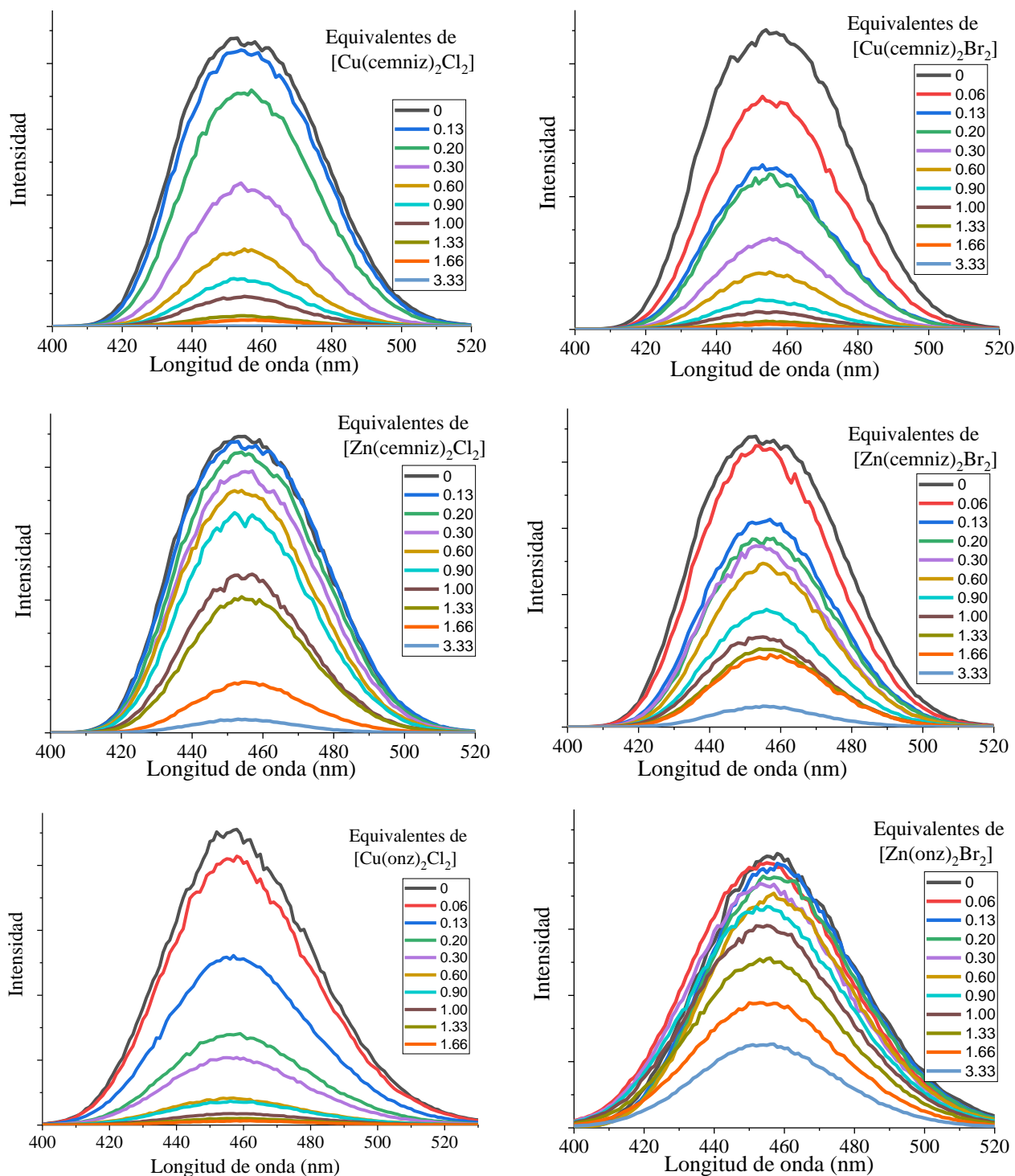
## ANEXO VII. Espectros de fluorescencia obtenidos para los ensayos con EB y Hoechst 33258

Ensayos de desplazamiento competitivo para los aductos de BE-ADN con concentraciones crecientes de los compuestos  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  (Incubación 1 h,  $[\text{EB}] = 75 \mu\text{M}$ ,  $\text{ct-DNA}_b = 15 \mu\text{M}$ ,  $[\text{compuesto}] = 0\text{-}50 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ , en buffer de cacodilato  $\text{pH} = 7.25$ )



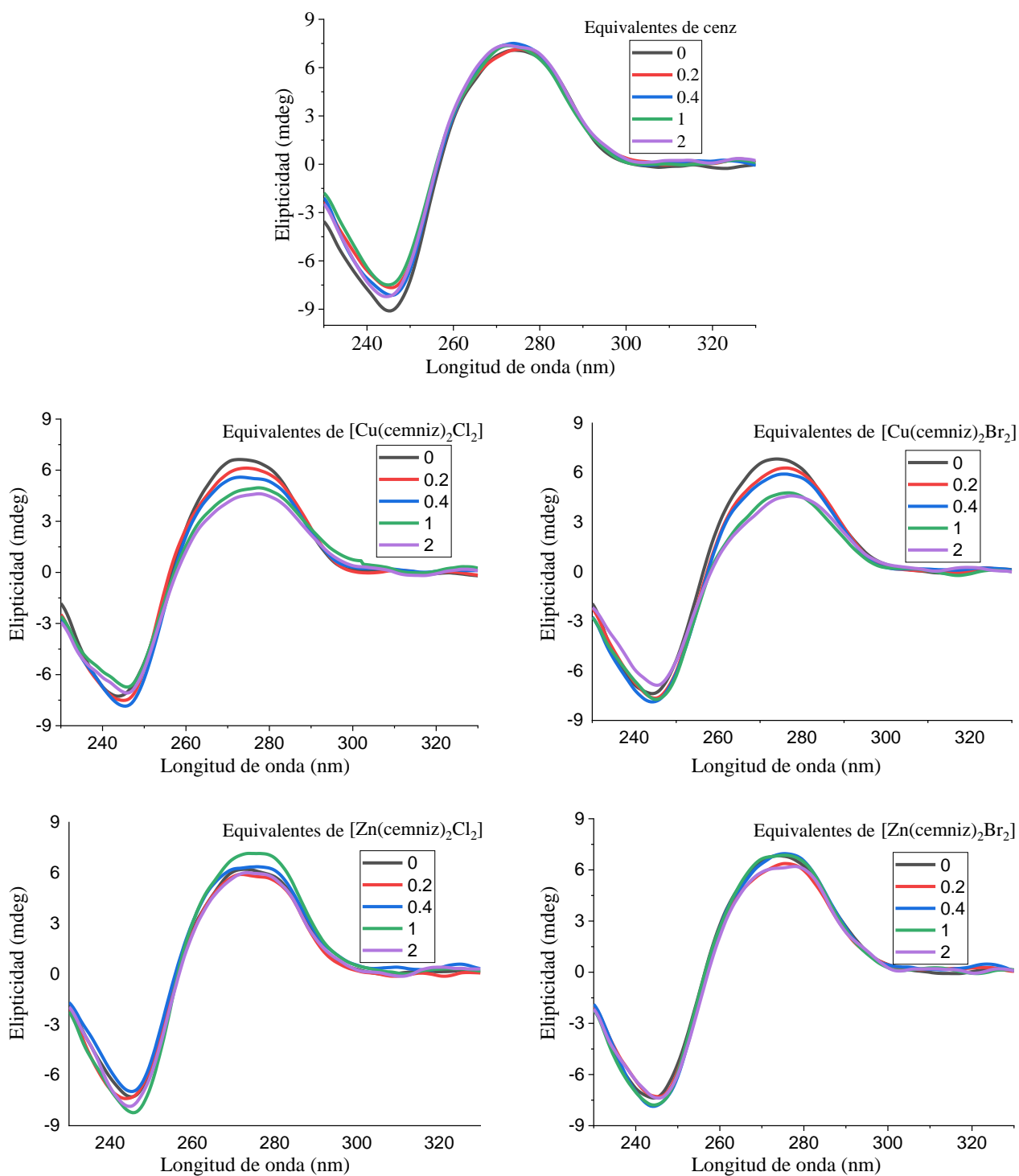


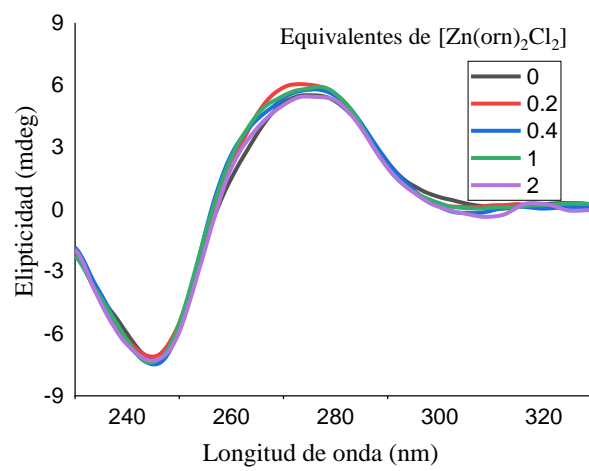
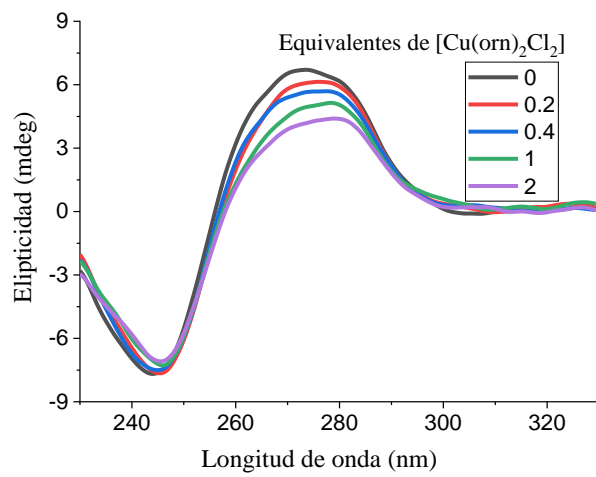
Ensayos de desplazamiento competitivo para el aducto de Hoechst 33258 con ADN con concentraciones crecientes de los compuestos  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  y  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  (Incubación 1h,  $[\text{Hoechst}] = 75 \mu\text{M}$ ,  $\text{ct-DNA}_b = 30 \mu\text{M}$ ,  $[\text{compuesto}] = 0\text{-}50 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 458 \text{ nm}$  en buffer de cacodilato  $\text{pH} = 7.25$ ).





## ANEXO VIII. Espectros de dicroísmo circular









## ANEXO IX. Datos de electroforesis en gel

Resultados de electroforesis en gel para plásmido pBR322 (15  $\mu\text{M}_{\text{pb}}$ ) después de 1 h de incubación a 37°C en cacodilato (pH = 7.25) con el ligante onz y sus compuestos de coordinación de cobre(II), en presencia de ácido ascórbico (50  $\mu\text{M}$ ) y peróxido de hidrógeno (500  $\mu\text{M}$ ).

Carril	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Forma I	Forma II	%Daño
plásmido ADN (p)	-	93.6	5.9	6.4
p + AA	-	91.5	-	8.5
p + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	94.6	4.5	5.4
p + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	89.2	9.0	10.8
Cu(phen)	10	81.7	-	18.3
Cu(phen) + AA	10	-	-	100.0
Cu(phen) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	19.3	17.2	80.7
Cu(phen) + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	-	-	100.0
p + onz	50	90.2	7.6	9.8
p + onz + H <sub>2</sub> Asc	50	88.2	5.6	11.8
p + onz + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	89.3	8.9	10.7
p + onz + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	91.2	4.3	8.8
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	10	63.6	6.4	36.4
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]+ AA	10	41.9	33.0	58.1
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	83.6	6.1	16.4
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]+ AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	19.4	46.5	80.6
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	50	66.2	9.7	33.8
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA	50	-	-	100.0
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.0
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.0
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	10	92.2	-	7.8
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA	10	55.3	35.6	44.7
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	-	-	100.0
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	-	-	100.0
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	50	93.3	23.0	6.7
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA	50	-	-	100.0
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.0
p + [Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA	50	-	-	100.0



Resultados de electroforesis en gel para plásmido pBR322 (15  $\mu\text{M}_{\text{pb}}$ ) después de 1 h de incubación a 37°C en cacodilato (pH = 7.25) con los compuestos de coordinación de zinc(II) con onz, en presencia de ácido ascórbico (50  $\mu\text{M}$ ) y peróxido de hidrógeno (500  $\mu\text{M}$ ).

Carril	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Forma I	Forma II	%Daño
plásmido ADN (p)	-	93.6	5.9	6.4
p + AA	-	91.5	-	8.5
p + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	94.6	4.5	5.4
p + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	89.2	9.0	10.8
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	10	85.4	-	14.6
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA	10	8.8	65.7	91.2
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	89.2	5.9	10.8
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	32.1	44.0	67.9
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	50	67.1	3.9	32.9
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA	50	-	4.8	100.0
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	21.7	47.6	78.3
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.0
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	10	96.5	2.6	3.5
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA	10	12.7	81.8	87.3
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	85.7	4.7	14.3
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	-	-	100.0
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	50	88.1	0.4	11.9
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA	50	1.8	98.8	98.2
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	55.2	29.1	44.8
p + [Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.0



Resultados de electroforesis en gel para plásmido pBR322 (15  $\mu\text{M}_{\text{pb}}$ ) después de 1 h de incubación a 37°C en cacodilato (pH = 7.25) con el ligante cenz y sus compuestos de coordinación, en presencia de ácido ascórbico (50  $\mu\text{M}$ ).

Carril	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Forma I	Forma II	%Daño
plásmido ADN (p)	-	95.20	-	4.80
p + AA	-	96.30	-	3.70
p + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	92.70	6.50	7.30
p + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	90.50	3.90	9.50
Cu(phen)	10	93.20	-	6.80
Cu(phen) + AA	10	5.10	64.80	94.90
Cu(phen) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	21.00	64.80	79.00
Cu(phen) + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	-	-	100.00
p + cenz	50	92.50	-	7.50
p + cenz + H <sub>2</sub> Asc	50	91.20	-	8.80
p + cenz + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	92.80	5.90	7.20
p + cenz + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	90.30	4.00	9.70
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	10	88.00	-	12.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]+ AA	10	66.80	16.60	33.20
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	16.50	84.30	83.50
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]+ AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	-	-	100.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	50	68.50	-	31.50
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA	50	-	-	100.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	10	62.20	11.30	37.80
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA	10	56.10	-	43.90
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	16.00	37.10	84.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	-	-	100.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	50	66.20	7.50	33.80
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA	50	-	-	100.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.00
p + [Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]+ AA	50	-	-	100.00



Resultados de electroforesis en gel para plásmido pBR322 (15  $\mu\text{M}_{\text{pb}}$ ) después de 1 h de incubación a 37°C en cacodilato (pH = 7.25) con el ligante *cen*z y sus compuestos de coordinación, en presencia de ácido ascórbico (50  $\mu\text{M}$ ) y peróxido de hidrógeno (500  $\mu\text{M}$ ).

Carril	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Forma I	Forma II	%Daño
plásmido ADN (p)	-	95.20	-	4.80
p + AA	-	96.30	-	3.70
p + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	92.70	6.50	7.30
p + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	90.50	3.90	9.50
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	10	88.40	2.20	11.60
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA	10	82.90	2.90	17.10
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	92.70	6.50	7.30
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	9.10	2.10	90.90
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	50	79.20	2.50	20.80
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA	50	19.40	40.60	80.60
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	2.40	81.50	97.60
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	-	-	100.00
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	10	93.80	3.00	6.20
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA	10	71.60	6.40	28.40
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	80.70	27.20	19.30
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	11.00	75.80	89.00
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	50	81.60	2.20	18.40
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA	50	3.90	39.50	96.10
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	1.60	63.30	98.40
p + [Zn( <i>cen</i> z) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ] + AA + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	21.60	10.40	78.40



# Anti-toxoplasma activity and DNA-binding of copper(II) and zinc(II) coordination compounds with 5-nitroimidazole-based ligands

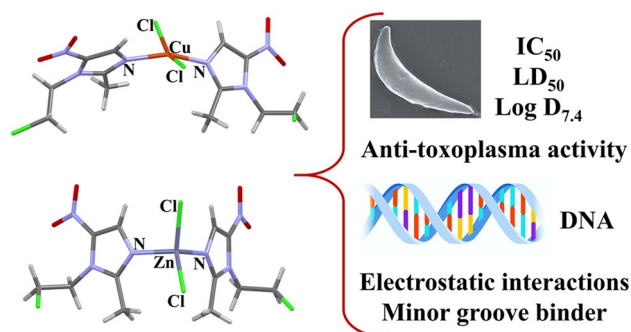
Rubí Navarro-Peñaloza<sup>1</sup> · Jhony Anacleto-Santos<sup>2</sup> · Norma Rivera-Fernández<sup>2</sup> · Francisco Sánchez-Bartez<sup>3</sup> · Isabel Gracia-Mora<sup>3</sup> · Ana B. Caballero<sup>4,5</sup> · Patrick Gamez<sup>4,5,6</sup> · Norah Barba-Behrens<sup>1</sup>

Received: 17 July 2023 / Accepted: 14 November 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

Tetrahedral copper(II) and zinc(II) coordination compounds from 5-nitroimidazole derivatives, viz. 1-(2-chloroethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (cenz) and ornidazole 1-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (onz), were synthesized and spectroscopically characterized. Their molecular structures were determined by X-ray diffraction studies. The complexes  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{X}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{X}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{X}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{X}_2]$  ( $\text{X}^- = \text{Cl}, \text{Br}$ ), are stable in solution and exhibit positive  $\text{LogD}_{7.4}$  values that are in the range for molecules capable of crossing the cell membrane via passive diffusion. Their biological activity against *Toxoplasma gondii* was investigated, and  $\text{IC}_{50}$  and lethal dose ( $\text{LD}_{50}$ ) values were determined. The ornidazole copper(II) compounds showed very good antiparasitic activity in its tachyzoite morphology. The interaction of the coordination compounds with DNA was examined by circular dichroism, fluorescence (using intercalating ethidium bromide and minor groove binding Hoechst 33258) and UV–Vis spectroscopy. The copper(II) compounds interact with the minor groove of the biomolecule, whereas weaker electrostatic interactions take place with the zinc(II) compounds. The spectroscopic data achieved for the two series of complexes (namely with copper(II) and zinc(II) as metal center) agree with the respective DNA-damage features observed by gel electrophoresis.

## Graphical abstract



**Keywords** Coordination compounds · Nitroimidazole ligands · Anti-toxoplasma activity · Copper(II) and zinc(II) · DNA-damage

## Introduction

5-Nitroimidazole derivatives are a group of heterocyclic compounds of broad spectrum against Gram-positive and Gram-negative bacteria, protozoa, and helminth that cause

infection on the human body [1–3]. Metronidazole (mtz) was the first derivative to be used due to its potent activity against the parasite *Trichomonas vaginalis*, which causes trichomoniasis disease. It is currently used against amebiasis caused by *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*, and for stomach ulcers caused by *Helicobacter pylori* [1–4]. After the discovery of metronidazole, a second and third

Extended author information available on the last page of the article

generation of 5-nitroimidazole drugs with different chains at the N1-position of the imidazole were developed, such as tinidazole (tnz), secnidazole (snz) and ornidazole (onz) [1, 2].

Regarding the mechanism of action, 5-nitroimidazoles are considered as pro-drugs which require intracellular bioactivation through three essential steps: (1) entry of the compound into the cell by passive diffusion, (2) enzymatic reduction (type I or type II) of the nitro group and (3) damage by rupture of DNA strands and subsequent cell death [1–7]. The type I mechanism is oxygen-insensitive and consists in sequential two-electron reductions of the nitro group generating relatively stable nitroso and hydroxylamine intermediates. On the other hand, the type II mechanism (one-electron reduction) is oxygen sensitive and gives rise to a nitro radical anion  $R\text{-NO}_2^{\cdot-}$  which reacts with molecular oxygen to form a superoxide anion and subsequent reoxidation to a nitro group [7]. This process is responsible for the toxic effects of the nitro groups that cause gastrointestinal diseases, carcinogenicity, hepatotoxicity and mutagenicity. Resistance of microorganisms to these drugs have also been observed [6–10].

Due to reported clinical resistance and side effects, the use of 5-nitroimidazoles as ligands to generate coordination compounds has been reported as an alternative for the treatment against parasites and bacteria [11]. We have been interested in investigating the biological activity of a series of coordination compounds with nitroimidazole derivatives; among them tinidazole complexes were synthesized. The tetrahedral coordination compounds  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  were tested against the helminth *Euryhalitotrema perezponcei*, which affects flamingo snapper fishes that are consumed by humans. The in vitro and in vivo assays carried out presented a parasite mortality percentage of 100% for  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  [12, 13]. Characterization by UV–Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy and gel electrophoresis showed that these compounds are capable of causing DNA-damage through binding to its minor groove via electrostatic interactions and by oxidative cleavage [14]. Recent theoretical studies of the DNA recognition process with Molecular Dynamics and the Quantum Theory of Atoms in Molecules, provided results that were consistent with the experimental findings [15].

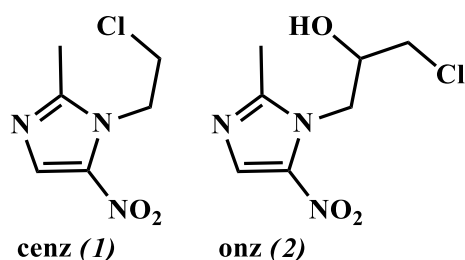
Previously, the tetrahedral mononuclear compounds  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  have been reported with the onz ligand. The zinc(II) complex showed higher activity against amoeba *Entamoeba histolytica* than the free ligand (MIC = 6.25  $\mu\text{M}$  and 12.5  $\mu\text{M}$ , respectively) [16, 17].

Toxoplasmosis is an infectious zoonotic disease caused by the apicomplex opportunistic parasite *Toxoplasma gondii*,

which infects humans and all homoeothermic vertebrates. It is one of the most common infections in humans; it is estimated that approximately one third of the world's population is infected with latent toxoplasmosis [18, 19]. The disease can go unnoticed clinically in immunocompetent patients, but it causes fatal complications in immunocompromised patients, such as those living with HIV, who commonly have brain lesions due to this parasite [18, 20, 21]. Women of reproductive age and fetuses are also affected groups [18–22]. *T. gondii* can be transmitted by (i) oral ingestion of food and water contaminated by parasite oocysts that are shed in cat feces, (ii) consumption of raw or undercooked meat containing tissue cysts, and (iii) congenital transmission from mother to fetus [21]. The parasite is heteroxenous, completing its evolutionary cycle in two or more hosts, during this cycle it fulfills three different morphologies, namely: oocysts, which is the phase in which it can survive for long periods of time outside the host; bradyzoites or cysts, which is the slow replicating form and has a great affinity for neuronal and muscular tissue; and the tachyzoite, which is the rapidly replicating form [19–23]. Currently, pyrimethamine-sulfadiazine is the combination of choice to treat acute toxoplasmosis, with an effectiveness of 75–89%. However, resistance to both drugs has been reported and they are known to cause serious host side effects including agranulocytosis, hypersensitivity reactions, leukopenia, neutropenia, skin and liver necrosis, Stevens-Johnson syndrome [19, 24].

Due to the prevalence of toxoplasmosis and the complications that occur in immunocompromised patients, various studies have been focused on finding safe drugs with new mechanisms of action that are effective and non-toxic to patients [25]. An alternative anti-toxoplasma treatment is provided by natural products, like for instance those extracted from *Pleopeltis crassinervata* [26]. Some, pyridine-based coordination compounds of iron(III) cobalt(II) copper(II) and zinc(II) were also described as active agents against *T. gondii* [27–31]. The most effective coordination compounds, which were recently patented, are the dinuclear copper(II) complexes  $[(\text{HL}1)\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{HL}1)]\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  and  $[(\text{H}_2\text{L}2)\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}2)]\text{Cl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.78 and 3.57  $\mu\text{M}$ , respectively [30, 31].

Given the prevalence of toxoplasmosis throughout the world, the associated complications in immunocompromised patients, the low efficacy of currently available drugs, and the relevance of 5-nitroimidazole derivatives for the treatment of parasitic diseases, we have been interested in the development of new coordination compounds of copper(II) and zinc(II) with 1-(2-chloroethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (cenz) and 1-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (onz), Fig. 1. Herein, their structural and physicochemical properties, interactions with DNA, as well as their anti-toxoplasma activity will be discussed.



**Fig. 1** Representation of the structures of the 5-nitroimidazole-based ligands cenz and onz

## Experimental

### Materials and reagents

The reagents and solvents were used without further purification. The ligand 1-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (onz) was obtained from Sigma Aldrich, as well as thionyl chloride, sulfadiazine, Hoechst 33258, cacodylic acid, (3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid) (MOPS), ascorbic acid, hydrogen peroxide, SYTOX<sup>®</sup> Green, SYBR<sup>™</sup> Safe and the calf thymus DNA. The metal salts: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, CuBr<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> and ZnBr<sub>2</sub>, and solvents: acetonitrile, ethyl acetate, hexane, ethanol, dimethyl sulfoxide, and 1-octanol were obtained from J.T. Baker. NaCl was purchased from Fisher, TBE 10X from Invitrogen, sodium salt of calf thymus DNA (ct-DNA, type I fibrous) from Sigma-Aldrich, plasmid pBR322 (4361 bp, 0.25 mg mL<sup>-1</sup>) from Thermo Scientific, agarose from Eco-gen and ethidium bromide 10 mg mL<sup>-1</sup> from Promega.

### Synthesis of 1-(2-chloroethyl)-2-methyl-5-nitro-1H-imidazole (cenz) (1)

The synthesis of cenz was previously reported [32, 33]. However, light modification of the reaction conditions were used, and the ligand was prepared as follows. 5 mL (70 mmol) of thionyl chloride were slowly added, under anhydrous conditions and inert atmosphere, to two grams (12 mmol) of metronidazole in an ice bath. The reaction was kept under stirring and heated with a sand bath for 4 h at 65 °C. Thereafter, a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution was added slowly, in an ice bath until reaching pH 9. Subsequently, extractions were carried out with ethyl acetate (3 × 15 mL); from the combined organic phase was evaporated under reduced pressure and a beige product was obtained. Yield: 89%, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO): δ/ppm = 8.02 (s, 1H, Iz-H); 4.63 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.97 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (400 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO): δ/ppm = 152.28; 138.93; 133.69; 47.36; 43.64; 14.77 (Fig. S1). FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>) 3017 ν(CH<sub>3</sub>), 2930 ν(CH<sub>2</sub>), 1520 ν(C=N), 1458 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>),

1422 ν(N–C–N), 1366 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1259 ν(C–N), 1190 ν(N–O). Anal. Calc. for C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Cl: C, 38.10; H, 4.28; N, 22.16%. Anal Found. C, 38.56; H, 4.35; N, 21.82%.

### Synthesis of the coordination compounds

The synthesis of the coordination compounds [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] was reported previously [16, 17]. However, the reaction conditions were modified to obtain the mononuclear compounds, as discussed below.

#### [Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (3)

A solution of CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (45 mg, 0.26 mmol) in acetonitrile (10 mL) was added to a solution of cenz (100 mg, 0.52 mmol) in acetonitrile (5 mL). The reaction mixture was kept under stirring at room temperature for 20 min. After this time a blue precipitate was obtained. The solid product was dissolved in acetonitrile and single crystals were obtained by ether diffusion, which were suitable for X-ray diffraction analysis. Yield: 90%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1560 ν(C=N), 1481 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1425 ν(N–C–N), 1363 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1271 ν(C–N), 1186 ν(N–O). Anal. Calc. for CuCl<sub>4</sub>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: C, 28.05; H, 3.14; N, 16.36%. Anal Found. C, 27.95; H, 3.20; N, 15.86%.

#### [Cu(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (4)

A solution of CuBr<sub>2</sub> (60 mg, 0.26 mmol) in hot ethanol (10 mL) was added to a solution of cenz (100 mg, 0.52 mmol) in hot ethanol (10 mL). The resulting mixture was refluxed for 4 h, after this time the solvent was evaporated under reduced pressure and a brown product was isolated by filtration. Yield: 94%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1548 ν(C=N), 1470 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1435 ν(N–C–N), 1361 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1271 ν(C–N), 1194 ν(N–O). Anal. Calc. for CuBr<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 23.92; H, 2.68; N, 13.95%. Anal Found. C, 23.73; H, 2.69; N, 13.68%.

#### [Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (5)

A solution of ZnCl<sub>2</sub> (36 mg, 0.26 mmol) in hot acetonitrile (10 mL) was added to a solution of cenz 100 mg, 0.52 mmol) in hot acetonitrile (10 mL). The mixture was refluxed for 3 h. The solution was subsequently kept unperturbed for the slow evaporation of the solvent and after two days colorless single crystals, suitable for X-ray diffraction analysis were obtained. Yield: 91%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1554 ν(C=N), 1480 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1420 ν(N–C–N), 1360 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1269 ν(C–N), 1188 ν(N–O). Anal. Calc. for ZnCl<sub>4</sub>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: C, 27.96; H, 3.13; N, 16.30%. Anal Found. C, 27.71; H, 3.47; N, 15.66%.

**[Zn(cenz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (6)**

A solution of ZnBr<sub>2</sub> (60 mg, 0.26 mmol) in hot acetonitrile (10 mL) was added to a solution of cenz (100 mg, 0.52 mmol) in hot acetonitrile (10 mL). The reaction mixture was refluxed for 3 h, producing a white precipitate that was isolated by filtration. Yield: 88%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1558 ν(C=N), 1478 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1422 ν(N-C-N), 1375 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1269 ν(C-N), 1188 ν(N-O). Anal. Calc. for ZnBr<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 23.85; H, 2.67; N, 13.90%. Anal Found. C, 23.49; H, 2.90; N, 13.35%.

**[Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (7)**

A solution of CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (43 mg, 0.23 mmol) in hot acetonitrile (10 mL) was added to a solution of onz (100 mg, 0.46 mmol) in hot acetonitrile (10 mL). The resulting mixture was heated stirring for 1 h. Afterwards, the solvent was evaporated, and a viscous product was obtained. A green compound was isolated by precipitation in hexane. Yield: 83%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1556 ν(C=N), 1478 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1425 ν(N-C-N), 1367 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1272 ν(C-N), 1191 ν(N-O). Anal. Calc. for CuCl<sub>4</sub>C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>: C, 29.31; H, 3.51; N, 14.65%. Anal Found. C, 29.45; H, 3.61; N, 14.86%.

**[Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (8)**

A solution of CuBr<sub>2</sub> (50 mg, 0.23 mmol) in hot acetonitrile (10 mL) was added to a solution of onz (100 mg, 0.46 mmol) in hot acetonitrile (10 mL). The mixture was stirred under heating for 1 h. Afterwards, the solvent was evaporated, and a viscous product was obtained. A brown compound was isolated by precipitation in hexane. Yield: 87%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1556 ν(C=N), 1476 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1425 ν(N-C-N), 1365 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1270 ν(C-N), 1189 ν(N-O). Anal. Calc. for CuBr<sub>2</sub>C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 25.38; H, 3.04; N, 12.68%. Anal Found. C, 25.53; H, 3.59; N, 12.40%.

**[Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (9)**

A solution of ZnCl<sub>2</sub> (31 mg, 0.23 mmol) in hot acetonitrile (10 mL) was added to a solution of onz (100 mg, 0.46 mmol) in hot acetonitrile (10 mL). The mixture was stirred under heating for 1 h. Afterwards, the solvent was evaporated, and a viscous product was obtained. A white compound was isolated by precipitation in hexane. Yield: 82%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1559 ν(C=N), 1480 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1427 ν(N-C-N), 1369 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1272 ν(C-N), 1192 ν(N-O). Anal. Calc. for ZnCl<sub>4</sub>C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>: C, 29.22; H, 3.50; N, 14.60%. Anal Found. C, 28.99; H, 3.85; N, 14.62%.

**[Zn(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] (10)**

A solution of ZnCl<sub>2</sub> (31 mg, 0.23 mmol) in hot acetonitrile (10 mL) was added to a solution of onz (100 mg, 0.46 mmol) in hot acetonitrile (10 mL). The resulting mixture was stirred under heating for 1 h. Afterwards, the solvent was evaporated, and a viscous product was obtained. A white compound was precipitated from hexane. Yield: 81%. FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 1558 ν(C=N), 1480 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1427 ν(N-C-N), 1368 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1270 ν(C-N), 1191 ν(N-O). Anal. Calc. for ZnBr<sub>2</sub>C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 25.31; H, 3.03; N, 12.65%. Anal Found. C, 25.52; H, 3.28; N, 12.80%.

**Physical measurements**

Elemental analyses for carbon, hydrogen and nitrogen were carried out with a Perkin Elmer 2400 analyzer. FT IR spectra in the range 4000–400 cm<sup>-1</sup> and 600–50 cm<sup>-1</sup> were collected with a Perkin Elmer FTIR/FIR Spectrum 4000 spectrophotometer by attenuated total reflectance (ATR). NMR spectra were obtained at room temperature on a 400 MHz VNMRS Varian with Broad Band Switchable probe of two channel ratio frequency (<sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F) (<sup>31</sup>P/<sup>15</sup>N) spectrophotometer of 9.4 T. Electronic spectra were measured over the range 40,000–5000 cm<sup>-1</sup> by the diffuse reflectance method on a Cary-5000 Varian spectrophotometer at room temperature. Spectra of solution spectra in sodium cacodylate, 3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS) and phosphate-buffered saline (PBS) were collected in the range of 1600–250 nm. Magnetic susceptibility measurements at room temperature of powdered samples were obtained on a Sherwood Scientific MK1 magnetic susceptibility balance, using the Gouy method.

**X-ray crystallography**

X-ray diffraction data for [Cu(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Zn(cenz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] were collected at 130 K using an Oxford Diffraction Gemini “A” diffractometer with a CCD-detector and using graphite monochromated Mo Kα radiation source at 298 K. CrysAlisPro software packages were used for data collection and data integration. Absorption corrections were applied using analytical procedures. The structures were solved by direct methods using the package SHELXS and refined with an anisotropic approach for non-hydrogen atoms using the SHELXL program. All the hydrogen atoms attached to C atoms were positioned geometrically as riding on their parent atoms, with C–H = 0.93–0.99 Å and U<sub>iso</sub>(H) = 1.2 U<sub>eq</sub>(C) for aromatic and methylene groups, and U<sub>iso</sub>(H) = 1.5 U<sub>eq</sub>(C) for methyl groups [34–36]. A summary of the crystallographic data is shown in Table 1. The crystallographic data for the structures have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication



**Table 1** Crystallographic data of [Cu(enz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Zn(enz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]

Compound	[Cu(enz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	[Zn(enz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]
Chemical formula	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Cu	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Zn
FW (g mol <sup>-1</sup> )	513.65	515.48
Crystal system	Orthorhombic	Orthorhombic
Space group	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C m c 2 <sub>1</sub>
a (Å)	7.2177(5)	24.725(2) Å
b (Å)	13.5212(8)	7.7268(7) Å
c (Å)	19.9050(11)	9.9383(7) Å
α (°)	90	90
β (°)	90	90
γ (°)	90	90
V (Å <sup>3</sup> )	1942.6(2)	1898.6(3) Å <sup>3</sup>
Z	4	4
D <sub>calc</sub> (mg cm <sup>-3</sup> )	1.7568	1.803
μ (mm <sup>-1</sup> )	1.707	1.889
F (000)	1036	1040
Temp (K)	130(2)	130(2)
θ range (°)	3.420–29.441	3.440–29.547
Index range	–8 ≤ h ≤ 9 –13 ≤ k ≤ 18 –25 ≤ l ≤ 27	–31 ≤ h ≤ 34 –7 ≤ k ≤ 10 –8 ≤ l ≤ 13
Measured reflection	8007	3038
Parameters	246	128
Final R indices [I > 2σ(I)]	0.0309	0.0389
wR <sub>2</sub>	0.0579	0.1166
F <sup>2</sup>	1.060	1.067
Δρ <sub>max</sub> (e Å <sup>-3</sup> )	0.317	1.404
Δρ <sub>min</sub> (e Å <sup>-3</sup> )	–0.323	–1.031

CCDC 2293450 and 2272007. Copies of the data can be obtained free of charge via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

## Biological assays

### Animals

For the anti-toxoplasma assays three-week-old male CDI mice (approximate weight 30 g) were obtained from the Faculty of Medicine, UNAM vivarium. The handling of the animals was carried out in accordance with the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999 for the production care, and use of laboratory animals in accordance with international guidelines and approved by the Ethical and Research Committee at Faculty of Medicine, UNAM (project 052/2017).

For the acute toxicity assays, young adult male ICR mice with an average weight of 28 g and a variation of no more than ± 3 g were used. The handling of the animals was carried out in accordance with the committee for the

care and use of laboratory animals (CICUAL) from the Faculty of Chemistry, UNAM.

### Tachyzoites of *Toxoplasma gondii*

RH tachyzoites of *Toxoplasma gondii* were extracted in PBS solution at pH 7.4 from intraperitoneal fluid of infected CD1 mice on the third day of infection and centrifuged for ten minutes at 260g. Purified parasites were used within 4 h after their isolation.

### Viability assays in extracellular tachyzoites of *Toxoplasma gondii*

The viability of the parasites was determined from staining with Sytox Green<sup>®</sup> fluorescent dye exclusion test. Purified tachyzoites (1 × 10<sup>6</sup>) were incubated for one hour at room temperature with PBS solutions of the coordination compounds or the free ligands at concentrations of 40, 20, 10, 5, and 2.5 μM (0.1% DMSO), in a volume final of 1 mL. After the incubation time, the samples were centrifuged for 10 min at 250g, the medium was removed and 20 μL of Sytox Green<sup>®</sup> was added after 15 min of incubation for differentiate dead parasites in a Neubauer chamber. The assays were performed in triplicate. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated by Boltzmann regression analysis and expressed as mean ± standard error of three replicates. Based on the results the tachyzoites were incubated under the same conditions with the coordination compounds [Cu(enz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Cu(enz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] at their respective IC<sub>50</sub> values, Sytox Green<sup>®</sup> was then added, and they were observed by fluorescence microscopy. Sulfadiazine was used as positive control.

### Pharmacological profile and acute toxicity

A stock solution with a concentration of 25 mg mL<sup>-1</sup> of [Cu(enz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Cu(enz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] was prepared with water for injection. In the case of [Cu(enz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>], 0.1% of DMSO was added. For the pharmacological profile three mice were used for each dose of 1, 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup> per compound. For the acute toxicity assays five mice were treated for each dose (10, 50, 75 and 100 mg kg<sup>-1</sup>) per compound. All study animals were observed at least twice daily to determine pain/mortality. A detailed clinical observation was made 24 h after administration. The doses were administered intraperitoneally. The data obtained were used to calculate the mean lethal dose using the software Prism 13.0 and SPSS 29.0 [37, 38].

### Distribution coefficient ( $\log D_{7.4}$ )

Solutions between 100 and 10  $\mu\text{M}$  of the free ligands (cenz and onz) and the coordination compounds 3–10 were prepared in a MOPS buffer pH 7.4 as the aqueous phase and in 1-octanol as the organic phase. The absorption at 320 nm and 310 nm was determined for the aqueous and organic phase respectively by electronic spectroscopy (UV–Vis). Through a linear regression (concentration vs. absorption) the molar extinction coefficient of each compound in both phases was determined (Table 3). The lipophilicity was calculated in the 1-octanol/water system from the shake flask method using Eq. 1 [39]:

$$\text{Log}D_{7.4} = \frac{C_{oc}}{C_w} \quad (1)$$

where,  $C_o$  is the final concentration in the organic phase and  $C_w$  is the final concentration in the aqueous phase (MOPS buffer at  $10^{-2}$  M pH 7.4). Both phases were presaturated with 50  $\mu\text{M}$  solutions of the free ligands or 500  $\mu\text{M}$  of each coordination compound and their UV spectrum was recorded. Both phases were combined and kept stirring for 3 h at 25 °C and in the absence of light. Subsequently, the mixture was centrifuged at 400g and the concentration in both phases was determined by UV–Vis spectroscopy using the Beer–Lambert law. The assays were performed in triplicate.

### Studies on DNA interaction and damage

For the UV–Vis, fluorescence and circular dichroism assays the concentration of ct-DNA was determined on a Varian Cary 100 Scan spectrophotometer from the absorption at 260 nm and the corresponding molar absorptivity of  $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (nucleobase concentration). The stock solutions of the coordination compounds and the free ligands were prepared in cacodylate/NaCl buffer (1 mM cacodylic acid and 20 mM sodium chloride) at pH 7.25. The final samples contained a DMSO concentration of 0.2%.

### UV–Vis measurements

Absorption titration experiments were carried out by adding increasing concentrations of ct-DNA (0–25  $\mu\text{M}$ ) to 10  $\mu\text{M}$  of

**Table 2** Far infrared bands ( $\text{cm}^{-1}$ ) and effective magnetic moments (BM) for the coordination compounds

Compound	$\nu(\text{M-Cl})$	$\mu_{\text{eff}}$	Compound	$\nu(\text{M-Br})$	$\mu_{\text{eff}}$
[Cu(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	326, 276	2.07	[Cu(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	199	1.86
[Zn(cenz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	332, 296	—	[Zn(cenz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	270, 214	—
[Cu(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	317, 273	1.78	[Cu(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	224, 185	1.99
[Zn(onz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	331, 273	—	[Zn(onz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	275, 249	—

the compounds in a final volume of 2 mL. The samples were incubated for 1 h at 37 °C, and spectra were collected on a Varian Cary 100 Scan spectrophotometer. For these assays the charge-transfer band of the compounds was followed at 320 nm. The intrinsic binding constant ( $K_b$ ) was determined from the titration data using Eq. 2:

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_a - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_0 - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_0 - \epsilon_f)} \quad (2)$$

where  $\epsilon_a$ ,  $\epsilon_0$  and  $\epsilon_f$  are respectively, the molar extinction coefficients of the free compounds in solution, fully bound compound with DNA and compound bound to DNA at a definite concentration.

### Fluorescence spectroscopy

Emission intensity of the dyes DNA-intercalator ethidium bromide, EB ( $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$ ) and the minor-groove binder Hoechst 33,258 ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ) was measured on iHR320 HORIBA JOBIN YVON spectrofluorometer. The samples contained 15  $\mu\text{M}$  (in base pairs) of ct-DNA and 75  $\mu\text{M}$  of EB or Hoechst 33,258 in cacodylate/NaCl buffer. The respective dye was incubated for 30 min with ct-DNA to allow its binding to the biomolecule. Subsequently, increasing amounts of coordination compounds (0–50  $\mu\text{M}$ ) were added up to a final volume of 2 mL, and the samples were incubated for 1 h at 37 °C. The fluorescence spectra of all samples were recorded at room temperature. The affinity of the compounds for ct-DNA compared to EB was evaluated through the Stern–Volmer quenching constant  $K_{sv}$ , from Eq. 3:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[\text{compound}] \quad (3)$$

where  $I_0$  and  $I$  are the emission intensities in absence and the presence of the compound, respectively.

### Circular dichroism (CD)

Circular dichroism (CD) spectra were recorded using a JASCO-815 spectropolarimeter, equipped with xenon-arc lamp of 450 W. The sample compartment was air-purged with  $\text{N}_2$  before use. For the measurements, a quartz cuvette with an optical path of 5 mm was used. A solution of 25  $\mu\text{M}$  (in base pairs) of ct-DNA in cacodylate/NaCl buffer was incubated for 1 h at 37 °C with increasing amounts of coordination compounds (0–50  $\mu\text{M}$ ). The CD spectra were recorded at room temperature.

## Agarose gel electrophoresis

Electrophoresis assays were performed in 1.5% agarose gel and 1× TBE buffer using the DNA plasmid pBR322. The plasmid (15 μM base pairs) was incubated with 10 and 50 μM concentrations of the coordination compounds for 1 h at 37 °C in presence and absence of ascorbic acid (50 μM) as reducing agent and hydrogen peroxide (500 μM) as ROS generator in a final volume of 20 μL. The DNA-cleaving compound [Cu(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> was used as reference. The samples were loaded into the gel with 4 μL of a loading buffer (30% glycerol, 5 mM xylene cyanol), and electrophoresis was performed in 1× TBE at 100 V for 1 h in a Bio-Rad horizontal tank. Subsequently, the gel was stained with SYBR™ Safe overnight and images were acquired with a Gel Doc EZ Imager instrument (Bio-Rad).

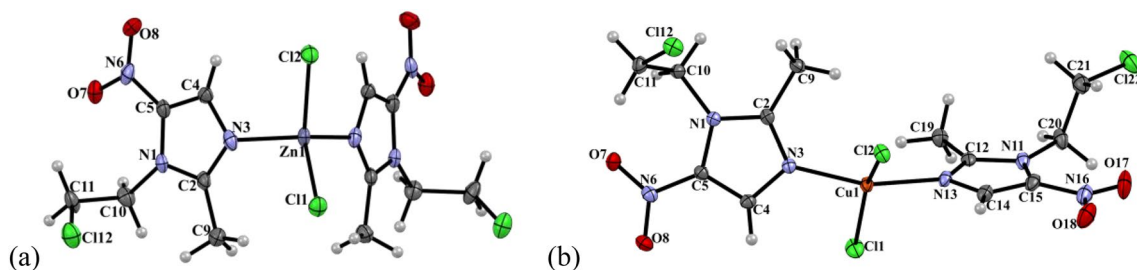
## Results and discussion

### Spectroscopic characterization

The chemical structures of the coordination compounds were proposed based on spectroscopic data as well as elemental analyses and effective magnetic moment.

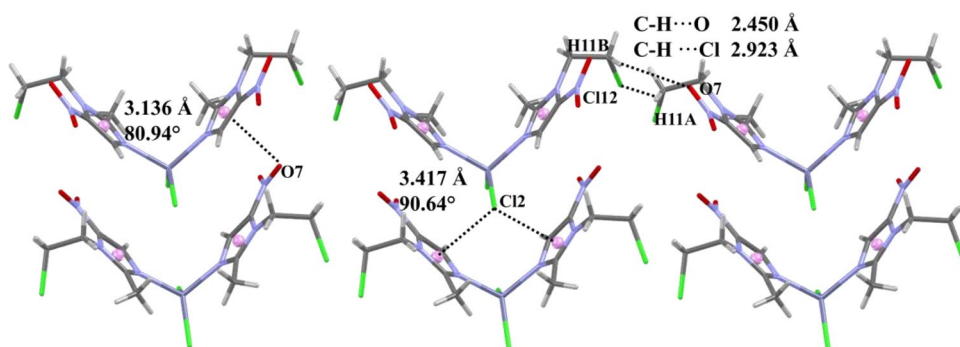
### IR spectra

The vibration band  $\nu(\text{C}=\text{N})$  presents a significant shift, which is indicative of the ligand coordination to the metal center through the aromatic nitrogen. This vibration is observed at 1520 cm<sup>-1</sup> for free *cen*z and at 1548–1560 cm<sup>-1</sup> for its compounds. For the *onz* ligand, this vibration at 1536 cm<sup>-1</sup> is shifted in the coordination compounds at

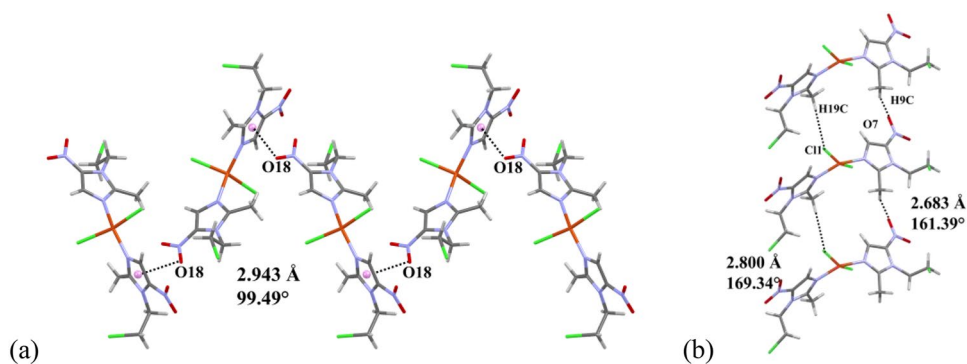


**Fig. 2** ORTEP representation of **a** [Zn(*cen*z)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and **b** [Cu(*cen*z)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] with ellipsoids at 50% probability

**Fig. 3** Non-covalent interactions observed for [Zn(*cen*z)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] in its solid-state structure



**Fig. 4** **a** Lone pair... $\pi$  interactions and **b** hydrogen bonds observed in the solid-state structure of [Cu(*cen*z)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]



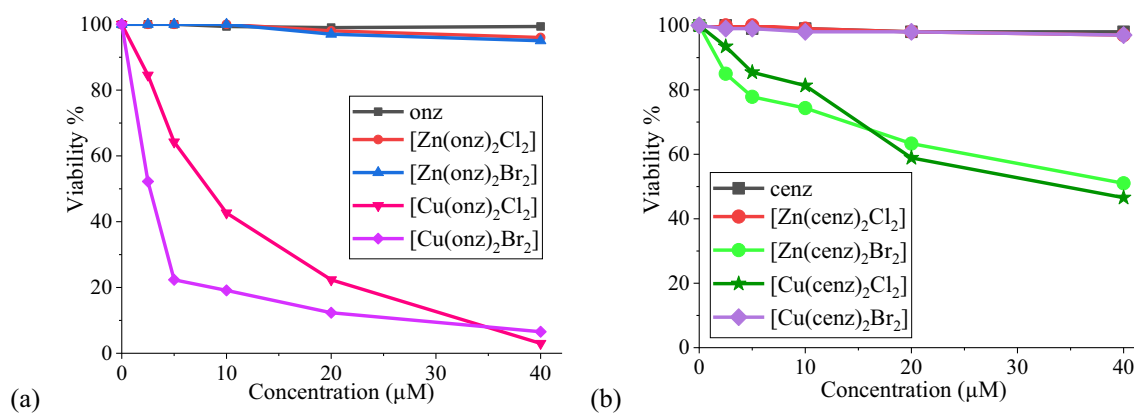
1552–1559  $\text{cm}^{-1}$ . The shifting of the  $\nu(\text{NCN})$  and  $\nu(\text{C-N})$  vibration bands corroborate the coordination of the metal ion in the range of 1425–1476  $\text{cm}^{-1}$  and 1270–1274  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The asymmetric vibration band of the nitro group  $\nu(\text{NO}_2)_{\text{as}}$  is observed at 1458 and 1466  $\text{cm}^{-1}$  for *cenz* and *onz* respectively, which is shifted for more than 12  $\text{cm}^{-1}$  in their coordination compounds due to non-covalent interactions, as observed from the X-ray structures of  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ .

Additionally, in the far infrared region of spectra, metal-halogen vibration  $\nu(\text{M-X})$  bands were observed. These coordination compounds showed the two normal modes of vibration ( $a_1 + b_1$ ) allowed for a tetrahedral geometry [40]. The assignments for each compound are shown in Table 2.

## Electronic spectroscopy and magnetic moments

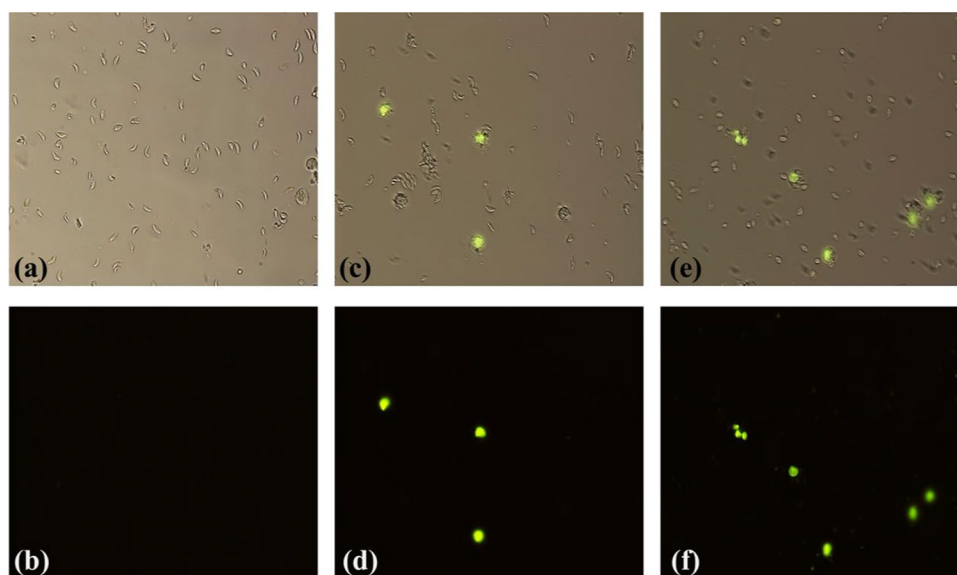
The diffuse reflectance spectra for the copper(II) complexes  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  showed a multi-component electronic transition band, centered at 12,560 and 12,450  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, characteristic of a pseudo-tetrahedral geometry [41]. Similar bands were observed for  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  compounds at 12,580 and 12,140  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The charge transfer bands were centered at 27,530 and 24,750  $\text{cm}^{-1}$  for  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , while for  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ , they were observed at 23,230 and 22,800  $\text{cm}^{-1}$ , respectively (Fig. S2).

The effective magnetic moments for  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  are in the range expected for such copper(II) coordination compounds, Table 2 [42].



**Fig. 5** Viability (%) of *Toxoplasma gondii* (RH tachyzoites) exposed to **a** onz and **b** cenz and their coordination compounds (0–40  $\mu\text{M}$ ) for 1 h in PBS buffer

**Fig. 6** Images of *T. gondii* RH strain tachyzoites: **a** control without treatment in bright field and **b** in fluorescence microscopy; **c** and **d** exposed to  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  (8  $\mu\text{M}$ ); **e** and **f** exposed to  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  (3  $\mu\text{M}$ )



## Solution stability assays

The solution spectra for the copper(II) coordination compounds were obtained in the buffer used for the distribution coefficient studies (namely, MOPS buffer at  $10^{-2}$  M pH 7.4), the determination of the antiparasitic activities (PBS) and the DNA-damage studies (cacodylate 1 mM / NaCl 20 mM pH 7.25). The spectra were obtained from complex solution of 5 mM, in a time interval between 0 and 24 h. During this period, a band centered between 800 nm ( $12,500\text{ cm}^{-1}$ ) and 810 nm ( $12,345\text{ cm}^{-1}$ ) was observed (Fig. S3), indicative that the pseudo-tetrahedral geometry is preserved in solution under physiological conditions.

The charge-transfer bands of the studied compounds were used for the distribution coefficient assays and the DNA-damage studies, which were carried out with UV-Vis spectroscopy, at 320 nm in buffer solutions and at 310 nm in octanol. These bands were also used for the partition assays with a complex concentration of 100  $\mu\text{M}$ , in MOPS buffer ( $10^{-2}$  M pH 7.4) and in octanol.

## NMR

For the zinc(II) compounds,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , the  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded in  $\text{DMSO-}d_6$ .

The coordination of the 5-nitroimidazole imidazole nitrogen atom to the metal center was corroborated by the shifting of the H4 aromatic proton signal. For the free cenz and onz ligands, the H4 signal is at 8.02 and 7.03 ppm, respectively, and shifts to higher ppm values upon coordination to zinc(II) (Fig. S4, S5).

## X-ray structures

$[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  crystallized in the orthorhombic crystal system,  $\text{Cmc}2_1$  space group. In this compound two 5-nitroimidazole ligands are coordinated to the metal center through the imidazolic N3 atom, which are reflected through a plane of symmetry, and two chloride ligands complete the coordination sphere (Fig. 2). The angles around the metal center have values between  $103.45$  ( $15^\circ$ ) and  $122.45$  ( $10^\circ$ ). The calculated parameter  $\tau_4 = 0.9$  is indicative of a tetrahedral geometry [43]. Based on the spectroscopic data, a similar tetrahedral geometry for the zinc(II) compounds  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  is expected.

The compound  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  crystallizes in an orthorhombic crystal system with  $\text{P}2_12_12_1$  space group. The coordination sphere is similar to that of the zinc(II) compound describe above, but in this case the parameter  $\tau_4 = 0.32$ , which is indicative of a distorted tetrahedral geometry, as reflected by the angles of ca.  $91.64(8)^\circ$

**Table 3** Molar extinction coefficients in octanol and water (MOPS buffer  $10^{-2}$  M pH 7.2) for the ligands and the coordination compounds and corresponding  $\text{Log}D_{7.4}$  (logarithm of distribution ratio octanol/water) values

Compound	$\epsilon_{\text{oc}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) $\lambda_{\text{max}} = 320\text{ nm}$	$\epsilon_{\text{buffer}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) $\lambda_{\text{max}} = 310\text{ nm}$	$\text{Log}D_{7.4}$
onz	$7945.45 \pm 25.43$	$9702.98 \pm 67.69$	0.64
$[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$	$1296.36 \pm 20.70$	$1366.66 \pm 30.00$	0.61
$[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$	$1359.36 \pm 45.80$	$1489.64 \pm 15.80$	0.56
$[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$	$1274.74 \pm 35.40$	$1036.86 \pm 16.50$	0.90
$[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$	$1289.53 \pm 41.79$	$1044.84 \pm 14.25$	0.95
cenz	$8236.23 \pm 46.50$	$9846.14 \pm 16.50$	0.72
$[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$	$1246.51 \pm 15.58$	$1346.55 \pm 45.35$	0.69
$[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$	$1365.65 \pm 13.26$	$1465.15 \pm 46.56$	0.62
$[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$	$1249.85 \pm 32.89$	$1194.46 \pm 16.50$	0.86
$[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$	$1246.56 \pm 34.50$	$1148.69 \pm 34.55$	0.82

and  $158.8(1)^\circ$ . For  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , a similar coordination geometry is proposed, based on their comparable spectroscopic data.

The crystal packing of  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  is stabilized by lone pair $\cdots\pi$  interactions (Fig. 3), between one of the coordinated halogen atoms and the  $\pi$  system of the imidazole ring, with  $\text{Zn-Cl}2\cdots\pi_{\text{iz}}$  ( $\text{Cl}\cdots\text{centroid}$ ) =  $3.417\text{ \AA}$  and an angle of  $90.64^\circ$ . Furthermore, the nitro group is also involved in lone pair $\cdots\pi$  interactions, with  $\text{N}6\text{-O}7\cdots\pi_{\text{iz}}$  =  $3.136\text{ \AA}$  and angle of  $80.94^\circ$ . Finally, hydrogen bonds are observed between the nitro group and the ligand alkyl chains, viz.  $\text{ONO}\cdots\text{H-C}11 = 2.45\text{ \AA}$ , and  $\text{C}112\cdots\text{H-C}11\text{A} = 2.923\text{ \AA}$ .

For  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$ , lone pair $\cdots\pi$  interactions take place between the nitro group and a neighboring imidazolic ring ( $\text{ON-O}18\cdots\pi_{\text{iz}} = 2.943\text{ \AA}$ ), which stabilize the crystal packing of the molecule. Hydrogen bonds are also observed between the methyl group and one of the coordinated chlorido ligand ( $\text{C}19\text{-H}19\text{C}\cdots\text{Cl}1 = 2.800\text{ \AA}$ ), as well as with the nitro group ( $\text{C}9\text{-H}9\text{C}\cdots\text{O}7 = 2.683\text{ \AA}$ ) (Fig. 4).

## Anti-toxoplasma activity

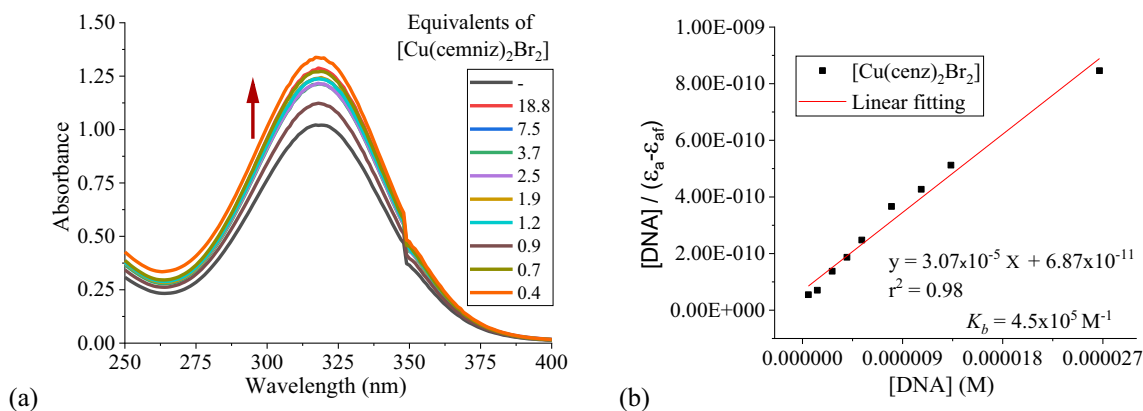
Viability assays were performed against tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. The RH strain was used to evaluate the effect of different concentrations (namely, 2.5, 5, 10, 20 and 40  $\mu\text{M}$ ) of the coordination compounds and the free 5-nitroimidazole against the tachyzoites. The evaluation were performed in PBS buffer (pH 7.4) with Sytox Green<sup>®</sup> exclusion test, which allows differentiating dead from live tachyzoites, since the intact cell membrane of alive ones is not stained [44].

The free cenz and onz ligands did not show activity against *T. gondii*. The copper(II) compounds  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  showed  $\text{IC}_{50}$  values of  $8.49 \pm 0.64$  and



**Table 4**  $K_b$  binding constant (UV–Vis) and Stern–Volmer quenching constant  $K_{sv}$  for the copper(II) and zinc(II) coordination compounds using EB (75  $\mu\text{M}$ ) and Hoechst 33258 (1.9  $\mu\text{M}$ );  $[\text{DNA}]_b = 30 \mu\text{M}$ 

Coordination compound	$K_b$ ( $\text{M}^{-1}$ )	Ethidium bromide $K_{sv}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	Hoechst 33258 $K_{sv}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	Coordination compound	$K_b$ ( $\text{M}^{-1}$ )	Ethidium bromide $K_{sv}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	Hoechst 33258 $K_{sv}$ ( $\text{M}^{-1}$ )
$[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$	$1.2 \times 10^5$	$2.6 \times 10^4$	$1.2 \times 10^6$	$[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$	$7.3 \times 10^4$	–	$1.6 \times 10^6$
$[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$	$4.2 \times 10^5$	$4.3 \times 10^4$	$2.5 \times 10^6$	$[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$	$4.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^4$	$2.1 \times 10^6$
$[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$	$3.5 \times 10^4$	$4.5 \times 10^3$	$3.8 \times 10^4$	$[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$	$2.3 \times 10^4$	–	$6.1 \times 10^4$
$[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$	$4.2 \times 10^4$	$2.6 \times 10^3$	$4.8 \times 10^4$	$[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$	$4.7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^3$	$1.2 \times 10^5$

**Fig. 7** **a** Absorption spectra of 10 mM solution of  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  upon increasing  $[\text{ct-DNA}]$  (0–27 mM), in cacodylate buffer (pH 7.25) and applying an incubation time of 1 h, **b** Linear fitting of plots  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_{at})$  vs  $[\text{DNA}]$  for the titration of ct-DNA

$2.73 \pm 0.34 \mu\text{M}$ , respectively, thus these two complexes are more active than sulfadiazine ( $\text{IC}_{50} > 1600 \mu\text{M}$ ), one of the drugs of choice against toxoplasmosis.  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  was the only zinc(II) compound that presented activity, with a  $\text{IC}_{50}$  value of  $40.0 \pm 0.96 \mu\text{M}$ . Finally  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  was also active ( $\text{IC}_{50} = 30.55 \pm 0.25 \mu\text{M}$ ). The plots of viability percent vs. the concentration of the tested compounds are presented in Fig. 5. The viability plots obtained by Boltzmann regression analysis for the active compounds and the sulfadiazine are shown in the supplementary material (Fig. S6).

To corroborate the toxic effect of  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , assays were carried out by fluorescence microscopy, using Sytox<sup>®</sup> Green, a nucleic acid stain that allows distinguishing dead cells, by becoming fluorescent when entering the damaged membrane and binding to the DNA [26]. Fluorescent images for  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  are shown in Fig. 6.

In order to investigate the effect on host cells of the most active coordination compounds against *T. gondii*, the cytotoxic activity in healthy mouse fibroblast L929 cells was determined. The  $\text{IC}_{50}$  values obtained for  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  ( $210.2 \mu\text{M}$ ) and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  ( $180.2 \mu\text{M}$ ) showed low toxicity in healthy cells compared to the great anti-toxoplasma activity they presented.

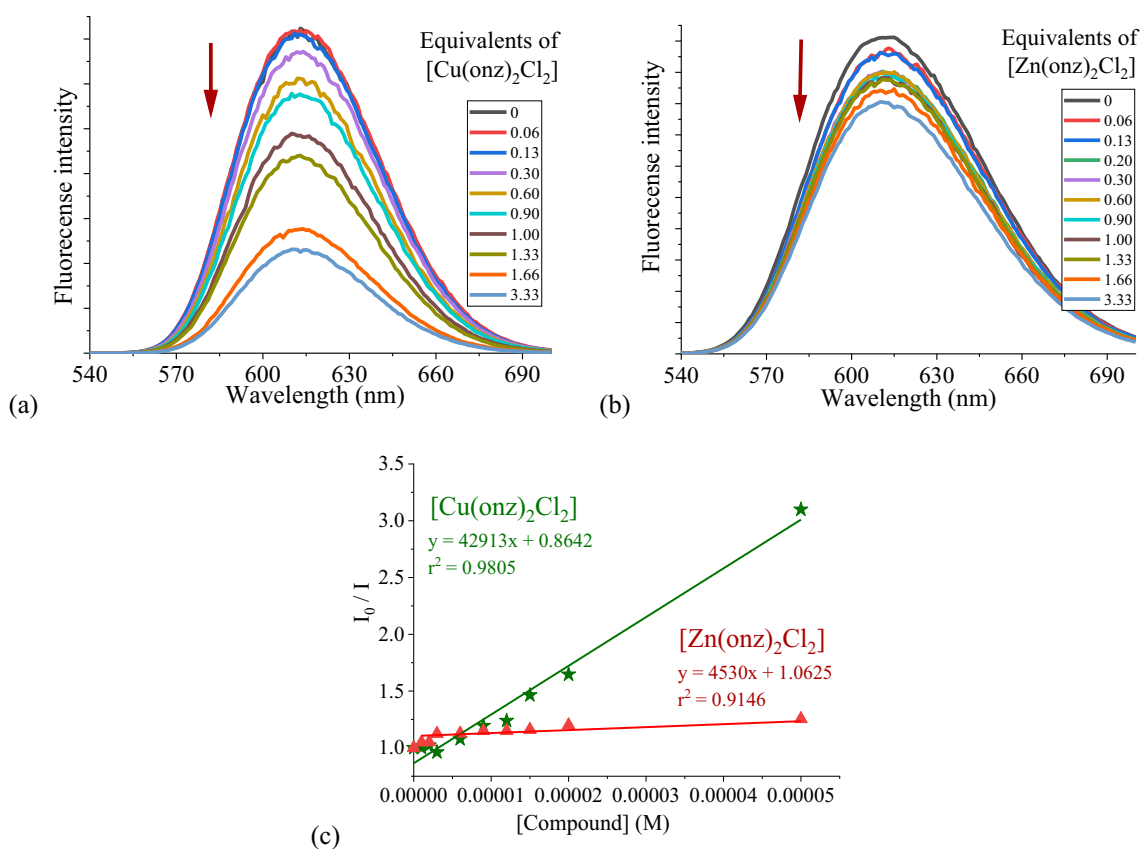
### Acute toxicity ( $\text{LD}_{50}$ )

Based on the anti-toxoplasma results the medial lethal dose ( $\text{LD}_{50}$ ) for  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  were determined intraperitoneally using doses of 10, 50, 75 and  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  per compound in young adult male ICR mice.

The  $\text{LD}_{50}$  values were 49.35 and  $83.24 \text{ mg kg}^{-1}$  for  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , respectively. The value reported for sulfadiazine (through intraperitoneal injection) is  $180 \text{ mg kg}^{-1}$  [45]. The coordination compounds appear to be more active than the standard drug. Considering these highly promising preliminary  $\text{LD}_{50}$  results (toxicity at a single dose) additional studies with these coordination compounds may be envisaged.

### Distribution coefficient

The *T. gondii* parasite is an apicomplex organism; it requires a host cell to live, so it is important that the drugs used against the parasite have easy access to the cell. The lipophilicity of a compound is an important physicochemical property to determine its ability to permeate the biological membrane through passive diffusion; which usually is measured from the distribution coefficient  $\log D_{7.4} = \log(C_o/C_w)$ ,



**Fig. 8** Competitive displacement assays for the DNA-EB adducts, upon addition of increasing amounts of **a**  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and **b**  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$ ; **c** Stern–Volmer plots of  $I_0/I$  vs. [compound] for

the titration of DNA-EB. Experimental data points and linear fitting after 1 h of incubation.  $[\text{EB}] = 75 \mu\text{M}$ ,  $[\text{DNA}]_b = 30 \mu\text{M}$ , [compound] = 0–50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$

in n-octanol/water [39]. The shake-flask method was used to determine the  $\text{LogD}_{7.4}$  values from the molar extinction coefficients of the coordination compounds and the ligands in the two solvents (Table 3). For all compounds, positive  $\text{LogD}_{7.4}$  values were obtained, indicating that they are capable of crossing the cell membrane via passive diffusion, due to a good balance between permeability and solubility [39].

### DNA-damage

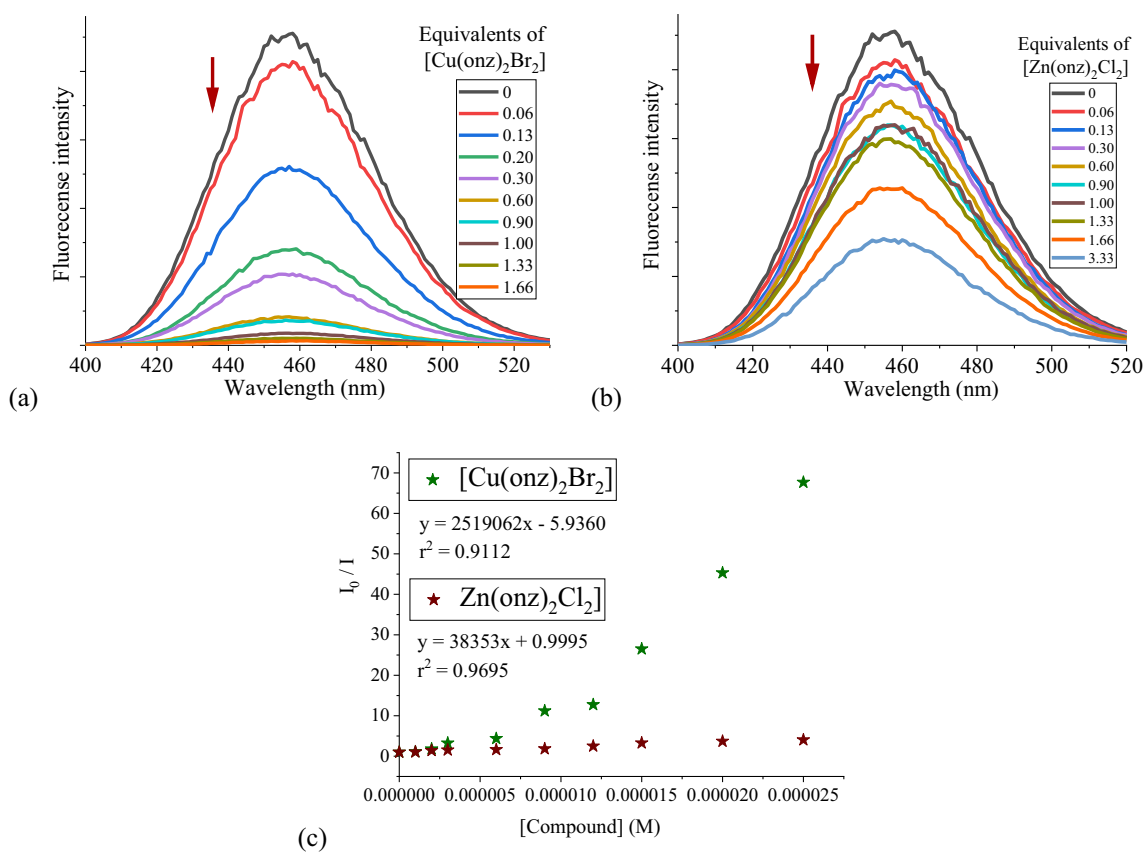
The interaction of small molecules with DNA has been studied extensively through different spectroscopic techniques with the aim of understanding the possible mechanisms of action of potential drugs. The interaction with DNA may be of electrostatic nature, for instance between the negatively charged phosphate backbone of DNA and the positively charged ends of small molecules. Groove binding involves hydrogen or van der Waals interactions between small molecules and nucleic bases within the major or minor groove.

The DNA-interaction may also occur through intercalation of the molecules between nucleic base pairs [46, 47].

### UV–Vis spectroscopy

UV–Vis spectroscopy is one of the most effective methods to study the interaction of small molecules with DNA. In the present case the absorption maxima of the coordination compounds around 320 nm, exhibit changes upon the addition of increasing amounts of ct-DNA (1 h of incubation).

In general, the copper(II) coordination compounds present a hyperchromic effect when [ct-DNA] increases, while for the zinc(II) compounds, a hypochromic effect, is observed. For all the complexes investigated no wavelength shift was observed. This behavior is characteristic of groove binding or electrostatic interactions with DNA. From Eq. 2 the binding constant ( $K_b$ ) was determined (Table 4). Higher values are obtained for the copper(II) compounds, indicating a stronger DNA binding than the zinc(II) compounds (Fig. 7).



**Fig. 9** Competitive displacement assays for the DNA-Hoechst 33258 adduct, upon addition of increasing amounts of **a** [Cu(onz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] and **b** [Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; **c** Stern–Volmer plots of  $I_0/I$  vs. [compound] for the titration of DNA-Hoechst 33258. Experimental data points

and linear fitting after 1 h of incubation. [Hoechst 33258] = 1.9  $\mu$ M, [DNA]<sub>b</sub> = 30  $\mu$ M, [compound] = 0–50  $\mu$ M,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 350 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  = 458 nm

### Competitive displacement assays using fluorescent DNA-binders

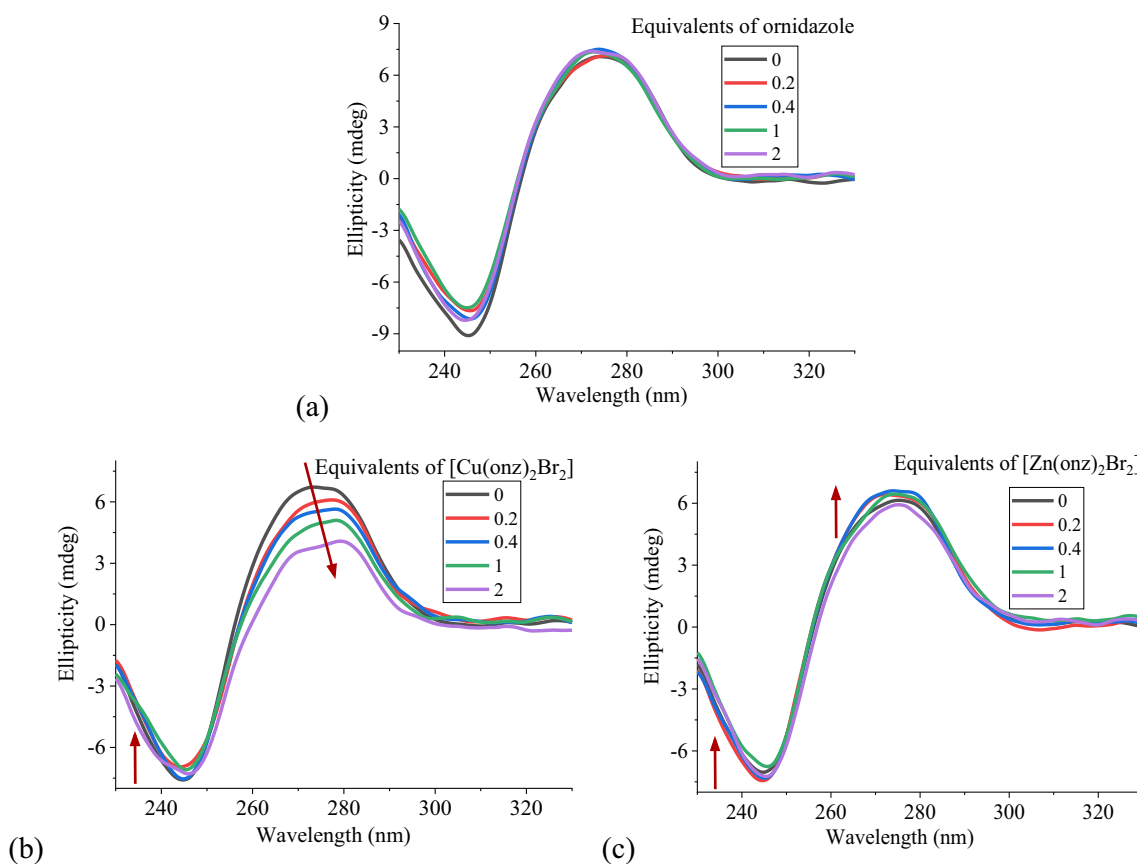
With the aim to corroborate the binding mode of the coordination compounds with DNA competitive displacement assays were carried out by fluorescence spectroscopy. The fluorescence of ethidium bromide (EB) increases when it intercalates between DNA base pairs, forming an EB-DNA adduct. Competitive binding assays will lead to a decrease of the fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 514 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  = 610 nm) if the interacting molecule is capable of displacing EB from the DNA helix [48]. Solutions containing constant concentrations of DNA (30  $\mu$ M) and EB (75  $\mu$ M) were incubated for 30 min. Then the coordination compounds to be tested were added in a concentration in the range of 0–50  $\mu$ M (corresponding to [complex]/[DNA] ratios between = 0 and 3.3), and fluorescence spectra were recorded after 1 h of incubation.

In all cases fluorescence quenching was observed; the spectra obtained for [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] are shown in Fig. 8. This behavior is not necessarily due to

DNA intercalation. Electrostatic interactions or groove binding may be strong enough to modify the DNA double helix and displace EB. From the slope of the plot of  $I_0/I$  values vs concentration (Fig. 8c), the Stern–Volmer  $K_{\text{sv}}$  values for each compound were obtained (Table 4). These values characterize a moderate EB-displacement, the copper(II) compounds being more effective than the zinc(II) ones. For [Cu(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Zn(onz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], it was not possible to determine  $K_{\text{sv}}$  because the plot was non-linear.

Competitive binding assays were carried out with Hoechst 33,258. This dye binds to B-DNA, especially those with an AT-rich sequence giving a fluorescent signal at 458 nm when excited at 350 nm [49]. As for to the EB assays, DNA (30  $\mu$ M) was incubated for 30 min with Hoechst 33,258 (1.9  $\mu$ M) and increasing amounts of the coordination compounds were subsequently added. In all cases, fluorescence quenching was observed (Fig. 9). As previously, the  $K_{\text{sv}}$  constants were determined (Fig. 9c and Table 4). The copper(II) compounds show  $K_{\text{sv}}$  values in the  $1.2$ – $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$  range (Table 4), indicating a groove binding behavior. For the zinc(II) compounds, the  $K_{\text{sv}}$  values are two orders of





**Fig. 10** CD spectra of ct-DNA ( $50 \mu\text{M}_{\text{base}}$ ) in the presence of increasing amounts of **a** onz, **b**  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$  and **c**  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , in 1 mM cacodylate/20 mM NaCl buffer (pH 7.25). The spectra were recorded after 1 h incubation at  $37^\circ\text{C}$

magnitude lower indicating weaker interactions, must likely of electrostatic nature.

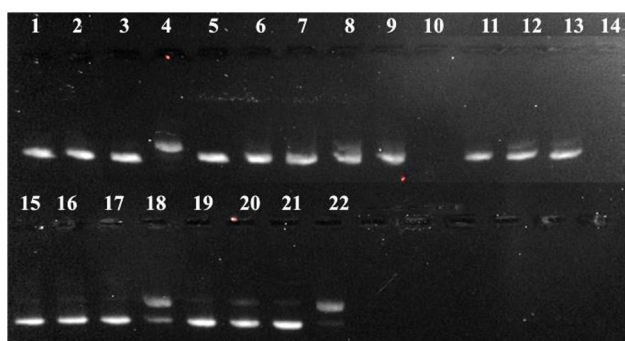
### Circular dichroism (CD)

Circular dichroism (CD) spectroscopy was used to analyze the conformational changes of ct-DNA, its spectrum exhibited a characteristic positive band at 275 nm due to base stacking interactions, and a negative band at 245 nm originating from the right-handed helicity of DNA B-form [50, 51]. The interaction of small molecules with DNA can modify these CD signals depending on the type of binding. Intercalative interactions increase the intensity of the signals, as the result of an increase of the stability of the B conformation, whereas groove binding or covalent interactions tend to decrease the intensity of these signals, which are moreover displaced [51, 52]. The CD spectra for both ligands and their copper(II) and zinc(II) complexes were obtained at constant concentration of ct-DNA, increasing the complex concentration up to two equivalents ( $[\text{complex}]/[\text{DNA}]$  ratios of 0, 0.2, 0.4, 1, 2) with respect to the nucleobases concentration ( $[\text{DNA}]_0 = 50 \mu\text{M}$ ).

The free ligands *cez* and *onz* did not affect the DNA structure, while the increase of the concentration of  $[\text{Cu}(\text{cez})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{cez})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  or  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , give rise to a decrease of the intensity of the positive and negative bands at 275 nm and 245 nm, accompanied by a bathochromic shift. This phenomenon is indicative of alteration of the base stacking interactions and the helicity, which may be explained by the groove binding of complexes [53]. For  $[\text{Zn}(\text{cez})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{cez})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , the spectra changes are minor, which can be expected for compounds undergoing electrostatic interactions with the biomolecule (see above) which do not significantly modify its structure. CD spectra for *onz* coordination compounds and its copper(II) and zinc(II) complexes are shown at in Fig. 10.

### Agarose gel electrophoresis

Distinct forms of pBR322 plasmid DNA are commonly observed by gel electrophoresis due to the conformational changes that present distinct electrophoretic mobility: (1) supercoiled DNA (Form I) that migrates faster on the gel, (2)



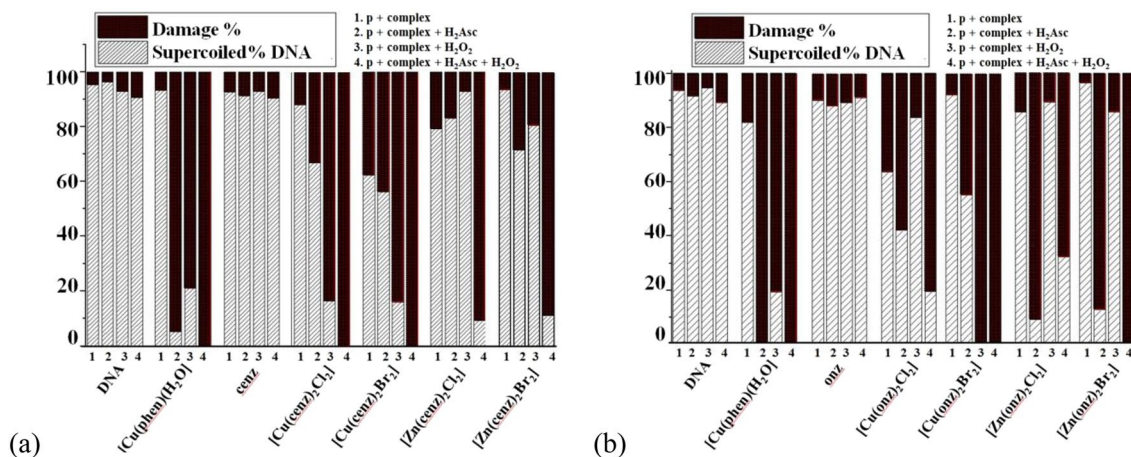
**Fig. 11** Agarose gel electrophoresis image of 15  $\mu\text{M}_{\text{pb}}$  pBR322 plasmid DNA incubated for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  with 10 and 50  $\mu\text{M}$  concentrations of cenz coordination compounds in cacodylate-NaCl buffer pH 7.2. Lane 1-plasmid DNA (p); lane 2-p +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 3-p +  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$ ; lane 4-p +  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+ + \text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 5-p + cenz; lane 6-p + cenz +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 7-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ); lane 8-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 9-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ); lane 10-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 11-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ); lane 12-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 13-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ); lane 14-p +  $[\text{Cu}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 15-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ); lane 16-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 17-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ); lane 18-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Cl}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 19-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ); lane 20-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (10  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$ ; lane 21-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ); lane 22-p +  $[\text{Zn}(\text{cenz})_2\text{Br}_2]$  (50  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{Asc}$

circular nicked (Form II), obtained from a one-strand scission, has a slower migration through the gel and (3) linear form (Form III) is generated when both strands are cleaved and migrates between forms I and II [54]. The interaction of the free ligands and their copper(II) and zinc(II) coordination compounds with pBR322 was investigated in presence of  $\text{H}_2\text{Asc}$  (50  $\mu\text{M}$ ) as reducing agent and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) as ROS generator. Solutions of 10 and 50  $\mu\text{M}$  of the coordination compounds were incubated with the DNA at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h.

Solely, the data achieved with cenz as ligand are described below, the results obtained with onz being comparable (see Tables S1-S4).

The pure plasmid DNA presents ca. 90% of supercoiled form (I) and ca. 10% of circular nicked form (II). The controls corresponding to the DNA with  $\text{H}_2\text{Asc}$  and peroxide show similar intensities (to those of the control), indicating that they do not produce DNA-damage (Fig. 11, lines 1, 2; Fig. 12, lines 1–3).  $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$  at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  was used as reference. The free ligands onz and cenz did not provoke any significant DNA cleavage (Fig. 11, lines 5, 6; Fig. 12, lines 6, 7). The electrophoresis assay shows that the amount of supercoiled DNA decreases in presence of the coordination compounds and  $\text{H}_2\text{Asc}$ . In the case of the copper(II) compounds (Fig. 11 lines 8, 10, 12, 14), at concentration of 50  $\mu\text{M}$ , the plasmid DNA is completely degraded into undetectable pieces (Fig. 11 lines 10, 14). The zinc(II) complexes exhibited a similar behavior (Fig. 11, lines 16, 18, 20, 22). When  $\text{H}_2\text{Asc} + \text{H}_2\text{O}_2$  are added, a significant DNA cleavage is observed. At a concentration of 10  $\mu\text{M}$ , the plasmid is completely degraded, for the two series of complexes (Tables S2 and S4).

DNA degradation observed with the non-redox zinc(II) complex may be explained by the reduction of the nitro group to the nitro radical anion  $\text{R-NO}_2^-$  in the presence of  $\text{H}_2\text{Asc}$ , which is most likely facilitated by the coordination of cenz to Zn(II) ion. Additionally, the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  resulted in a decrease of the supercoiled form, suggesting a higher DNA-damage, probably due to the formation of  $\text{OH}^-$  species (Fig. 12). The copper(II) coordination compounds presented a higher activity, which may be expected as these complexes are redox-active and can therefore reduce ROS through a Fenton-like reaction. The data for all the investigated compounds are listed in Tables S-S4.



**Fig. 12** Percentages of supercoiled and damage DNA in the presence of the reference copper(II) complex, the free ligands cenz and onz, and the corresponding copper(II) and zinc(II) coordination compounds, at a concentration of 10  $\mu\text{M}$

## Concluding remarks

Tetrahedral coordination compounds with copper(II) and zinc(II) were synthesized with the ligands *cen* and *onz*. The complexes are stable in solution, with positive  $\text{Log}D_{7.4}$  values, which are in the appropriate range for a passive diffusion through the cell membrane.

$[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Br}_2]$ , exhibit very good activity against *toxoplasma gondii* in its tachyzoite morphology. Additionally, the in vitro studies against healthy host cell and in vivo acute toxicity assays showed low toxicity for these compounds. The preliminary promising results achieved certainly deserve additional in-depth biological studies which will be carried out in the near future.

DNA-binding studies reveal that the copper(II) compounds strongly interact with the minor groove of the biomolecule, while the interaction of weaker with the zinc(II) compounds which bind through electrostatic contacts. These different type of binding are corroborated by the DNA-damage observed by gel electrophoresis, which showed that the zinc(II) complexes are less active than the copper(II) ones. Moreover, it was found that the coordination of the metal ion to the ligands seems to favor the reduction of the nitro group to  $\text{NO}_2^-$ , and the generation of  $\text{OH}^\cdot$  species in the case of copper(II) in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and ascorbic acid, through a Fenton-like reaction (copper(II) to copper(I) redox cycle). Further studies are definitively required to assess the mechanism of formation of these radical species.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00775-023-02029-7>.

**Acknowledgements** The financial support to DGAPA-UNAM (IN206922) and PAPIT-FQ-UNAM (5000-9035) are gratefully acknowledged. R.N.P. thanks to CONACyT (772020) scholarship. Technical support from Patricia Fierro is also acknowledged. Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects PID2020-115537RB-I00, PID2019-107006GB-C21 and RED2018-102471-T; MCIN/AEI/<https://doi.org/10.13039/501100011033>) is kindly acknowledged. P.G. thanks the Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA). Authors also thank CERCA Program, Generalitat de Catalunya, for institutional support.

**Data availability** The crystallographic data for the structures have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication CCDC 2293450 and 2272007. Copies of the data can be obtained free of charge via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif). The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long

as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Edwards DI (1993) Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 31:9–20. <https://doi.org/10.1093/jac/31.1.9>
- Ang CW, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT (2017) Nitroimidazoles: molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases. *J Med Chem* 60:7636–7657. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00143>
- Nepali K, Lee HY, Liou JP (2019) Nitro-group-containing drugs. *J Med Chem* 62:2851–2893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00147>
- Riches A, Hart CJS, Trenholme KR, Skinner-Adams TS (2020) Anti-giardia drug discovery: current status and gut feelings. *J Med Chem* 63:13330–13354. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00910>
- Edwards DI (1986) Reduction of nitroimidazoles and DNA damage. *Biochem Pharmacol* 35:53–58. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90554-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90554-X)
- Schmid A, Schmid H (1999) Pharmacotoxicological mode of action of antimicrobial 5-nitroimidazole derivatives. *J Vet Med* 46:517–522. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.1999.00245.x>
- Patterson S, Wyllie S (2014) Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol (TREPAP)* 30:289–298. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>
- Van Der Wouden EJ, Thijs JC, Van Zwet AA, Kleibeuker JH (2000) Review article: nitroimidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 14:7–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00675.x>
- Jenks PJ (2010) Chapter 24: Nitroimidazoles. Antibiotic and chemotherapy, 9th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 292–300. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4064-1.00024-5>
- Thomas C, Gwenin CD (2021) The role of nitroreductases in resistance to nitroimidazoles. *Biology* 10:388. <https://doi.org/10.3390/biology10050388>
- Navarro-Peñaloza R, Landeros-Rivera B, López-Sandoval H, Castro-Ramírez R, Barba-Behrens N (2023) New insights on transition metal coordination compounds with biological active azole and nitroimidazole derivatives. *Coord Chem Rev* 494:215360. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215360>
- Alfaro-Fuentes I, López-Sandoval H, Mijangos E, Duarte-Hernández AM, Rodríguez-López G, Bernal-Uruchurt MI, Contreras R, Flores-Parra A, Barba-Behrens N (2014) Metal coordination compounds derived from tinidazole and transition metals. Halogen and oxygen lone pair•••• interactions. *Polyhedron* 67:373–380. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.09.030>
- Alfaro-Fuentes I, Castro-Ramírez R, Ortiz-Pastrana N, Medina-Guerrero RM, Soler-Jiménez L, Martínez-Rodríguez I, Ibarra-Castro L, Barba-Behrens N (2017) Novel antihelmintic activity of tinidazole coordination compounds. relevance of the metal ion and structural properties. *J Inorg Biochem* 176:159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.013>



14. Castro-Ramírez R, Ortiz-Pastrana N, Caballero AB, Zimmerman MT, Stadelman BS, Gaertner AAE, Brumaghin JL, Korrodi-Gregório L, Pérez-Tomás R, Gamez P, Barba-Behrens N (2018) DNA interaction of non-chelating tinidazole-based coordination compounds. Structural, redox and cytotoxic properties. *Dalton Trans* 47:7551–7560. <https://doi.org/10.1039/C8DT00716K>
15. Ramírez-Palma LG, Castro-Ramírez R, Lozano-Ramos L, Galindo-Murillo R, Barba-Behrens N, Cortés-Guzmán F (2023) DNA recognition site of anticancer tinidazole copper(II) complexes. *Dalton Trans* 52:2087–2095. <https://doi.org/10.1039/D2DT02854A>
16. Nandy P, Das S (2020) In situ reactivity of electrochemically generated nitro radical anion on Ornidazole and its monomeric Cu(II) complex with nucleic acid bases and calf thymus DNA. *Inorg Chim Acta* 501:119267. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119267>
17. Nandy P, Singha S, Banyal N, Kumar S, Mukhopadhyay K, Das S (2020) A Zn<sup>II</sup> complex of ornidazole with decreased nitro radical anions that is still highly active on *Entamoeba histolytica*. *RSC Adv* 10:23286–23296. <https://doi.org/10.1039/d0ra02597f>
18. Vidal JE (2019) HIV-related cerebral toxoplasmosis revisited: current concepts and controversies of an old disease. *Int Assoc Provid AIDS Care* 18:1–20. <https://doi.org/10.1177/2325958219867315>
19. Hatam-Nahavandi K, Calero-Bernal R, Rahimi MT, Pagheh AS, Zarean M, Dezhkam A, Ahmadpour E (2021) *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as public health concerns: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 11:9509. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89031-8>
20. Matta SK, Rinkenberger N, Dunay IR, Sibley LD (2021) *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nat Rev Microbiol* 19:467–480. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00518-7>
21. Montoya JG, Liesenfeld O (2004) Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
22. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
23. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP (2005) Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6:41–61. <https://doi.org/10.1079/AHR2005100>
24. Montazeri M, Mehrzadi S, Sharif M, Sarvi S, Tanzifi A, Aghayan SA, Daryani A (2018) Drug resistance in *Toxoplasma gondii*. *Fron Microbiol* 9:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02587>
25. Antczak M, Dzitko K, Długoska H (2016) Human toxoplasmosis—searching for novel chemotherapeutics. *Biomed Pharmacother* 82:677–684. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.041>
26. Anacleto-Santos J, López-Camacho P, Mondragón-Flores R, Basurto-Islas G, Mondragón-Castelán M, Carrasco-Ramírez E, Vega-Ávila E, Rivera-Fernández N (2020) Anti-toxoplasma, anti-oxidant and cytotoxic activities of *Pleopeltis crassinervata* (Fée) T. Moore hexane fraction. *Saudi J Biol Sci* 27:812–819. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.032>
27. de Assis VM, Visentin LC, de Souza FS, DaMatta RA, Horn A Jr, Fernandes C (2016) Synthesis, crystal structure and relevant antiproliferative activity against *Toxoplasma gondii* of a new binuclear Co(II) complex. *Inorg Chem Commun* 67:47–50. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2016.02.017>
28. Batista LC, de Souza FS, de Assis VM, Seabra SH, Bortoluzzi AJ, Rennó MN, Horn A Jr, DaMatta RA, Fernandes C (2015) Antiproliferative activity and conversion of tachyzoite to bradyzoite of *Toxoplasma gondii* promoted by new zinc complexes containing sulfadiazine. *RSC Adv* 5:100606–100617. <https://doi.org/10.1039/c5ra17690e>
29. Portes JA, Souza TG, dos Santos TAT, da Silva LLR, Ribeiro TP, Pereira MD, Horn A Jr, Fernandes C, DaMatta RA, de Souza W, Seabra SH (2015) Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron(III) compound. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7374–7386. <https://doi.org/10.1128/AAC.00057-15>
30. Portes JA, Motta CS, Azeredo NF, Fernandes C, Horn A Jr, DaMatta RA, Seabra SH (2017) In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper(II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. *Vet Parasitol* 245:141–152. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.002>
31. Fernandes Horn C, de Araujo Portes J, Soares Motta C, Barros Azeredo NF, Horn Jr A, de Souza W, Damatta RA, Seabra SH (2020) Compostos de coordenação de cobre(II) como agentes anti-toxoplasma BR 102018013176-1 A2
32. Pi WX, Yang YM, Li HQ, Zhu HL (2005) Chlorometronidazole. *Acta Cryst E* 61:o2880–o2881. <https://doi.org/10.1107/S1600536805025201>
33. Kumar L, Sarswat A, Lal N, Sharma VL, Jain A, Kumar R, Verma V, Maikhuri JP, Kumar A, Shukla PK, Gupta G (2010) Imidazole derivatives as possible microbicides with dual protection. *Eur J Med Chem* 45:817–824. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.021>
34. Hübschle CB, Sheldrick GM, Dittrich B (2011) ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL. *J Appl Crystallogr* 44:1281–1284. <https://doi.org/10.1107/S0021889811043202>
35. Clark RC, Reid JS (1995) The analytical calculation of absorption in multifaceted crystals. *Acta Cryst A* 51:887. <https://doi.org/10.1107/S0108767395007367>
36. Sheldrick GM (2008) A short history of SHELX. *Acta Cryst A* 64:112. <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>
37. OECD (2001) Guideline for the testing of chemicals 423. In: Acute oral toxicity—acute toxic class method. In: OECD. pp 1–14. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>
38. FDA (1996) Guidance for industry: single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals, 3rd edn. Center for Drug Evaluation and Research FDA, Beltsville
39. Andrés A, Rosés M, Ràfols C, Bosch E, Espinosa S, Segarra V, Huerta JM (2015) Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur J Pharm Sci* 76:181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>
40. Clark RJH, Williams CS (1965) The far-infrared spectra of metal-halide complexes of pyridine and related ligands. *Inorg Chem* 4:350–357. <https://doi.org/10.1021/ic50025a020>
41. Lever ABP (1968) Inorganic electronic spectroscopy, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam
42. Gliemann G, Wang Y (2003) The ligand field concept. *Encyclopedia of physical science and technology*, 3rd edn. Academic Press, Cambridge, pp 523–538. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00376-8>
43. Yang L, Powell DR, Houser RP (2007) Structural variation in copper(I) complexes with pyridylmethylamide ligands: structural analysis with a new four-coordinate geometry index,  $\tau_4$ . *Dalton Trans*. <https://doi.org/10.1039/B617136B>
44. Nguyen TT, Kamyngkird K, Phimpraphai W, Inpankaew T (2022) Viability of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in different conditions for parasite transportation. *Vet World* 15:198–204. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.198-204>
45. Kuhlmann FM, Fleckenstein JM (2017) 157—Antiparasitic agents, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 1345-1372.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00157-X>
46. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A (2013) Drug–DNA interactions and their study by UV–visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. *J Photochem Photobiol B Biol* 124:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>

47. Rehman SU, Sarwar T, Husain MA, Ishqi HM, Tabish M (2015) Studying non-covalent drug–DNA interactions. *Arch Biochem Biophys* 576:49–60. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.024>
48. Gallagher SR, Desjardins PR (2006) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Mol Biol* 76:A.3D.1-A.3D.21. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03ds76>
49. Bucevičius J, Lukinavičius G, Gerasimaitė R (2018) The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. *Chemosensors* 6:18. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>
50. Censi V, Caballero AB, Pérez-Hernández M, Soto-Cerrato V, Korrodi-Gregório L, Pérez-Tomás R, Dell'Anna MM, Mastroilli P, Gamez P (2019) DNA-binding and in vitro cytotoxic activity of platinum(II) complexes of curcumin and caffeine. *J Inorg Biochem* 198:110749. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110749>
51. Shahabadi N, Moghadam NH (2012) Determining the mode of interaction of calf thymus DNA with the drug sumatriptan using voltammetric and spectroscopic techniques. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectr* 99:18–22. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.022>
52. Barrera-Guzmán VA, Rodríguez-Hernández EO, Ortiz-Pastrana N, Domínguez-González R, Caballero AB, Gamez P, Barba-Behrens N (2018) Efficient copper-based DNA cleavers from carboxylate benzimidazole ligands. *J Biol Inorg Chem* 23:1165–1183. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1598-9>
53. Kashanian S, Khodaei MM, Pakravan P (2010) Spectroscopic studies on the interaction of isatin with calf thymus DNA. *DNA Cell Biol* 29:639–646. <https://doi.org/10.1089/dna.2010.1054>
54. Palmeira-Mello MB, Caballero AB, Lopez-Espinar A, Guedes GP, Caubet A, Teles de Souza AM, Lanznaster M, Gamez P (2021) DNA-interacting properties of two analogous square-planar cis-chlorido complexes: copper versus palladium. *J Biol Inorg Chem* 26:727–740. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01888-2>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Authors and Affiliations

Rubí Navarro-Peñaloza<sup>1</sup> · Jhony Anacleto-Santos<sup>2</sup> · Norma Rivera-Fernández<sup>2</sup> · Francisco Sánchez-Bartez<sup>3</sup> · Isabel Gracia-Mora<sup>3</sup> · Ana B. Caballero<sup>4,5</sup> · Patrick Gamez<sup>4,5,6</sup> · Norah Barba-Behrens<sup>1</sup>

✉ Norah Barba-Behrens  
norah@unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico

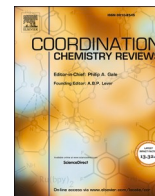
<sup>2</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> nanoBIC, Departament de Química Inorgànica i Orgànica, Secció Química Inorgànica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1–11, 08028 Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain



## New insights on transition metal coordination compounds with biological active azole and nitroimidazole derivatives

Rubí Navarro-Peñaloza, Bruno Landeros-Rivera, Horacio López-Sandoval, Rodrigo Castro-Ramírez, Norah Barba-Behrens\*

Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biological active azoles and nitroimidazoles  
Transition metal complexes  
Antifungal  
Antimicrobial  
Antiparasitic  
Cytotoxic  
Non-covalent interactions

### ABSTRACT

In this review we have selected some notable examples of azoles and nitroimidazoles and their coordination compounds with previously reported biological effectiveness. In an effort to further extend the discussion of these complexes and to highlight some structure–activity relationship that might have been overlooked throughout the years, a depth analysis of their crystal structures and their weak interactions was carried on. There were analysed examples of compounds with a wide range of transition metal ions, with different coordination modes and geometries. State of art of the intra and intermolecular non-covalent interactions in these compounds, such as lone pair... $\pi$ ,  $\pi$ ... $\pi$ ,  $\sigma$ -hole, C-H... $\pi$ , Cl...Cl and hydrogen bonding are discussed and to have a deeper insight on the nature of relevant interactions, theoretical calculations were performed. The understanding of the coordination environment and these weak interactions may contribute to the rational design of new compounds with potential applications in bioinorganic and medicinal inorganic chemistry.

### 1. Introduction

In the last few years non-covalent interactions have become a subject of considerable interest, due to their key role in chemical, physical and biochemical processes, as into the stabilization of molecular structures

and supramolecular associations. Single X-ray crystal structures provide valuable information related to covalent bonding and non-covalent interactions, which is relevant for the understanding of molecular and biological properties. Among the weak interactions the most analysed has been the classical hydrogen bonding (D-H...A), formed between

**Abbreviations:** acac, acetylacetonate; aminophen, 5-amino-1,10-phenantroline; A2780, ovarian cancer cell line; Balb/c 3T3, healthy cell mouse fibroblast; BCP, bond critical point; bese, 1,2-bis(ethylsulfanyl)ethane; bipy, 2,2'-bipyridine; bipy<sup>COOCH<sub>3</sub></sup>, 4,4'-Bis(methoxycarbonyl)-2,2'-bipyridine; 2-bba, 2-bromobenzoic acid; BP, bond path; CD, circular dichroism; CHO, chinese hamster ovary; ct-DNA, calf thymus DNA; cod, 1,5-cyclooctadiene; cp, cyclopenta-2,4-dien-1-yl; ctz, 1-[(2-chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-imidazole; CV, cyclic voltammetry; CYP51, lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase; dmb: 4, 4'-dimethyl 2,2'-bipyridine; DNA, deoxyribonucleic acid; DPV, differential pulse voltammetry; en, 1,2-diaminoethane;  $\rho(r)$ , electron density; EPR, electron paramagnetic resonance; ESP, electrostatic potential; EtBr, ethidium bromide; EtOH, ethyl alcohol; E<sub>1/2</sub>, half wave potential; FAD, Flavin adenine dinucleotide; FMN, Flavin mononucleotide; HCT-15, colon cancer cell lines; HeLa, cervix-uterine cancer cell lines; HepG2, human hepatocellular carcinoma; HFF, Human Foreskin Fibroblast; IC<sub>50</sub>, concentration of drug required for 50% inhibition; iPrOH, isopropanol; IR, infrared; K<sub>app</sub>, apparent DNA-binding constant; LD, linear dichroism; lp, lone pair; MBC, minimum bactericidal concentration; MCF-7, breast cancer cell lines; mcnz, 1-[2,4-Dichloro-beta-(2,4-dichlorobenzoyloxy)phenylethyl] imidazole; MFC, minimum fungicidal concentration; MIC, minimum inhibitory concentration; MurG, UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide)pyrophosphoryl-undecaprenol-N-acetylglucosamine transferase; mtz, 2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; nba, 4-nitrobenzoate; NCI, Non-Covalent Interaction Index; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; NTR, nitroreductases; OAc, acetate; OPhBut, 4-phenylbutanate; onz, R,S-1-chloro-3-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ol; p-cymene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)benzene; PC3, prostate cancer cell lines; phen, 1,10-phenantroline; PPh<sub>3</sub>, triphenylphosphine; pta, p-methylbenzoate; QTAIM, Quantum Theory of Atoms in Molecules; QCT, Quantum Chemical Topology; ROS, reactive oxygen species; RT, room temperature; SEM, scanning electron microscopy; snz, 1-(2-methyl-5-nitroimidazol-1-yl)propan-2-ol; tca, trichloroacetic acid; tcnz, 1-[2-((2-chlorothiophen-3-yl)methoxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl] imidazole; TEM, transmission electron microscopy; tmp, 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenantroline; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling; tnz, 2-methyl-5-nitro-1-[2-(1,1,2,2,2-pentadeuterioethylsulfonyl)ethyl] imidazole; UV-Vis, ultraviolet visible spectroscopy;  $\chi_M$ , molar magnetic susceptibility.

\* Corresponding author.

E-mail address: [norah@unam.mx](mailto:norah@unam.mx) (N. Barba-Behrens).

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215360>

Received 4 April 2023; Received in revised form 13 July 2023; Accepted 18 July 2023

Available online 1 August 2023

0010-8545/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

polar species D-H and a lone pair (*lp*) carrier A (electron rich atom). It is characterised by a weak to medium interaction energy (ca.10–40 kJ/mol), with bond lengths from 2.2 Å to 3.2 Å (D...A), and angles from 90° to 180° (D-H...A) [1–3]. Interactions between aromatic rings, such as  $\pi\cdots\pi$  stacking, have also been widely studied. Burley and Petsko, in their pioneering work on DNA and proteins, showed that there is a competition between  $\pi\cdots\pi$  stacking and T-shape arrangements on interacting aromatic rings, with very low energy difference (0–50 kJ/mol) [4,5]. Crystal data analysis of biological molecules and synthetic compounds has permitted the study of new types of non-covalent interactions, such as halogen bonding [6], a type of  $\sigma$ -hole bond, where an atom behaves as a Lewis acid centre towards a negatively charged or electron rich molecule [7,8], and a lone pair  $lp\cdots\pi$  interaction, which is considered as a non-covalent contact between an atom with a lone pair of electrons and a  $\pi$  system [9]. Wetmore *et al.* analysed several crystal structures of Z-DNA and found that its conformation is stabilised by a *lp* interaction of an oxygen atom from the cytidine and the  $\pi$  system of the guanine. This electrostatic interaction is recognised as a supramolecular association present in biological systems [10]. Computational studies have demonstrated that such interactions, between a *lp* donor and an aromatic ring centroid, can be energetically favourable, with a maximum distance of 3.82 Å [11–13].

In this review we have selected some notable examples of coordination compounds with biologically active molecules, namely, azoles and nitroimidazoles with previously reported biological effectiveness and present an in depth analysis of their crystal structures and their weak interactions that could be key for their biological activity. Each section begins with a brief presentation of some organic molecules (ligands) already being used to treat a variety of diseases. As well as a detailed analysis of some outstanding intramolecular contacts and a detailed description of their mechanism of action. Finally, we have taken the previously reported crystal structures of coordination compounds using these ligands and analysed each of them in an effort to further extend the discussion of these complexes and to highlight some structure–activity relationship that might have been overlooked throughout the years. As we have reviewed a broad number of publications, spreading throughout several decades, we have modified the name and atom numbers of some of the compounds discussed herein for clarity and consistency.

Additionally, the last section focuses on further evaluating relevant non-covalent interactions using Quantum Chemical Topology (QTC). Namely, Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM), Non-Covalent Interaction Index (NCI) and electrostatic potential, going beyond geometrical parameters and highlighting the importance of complementing experimental X-ray structural data with theoretical calculations.

## 2. Azoles

The incidence of infection diseases has been steadily increasing throughout the years causing a health problem worldwide. A wide variety ofazole derivatives have been used for the treatment of these infections mainly as antifungal, antimicrobial and antiparasitic agents [14].

Nowadaysazole derivatives are the most approved clinical candidate antifungal drugs. Over the last fifty years,azole drugs have had a significant impact for the treatment of invasive fungal infections, which was very limited prior to their discovery. Fungi have eukaryotic cellular functions, making them more closely related to human than bacteria. This similarity affects the treatment of fungal infections, due to probable toxic effects of antifungal drugs on human cells [15]. The first generation miconazole (mcnz), tioconazole (tcnz), clotrimazole (ctz) and their analogues were limited to treat superficial fungal infections, Fig. 1. These compounds present similar imidazolic structures and physico-chemical properties, it has been developed up to fourth generations ofazole antifungal drugs [14]. This review is focused in the coordination compounds of this first generation azoles.

X-ray crystal structures of the antifungal drugs miconazole, tioconazole and clotrimazole have been analysed [16–19]. The miconazole structure is formed by an imidazole ring and two dichlorophenyl rings, Fig. 2 a, while in tioconazole one of the dichlorophenyl ring is changed by a thiophene group, Fig. 2b. Both compounds show a chiral center at carbon C7, and the racemic mixture is observed in their X-ray structures, where the molecules with *R* and *S* configurations are related by an inversion center. Tioconazole stabilizes an intramolecular C20-H20... $\pi$  interaction between an aromatic hydrogen from the thiophene with the imidazole ring (2.791 Å), Fig. 2b.

On the other hand, the molecule of clotrimazole has one imidazole and three phenyl rings, one of them with a chloro atom in the ortho position, which stabilises an intramolecular  $lp\cdots\pi$  (C8-Cl8... $\pi$ ) interaction with the imidazole ring (3.380 Å) Fig. 2 (c).

Additionally, all three compounds present intermolecular hydrogen bonding Fig. 3, whereas miconazole presents a Cl...Cl interaction, Fig. 3 (a).

### 2.1. Mechanism of action

In biochemical processes, transition metal-containing enzymes can catalyse a wide variety of chemical reactions by their primary and secondary coordination spheres. The primary coordination sphere is dominated by covalent interactions between metal ions and donor atoms on the biomolecules. On the other hand, non-covalent interactions regulate the secondary coordination sphere which modulate and assist the catalytic reaction. For the proper function of these macromolecules, non-covalent interactions within the secondary coordination sphere of

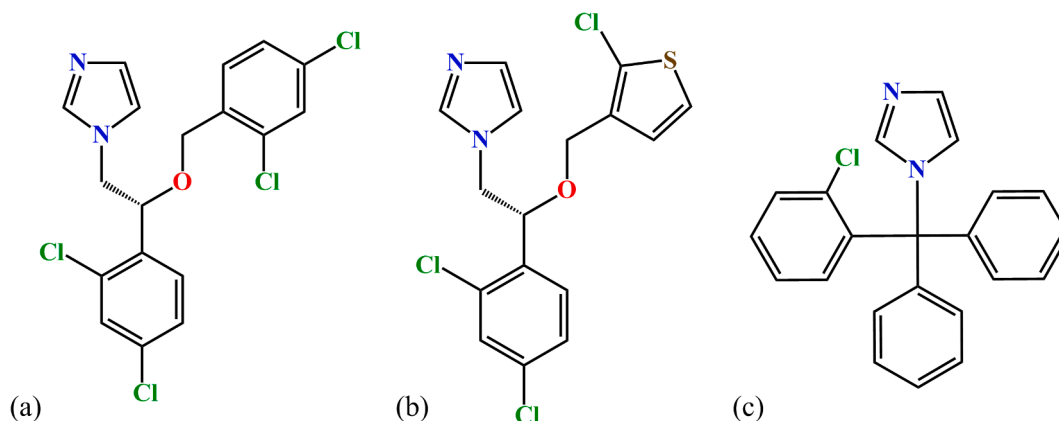


Fig. 1. Chemical structures of first generation azole derivatives: (a) miconazole, (b) tioconazole and (c) clotrimazole.

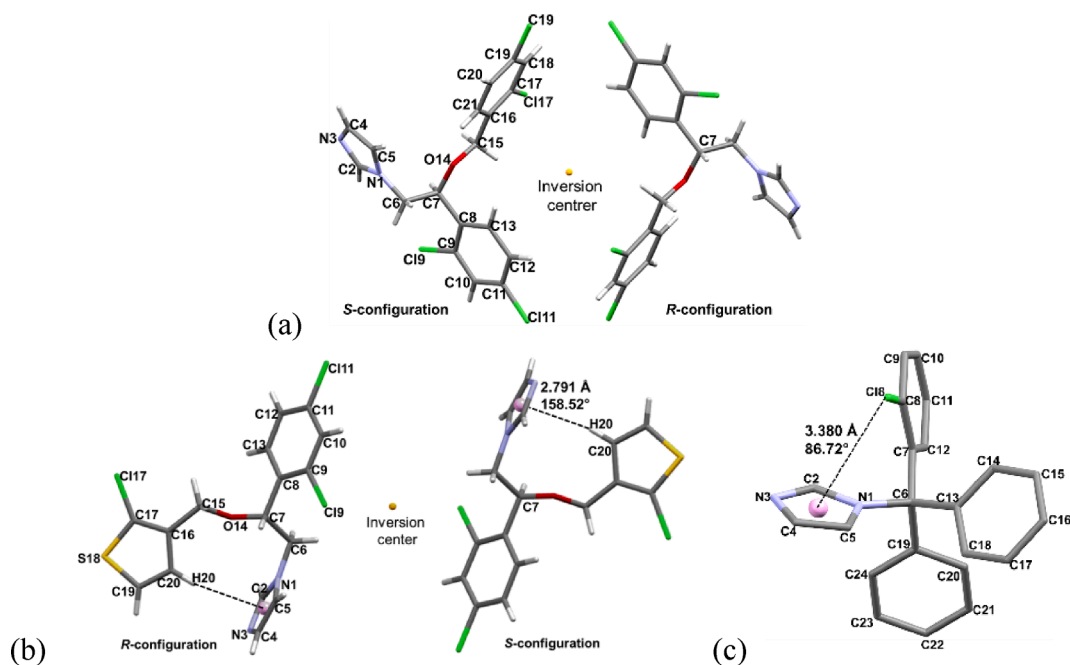


Fig. 2. Structures of (a) miconazole, (b) tioconazole and (c) clotrimazole.

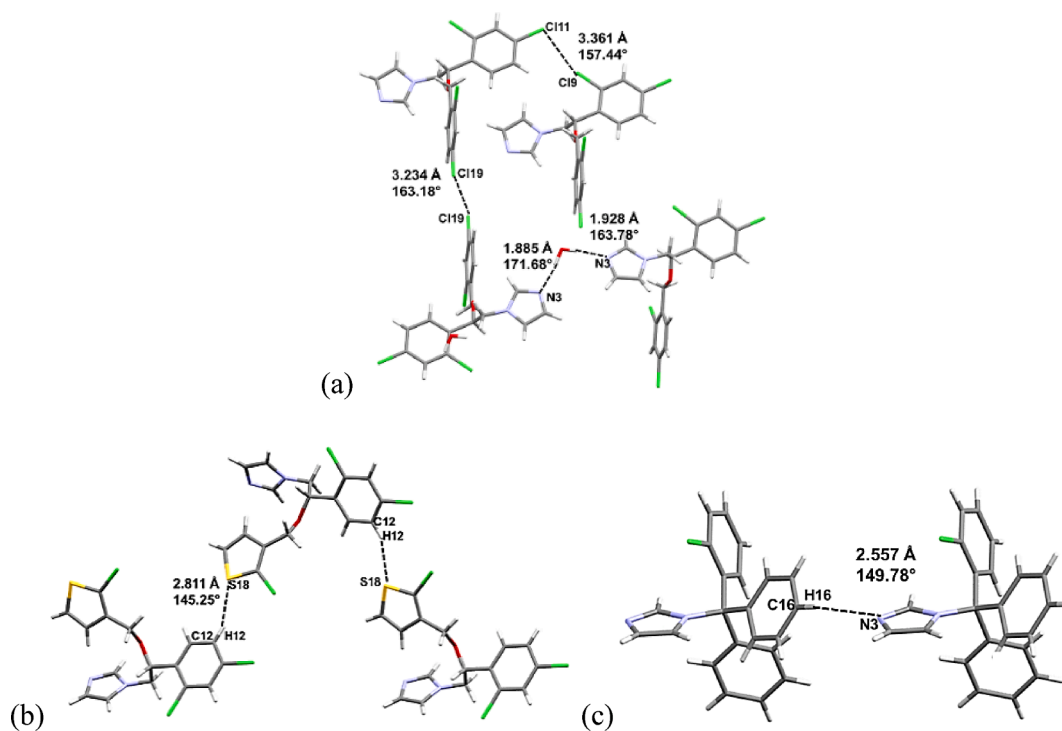


Fig. 3. Intermolecular interactions of (a) miconazole, (b) tioconazole and (c) clotrimazole.

metalloenzyme active sites is essential [20,21].

Antifungal azoles prevent the synthesis of ergosterol, a derivative of mammalian cholesterol, by competitive inhibition of CYP51 (lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase), which is a key enzyme for sterol biosynthesis in fungi. This selective inhibition of the enzyme causes an accumulation of lanosterol and other 14-methylsterols, which have an impact on the fungal cellular proliferation and alterations of the fungal wall. CYP51 belongs to the cytochrome P450 family and catalyses an oxidative removal of lanosterol 14-methyl group, giving place to a C14-C15 double bond. In the active site, the highly reactive heme iron-oxo

species ( $\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}$ ; porphyrin radical cation) provide the oxygen for the first oxygen dependent reaction of the ergosterol biosynthesis. Azole drugs enter the CYP51 active site and inhibit the enzyme by a non-competitive reversible interaction, with an axial coordination of the imidazolic N3 nitrogen atom to the ferric iron atom in the heme domain. Non-covalent interactions, as hydrogen bonding and  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions, play an important role in the active site cavity preventing the access of protons to the active site, Fig. 4 [1,22–27].

The emergence of resistant to the treatment of infectious diseases by these compounds has compelled to the development of new drugs.



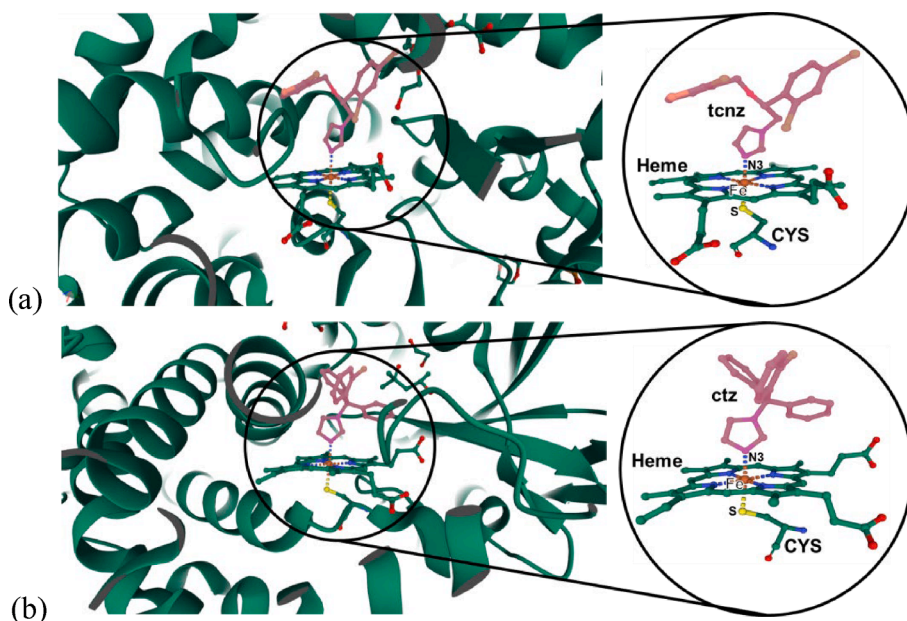


Fig. 4. X-ray crystal structures of (a) tioconazole and (b) clotrimazole, showing the coordination of the imidazolic N3 to the iron atom in the heme domain [27].

Multi-targeted drugs have appeared as a response to this medical need given their ability to affect multiple separate biotargets. One approach to developing such drugs is the use of coordination compounds with bioactive ligands, combining the chemotherapeutic properties of the parental N-heterocyclic drug and a central metal atom. Some of the advantages of using transition metal complexes include their capacity to exhibit an extensive range of coordination numbers and geometries, thermodynamic/kinetic preferences for ligand atoms, and in some cases, redox activity.

## 2.2. Azoles coordination compounds

### 2.2.1. Miconazole and tioconazole

Recently, J. Ochocki and co-workers synthesised four miconazole silver(I) coordination compounds with different counterions ( $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{SbF}_6^-$  and  $\text{NO}_3^-$ ). They were fully characterised, the X-ray single crystal structures were analysed and their biological activity against bacteria and yeast was investigated, Fig. 5 [28,29].

The  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{BF}_4$  and  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{SbF}_6$  coordination compounds present a linear geometry, with two miconazole ligands coordinated to the silver ion through the N3 from the imidazole ring, forming angles of 175.8, 176.4 and 180.0°, respectively. The compounds present hydrogen bonding between the imidazolic C2-H and C4-H with a counterion atom (F or O) (2.350–2.779 Å). There are also  $\pi \cdots \pi$  stacking interactions between neighbouring dichlorophenyl rings, as depicted for  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{ClO}_4$  in Fig. 6 [28,29].

Interestingly,  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{BF}_4$  shows a Cl $\cdots$ Cl interaction from the

dichlorophenyl rings (3.231 Å), while  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{SbF}_6$  presents Ag $\cdots$ F interactions with the counterion  $\text{SbF}_6^-$  (2.982 Å), Fig. 7.

On the other hand, the  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{NO}_3$  compound presents a N3-Ag-N3 angle of 152.39°, due to the bidentate coordination of the  $\text{NO}_3^-$  to the silver atom. Additionally, Ag $\cdots$ Cl intermolecular interactions (3.189 Å, 123.63°) and hydrogen bonding were observed, Fig. 8.

The four silver(I) compounds were tested against strains of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negative bacteria (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) and yeasts (*Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*). In general, the coordination compounds were active against Gram-positive bacteria. The highest activity was towards *M. luteus* with MIC values of 0.49, 1.88, 0.96 and 1.66  $\mu\text{M}$  for  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{NO}_3$ ,  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{BF}_4$  and  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{SbF}_6$ , respectively. The coordination compounds and the free miconazole did not show significant activity against Gram-negative bacteria. For *C. glabrata* and *C. albicans* the four coordination compounds presented higher antifungal activity (MIC = 0.83–1.95; 0.98–1.66  $\mu\text{M}$ ) than the free ligand (MIC = 4.69  $\mu\text{M}$ ), and for *C. parapsilosis* the silver complexes and the miconazole showed similar activity (MIC  $\approx$  0.1  $\mu\text{M}$ ). Interestingly, the most active compound is  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{NO}_3$  where the nitrate is coordinated to the silver atom. Based on this results, it was investigated the cytotoxic activity of  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{NO}_3$  and  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{ClO}_4$  compounds against human hepatocellular carcinoma HepG2 and healthy cell Balb/c 3 T3 fibroblast. Both coordination compounds presented better activity (IC<sub>50</sub>  $\approx$  0.45  $\mu\text{M}$ )

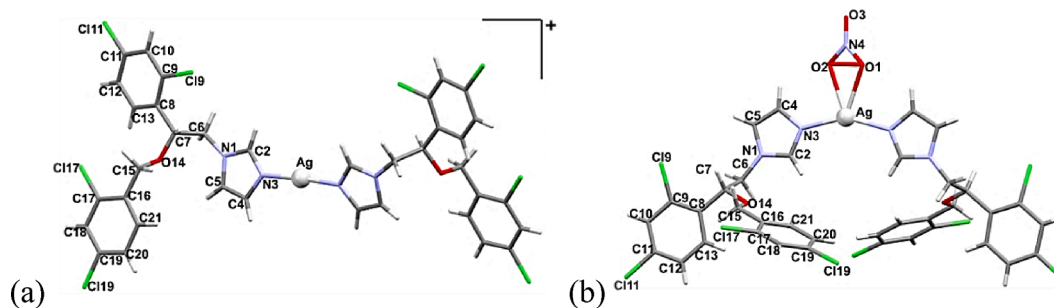


Fig. 5. Miconazole coordination compounds with silver(I). (a)  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{X}$  ( $\text{X}^- = \text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  and  $\text{SbF}_6^-$ ), (b)  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{NO}_3$ .

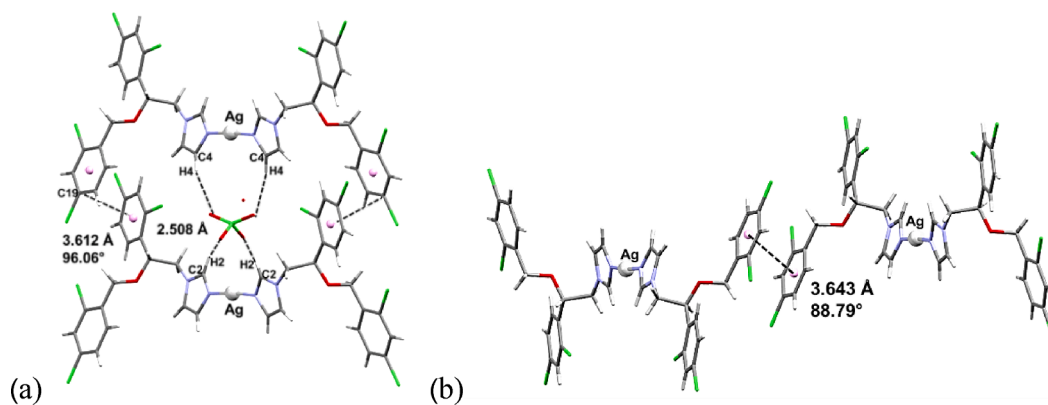


Fig. 6. Hydrogen bonding and  $\pi\cdots\pi$  stacking interactions in  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{ClO}_4$ .

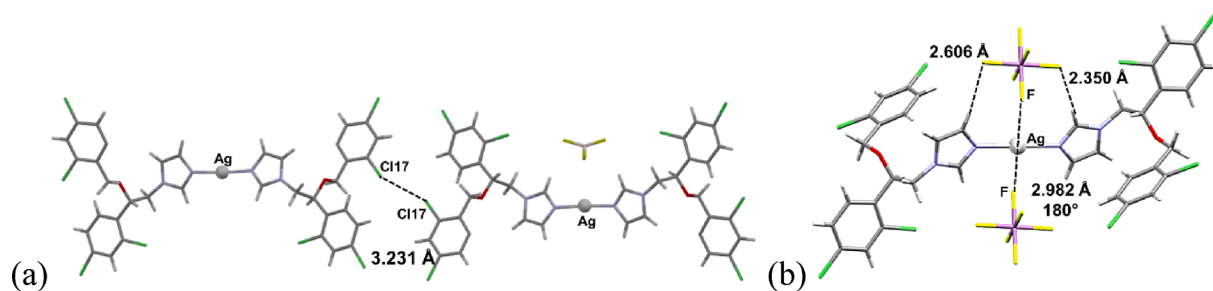


Fig. 7. Halide intermolecular interactions in (a)  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{BF}_4$  and (b)  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{SbF}_6$ .

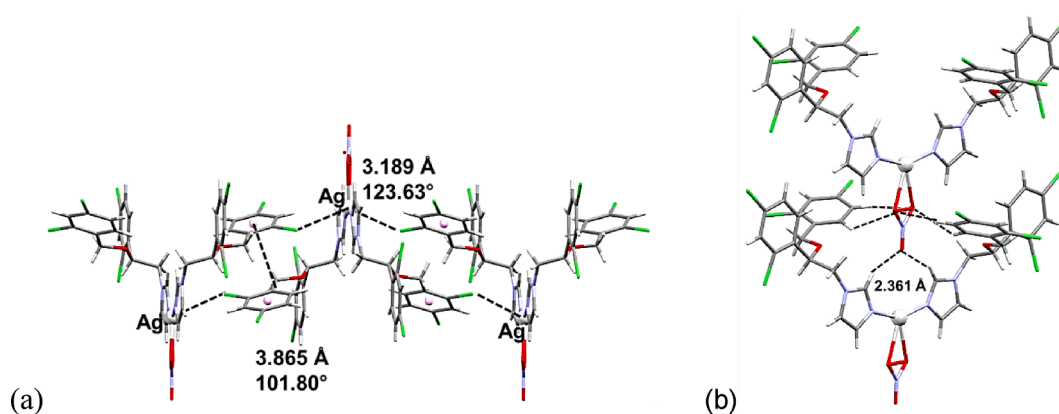


Fig. 8. Intermolecular interactions in  $[\text{Ag}(\text{mcnz})_2]\text{NO}_3$ : (a)  $\text{Ag}\cdots\text{Cl}$ ,  $\pi\cdots\pi$  stacking and (b) hydrogen bonding.

than cisplatin and miconazole against HepG2, but they were active towards to healthy cells ( $\text{IC}_{50} \approx 0.53 \mu\text{M}$ ) [28,29].

In an early work, there were obtained coordination compounds of miconazole (mcnz) and tioconazole (tcnz) with chromium(III), manganese(II), iron(III), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II), the proposed structures are depicted on Fig. 9. Their activity against different types of fungi (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium italicum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Candida albicans*), Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-negative bacteria (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) was explored. The tioconazole complexes  $[\text{Cr}(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Mn}(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  showed good antifungal activity against *A. fumigatus*, while miconazole and its derivatives,  $[\text{Mn}(\text{mcnz})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Ni}(\text{mcnz})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  against *C. albicans*. On the other hand, all compounds showed activity against the Gram-positive *S. aureus* and the Gram-negative *B. subtilis* bacteria, being the tioconazole derivatives  $[\text{Cr}(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Mn}(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Fe}(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Cu}$

$(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  the most active [30,31].

N. Barba-Behrens *et al.* synthesised a series of tioconazole coordination compounds of nickel(II), cobalt(II), copper(II) and zinc(II) with the counterions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  and  $\text{NO}_3^-$  with different geometries, their electronic and structural properties were studied as the cytotoxic activity against cancer cell lines HCT-15 (colon), HeLa (cervix-uterine) MCF-7 (breast) and PC3 (prostate) [32,33].

For the tetrahedral  $[\text{M}(\text{tcnz})_2\text{X}_2]\cdot n\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{M}(\text{II}) = \text{Co}, \text{Cu}, \text{Zn}; \text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ ) compounds the crystal structures showed than one coordinated tcnz ligand adopted a *R* configuration and the other one a *S* configuration. They present intramolecular  $\text{C-H}\cdots\pi$  interactions between the thiazole and the imidazole heterocycles, as well as intermolecular  $\pi\cdots\pi$  stacking between neighbouring imidazole rings, Fig. 10. The  $[\text{Zn}(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Cu}(\text{tcnz})_2\text{Cl}_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  compounds were the most active against the HCT-15 cell line ( $\text{IC}_{50} = 8.49$  and  $14.66 \mu\text{M}$ ). While  $[\text{Zn}(\text{tcnz})_2\text{Br}_2]$  was active against the HeLa cell line ( $13.54 \mu\text{M}$ ) [33].

In the crystal structures of the octahedral  $[\text{Cu}(\text{tcnz})_4\text{Cl}_2]\cdot 8\text{H}_2\text{O}$  and

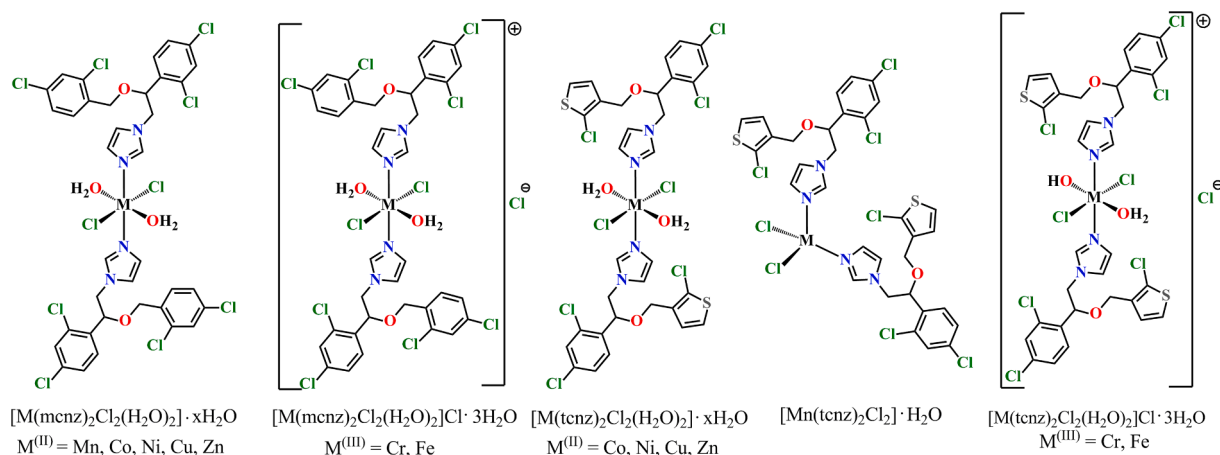


Fig. 9. Coordination compounds of miconazole and tioconazole.

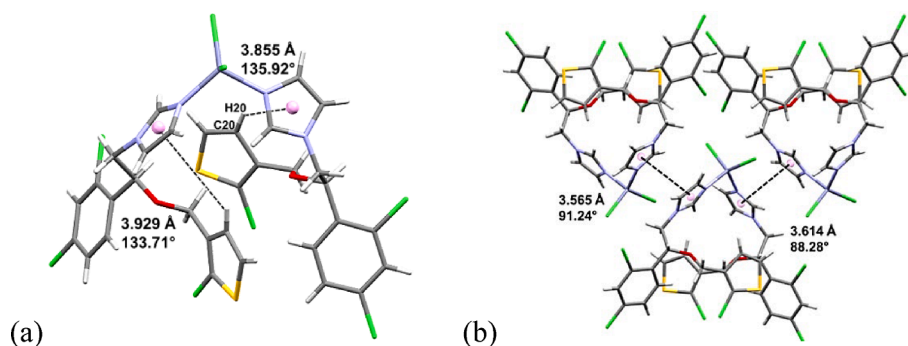


Fig. 10. Intra and intermolecular interactions in the [Zn(tcnz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] · H<sub>2</sub>O compound.

[Cu(tcnz)<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>] · 6H<sub>2</sub>O compounds, intermolecular *lp*...*π* interactions (Cl...*π*) between dichlorophenyl rings are observed, as well as Cl...Cl interactions, which are shown in Fig. 11. The compound [Cu(tcnz)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] · 8H<sub>2</sub>O showed promising activity against HCT-15 cell line with an inhibition concentration of 3.10  $\mu$ M [33].

In the octahedral nickel(II) compounds, [Ni(tcnz)<sub>6</sub>]Cl<sub>2</sub> and [Ni(tcnz)<sub>6</sub>]Br<sub>2</sub>, six tcnz ligands are coordinated to the metal atom, adopting a regular octahedral geometry. The tioconazole molecules are accommodated as a propeller, with *lp*...*π* (Cl...*π*) interactions between one chloro atom from the dichlorophenyl ring and the *π* system of thiophene group, Fig. 12. These interactions confer great stability to these complexes, which is reflected in their cytotoxic activity in most of the studied cancer cell lines. The IC<sub>50</sub> values for [Ni(tcnz)<sub>6</sub>]Cl<sub>2</sub> in HCT-15, HeLa and PC3 cancer cell lines were 14.02, 12.33 and 11.67  $\mu$ M, respectively. While for the [Ni(tcnz)<sub>6</sub>]Br<sub>2</sub> compound, the IC<sub>50</sub> values were 10.12, 15.36, 16.15  $\mu$ M for HeLa, MCF-7 and PC3, respectively [32].

For the octahedral [M(tcnz)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] · xH<sub>2</sub>O (M = Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>) compounds the crystal structures were not obtained by X-ray. However, the [Cu(tcnz)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] and [Zn(tcnz)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] · H<sub>2</sub>O

compounds presented activity against the HCT-15 cancer cell line, with an inhibitory concentration of 9.5  $\mu$ M [33].

### 2.2.2. Clotrimazole

In order to investigate the cytotoxic properties of coordination compounds of clotrimazole with transition metal ions, N. Barba-Behrens and co-workers synthesised a series of complexes with nickel(II), cobalt(II), copper(II) and zinc(II). The obtained complexes exhibited different coordination numbers (4–6) and geometries [34]. For tetracoordinated compounds [M(ctz)<sub>2</sub>X<sub>2</sub>] (M(II) = Ni, Co, Cu, Zn; X = Cl, Br) and [M(ctz)<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub> (M(II) = Cu, Zn) the metal ion stabilised a tetrahedral geometry. The X-ray crystal structures of [Cu(ctz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], [Zn(ctz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Zn(ctz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] showed an intermolecular hydrogen bonding from a phenyl ring and a neighbouring coordinated halogen (C11-H11...Cl). Additionally, the zinc(II) compounds present (H16...*π*) interactions between phenyl rings, Fig. 13. On the other hand, in the nitrate compounds [M(ctz)<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub> (M(II) = Cu, Zn), the metal atom is coordinated to three ctz ligands and one monodentate nitrate.

The [Ni(ctz)<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>] and [Cu(ctz)<sub>2</sub>(EtOH)Cl<sub>2</sub>] · EtOH stabilised penta-coordinated compounds. The crystal structure for the copper(II)

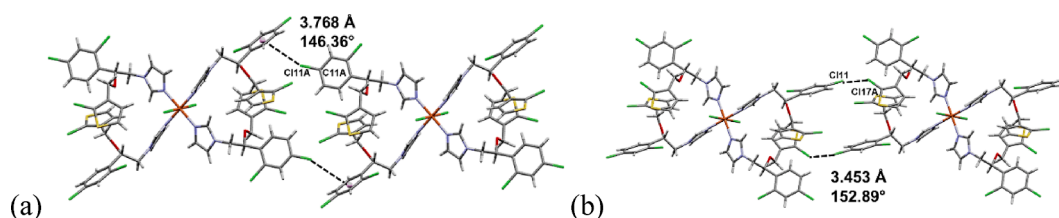


Fig. 11. Intermolecular (a) Cl...*π* and (b) Cl...Cl interactions in [Cu(tcnz)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] · 8H<sub>2</sub>O.

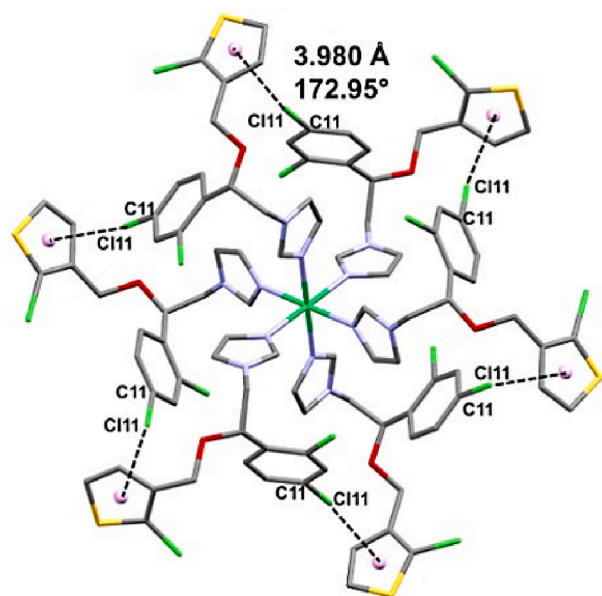


Fig. 12. Intramolecular  $lp \cdots \pi$  ( $Cl \cdots \pi$ ) interactions in  $[Ni(ctnz)_6]Cl_2$ .

complex showed that the metal ion stabilised a square pyramidal geometry, where the intramolecular  $lp \cdots \pi$  ( $Cl \cdots \pi$ ) interaction, which is present in the free ligand, is conserved. Additionally, this Cl atom from the chlorophenyl ring also participates in an intermolecular hydrogen bonding ( $H17 \cdots Cl$ ), as shown in Fig. 14.

There was obtained a tetranuclear copper(II) compound,  $[Cu_4(ctz)_4(\mu^4-Br)(\mu-O)] \cdot (iPrOH)$  which contains four copper(II) atoms in a trigonal bipyramidal geometry, each metal ion is bound to a clotrimazole ligand, three bridging bromo atoms and a central tetrahedral bridging oxygen atom. This tetranuclear molecule did not preserve the intramolecular  $lp \cdots \pi$  ( $Cl \cdots \pi$ ) interaction from the free ligand. Hydrogen bonding between the chlorophenyl ring and a bridging bromo atom

( $H11 \cdots Br3$ ) was observed, Fig. 15.

The biological activity of the complexes was investigated by different techniques [34,35]. They were tested against HeLa (cervix-uterine), PC3 (prostate) and HCT-15 (colon) carcinoma cell lines. All coordination compounds showed increased cytotoxic activity,  $IC_{50}$  values lower than  $30 \mu M$ , when compared with the free ligand and/or cisplatin, indicative of a synergetic effect of the clotrimazole when binding to the metal ions. The most effective compounds were  $[Cu(ctz)_2Br_2]$  and  $[Cu(ctz)_3NO_3]NO_3$ , against HeLa ( $IC_{50} = 3.9, 3.5 \mu M$ ) (cisplatin  $5.2 \mu M$ ) and PC3 ( $IC_{50} = 4.9, 8.2 \mu M$ ) (cisplatin  $19 \mu M$ ). An apoptotic cell death induced by the copper(II) complexes was proposed based on the results obtained from confocal microscopy, immunocytochemical evaluation and TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assays in tumor carcinoma cell lines [34].

Linear (LD) and circular dichroism (CD) studies showed that binding of these complexes to B-DNA affects its linear structure (bending) but does not significantly affect the helical structure. The atomic force microscopy imaging confirms changes on the DNA tertiary structure due to the binding of the coordination compounds and an interaction through groove binding is proposed. The apparent DNA-binding constants ( $K_{app}$ ) were determined through ethidium bromide (EtBr) displacement experiments. For the tetrahedral compounds  $[Cu(ctz)_2X_2]$  ( $X = Cl, Br$ ) the  $K_{app}$  values were approximately  $4.8 \times 10^4 M^{-1}$  and the nitrate compound  $[Cu(ctz)_3NO_3]NO_3 \cdot 2H_2O$  was 1.5 times higher ( $6.5 \times 10^4 M^{-1}$ ). Additionally, the electrochemical and gel electrophoresis studies correlate with the cytotoxic activity suggesting cell death by generating ROS. The  $Cu^{2+/+}$  redox potentials for  $[Cu(ctz)_2Cl_2]$  ( $E_{1/2} = -0.239 V$ ),  $[Cu(ctz)_2Br_2]$  ( $E_{1/2} = -0.139 V$ ) and  $[Cu(ctz)_3NO_3]NO_3 \cdot 2H_2O$  ( $E_{1/2} = -1.022 V$ ) are the most negative, which is consistent with being the most active compounds [35].

Sánchez-Delgado *et al.* synthesised clotrimazole complexes with ruthenium(II), rhodium(II), gold(III), platinum(II) and copper(I) metal ions and reported their biological activity against *Trypanosoma cruzi*. Based on their spectroscopic characterization it was proposed a tetrahedral geometry for  $[Ru(ctz)_2Cl_2]$  and  $[Ru(ctz)_2(bipy)](PF_6)_2$ , an octahedral arrangement for  $K_2[Pt(ctz)_2Cl_4]$  and a linear geometry for  $[Cu(ctz)_2]PF_6$  [36,37].

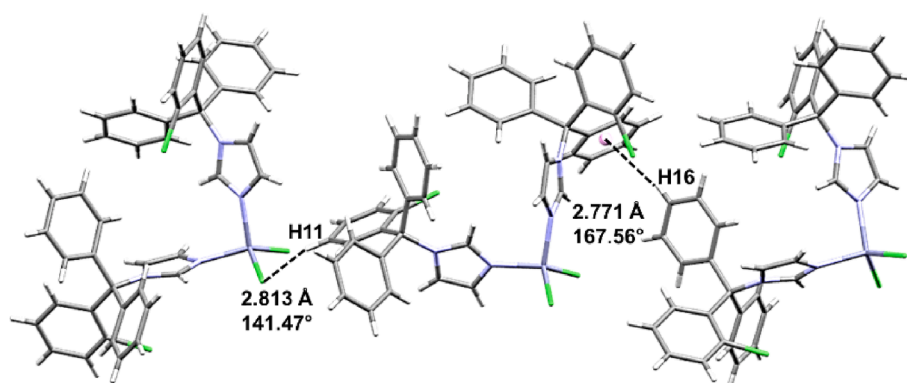


Fig. 13. Intermolecular interactions for  $[Zn(ctz)_2]Cl_2$  compound.

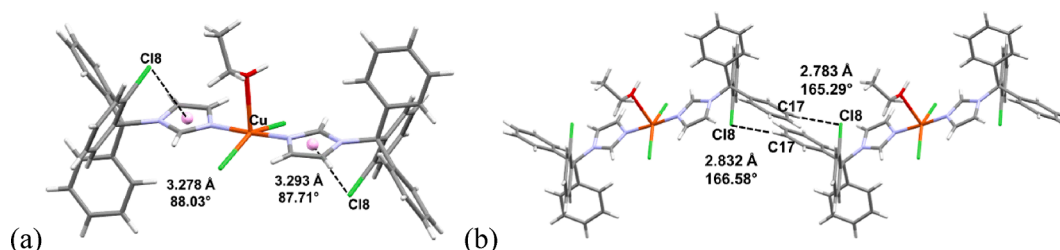


Fig. 14. (a) Intramolecular  $lp \cdots \pi$  interaction and (b) intermolecular hydrogen bonding in  $[Cu(ctz)_2(EtOH)Cl_2] \cdot EtOH$ .



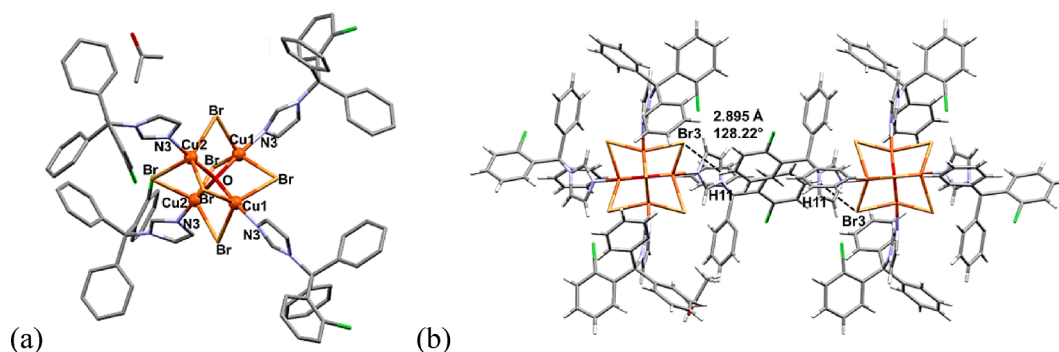


Fig. 15. (a) Structure of tetranuclear copper(II) compound  $[\text{Cu}_4(\text{ctz})_4(\mu^4\text{-Br})(\mu\text{-O})](i\text{PrOH})$  and (b) intermolecular hydrogen bonding.

The X-ray crystal structure of the  $[\text{Rh}(\text{ctz})(\text{cod})\text{Cl}]$  complex showed that one ctz ligand, a cyclopentadiene molecule and a chloro atom are bound to the rhodium(II) atom. It is conserved the intramolecular  $lp\cdots\pi$  ( $\text{Cl}\cdots\pi$ ) interaction from the free ligand, Fig. 16a. The  $[\text{Au}(\text{ctz})\text{Cl}_3]$  compound presents one ligand and three chloro atoms coordinated to the gold(III) atom, in a square planar geometry. Interestingly, intermolecular  $\text{Au}\cdots\text{Cl}$  interactions were observed, as well as hydrogen bonding between coordinated chloro atoms and neighbouring phenyl rings, the intramolecular  $\text{Cl}\cdots\pi$  interactions are also conserved, Fig. 16b.

There were performed *in vitro* studies against *T. cruzi*, being  $[\text{Ru}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  the most active on the proliferation of the parasite (100% of inhibition, 10  $\mu\text{M}$ ). The tests with infected mammalian cells with trypanomastigotes showed good activity ( $\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$ ) and did not affect the proliferation of normal cells [36,37].

In order to investigate new metal-base organometallic complexes as an alternative for the treatment of parasitic infections, Sánchez-Delgado *et al.* synthesised a series of ruthenium(II) compounds with clotrimazole. Complexes with *p*-cymene and bidentate ligands (bipy = bipyridine, en = ethylenediamine, acac = acetylacetonate) were obtained:  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{bipy})](\text{trinitrophenole})_2$ ,  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})](\text{BF}_4)$  and  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{acac})](\text{BF}_4)$ . Additionally, octahedral coordination compounds with ruthenium(II) and ruthenium(III): *cis, fac*- $[\text{Ru}(\text{ctz})\text{Cl}_2(\text{DMSO})_3]$ , *cis, cis, trans*- $[\text{Ru}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2(\text{DMSO})_2]$ ,  $\text{Na}[\text{Ru}(\text{ctz})\text{Cl}_4(\text{DMSO})]$  and  $\text{Na trans}$ - $[\text{Ru}(\text{ctz})_2\text{Cl}_4]$ , were synthesised [38].

The structures of the four new complexes with *p*-cymene ligand were determined by X-ray diffraction. In the  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2]$  compound, the ruthenium atom is coordinated to a ctz ligand and two chloro atoms, with the *p*-cymene ligand bound in a “piano-stool” geometry. The compound preserved the  $lp\cdots\pi$  ( $\text{Cl}\cdots\pi$ ) intramolecular interaction present in the free ligand Fig. 17a. Additionally, intermolecular interactions between two phenyl rings ( $\text{H}\cdots\pi$ ) and the coordinated chloro atoms with a chlorophenyl ring ( $\text{H}\cdots\text{Cl}$ ), Fig. 17b and 17c were observed (Fig. 18).

The metal atom in the three complexes,  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{bipy})](\text{BF}_4)_2$ ,  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})](\text{BF}_4)_2$  and  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{acac})](\text{BF}_4)$ , presents a similar structure to the previously

described, where one bidentate ligand substituted the two chloro atoms. Interestingly, in the clotrimazole ligand, the length of the intramolecular  $lp\cdots\pi$  ( $\text{Cl}\cdots\pi$ ) interaction with the imidazole ring, varied upon the ligands present in the coordination sphere, en (3.277 Å), Cl (3.326 Å), bipy (3.40 Å), and in the case of the acac, this interaction is observed with a phenyl ring instead of the imidazole (3.443 Å), Fig. 17.

In these compounds the tetrafluoroborate counterion participates extensively in hydrogen bonding with the ruthenium complexes, as depicted in Fig. 19.

The *in vitro* antiparasitic studies of the ruthenium(II) coordination and the organometallic compounds against promastigotes of *Leishmania major* and epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* showed that the incorporation of the metal atom and the clotrimazole ligand results in a synergistic effect, enhancing the antiproliferative activity. In particular the compound  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2]$  was the most active against both parasites with  $\text{LD}_{50}$  values of 0.015 and 0.1  $\mu\text{M}$  for *L. major* and *T. cruzi*, respectively, followed by  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{acac})](\text{BF}_4)$  (*L. major* 0.45  $\mu\text{M}$  and *T. cruzi* 2.9  $\mu\text{M}$ ). Additionally, these compounds did not present any appreciable toxicity to human osteoblasts. It was proposed that the good activity of these compounds was due to the high water solubility and the stability given by the arene ligand [38].

With the aim to develop biological active organometallic ruthenium (II) compounds that could present both antiparasitic (trypanosomatid) and cytotoxic activity on human cancer cell lines (A2780 ovarian, MCF7 breast, HeLa cervical), D. Gambino *et al.* synthesised a ruthenium(II)-cyclopentadienyl complex with triphenylphosphine and clotrimazole ligands  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\text{cp})(\text{PPh}_3)_2]\text{CF}_3\text{SO}_3$ . This compound was fully characterised by spectroscopic techniques, as NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$ ) and IR, Fig. 20a [39]. This complex was evaluated against *T. cruzi* ( $\text{IC}_{50} = 0.25 \mu\text{M}$ ) and it presented a six fold increase of activity with respect of the free ctz and 30 time higher than Nifurtimox ( $\text{IC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$ ) the reference drug. Additionally, it showed a dose dependent antiproliferative effect on *T. brucei brucei* ( $\text{IC}_{50} = 0.6 \mu\text{M}$ ), being more active than ctz. These results show that this organometallic compound may be proposed as a broad spectrum metal-based drug active against multiple trypanosomatid protozoa. In addition, the compound showed high cytotoxic activity on three human cancer cell lines, A2780 ovarian (0.54  $\mu\text{M}$ ),

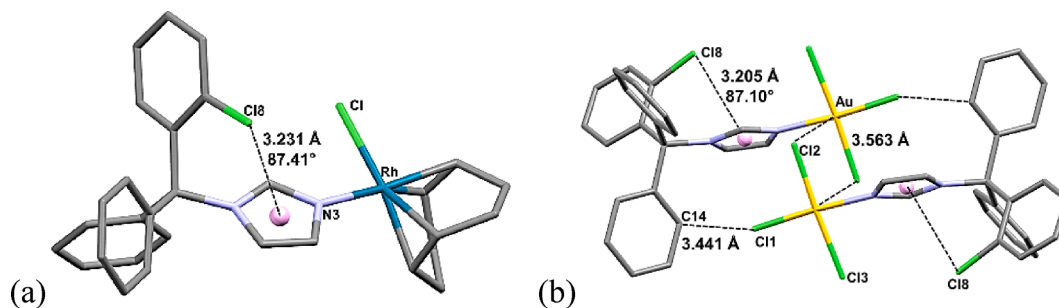


Fig. 16. Intra and intermolecular interactions in (a)  $[\text{Rh}(\text{ctz})(\text{cod})\text{Cl}]$  and (b)  $[\text{Au}(\text{ctz})\text{Cl}_3]$ .

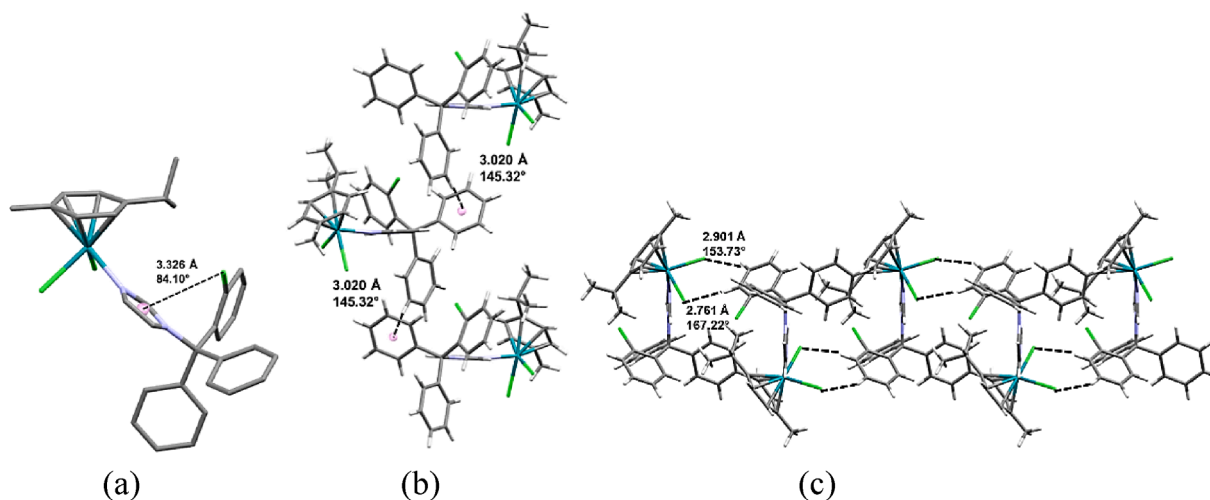


Fig. 17. (a) Structure of the  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2]$  compound; intermolecular (b)  $(\text{H}\cdots\pi)$  and (c)  $(\text{H}\cdots\text{Cl})$  interactions.

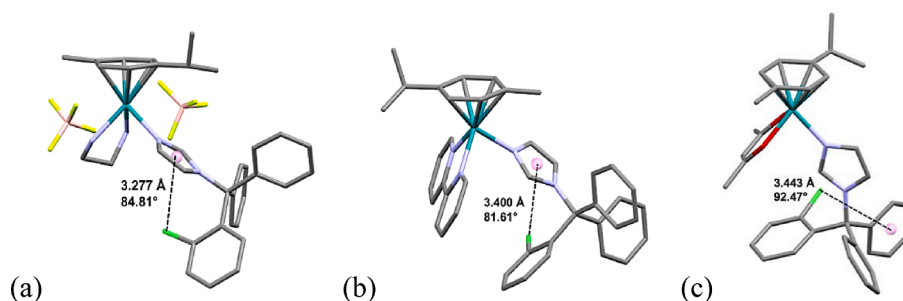


Fig. 18. Ruthenium(II) complexes. Intramolecular  $lp\cdots\pi$  ( $\text{Cl}\cdots\pi$ ) for: (a)  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{bipy})][\text{BF}_4]_2$ , (b)  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})](\text{BF}_4)_2$  and (c)  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{acac})](\text{BF}_4)$ .

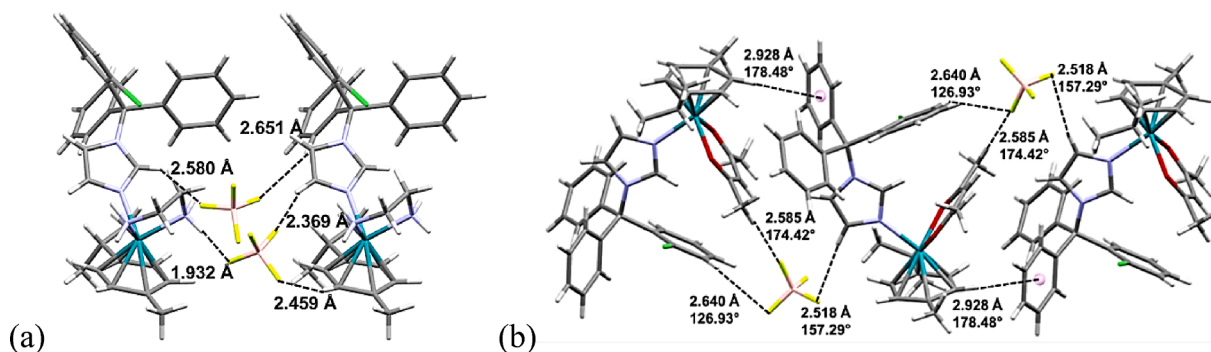


Fig. 19. Hydrogen bonding of  $\text{BF}_4$  in (a)  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})](\text{BF}_4)_2$  and (b)  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{acac})](\text{BF}_4)$ .

MCF7 breast ( $5.4 \mu\text{M}$ ) and HeLa cervical ( $0.25 \mu\text{M}$ ), higher activity than cisplatin and clotrimazole [39].

Recently, a series of rhenium(I) tricarbonyl compounds *fac*- $[\text{Re}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{NN})]\text{PF}_6$  with clotrimazole and NN derivatives (bipy, dmb, phen, tmp, aminophen) was synthesised [40]. The crystal structure of *fac*- $[\text{Re}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{phen})]\text{PF}_6$  showed a *fac* isomer in a distorted octahedral geometry with a phenanthroline molecule coordinated in a bidentate form and one clotrimazole molecule in the coordination sphere. The structure stabilised the intramolecular  $lp\cdots\pi$  ( $\text{Cl}\cdots\pi$ ) interaction that has been observed between the chlorine atom and the imidazole ring of clotrimazole, Fig. 20b. All coordination compounds of rhenium(I) presented major activity against the *Trypanosoma cruzi* forms epimastigotes and trypomastigotes compared to the free clotrimazole. The *fac*- $[\text{Re}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{tmp})]\text{PF}_6$  compound showed a  $\text{IC}_{50}$  value of  $3.48$  and  $0.61 \mu\text{M}$  for

epimastigotes and trypomastigotes. However, the results in healthy cells did not show a greater selectivity of the rhenium(I) compounds towards the parasite compared to the reference drug Nifurtimox [40]. Molecular docking calculations on ct-DNA showed that rhenium(I) derived complexes interact with the DNA major groove through hydrogen bonding between the carbonyl ligands and cytosine as well as phosphates. While, the clotrimazole stabilizes  $\pi\cdots\sigma$  interactions with thymine [40].

New rhenium(I) coordination compounds of ctz and bipy derivatives, *fac*- $[\text{Re}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{R-bpy})]$ , were synthesised by F. Zobi et al. and their antimicrobial activity was investigated towards *S. aureus*, with a moderate activity. *In silico* calculations with a homology model of *S. aureus* MurG enzyme showed that the coordination compounds presented high affinity for this enzyme by non-polar interactions in the binding pocket [41].

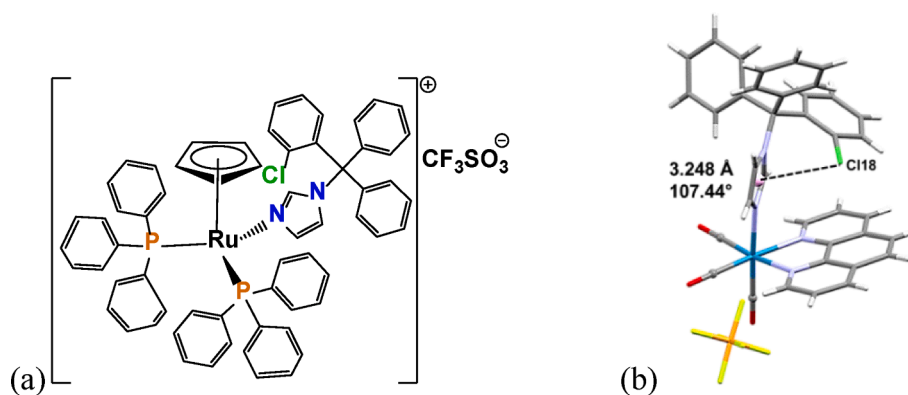


Fig. 20. Structure of the (a)  $[\text{Ru}(\text{ctz})(\text{cp})(\text{PPh}_3)_2]\text{CF}_3\text{SO}_3$  and (b) *fac*- $[\text{Re}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{phen})]\text{PF}_6$  complexes.

I. Turel and co-workers designed a series of mono, bis-, and tris-organometallic complexes of ruthenium(II) with miconazole, tioconazole and clotrimazole to investigate the antifungal and antiparasitic activity of azole organometallic complexes, Fig. 21. The antifungal activity of all complexes against *Curvularia lunata* was tested and the miconazole compounds were studied against the *Schistosoma mansoni* parasite [17].

The obtained structure of the tioconazole compound,  $[\text{Ru}(\text{tcnz})(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}_2]$ , showed that the metal ion is in a pseudooctahedral “piano-stool” geometry, with the aromatic *p*-cymene  $\pi$ -bound to the ruthenium (II) atom, one tioconazole ligand and two chloro atoms coordinated to the metal atom. It was observed the formation of dimers by intermolecular hydrogen bonds between two molecules,  $\text{H}_{\text{p-cymene}}$  and the coordinated Cl atoms,  $\text{C-H}\cdots\text{Cl}$  (2.734(1), 2.716(1) Å), which present an inversion center, Fig. 22 [17].

On the other hand, in the  $[\text{Ru}(\text{ctz})_2(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}](\text{PF}_6)\cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$  there are two clotrimazole ligands and one chloro atom coordinated to ruthenium(II) atom, with the *p*-cymene ligand in a “piano-stool” geometry, as in the clotrimazole compound. The ligand conserved its intramolecular  $lp\cdots\pi$  ( $\text{Cl}\cdots\pi$ ) interaction with the  $\pi$  system of the imidazole, while the second ctz ligand presents this  $lp\cdots\pi$  interaction with a phenyl ring, Fig. 23 [17].

The tris-ruthenium compounds, at 0.5 mM, reduced the fungal growth of *Curvularia lunata* as compared with the control. The miconazole complexes presented moderate antichistosomal activity, (10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) which decreased when diminishing the number of coordinated miconazole ligands [17].

Recently, M. Navarro *et al.* studied the antifungal properties of a series of clotrimazole coordination compounds with zinc(II) and their copper(II) analogues  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , and  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]$  [42].

The structures of the  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]$  compounds were obtained by X-ray diffraction. In the first compound, the metal atom adopts a tetrahedral geometry, with two ctz ligands and two monodentate acetate molecules in the coordination sphere. The  $\text{Cl}\cdots\pi$  interaction (3.345 Å, 87.31°), which is present in the free clotrimazole, is maintained. Additionally, the Cl atom, from the chlorophenyl

ring, also participates in intermolecular hydrogen bonding, Fig. 24.

A distorted octahedral geometry was observed for the copper(II) atom in the  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]$  compound, with two bidentate acetate molecules and two ctz in the coordination sphere. Neighbouring chlorophenyl rings stabilize intermolecular  $\pi\cdots\pi$  stacking and hydrogen bonding with the coordinated acetates, Fig. 25.

The antifungal properties of these zinc(II) and copper(II) clotrimazole complexes were studied against *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Sporothrix brasiliensis* yeast, as well as their antiparasitic activity against *Trichomonas vaginalis*. [42,43].

The  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  compound exhibited the major antifungal activity, with  $\text{IC}_{50}$  values of 0.06  $\mu\text{M}$  for *C. albicans* and 0.125  $\mu\text{M}$  for *C. neoformans* and *S. brasiliensis* yeast. The  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  compounds presented important  $\text{IC}_{50}$  values of 0.03  $\mu\text{M}$  for *S. brasiliensis*. They were more active than itraconazole and fluconazole drugs, used to treat for these fungal infections, and then the free ctz. The copper(II) compounds showed lower activity than their zinc(II) analogues [42].

The zinc(II) tetrahedral compounds  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  were investigate as possible antiparasitic agents against *Trichomonas vaginalis* [43]. The  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{IC}_{90}$ , showed that the complexes  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  (10.5 and 22.9  $\mu\text{M}$ ) and  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]$  (4.9 and 17.2  $\mu\text{M}$ ) were more active in comparison to free ligand (17.2 and > 40  $\mu\text{M}$ ). Through scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) it was observed that the morphology of the parasite displayed several ultrastructural alterations, being the  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]$  compound the most effective. The toxicity effects of the zinc compounds and ctz towards primary cultures of Human Foreskin Fibroblast (HFF) was evaluated. The  $\text{TC}_{50}$  (toxic concentration) for  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  (29.7  $\mu\text{M}$ ),  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]$  (28.4  $\mu\text{M}$ ) and the free clotrimazole (34.7  $\mu\text{M}$ ), showed lower toxicity towards healthy human cells [43]. Additionally, the cytotoxic activity towards cancer cell lines of the *trans*-square planar compounds  $[\text{Pd}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Pt}(\text{ctz})_2\text{I}_2]$  were also studied, however they were not active [44,45].

Schatzschneider *et al.* synthesised manganese(I) tricarbonyl compounds of miconazole and clotrimazole with bipyridine,  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$ ,  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy}^{\text{COOCH}_3})]\text{PF}_6$  and  $[\text{Mn}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . The manganese(I) atom adopts a *fac*-octahedral

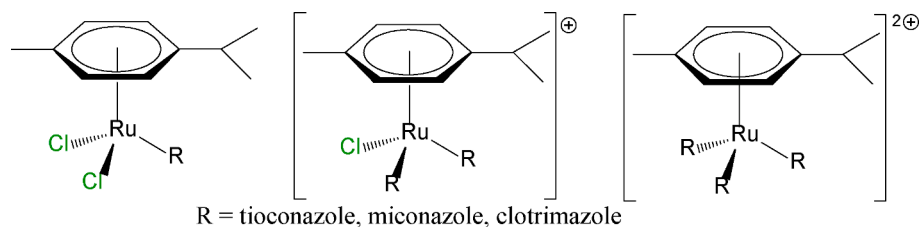


Fig. 21. Ruthenium(II) organometallic compounds with tncz, mcnz and ctz.

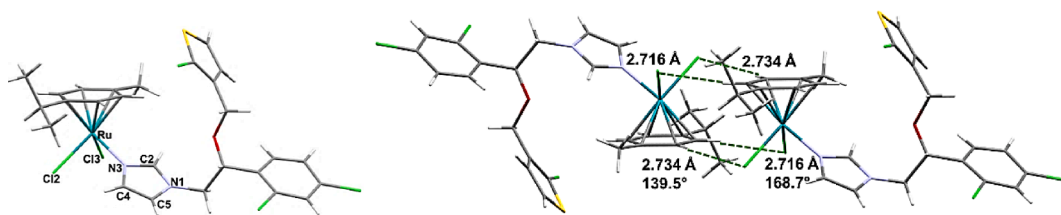


Fig. 22. Structure of the  $[\text{Ru}(\text{tcnz})(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}_2]$  complex and the formation of dimers by hydrogen bonding.

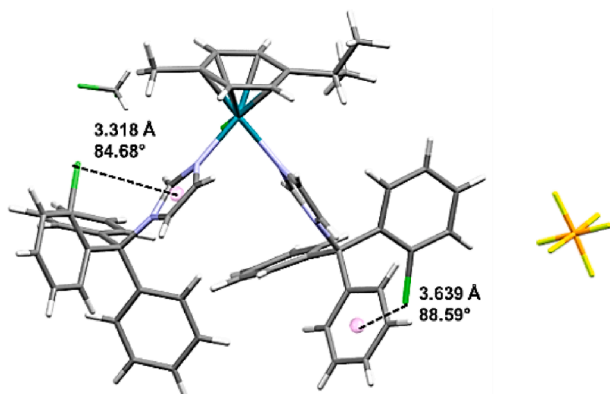


Fig. 23. Intramolecular  $lp\cdots\pi$  ( $\text{Cl}\cdots\pi$ ) interactions in  $[\text{Ru}(\text{ctz})_2(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}](\text{PF}_6)\cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$  compound.

geometry. For the  $[\text{Mn}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$  complex, the intramolecular  $lp\cdots\pi$  ( $\text{C8}\cdots\pi$ ) interaction in the clotrimazole is preserved (Fig. 26a). A dimer is formed by a  $\pi\cdots\pi$  stacking interaction between two neighboring bipyridine ligands, 3.726 Å ( $\text{C}\cdots\pi$ ) (Fig. 26b). For  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy}^{\text{COOCH}_3})]\text{PF}_6$  and  $[\text{Mn}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$  the same structure is proposed [46].

The antibacterial activity was studied on Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*) bacterial strains. Their antiparasitic activity on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*, was investigated [46]. Neither the compounds nor the ligands showed significant activity against Gram-negative bacteria. However, the three organometallic compounds exhibited greater activity than their respective free ligands against Gram-positive bacteria. The derivative of clotrimazole  $[\text{Mn}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$  was the most active with values of 0.625  $\mu\text{M}$  (*S. aureus*, *S. epidermis*) and 2.5  $\mu\text{M}$  (*E. faecalis*, *E. faecium*). While the second more active was the miconazole derivative  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$  followed by  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy}^{\text{COOCH}_3})]\text{PF}_6$  with inhibitory concentration of 1.25 and 2.5  $\mu\text{M}$  for *Staphylococcus* strain, respectively. When tested against *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* the difference was notable, the  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$  presented values of 2.5 and 1.25  $\mu\text{M}$  (*E. faecalis*, *E. faecium*), and  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy}^{\text{COOCH}_3})]\text{PF}_6$  had a concentration of 10 and 2.5  $\mu\text{M}$

(*E. faecalis*, *E. faecium*) [46]. These compounds were active against *L. major* and *T. brucei* parasites with  $\text{IC}_{50}$  of 1.8, 0.4  $\mu\text{M}$  for  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , 4.7, 2.1  $\mu\text{M}$  for  $[\text{Mn}(\text{mcnz})(\text{CO})_3(\text{bipy}^{\text{COOCH}_3})]\text{PF}_6$  and 2.2, 0.5  $\mu\text{M}$  for  $[\text{Mn}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . Unfortunately, despite of their very good antiparasitic activity, these compounds showed significant toxicity on the mammalian cell lines, 293 T (human embryonal kidney cells) and J774.1 (murine macrophages) [46].

### 3. Nitroimidazoles

Over the last few decades, nitroimidazoles have proven to be highly effective against infectious diseases, mainly as antiparasitic and antibacterial agents, albeit through a completely different mechanism of action to theazole derivatives. Metronidazole (mtz), a 2-methyl-5-nitroimidazole derivative with an ethyl alcohol group in position N1, has been the preferred treatment for trichomoniasis, giardiasis, and amoebiasis. However, due to the resistant acquire by the parasites that cause those diseases, other compounds have since been developed and are now being used as an alternative to metronidazole, for example, tinidazole (tnz), secnidazole (snz), and ornidazole (onz). As shown in Fig. 27, both secnidazole and ornidazole are secondary alcohols with the latter also depicting a terminal chlorine atom. Tinidazole, on the other hand, has an alkyl sulfone substituted in N1 [47–49].

Given the nature of the atoms that are present in this series of

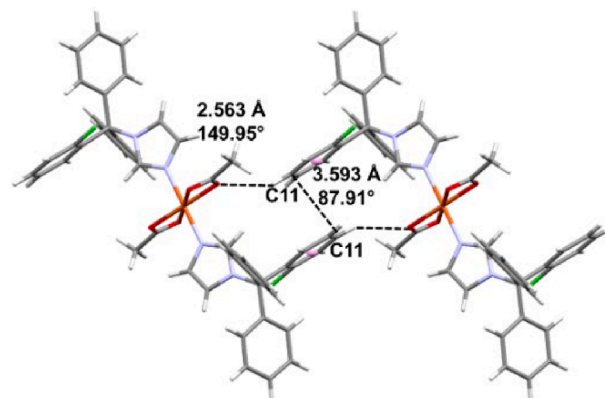


Fig. 25. Intermolecular interactions,  $\pi\cdots\pi$  stacking and hydrogen bonding in  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]$ .

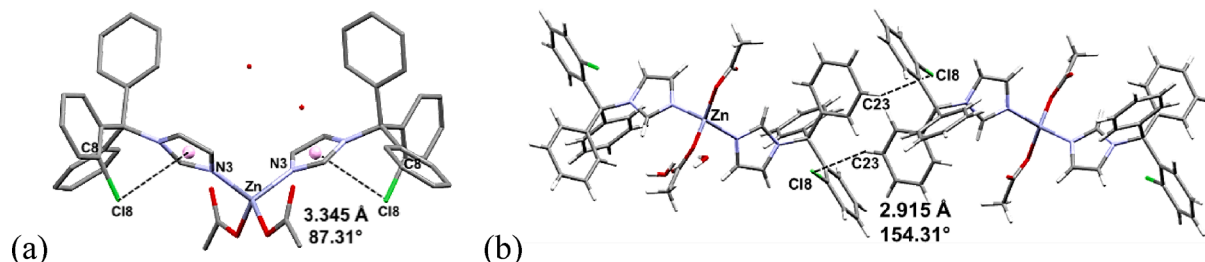


Fig. 24. Tetrahedral compound (a)  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2(\text{OAc})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , (b) intra and intermolecular interactions,  $\text{Cl}\cdots\pi$ , and  $\text{H}\cdots\text{Cl}$ .



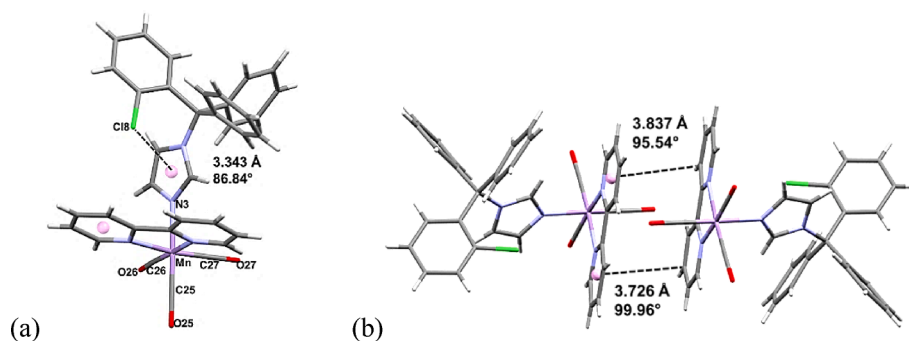


Fig. 26. Intra and intermolecular interactions in  $[\text{Mn}(\text{ctz})(\text{CO})_3(\text{bipy})]\text{PF}_6$ .

nitroimidazoles, a network of hydrogen bonds is expected in their crystal structures. Metronidazole shows an intramolecular hydrogen bond between the OH group and hydrogen from the methyl group substituted in the aromatic group (Fig. 28a). Additionally, strong intermolecular contacts between the OH and the imidazolic nitrogen atom (1.868 Å, 173.68°), and  $\pi\cdots\pi$  interaction between the heterocyclic rings can be observed (3.495 Å) in Fig. 28b [50].

Tinidazole also stabilised intramolecular hydrogen bond between the oxygens from sulfone group and the hydrogens from the alkyl chain (Fig. 29a). Interestingly, the crystal structure of the protonated tinidazole showed a different conformation stabilised by a  $lp\cdots\pi$  interaction between the oxygen of the sulfone and the aromatic ring, being polarised by the added proton (Fig. 29b) [51]. The chloro anion does not show a clear interaction with the imidazole ring, as would be expected for a positively charged ligand and an anion, this highlights the importance of this type of interactions, over an electrostatic one. Furthermore, these interactions are still prevalent in the coordination compounds and will be discussed with more detail in section 3.2. Tinidazole depicts a couple of moderate H bonds in its crystal structure. These contacts occur between the oxygen of the sulfone and a  $-\text{CH}_2-$  of a neighbouring molecule and another one between the hydrogen of the imidazole ring and the nitro group of a different tinidazole molecule [51] (Fig. 29c).

On the other hand, secnidazole and ornidazole show a chiral carbon (C11) in their respective chemical structures, Fig. 30. Two stereoisomers are expected for each of these compounds. The reported structure of ornidazole does show both *R* and *S* configurations of this molecule in the single crystal (Fig. 30a). These two stereoisomers interact with each other through the OH of the secondary alcohol and the nitrogen in the imidazolic ring at 1.805 Å with an angle of 174.11°. Moreover, the water molecule, which is present in the structure, is involved in a series of hydrogen bonds acting as a donor towards the imidazolic nitrogen and OH group, and as an acceptor from the secondary alcohol (Fig. 30a) [52]. For secnidazole, only the *R* configuration is observed by X-ray diffraction (Fig. 30b) [53]. Theoretical calculations for secnidazole have been carried out in order to assess the stability of their isomers. Functional density calculations have shown that, although three different

conformations are possible (two stereoisomers and a conformational isomer), only one of them is obtainable at room temperature [54]. Additionally, secnidazole presented two H bonds between the hydroxyl group and the water molecules at 2.227 Å and 2.878 Å (Fig. 30b) and  $\pi\cdots\pi$  stacking (3.608 Å), (Fig. 30c).

### 3.1. Mechanism of action

Despite the structural differences in these compounds, they all share the same mechanism of action, where the nitro group is biologically reduced and, upon interacting with DNA, generates oxidative damage and cell death (*vide infra*). Regardless, they have unique structural features when analysing their X-ray structures.

The broad spectrum activity against susceptible pathogens of nitroimidazoles is initialised by passive diffusion into the organism, where the inactive nitroimidazole compound (*prodrug*) is reduced *via* its nitro group to cytotoxic metabolites. This leads to DNA helix damage, disruption of bacterial protein synthesis and replication, and ultimately, causing cell death [47,55,56]. In Fig. 31, metronidazole is used to exemplify their mechanism of action, where the two reduction pathways *via* nitroreductases (NTR) are depicted. These enzymes belong to a family of FMN- or FAD-dependent enzymes capable of metabolising nitroaromatic compounds, which utilise NADH or NADPH as a reductive co-factor. The mechanism of action is subdivided into two classes: **Type I** (oxygen-insensitive), where the nitroreductase performs a two electron reduction and **Type II** (oxygen-sensitive) *via* one-electron reduction [48].

For **Type I**, a sequential two-electron reduction of the nitro group gives place first to a nitroso intermediate followed by the production of hydroxylamine, both intermediates may react with biomolecules to exert toxic and mutagenic effects. A further two-electron reduction of the hydroxylamine may produce an amine, or alternatively in an acid-catalysed reaction, a reactive nitrenium ion can be generated [48].

In the **Type II** mechanism, under aerobic conditions, a process known as the “futile cycle” has been proposed, where a one-electron reduction of the nitro group gives place to a nitro radical anion that,

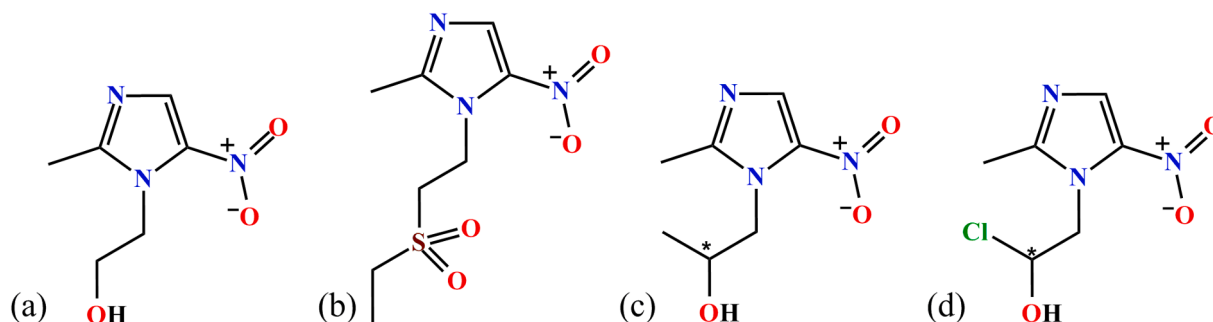


Fig. 27. Chemical structures of (a) metronidazole (b) tinidazole, (c) secnidazole and (d) ornidazole.

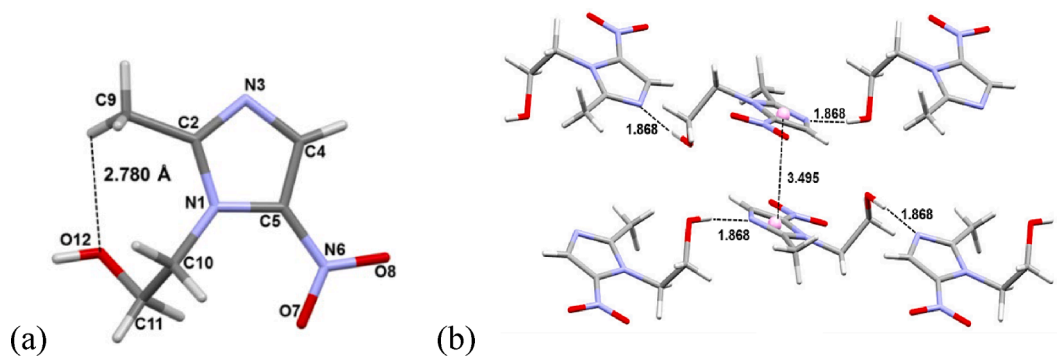


Fig. 28. (a) Intramolecular hydrogen bond of metronidazole and (b) intermolecular interactions.

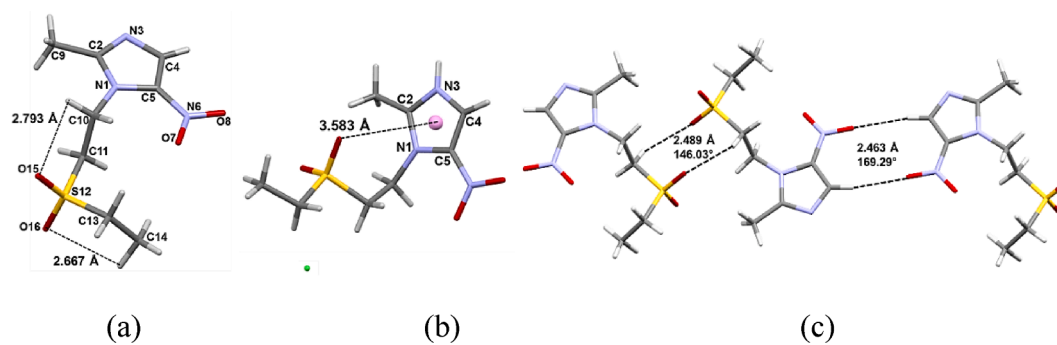


Fig. 29. Molecular structures of (a) tinidazole and (b) protonated tinidazole, (c) hydrogen bonds.

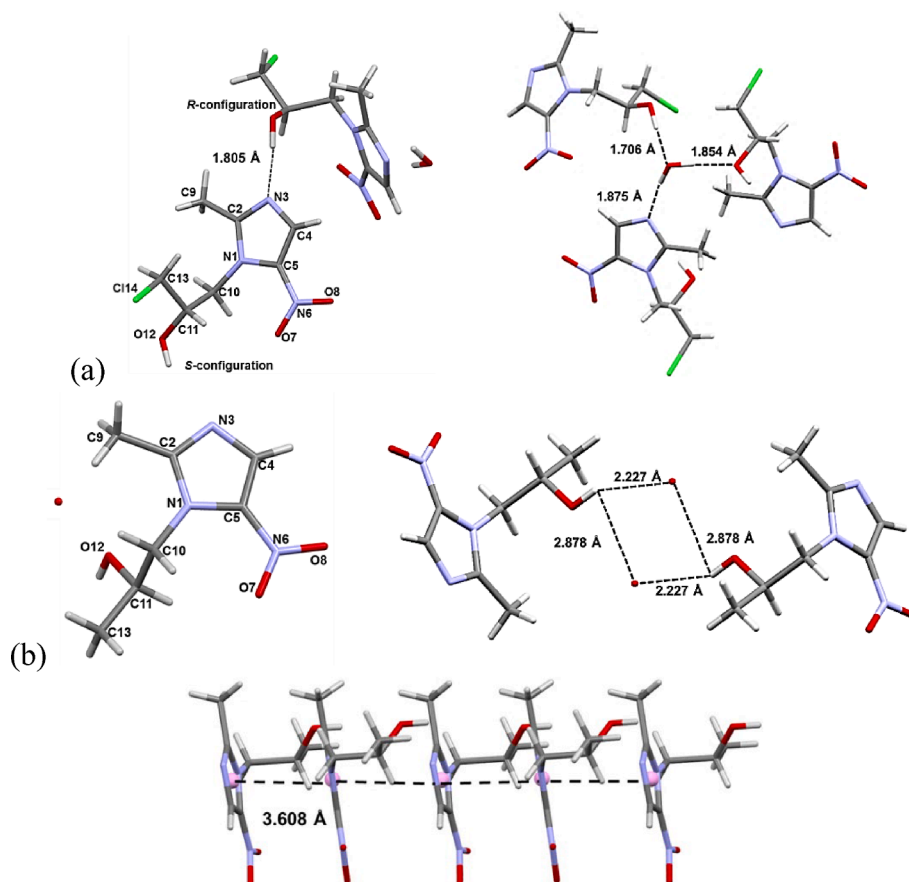


Fig. 30. Molecular structures and hydrogen bonds for (a) R and S configurations of ornidazole, (b) R configuration of secnidazole (c)  $\pi$ – $\pi$  stacking.

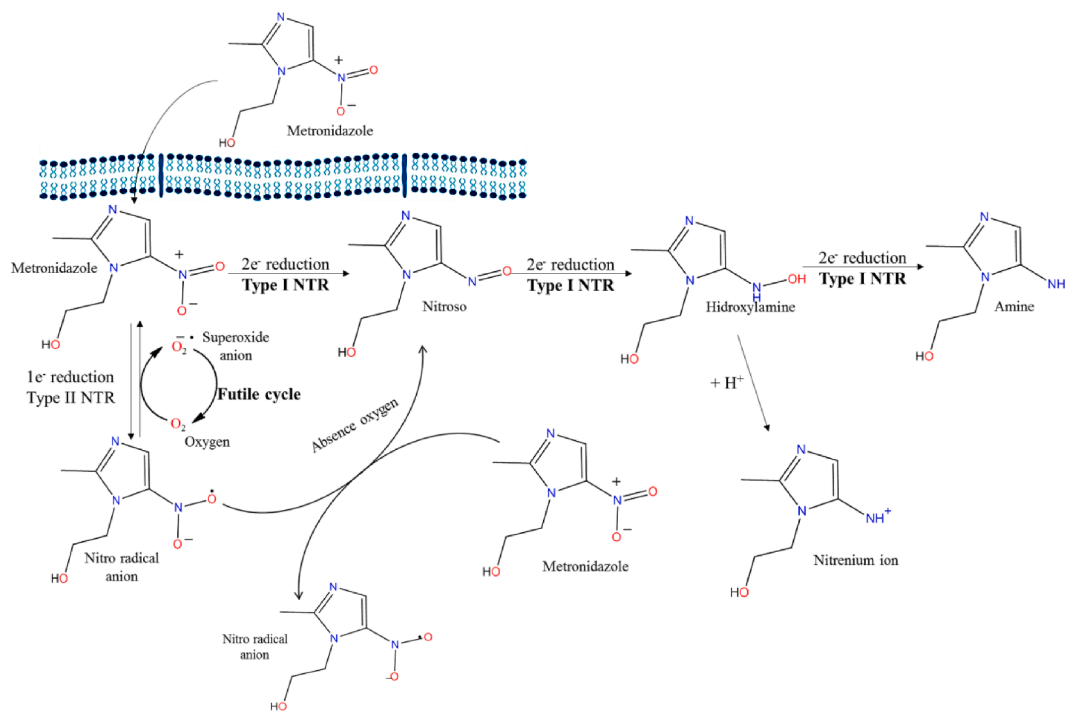


Fig. 31. Mechanism of action of nitroimidazoles.

under the presence of molecular oxygen, is re-oxidised to a nitro group with the formation of a reactive superoxide anion, being this process responsible for the toxic effects. On the other hand, in the absence of oxygen a disproportionation reaction takes place, the nitro radical ion forms a nitroso intermediate or it may go back to the nitro derivative (Fig. 31). It has been proposed that this process may produce nitroso compounds in biological systems, ultimately causing the aforementioned damage [47–48,56].

### 3.2. Nitroimidazole coordination compounds

#### 3.2.1. Metronidazole

In this section, metronidazole coordination compounds will be discussed accordingly to their coordination numbers and geometries.

The research group of A. Kalinowska-Lis, synthesised a series of

silver(I) coordination compounds [Ag(mtz)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)], [Ag(mtz)<sub>2</sub>(ClO<sub>4</sub>)], [Ag(mtz)<sub>2</sub>(CF<sub>3</sub>COO)], [Ag(mtz)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)] and [Ag(mtz)<sub>2</sub>](BF<sub>4</sub>) (Fig. 32). Their molecular structure from X-ray diffraction studies revealed a similar T-shaped distorted geometry for [Ag(mtz)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)], [Ag(mtz)<sub>2</sub>(ClO<sub>4</sub>)], [Ag(mtz)<sub>2</sub>(CF<sub>3</sub>COO)] and [Ag(mtz)<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)]. Two metronidazole molecules and an oxygen atom from the corresponding anion are bound to the silver(I). The covalent Ag-O14 bond is in the range of 2.4795(18) – 2.6697(16) Å, CF<sub>3</sub>COO < SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> < NO<sub>3</sub> ≈ ClO<sub>4</sub>, while the Ag-N3 bond lengths are rather similar (ca. 2.14 Å), with N3-Ag1-N3 angles in the range of 162.73° – 171.82°, for all compounds. Both coordinated ligands present similar orientation of the nitro and methyl groups, while the hydroxyethyl groups are oriented in opposite directions [57].

On the other hand, there are significant weak interactions, as *lp*⋯ $\pi$  and  $\pi$ ⋯ $\pi$  stacking, that give place to different supramolecular

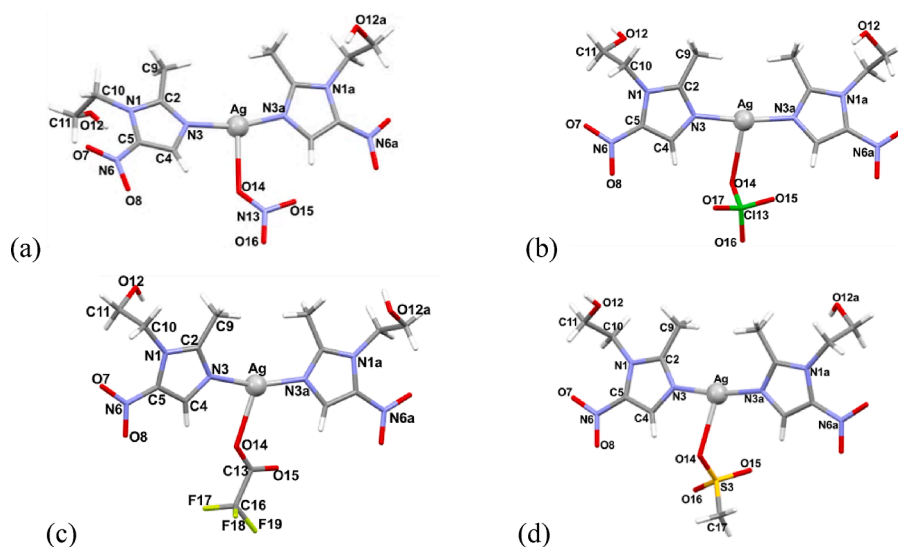


Fig. 32. Molecular structure of (a) [Ag(mtz)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)], (b) [Ag(mtz)<sub>2</sub>(ClO<sub>4</sub>)], (c) [Ag(mtz)<sub>2</sub>(CF<sub>3</sub>COO)] and (d) [Ag(mtz)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)].

aggregates. The  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{NO}_3)]$  compound exhibits a  $lp \cdots \pi$  interaction between the nitrate O15 and the imidazole ring at 3.136 Å, 91.96°, Fig. 33a. While the  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{ClO}_4)]$  and  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{SO}_3\text{CH}_3)]$  compounds show  $\pi \cdots \pi$  stacking interactions at 3.743(1) Å and 3.516(1) Å, respectively, Fig. 33b. All four compounds present a hydrogen bonding interaction between the alcohol group and the corresponding anions, O12-H12a $\cdots$ O15, in the range of 1.995–2.125 Å, Fig. 33c.

Finally, in the tetrafluoroborate compound  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2](\text{BF}_4)$ , the silver(I) atom stabilised a pseudocentrosymmetric linear geometry, with an angle N3–Ag–N3a of 174.86(6)°, where the nitro, methyl and alcohol groups from the metronidazole ligands are in opposite directions, Fig. 34a. Intermolecular  $\pi \cdots \pi$  stacking between two neighbouring imidazole rings (3.663(1) Å), gives place to dimeric arrangements, where Ag $\cdots$ Ag interactions (3.23 Å) are favoured. On the other hand, it was observed that the oxygens of the nitro group participate in  $lp \cdots \pi$  interactions with imidazole rings (2.886 Å, 85.26°), or with the silver ions O $\cdots$ Ag (3.16–3.23 Å), Fig. 34b.

The antimicrobial activity against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus hauseri* and yeast *Candida albicans* was determined for all silver(I) compounds [57]. In general, the coordination compounds presented better activity than the respective silver(I) salts and the free ligand. The compound  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{SO}_3\text{CH}_3)]$  was the most active against *C. albicans* with a minimum fungicidal concentration (MFC) of 37  $\mu\text{M}$ , as well as for *S. epidermidis* and *S. aureus* strain with minimum bactericidal concentration (MBC) of 37 and 55  $\mu\text{M}$ , respectively. The  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{NO}_3)]$ , and  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{CF}_3\text{COO})]$  compounds were activity towards *P. aeruginosa* of 17 and 19  $\mu\text{M}$ . And for *E. coli* the MBC value for  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2](\text{BF}_4)$  and  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{SO}_3\text{CH}_3)]$  were 56 and 51  $\mu\text{M}$  [57].

Additionally,  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2(\text{NO}_3)]$  was investigated for the treatment of ocular rosacea in patients with ophthalmic complications. The results showed that the compound is an alternative to alleviate ophthalmic complications such as corneal inflammations due to rosacea [58], also it reduced of blepharospasm and helped to the postponement of corneal transplantation, avoiding the used of antibiotic therapy. No toxic effects of the therapy were detected.

In the eighties were synthesised the first metal coordination compounds with nitroimidazole to obtain new radiosensitisers. A *cis*-square planar geometry for the platinum compounds  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{I}_2]$  and  $[\text{Pt}(\text{mtz})(\text{NH}_3)\text{Cl}_2]$  was determined, while

$[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  stabilised a *trans*-square-planar geometry [59–62]. The molecular structures of *cis*- $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  and *trans*- $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  compounds were determined by X-ray crystallography, Fig. 35, [60,61]. Both compounds present the platinum atom in a square planar geometry with two metronidazole molecules coordinated by N3 and two chloro atoms. The alcohol group participates in hydrogen bonding with neighbouring molecules. Intermolecular lone pair $\cdots\pi$  interactions, from the chloro atom or an oxygen from the nitro group to imidazole ring in the range of 3.077 to 3.610 Å, were observed, as depicted on Fig. 35.

For the *cis*- $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  compound its biological activity as radiosensitiser was studied. It was found that the platinum compound enhanced the radiation response of hypoxic cells due to drug pre-treatment (70  $\mu\text{M}$ ), increasing X-irradiation damage, which was higher than *cis*-platin and metronidazole, with lower toxicity (90  $\mu\text{M}$ ) in Chinese hamster ovary (CHO) cells [59].

R. K. Upmacis et al. reported a copper(II) compound, *trans*- $[\text{Cu}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{MeOH}$ , in a square planar geometry, with two metronidazole and two chloro atoms coordinated in *trans* position, Fig. 36a [63]. Interesting, the oxygen atom of a neighbouring alcohol group is interacting in apical position with the metal centre, Cu $\cdots$ O12 (2.800(2) Å), as shown in Fig. 36b.

N. Barba-Behrens and coworkers obtained a series of tetrahedral cobalt(II) and zinc(II) coordination compounds with metronidazole, as shown by X-ray diffraction studies [50]. The cobalt(II) coordination compounds,  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Br}_2]$  (Fig. 37) present two metronidazole molecules coordinated through the N3 atom and two chloro or bromo atoms in the coordination sphere. These compounds crystallize in the space group  $P_{mmm}$  and  $P_{2/m}$ , respectively. In the  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  compound the ligands show similar orientations, related by a plane of symmetry passing through the cobalt and chloro atoms. On the other hand, in its bromo analogue,  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Br}_2]$ , the ligands are oriented in opposite directions, as well as in the zinc(II) compounds,  $[\text{Zn}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{mtz})_2\text{Br}_2]$  [50].

The difference on the orientation of the ligands generated different supramolecular arrangements. In  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$ , a lone pair $\cdots\pi$  intermolecular interaction was observed between the coordinated chloro atom and the two imidazole rings a neighbouring molecule, 3.154 Å. Additionally, weak hydrogen bonding between the alcohol and nitro groups were observed. Both interactions form a butterfly supramolecular arrangement (Fig. 38a). For  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Br}_2]$ , there were stabilised zig-zag chains, through moderate hydrogen bonds between hydroxyl groups

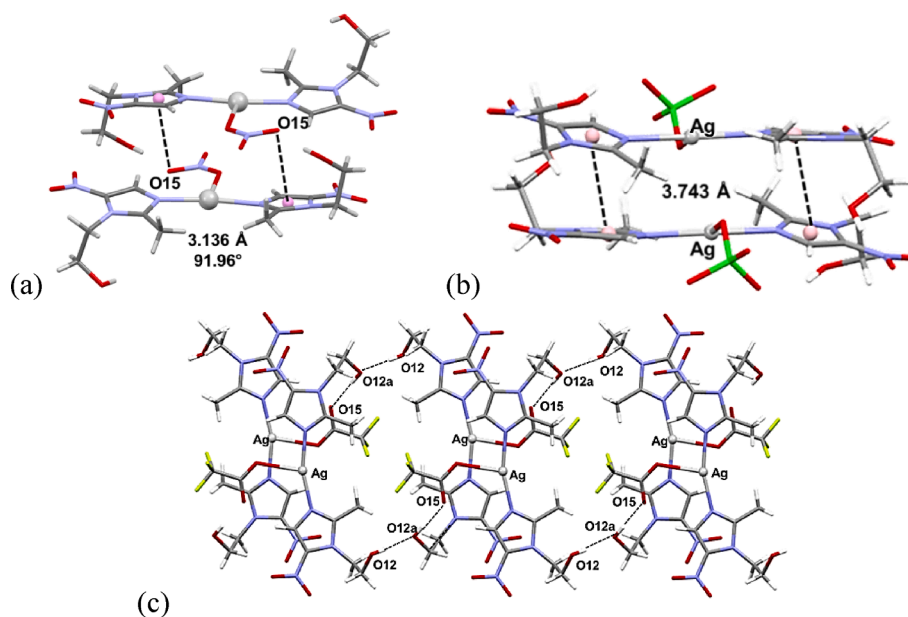


Fig. 33. (a)  $lp \cdots \pi$  interaction for  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2\text{NO}_3]$ , (b)  $\pi \cdots \pi$  staking for  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2\text{ClO}_4]$  and (c) hydrogen bonding for  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2\text{CF}_3\text{COO}]$ .

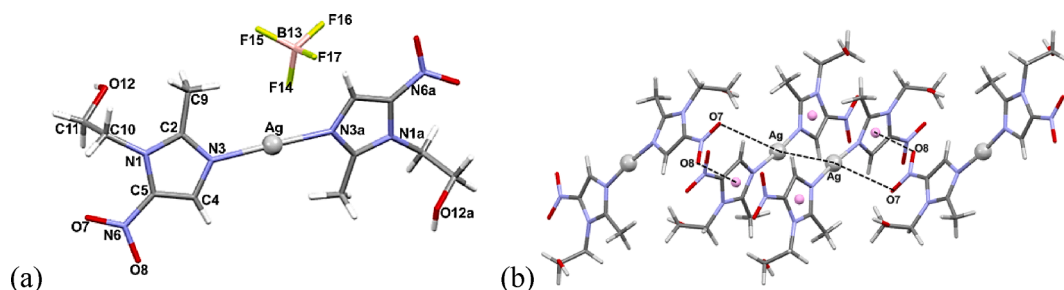


Fig. 34. (a) Molecular structure and (b) interactions of  $[\text{Ag}(\text{mtz})_2](\text{BF}_4)$ .

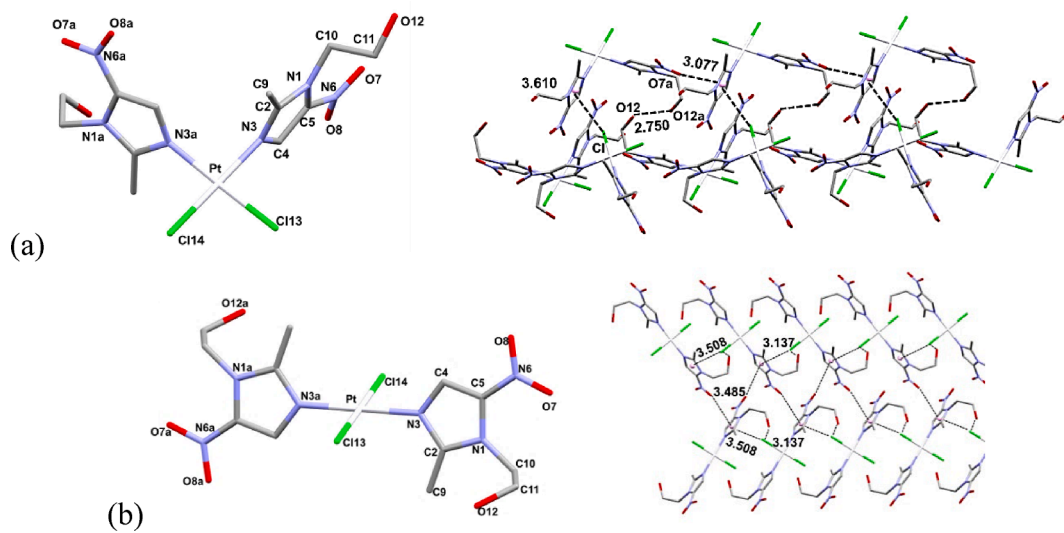


Fig. 35. Molecular structure and intermolecular lone pair... $\pi$  interactions of (a) *cis*- and (b) *trans*- $[\text{Pt}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$ .

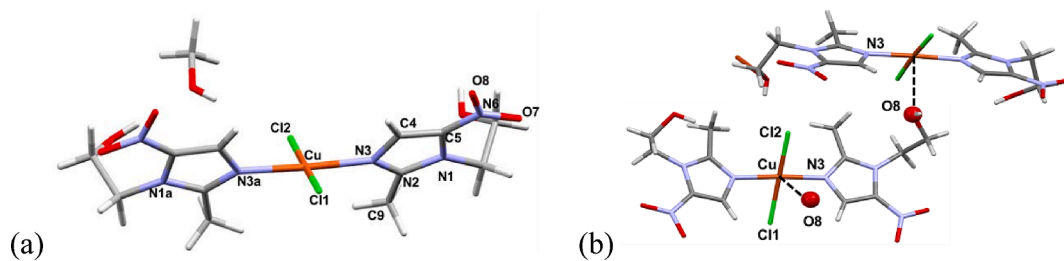


Fig. 36. (a) Molecular structure and (b) interactions of  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]\cdot\text{MeOH}$ .

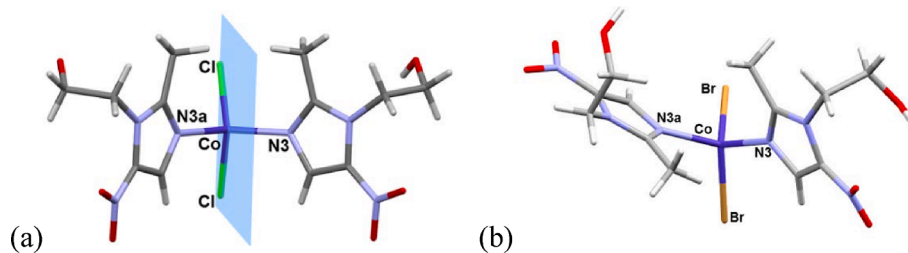


Fig. 37. X-ray structure of the cobalt compounds (a)  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Cl}_2]$  and (b)  $[\text{Co}(\text{mtz})_2\text{Br}_2]$ .

$\text{O12}\cdots\text{H12}\cdots\text{O12a}$  (1.917 Å,  $146.20^\circ$ ), and  $\text{O12}\cdots\text{H12}\cdots\text{Br}$  (2.781 Å,  $126.01^\circ$ ), Fig. 38b. The zinc(II) compounds present the same arrangement.

Pentacoordinated geometries were stabilised on dinuclear coordination compounds. A square base pyramidal geometry was found on

several coordination compounds with bridging acetates. The molecular structure of  $[\text{Cu}(\text{mtz})(\mu\text{-OAc})_2]_2$ ,  $[\text{Cu}(\text{mtz})(\mu\text{-pta})_2]$  (p-methylbenzoate, pta)  $[\text{Rh}(\text{mtz})(\mu\text{-OAc})_2]_2$  and  $[\text{Rh}(\text{mtz})(\mu\text{-OPhBut})_2]_2$  (4-phenylbutanate, OPhBut) compounds, was analysed [50,64,65]. For all compounds the copper(II) and the rhodium(II) presents a square-base



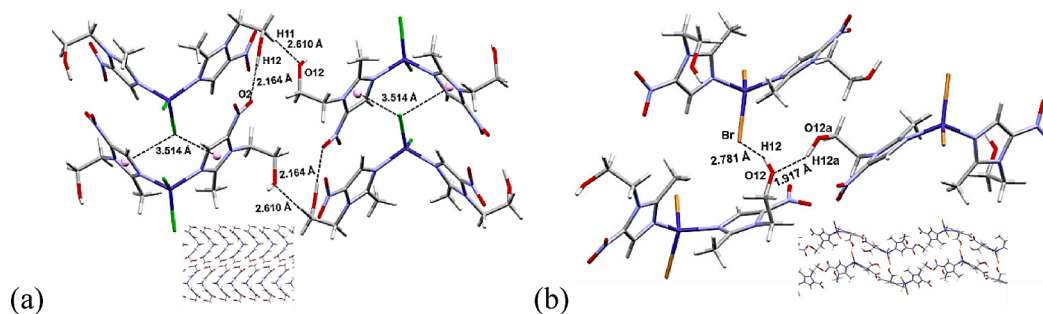


Fig. 38. Intermolecular interactions and arrangement of (a) [Co(mtz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and (b) [Co(mtz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>].

pyramid geometry with four bridging acetate molecules and a metronidazole ligand in the axial position, Fig. 39.

The copper(II) dinuclear compounds are centrosymmetric, with Cu...Cu distances of 2.648(2) Å for [Cu(mtz)(μ-OAc)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> and 2.677(1) Å for [Cu(mtz)(μ-pta)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>. These short distances gave place to magnetic couplings, as observed from magnetic susceptibility studies at variable temperature, where  $\chi_{MT}$  vs T showed that  $\chi_{MT}$  decreases on cooling and at room temperature presented a value of 0.56 cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>, characteristic of a strong antiferromagnetic coupling [50]. Additionally, EPR studies showed g values,  $g_x = 2.059(2)$ ,  $g_y = 2.076(2)$ ,  $g_z = 2.377(1)$ , and a hyperfine structure with seven signals indicating a Cu...Cu interaction [64]. The supramolecular arrangement for [Cu(mtz)(μ-OAc)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> is formed by intermolecular hydrogen bonding between one oxygen of the acetate and an alcohol group (O12-H12...O14, 2.098 Å, 139.44°) and other oxygen and a methylene group (C10-H10...O15 2.553 Å, 156.22°). While, for the [Cu(mtz)(μ-pta)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> shows H...π interactions from the alcohol (O12-H12...π 2.417 Å, 171.51°) and π...π staking (3.895 Å) between two phenyl groups of the pta, Fig. 39d [50]. D. A. Tocher et. al. reported similar crystal structures for the dinuclear compounds [Rh(mtz)(μ-OAc)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> and [Rh(mtz)(μ-OPhBut)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (4-phenylbutanate,

OPhBut) [65].

On the other hand, copper(II) dinuclear complexes were obtained with one bridging and one terminal trichloroacetic acid (tca) [Cu(mtz)<sub>2</sub>(μ-tca)(tca)]<sub>2</sub> or 4-nitrobenzoate (nba) [Cu(mtz)<sub>2</sub>(μ-4-nba)(4-nba)]<sub>2</sub>, and two metronidazole ligands in the coordination sphere of a copper(II) in a square-based pyramid geometry, as shown in Fig. 40 [66–68].

In the [Cu(mtz)<sub>2</sub>(μ-tca)(tca)]<sub>2</sub> compound there were observed intermolecular interactions, a *lp*...π between a chloro atom from a terminal trichloroacetate and a neighbouring imidazole ring (Cl2...π, 3.350 (3) Å), as well as a hydrogen bonding between the alcohol and the terminal acetate (O12-H12...O15, 1.929 Å) Fig. 41a [66]. For [Cu(mtz)<sub>2</sub>(μ-4-nba)(4-nba)]<sub>2</sub> it was observed a similar hydrogen bonding (O12-H12...O15 2.012 Å) and in addition, the alcohol group interacts with a nitro group (O12-H12...O10 2.172 Å), Fig. 41b, [67]. Their electronic properties were studied by EPR. The solid state spectrum of [Cu(mtz)<sub>2</sub>(μ-4-nba)(4-nba)]<sub>2</sub> presented a hyperfine quartet ( $g = 2.125$ ), corresponding to electron spin interactions with the Cu(II) nuclear spin ( $I = 3/2$ ) [69]. While, the simulated spectrum of [Cu(mtz)<sub>2</sub>(μ-tca)(tca)]<sub>2</sub> indicated an interaction of the copper(II) atoms through the carboxylate

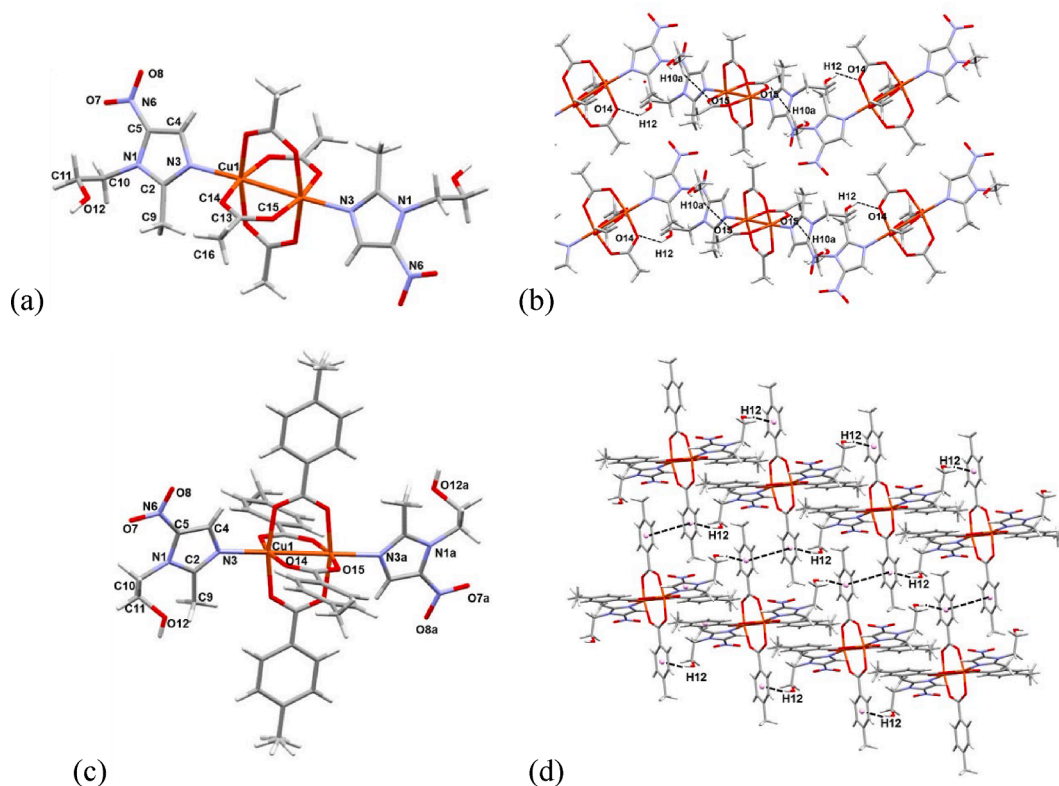


Fig. 39. Molecular structure intermolecular interactions of (a) [Cu(mtz)(μ-OAc)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> and (b) [Cu(mtz)(μ-pta)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>.

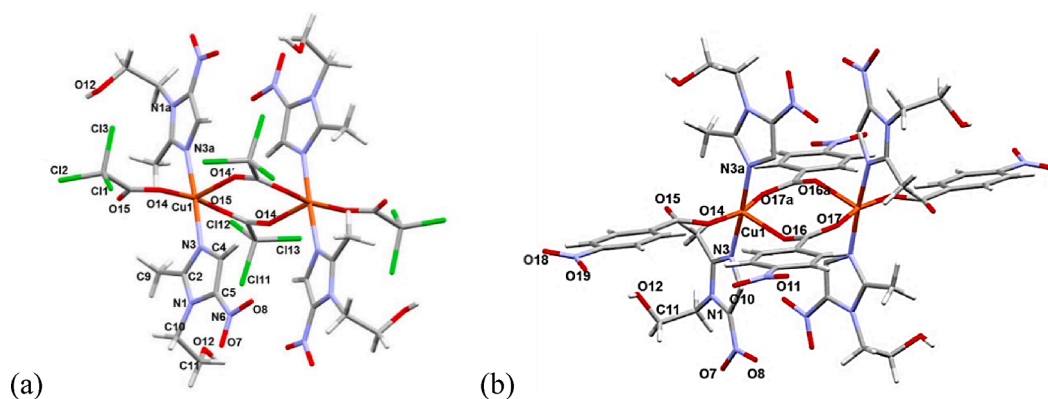


Fig. 40. Structure of the coordination compound (a)  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-tca})(\text{tca})]_2$  and (b)  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-4-nba})(4\text{-nba})]_2$ .

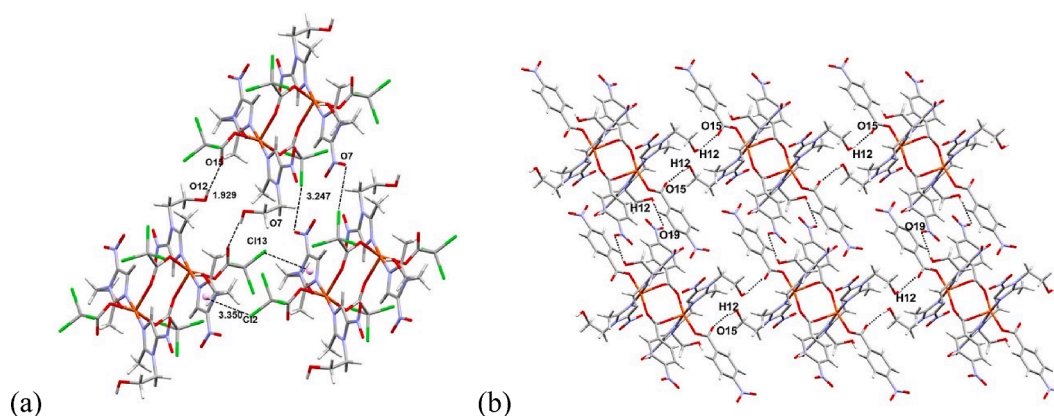


Fig. 41. Intermolecular interactions in the compounds (a)  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-tca})(\text{tca})]_2$  (b)  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-4-nba})(4\text{-nba})]_2$ .

bridges [66].

The  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-tca})(\text{tca})]_2$  compound showed better antifungal (*Candida albicans*) and antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*, than the free metronidazole [66].

Additionally, a similar geometry was found for compound  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{H}_2\text{O})]_2\text{Cl}_2$  with two bridging chloro atoms, two ligands and a water molecule coordinated to the copper(II) atoms, and in the second coordination sphere two chloride atoms, Fig. 42a [50]. The chloride anion interacts via strong hydrogen bonding with the alcohol groups ( $\text{O12-H12}\cdots\text{Cl2}$  2.27 Å, 168.88°) and the water molecules ( $\text{O13-H}\cdots\text{Cl2}$  2.15 Å, 171.88°), as depicted in Fig. 42b. Its magnetic properties were investigated and the  $\chi_{\text{MT}}$  vs T showed an antiferromagnetic coupling, with a value of  $\chi_{\text{MT}} = 0.83 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  at RT [50].

A trigonal bipyramidal geometry for the dinuclear copper(II) compounds was stabilised for the  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{Cl})]_2$  compound, which is centrosymmetric, where each copper(II) atom is coordinated to two ligands in apical positions, two bridging chloro atoms and a terminal chloro atom. In this molecule, the ligands are parallel to each other giving place to  $\pi\cdots\pi$  stacking intramolecular interactions, Fig. 43a [68]. Additionally, this compound showed intermolecular hydrogen bonding with two neighboring molecules between the hydrogen of the metronidazole alcohol group and a terminal chloro atom ( $\text{O12-H}\cdots\text{Cl2}$  2.519 Å, 167°) and between alcohol groups ( $\text{O12B-H}\cdots\text{O3}$  1.980 Å, 170.56°), Fig. 43b.

S. van Vuuren and S. Ogunlaj studied the antimicrobial activity of both compounds against Gram-negative, Gram-positive and yeast organisms (*Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*).  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-}$

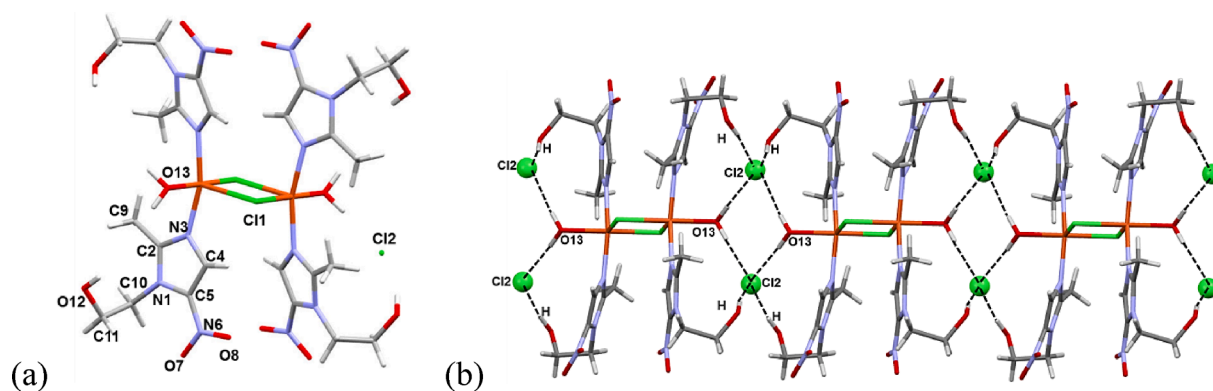


Fig. 42. (a) Molecular structure and (b) hydrogen bonding of  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{H}_2\text{O})]_2\text{Cl}_2$ .

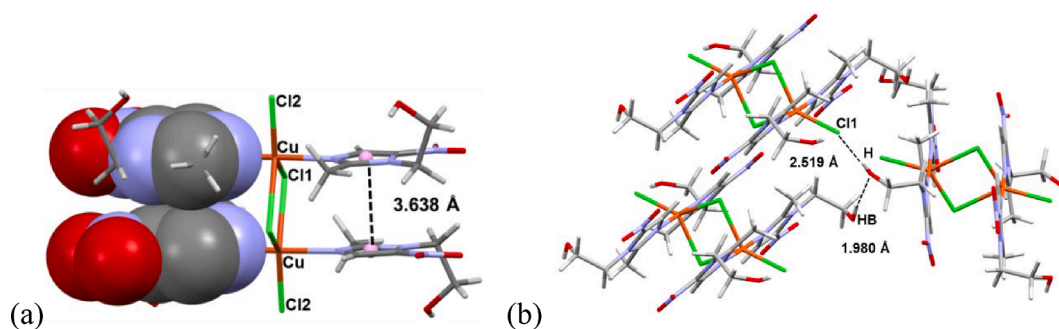


Fig. 43. (a) Intramolecular and (b) intermolecular interactions in  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{Cl})]_2$ .

$\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}_2$  showed good activity against *K. pneumoniae* (MIC 31.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), while  $[\text{Cu}(\text{mtz})_2(\mu\text{-Cl})(\text{Cl})]_2$  was effective against most organism, mainly for *B. cereus* and *C. albicans* with values of (MIC 31.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [69].

Additionally, a manganese(II) compound with metronidazole and the benzoic acid derivative 2-bromobenzoic acid (2-bba) was also synthesised [67]. The crystal structure of  $[\text{Mn}(\text{mtz})_2(2\text{-bba})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  revealed a *trans*-octahedral geometry for the metal atom, with two ligands, two monodentate 2-bba and two water molecules coordinated to the metal ion, Fig. 44a. Six membered hydrophilic cavities are formed through intramolecular hydrogen bonding between oxygen atoms from the 2-bba ligand, coordinated water molecules and the metronidazole alcohol groups, Fig. 44b.

Similar coordination compounds with the 2-bromobenzoate (bba) and metronidazole  $[\text{M}(\text{mtz})_2(\text{bba})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  ( $\text{M}^{2+} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cu}, \text{Zn}, \text{Cd}$ ) were crystallised. These compounds were isostructural and centrosymmetric, with a *trans*-octahedral geometry and presented hydrophilic cavities, similar to that of the manganese compound described above [64]. These compounds did not showed better activity than the free metronidazole in antimicrobial assays.

The ruthenium(II) compound,  $[\text{Ru}(\text{mtz})_2(\text{bese})\text{Cl}_2]$  (bese = 1,2-bis(ethylsulfanyl)ethane), was synthesised as an analogue of the *cis*- and *trans*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$  compound, with good anticancer activity, adding chiral properties. The X-ray structure of the octahedral compound is shown in Fig. 45a [70]. The bese ligand is a molecule with two chiral centres in the sulfoxide groups stabilizing *S,S* or *R,R* configurations. The metronidazole alcohol groups stabilised hydrogen bonding ( $\text{O}12\text{-H}\cdots\text{O}13$ ) at 1.537 Å, 162.33° and with the sulfoxide group at 1.796 Å, 169.77°, Fig. 45b. However, this compound did not presented activity against cancer cells.

### 3.2.2. Tinidazole

Tinidazole is second generation of antiparasitic nitroimidazole derivative, with a sulfone group that contributes to new non-covalent interactions.

N. Barba-Behrens and co-workers synthesised a series of

coordination compounds with tinidazole and cobalt(II), copper(II), zinc(II) silver(I) metal atoms. Diverse geometries interactions and conformations were obtained [51,71–73].

Recently, a trigonal planar copper(I)  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}]$  compound was obtained (Fig. 46a). Two tinidazole and one bromo atom were coordinated to the metal atom, with angles  $\text{N}3\text{-Cu-N}3$  of 149.71° and  $\text{N}3\text{-Cu-Br}1$  105.14° [71]. The two coordinated ligands stabilised intramolecular  $lp\cdots\pi$  interactions between an oxygen from sulfone group and the imidazole ring ( $\text{S}=\text{O}\cdots\pi$  3.443 Å). Additionally, an intermolecular  $\pi$ -hole interaction, which has been described as an electropositive potential located on an unpopulated  $\pi^*$  orbital [74], was observed (Fig. 46b) [71].

Cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II)  $[\text{M}(\text{tnz})_2\text{X}_2]$  ( $\text{M}(\text{II}) = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cu}, \text{Zn}; \text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ ) gave place to tetrahedral compounds, with two tinidazole molecules and two halide atoms coordinated to the metal atom. Their X-ray structures revealed different conformations for the tinidazole due to intramolecular  $lp\cdots\pi$  interactions and hydrogen bonding [51,72]. For the copper(II) compounds,  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ , there were isolated two different conformers, first a kinetic compound (green) and after twelve hours a thermodynamic compound (yellow) was obtained [51]. The difference between these compounds is the orientation of one of the coordinated tinidazole ligands. In the kinetic conformer both ligands present an extended conformation, Fig. 47a, while in the thermodynamic one, a bifurcated intramolecular  $lp\cdots\pi$  interaction between an oxygen from the sulfone group and the imidazole rings ( $\text{S}=\text{O}\cdots\pi$ , 3.450 Å), favoured by the coordination of the metal ion to  $\text{N}3$ , Fig. 47b. The intramolecular hydrogen bonding between a hydrogen atom from the methylene and an oxygen of the sulfone group, observed in the free ligand is conserve in both compounds. For the  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  compound an extended conformation, similar to the kinetic product  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ , was obtained [72].

Due to the extended conformation for the kinetic compound, intermolecular  $lp\cdots\pi$  interactions between the chloro atoms and neighboring imidazole rings ( $\text{Cl}\cdots\pi$ , 3.660 Å), were stabilised. On the other hand, the sulfone group forms  $\text{S}=\text{O}\cdots\pi$  interactions with the unsaturated imidazole  $\text{C}2\text{-N}1$  bond ( $\text{C}2\cdots\text{O}$  2.94 Å;  $\text{N}1\cdots\text{O}$  3.07 Å). This group also

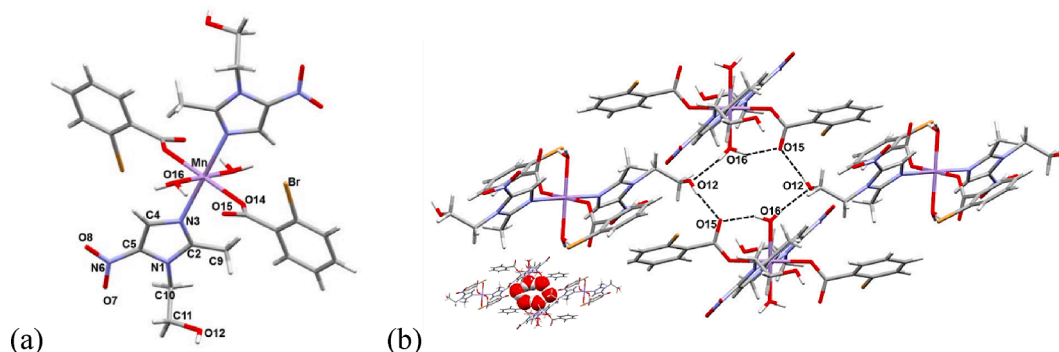


Fig. 44. (a) Molecular structure and (b) six membered hydrophilic cavities in  $[\text{Mn}(\text{mtz})_2(2\text{-bba})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ .



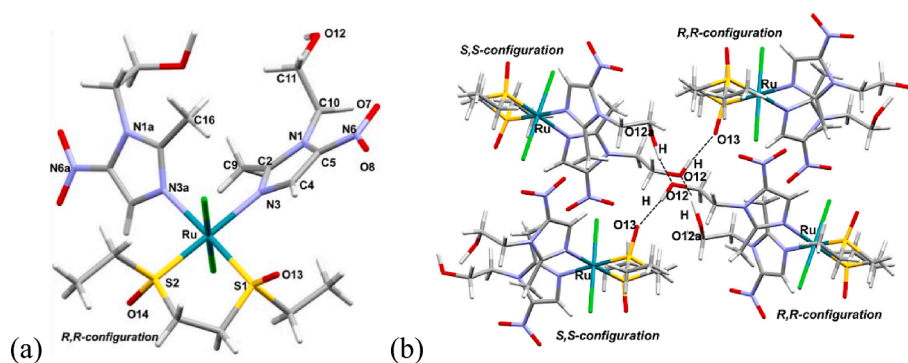


Fig. 45. (a) Structure and (b) intermolecular interactions of  $[\text{Ru}(\text{mtz})_2(\text{bese})\text{Cl}_2]$ .

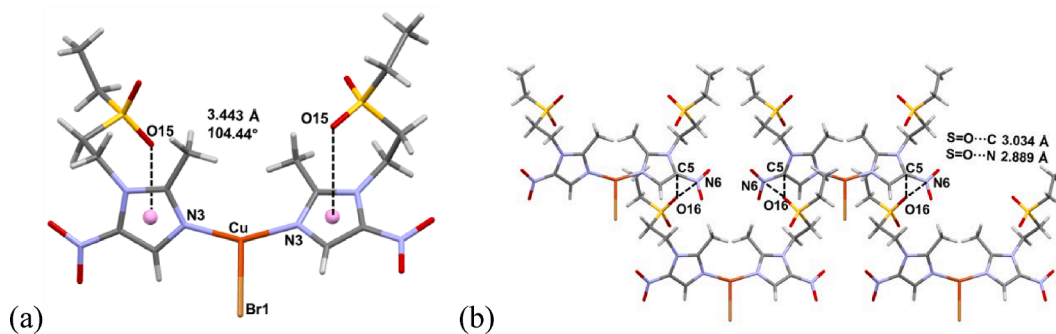


Fig. 46. (a) Molecular structure,  $lp \cdots \pi$  interactions and (b) lone pair  $\cdots \pi$ -hole interactions for  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}]$ .

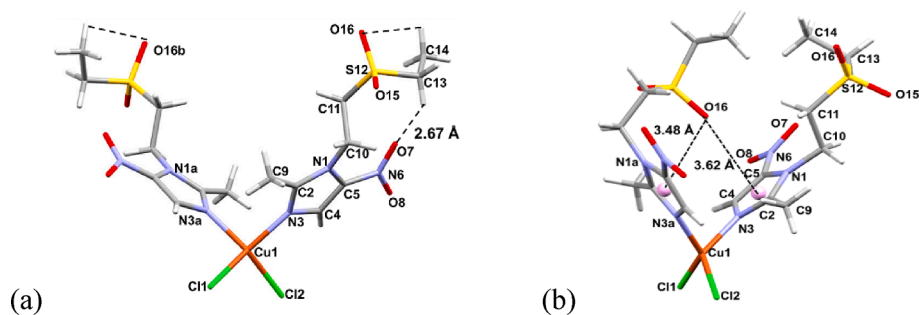


Fig. 47. Molecular structure of (a) kinetic and (b) thermodynamic  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ .

interacts via hydrogen bonding with nearby methylene hydrogens, forming a pleated sheet arrangement as shown in Fig. 48a. For the thermodynamic compound the chloro atoms interact with the imidazole ring at 3.400 Å and the nitro group at 3.280 Å forming a hexagonal assembly, Fig. 48b [51].

The X-ray diffraction revealed that the tetrahedral compounds  $[\text{Zn}$

$(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$ ,  $[\text{Co}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Co}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  are isomorphous, with one coordinated tinidazole in the same folded conformation that in the  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  thermodynamic compound [51,72]. These compounds exhibit a similar intramolecular  $lp \cdots \pi$  interaction  $\text{S}-\text{O} \cdots \pi$ , ca. 3.320–3.550 Å, and stabilised intermolecular  $\pi \cdots \pi$  staking between imidazole rings (ca. 3.303 Å) and hydrogen bonds with the coordinated

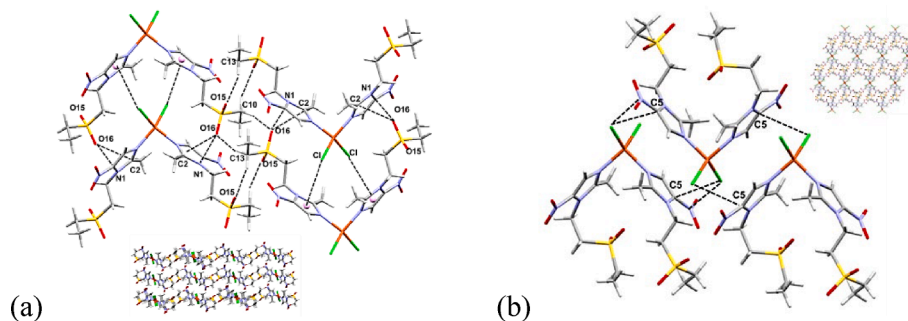


Fig. 48. Intermolecular interactions of  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  (a) kinetic and (b) thermodynamic.

halogen and a methylene hydrogen at 2.913 Å. The structure of  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  and its non-covalent interactions are shown in the Fig. 49.

Pentacoordinated dinuclear compounds were obtained with chloro and acetate bridges, similar to the metronidazole compounds previously described. A square-based pyramidal geometry for  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  was stabilised (Fig. 50a) [73], however, the metronidazole compound showed a trigonal bipyramidal geometry. The tinidazole compound exhibits intramolecular  $lp\cdots\pi$  interactions between the nitro group and an imidazole ring ( $\text{ON}\cdots\pi$ , 3.356 Å). S. Das and co-workers reported the X-ray structure of the dinuclear  $[\text{Cu}(\mu\text{-OAc})_2(\text{tnz})_2]$  compound [75], Fig. 50b, similar to its metronidazole analogue. The structure stabilised hydrogen bonding between the methylene hydrogens and the nitro group ( $\text{C6-H6A}\cdots\text{O1}$ , 2.58 Å;  $\text{C7-H7}\cdots\text{O2}$  2.40 Å) or sulphone group at 2.70 Å.

From the nitrate metal salts there were obtained cobalt(II), copper (II) and zinc(II) octahedral compounds,  $[\text{M}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$  ( $\text{M(II)} = \text{Co}, \text{Cu}, \text{Zn}$ ). Two tinidazole and two bidentate nitrate molecules are coordinated to the metal atom. However, different isomers were observed, for the cobalt(II) and zinc(II) compounds a *cis* isomer was stabilised, while for copper(II) a *trans* arrangement was found, Fig. 51 [73]. All compounds present an extended conformation for the tnz ligands.

For the *cis* and *trans* compounds, intermolecular  $lp\cdots\pi$  interactions between the oxygen atoms of the coordinated nitrates with the imidazole rings ( $\text{O}_2\text{N}\cdots\pi$ ) were observed, Fig. 52. Additionally, the *trans* compound presents a  $lp\cdots\pi$  interaction from the sulfone group and an imidazole ring ( $\text{S-O}\cdots\pi$ , 3.191 Å), Fig. 52b.

The antiparasitic and anticancer activity of the tetrahedral coordination compounds with tinidazole was investigated. Fish parasitic diseases have become a serious problem in aquaculture and has prompted the development of new antiparasitic agents. Tinidazole has been used as antiprotozoal in human and veterinary medicine [76]. It has been found that transition metal coordination compounds with a therapeutic compound may modify its biological activity, showing a different activity than the original compound. The *in vitro* antihelmintic activity of the parasite *dactylogyrid monogeneans*, isolated from the gills of infested spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*), was studied. The parasites were treated with tnz and its tetrahedral coordination compounds,  $[\text{M}(\text{tnz})_2\text{X}_2]$  ( $\text{M(II)} = \text{Co}, \text{Cu}, \text{Zn}; \text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ ). The most active compounds, after five hours of exposure, were the  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  which showed 100% and 80% of helminthic mortality, respectively. These compounds were selected for *in vivo* studies, based on their activity and stability in solution. The absorption and distribution evaluation for both compounds, after oral administration to the fish, showed that bioaccumulation of the compounds was mainly in the liver, much higher than in blood serum and gills. However, no toxicity was observed in the fish. Additionally, *in vivo* bath studies gave very good results for  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  (25 mg/mL, 95% helminthic mortality, 8 h), while the free tnz ligand showed no activity [72].

On the other hand, the cytotoxic activity of the tetrahedral copper(II) ( $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{X}_2]$   $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{NO}$ ) compounds and the dinuclear  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  was investigated. Cell viability assays were performed in A549

(lung adenocarcinoma), A375 (melanoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), SKOV3 (ovary adenocarcinoma) and SW620 (colorectal adenocarcinoma) cancer cell lines.  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  (MCF-7,  $\text{IC}_{50}$  9.2  $\mu\text{M}$ ) presented the highest cytotoxicity, followed by  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  (MCF-7,  $\text{IC}_{50}$  28.9  $\mu\text{M}$ ), and with lower toxicity in healthy cells (MCF-10A,  $\text{IC}_{50}$  18.0  $\mu\text{M}$  and 32.86  $\mu\text{M}$ ) [73]. The free tnz was not cytotoxic.

In order to explore plausible mechanisms of action of these compounds, their ability to interact with DNA was evaluated. UV-Vis and fluorescence spectroscopy experiments, as well as gel electrophoresis were performed. These copper(II) compounds showed two distinct interactions with DNA, via electrostatic and groove-binding [73]. Additionally, cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) experiments were realised for the free ligand and the complexes. The tinidazole exhibits a reversible  $\text{E}_{1/2}$  potential of  $-1.32$  V due to the reversible generation of the anionic nitro radical in acetonitrile, which remains constant in the coordination compounds, and for the copper ion  $\text{E}_{1/2}$   $\text{Cu}^{\text{II/I}}$  and  $\text{Cu}^{\text{I/0}}$  were observed,  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  (0.36 V,  $-0.77$  V),  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  ( $-0.13$  V,  $-0.39$  V) [73]. Recently, theoretical studies of the DNA recognition process for the  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  compound, with Molecular Dynamics and the Quantum Theory of Atoms in Molecules, showed that the coordination of one or two phosphates to the metal atom is the first DNA recognition site, due to partial intercalation of the copper(II) compound in the minor groove. These results are in agreement with the experimental findings, as well as with the reduction of copper(II) to copper(I), from the tetrahedral  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$  to the trigonal planar  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}]$ , a Fenton-like reaction favours the generation of the nitro radical anion causing an oxidative DNA damage [71].

The antibacterial activity for  $[\text{Cu}(\mu\text{-OAc})_2(\text{tnz})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  against *Staphylococcus aureus* (gram-positive) and *Escherichia coli* (gram-negative) compounds was tested (MIC of 10.13 and 12.5  $\mu\text{M}$ , respectively). As well as against *Entamoeba histolytica* ( $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ , 12.5  $\mu\text{M}$ ) and *Candida albicans* ( $[\text{Cu}(\mu\text{-OAc})_2(\text{tnz})_2]$ , 10.13  $\mu\text{M}$ ) [75,77].

### 3.2.3. Secnidazole and ornidazole

Secnidazole (snz) is a second generation of 5-nitroimidazole, an analogue of metronidazole. The structural properties and the biological activity of coordination compounds with this ligand have been studied. Spectroscopic characterization of the halide and nitrate compounds showed a tetrahedral geometry for the metal atom,  $[\text{Cu}(\text{snz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{snz})_2\text{Br}_2]$  and  $[\text{Co}(\text{snz})_2\text{Br}_2]$ , coordinated to two secnidazole molecules and two halide atoms. While, for the nitrate complexes,  $[\text{M}(\text{snz})_3(\text{NO}_3)]$   $\text{NO}_3$  ( $\text{M(II)} = \text{Cu}, \text{Ni}, \text{Zn}$ ), three secnidazole ligands and a monodentate nitrate molecule were coordinated to the metal, and one ionic nitrate outside of the coordination sphere. On the other hand, an octahedral geometry was observed for  $[\text{M}(\text{snz})_3\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]$  ( $\text{M(II)} = \text{Co}, \text{and Zn}$ ) and  $[\text{Co}(\text{snz})_3(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})\text{NO}_3]$ , with three ligands, a water molecule and two chloro atoms or a bidentate nitrate in their coordination sphere. The nickel(II) compound,  $[\text{Ni}(\text{snz})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ , presents a similar geometry but with two ligands, two chloro atoms and two water molecules in the coordination sphere. The proposed structures are depicted on Fig. 53 [78].

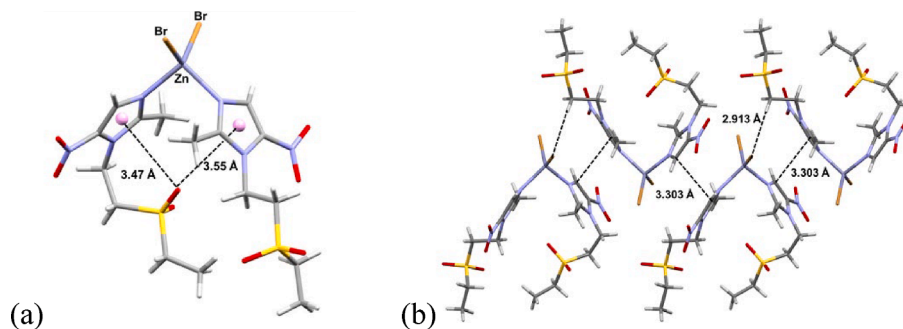


Fig. 49. Molecular structure, (a) intra and (b) intermolecular interactions for  $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$ .

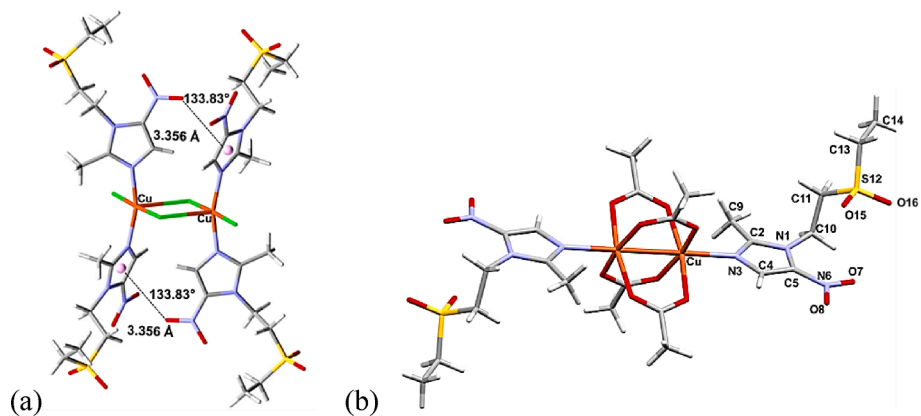


Fig. 50. (a) Molecular structure, (a)  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$  and (b)  $[\text{Cu}(\mu\text{-OAc})_2(\text{tnz})_2]$ .

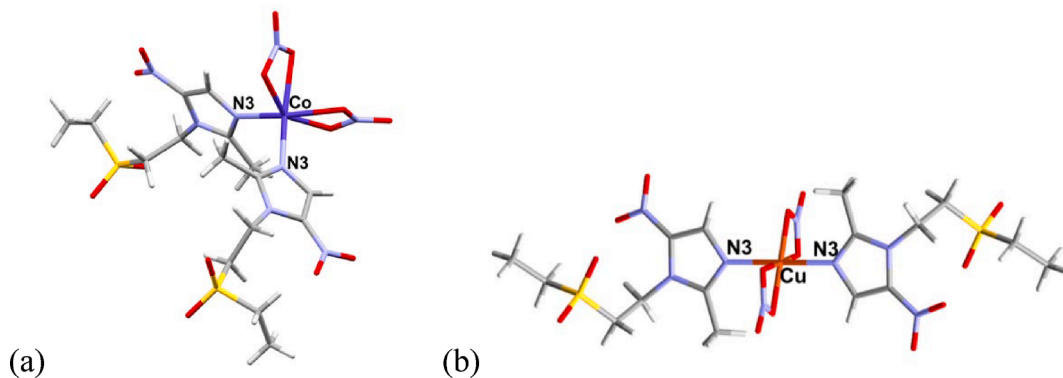


Fig. 51. Molecular structures of (a) *cis*- $[\text{Co}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$  and (b) *trans*- $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$ .

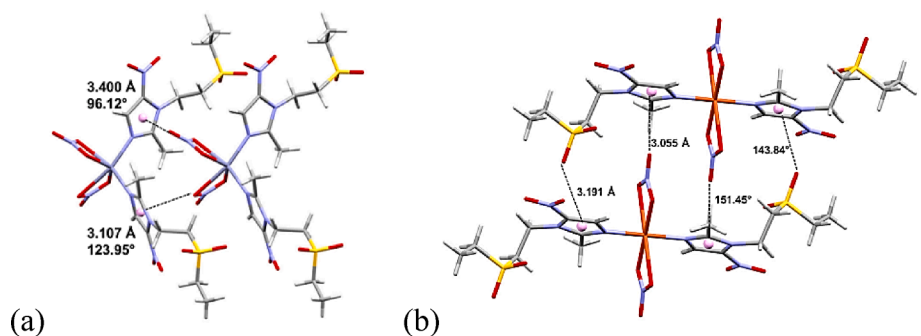


Fig. 52. Lone pair... $\pi$  interactions for (a) the *cis*- $[\text{Zn}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$  and (b) *trans*- $[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{NO}_3)_2]$ .

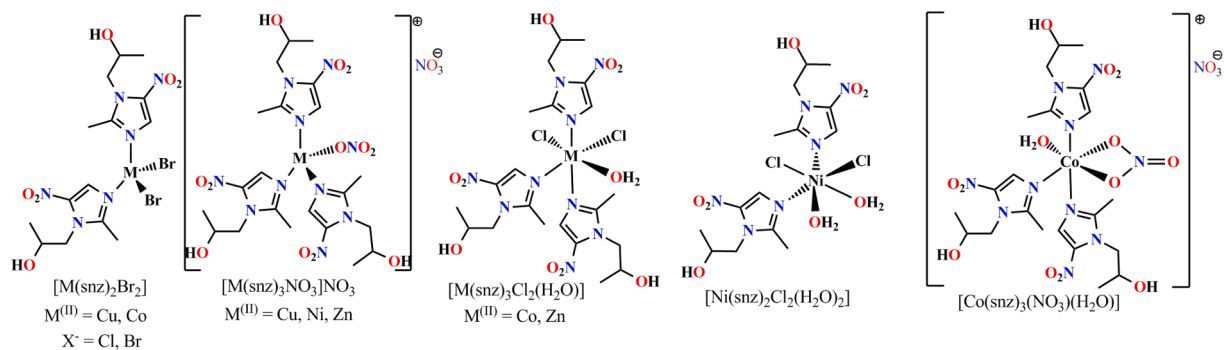


Fig. 53. Proposed structures of secnidazole coordination compounds.

Additionally, a dinuclear copper(II) compound was obtained. The X-ray crystal structure of  $[\text{Cu}(\text{snz})(\mu\text{-OAc})_2]_2$  consist of two copper(II) centres in a square-based pyramidal geometry, bridged by four acetate ligands, with one secnidazole in the apical position, Fig. 54 [78]. Intermolecular hydrogen bonds, between the methylene groups and the imidazolic nitro group, were stabilised (C10–H10...O8 (2.46 Å, 162°); C14–H14...O7 (2.47 Å, 167°)), Fig. 54b.

The coordination compounds were tested against the HeLa human cervix-uterine, PC3 human prostate, and HCT-15 human colon carcinoma cell lines, as well as their antimicrobial activity against *S. aureus*, *M. luteus*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Unfortunately, they did not show any biological activity [78].

S. A. Al-Aghbari and co-workers, further investigated the *in vitro* anticancer activity of the octahedral zirconium(IV) compound,  $[\text{Zr}(\text{snz})_2(\text{NO}_3)_4]$ , and the *trans*-square planar platinum(II)  $[\text{Pt}(\text{snz})_2\text{Cl}_2]$ . These compounds exhibited a moderate cytotoxic activity, for HeLa and PC3 cancer cell lines [79].

S. Das et al. reported the synthesis of coordination compounds with ornidazole, a third generation 5-nitroimidazole derivative. The X-ray studies of  $[\text{Cu}(\text{onz})(\mu\text{-OAc})_2]_2$  compound shows a similar structure to the described 5-nitroimidazole dinuclear acetate analogues, Fig. 55 [80]. A tetrahedral geometry was proposed for  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  compounds [81,82]. The antiparasitic studies showed that the  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  compound was more active against *Entamoeba histolytica* (MIC = 6.25 μM), higher than the free ornidazole (MIC = 12.5 μM) [81]. Additionally, the radiosensitiser properties of  $[\text{Zn}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{onz})_2\text{Cl}_2]$  were determined, being the copper(II) compound the most active, due to the presence of the nitro group, which generates the radical anion  $\text{RNO}_2^\bullet$  [83].

#### 4. Evaluation of non-covalent interactions using Quantum Chemical Topology

So far, our analysis of non-covalent interactions has relied exclusively in geometrical parameters, such as angles and distances between interacting species. Nevertheless, a deeper understanding of the nature of these interactions requires a more rigorous theoretical basis. Quantum Chemical Topology (QCT) has become a distinguished approach for evaluating the presence and strength of intermolecular interactions, both from theoretical and experimental molecules [84] QCT extracts chemical information from quantum chemical calculations or high-resolution X-ray diffraction experiments, by applying the formal language of dynamical systems to some scalar or vectorial fields, such as the electron density and its derivatives, the electrostatic potential, or the electron localization function [85]. Thus, we reanalysed the presence of non-covalent interactions in some selected systems (*vide supra*) using three of the most important methods of QCT; the Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM) [86], the Non-Covalent Interaction Index (NCI) [87], and the electrostatic potential. In QTAIM the existence of covalent and non-covalent interactions is confirmed by the presence of a bond critical point (BCP), and its associated bond path (BP), which corresponds to a saddle point of the electron density,  $\rho(\mathbf{r})$ . The value of  $\rho(\mathbf{r})$  at the BCP is a relative indicative of the interaction strength in most cases, while the value of the Laplacian at the same point can distinguish

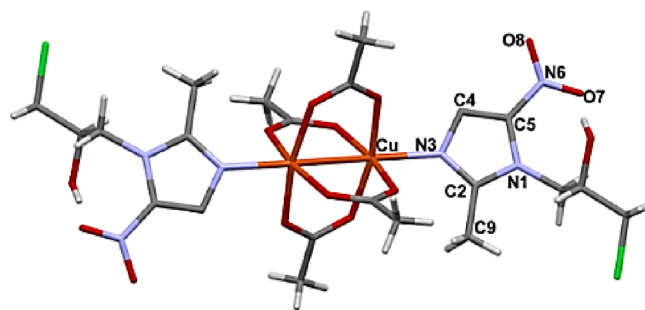


Fig. 55. Molecular structure for  $[\text{Cu}(\text{onz})(\mu\text{-OAc})_2]_2$ .

between covalent (negative) and non-covalent (positive) bonding. Previously, QTAIM has been successfully employed to study the supramolecular chemistry of other biologically active azole molecules. [88–95]. With the NCI method, localised and delocalised interactions, as well as steric effects, can be easily visualised with isosurfaces of the reduced density gradient, which is a dimensionless function that measures the deviation of  $\rho(\mathbf{r})$  with respect to the uniform electron gas. Localised interactions, such as hydrogen or halogen bonds, appear as small thick disks between the interacting atoms, as those observed in Fig. 57. On the other hand, delocalised interactions, like  $\pi$  stacking, emerge as flat extended sheets. The strength of the interactions is characterised by a colour code that is based on  $\text{sign}(\lambda_2)$ , the sign of the second eigenvalue of the electron density Hessian matrix.  $\text{Sign}(\lambda_2)$  is chosen because it reflects the charge accumulation (attraction) or depletion (repulsion) in the plane perpendicular to an interaction region. Blue, green, and red zones of the NCI isosurfaces represent strong attractive, weak, and repulsive interactions, respectively. Also, a quantitative analysis can be performed by integrating  $\rho(\mathbf{r})$  in the NCI isosurfaces [96]. It has been shown that these integral values correlate with interaction energies computed with classical and quantum mechanical calculations. Finally, the electrostatic potential (ESP) map is able to locate regions where a molecule can act as electrophile (positive) or as a nucleophile (negative).

As a starting point a simple molecule (nitromethane) was examined to highlight the versatility of the nitro group ( $-\text{NO}_2$ ) to form diverse types of intermolecular interactions due to its ability to behave as both electron donor and acceptor. In Fig. 56a, the ESP map of nitromethane is shown, depicting a positive (blue) region over the nitrogen atom which corresponds to the  $\pi$  hole, the electrophilic site of this system. For instance, for small nitro  $\pi$  hole complexes, the interaction energy (attributed mainly to the lone pair... $\pi$  hole contacts) has been calculate at about  $-5$  kcal/mol [97] which is comparable to that of hydrogen bonds in proteins [98]. Furthermore, it has been observed from Symmetry Adapted Perturbation Theory calculations of  $-\text{NO}_2$ ...C=C complexes [99] that electrostatic and dispersive effects have an important contribution to the stability of these systems, being the later the larger component of the total interaction energy [100]. The same conclusion was reached in the analysis of stacking interactions between nitroarene compounds with aromatic side chains of the binding sites of some representative proteins that have shown response to nitroaromatic ligands [101].

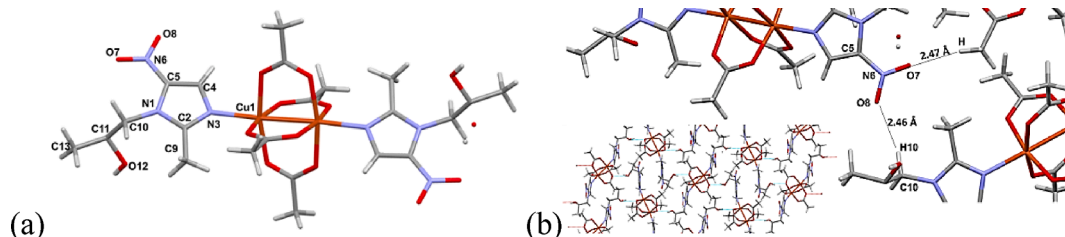


Fig. 54. (a) Molecular structure and (b) hydrogen bonding of  $[\text{Cu}(\text{snz})(\mu\text{-OAc})_2]_2$ .



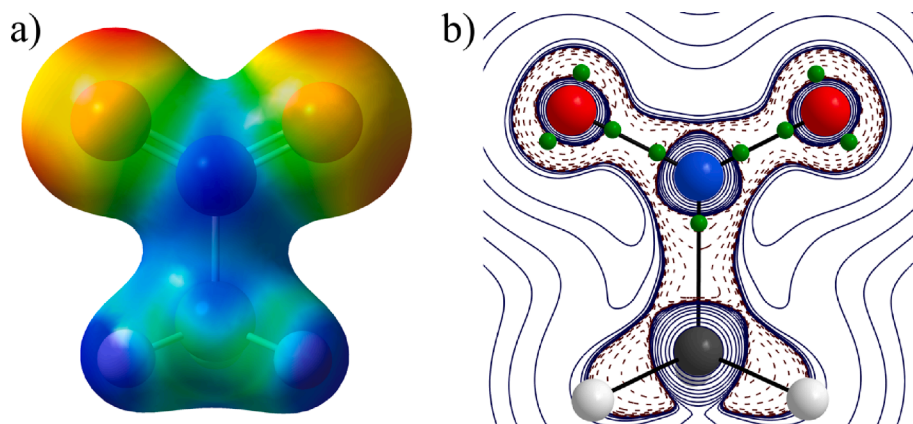


Fig. 56. A) electrostatic potential of nitromethane projected on a  $\rho(r) = 0.1$  a.u. isosurface (red:  $-0.01$  a.u., blue:  $0.5$  a.u.), and b) contour of the Laplacian of  $\rho(r)$  nitromethane. Minima of the Laplacian of  $\rho(r)$ , representing bonded and non-bonded electron pairs, are shown as green dots.

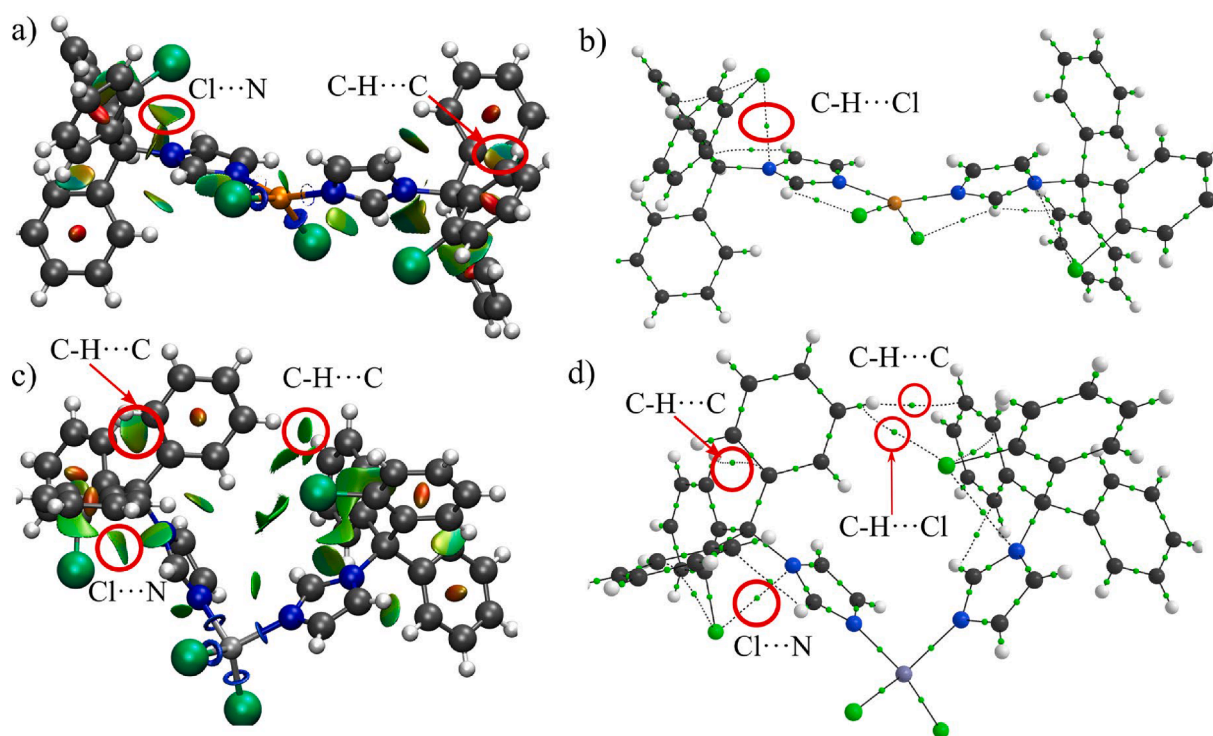


Fig. 57. A) NCI isosurface and b) bond critical points (green dots) of  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ . The same, c) and d), for  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ . The most relevant intramolecular non-covalent interactions are indicated and circled in red.

Additionally, there are two highly negative (red) regions in the ESP of nitromethane in each oxygen atom, which can be associated with the lone pairs predicted for the  $\text{sp}^2$  hybridization. This is corroborated in Fig. 56b, where a contour of the Laplacian of the electron density in the plane of the  $\text{NO}_2$  group is shown. The minima of this function around the nitro group, which are related to charge accumulation, are depicted as green dots. These indicate the location of bonded and non-bonded electrons. There are also two minima around each oxygen, which agree with the negative zones of the ESP. These correspond to the nucleophilic sites of the  $\text{NO}_2$  group. The ability to act as both, electrophile and nucleophile simultaneously provides the  $\text{NO}_2$  group of nitroimidazoles with great flexibility to form different types of intermolecular interactions.

Similarly, we applied these QCT methods to selected coordination compounds with azole and nitroimidazole ligands that have shown interesting biological activity. Herein, we explore the different

stabilizing interactions between zinc and copper complexes with clo-trimazole and tinidazole.

#### 4.1. Intra and intermolecular interactions in copper and zinc complexes

The NCI isosurfaces (Fig. 57a-d) of the  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  complexes with the NCIPLOT4 software [96] and the promolecular approach, using the geometries determined from the X-ray diffraction experiments (Fig. 13) [34] were computed. In contrast to the geometrical analysis, no evidence of a  $\text{lp}\cdots\pi$ -hole interaction between the Cl and the imidazole ring was found in either  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  or  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ . Instead, an intermolecular  $\text{Cl}\cdots\text{N}$  contact is observed in both systems. This was corroborated by the presence of a BCP between these two atoms, which was found from calculations performed at B3LYP/ZORA-def2-TZVP level of theory (Fig. 57b and 57d). This and the rest of the quantum chemical calculations were performed with the same

level of theory using the quantum chemistry package Orca (version 5.0.3) [102]. Furthermore, in  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  a C-H...C interaction between two rings of the same clotrimazole ligand was identified with NCI, although a corresponding BCP was not found. No interaction between the two clotrimazole ligands appears in this system. In comparison, for  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  an additional C-H...C contact and a C-H...Cl hydrogen bond emerge between the two different clotrimazole ligands was found. This is a consequence of the zinc complex having a more regular tetrahedral geometry. The NCI integrals for the strong/weak interactions of the  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  monomers are 29.28/5.17 and 29.15/4.85, respectively, indicating that this contacts (C-H...C, Cl...N and C...N) contribute almost 6 times more to the stability of these complexes than van der Waals forces. The value of  $\rho(r)$  in the BCP of these interactions is around 0.01 a.u., meaning that all contribute approximately the same. On the other hand, the strong interaction NCI integral is negligible for the NCI isosurfaces corresponding to the second coordination sphere of both complexes, which implies that the intermolecular interactions that stabilize the crystal have mainly a dispersive (van der Waals) origin. This indicates that intramolecular non-covalent interactions have a strong influence in the geometric arrangement of the  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$  crystals.

On the other hand, the  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  compound is an illustrative example of the importance that intramolecular non-covalent interactions can play in the conformation of a molecule and its crystal packing. A change in the molecular conformation, and thus of some of the intramolecular non-covalent interactions, causes a variation not only in the crystal packing also in a very notorious macroscopic property such as the crystal's colour, and in their biological properties [51]. In Fig. 58, the NCI isosurfaces and set of BCPs and BPs of the kinetic and thermodynamic conformers of  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ , taken from the crystalline structures, are shown. For the kinetic conformer (Fig. 57a and 57b), it can be seen from the QTAIM analysis that the nitro group forms C-H...O hydrogen bonds with the ethyl groups of the sulfone chain, thus stabilizing each tinidazole molecule. These are also observed in the NCI isosurface, where an additional region of van der Waals interactions between these two functional groups ( $\text{NO}_2$  and the sulfone chain) is also contributing to the conformer stability. However, no BCP is observed

between the two coordinated tinidazole ligands. In the NCI isosurface, only a small flat green surface between the two tinidazole molecules can be observed, indicating that they only interact by weak van der Waals forces. In comparison, in the thermodynamic conformer, the sulfone chain of one tinidazole molecule is twisted and pointing to the other ligand. By doing this, a lp... $\pi$  interaction between the oxygen of the sulfone and the imidazole ring of opposite tinidazole molecule is formed. This is observed as a green curved surface between the O atom and the imidazole ring in the NCI isosurface (Fig. 58c), and as a critical point between the corresponding O and N atoms (Fig. 58d). Additionally, the  $\text{NO}_2$  intramolecular hydrogen bonds are conserved, while new C-H...O contacts between the sulfone of the twisted chain with the ethyl groups of both tinidazole molecules appear. These strong interactions are thought to be largely responsible of the stability of the thermodynamic conformer. Additional stabilization comes from the intermolecular interactions, previously discussed (Fig. 48).

Fig. 59 depicts the NCI isosurface of the  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  complex in the crystalline environment, where van der Waals interactions predominate (green flat surfaces). However, some specific interactions that tend to be directional, can be identified. Such as, the  $\pi$ - $\pi$  interaction between two imidazole rings, which are in a displaced parallel conformation. Furthermore, the dual role of the nitro group as an electrophile and nucleophile can also be observed. On the one hand, it forms C-H...O hydrogen bonds with the ethyl groups of the neighbouring molecules. On the other hand, it forms a Cl... $\pi$ -hole with another molecule, where this group is acting as an electron receptor, which can be seen in its ESP map (Fig. 59b). No interaction with the  $\pi$ -hole of the nitro group is found in the kinetic conformer and, therefore, this interaction must also contribute to the stability of the thermodynamic conformer.

A final remark with regards to the atomic charges is that, in the two clotrimazole and the two tinidazole- $\text{M}^{+2}$  analysed complexes, the charge of the metal (computed within the QTAIM framework) is considerably reduced. In  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Zn}(\text{ctz})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  (kinetic) and  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  (thermodynamic), the metal charge is reduced from the free  $\text{M}^{+2}$  to +1.03, +1.19, +0.98 and +1.00, respectively. These results suggest that the reduction of Cu(II) to Cu(I) can be favoured in this systems, as observed in the tinidazole complexes-DNA molecular

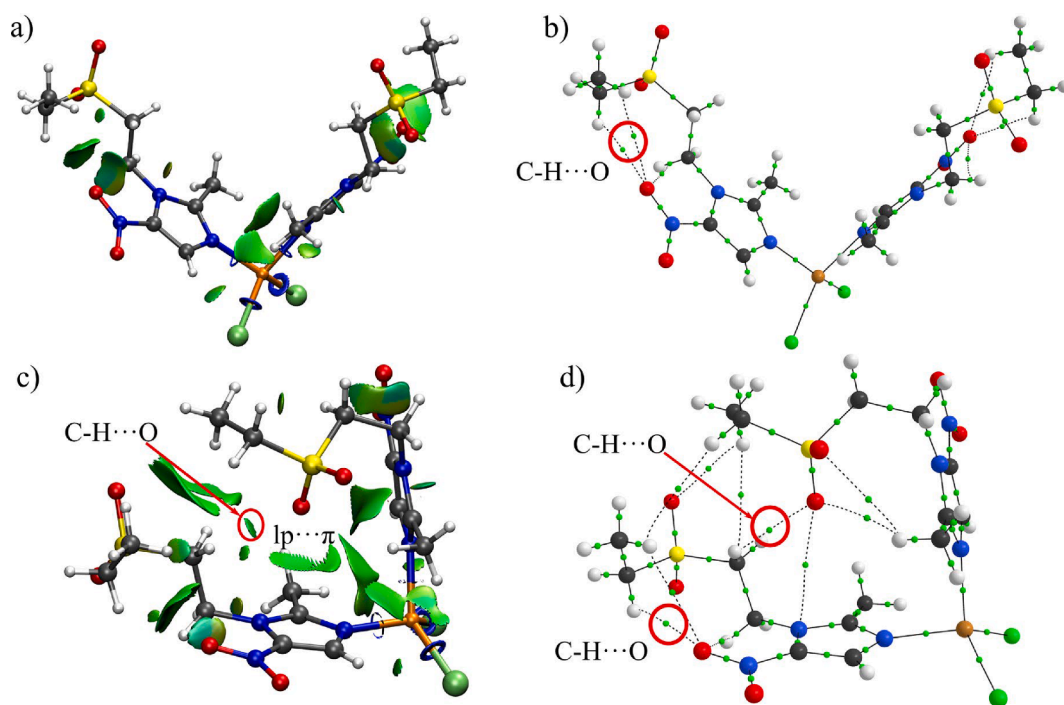


Fig. 58. A) NCI isosurface and b) bond critical points (green dots) of the kinetic conformer of  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ . The same, c) and d), for the thermodynamic conformer of  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ . The most relevant intramolecular non-covalent interactions are indicated and circled in red.

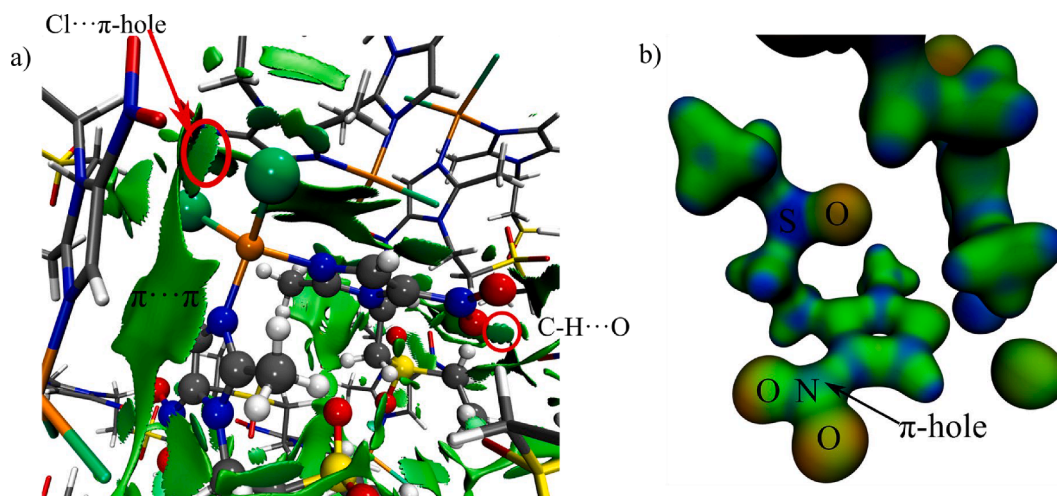


Fig. 59. A) NCI isosurface of the second sphere of the thermodynamic  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$  crystal. The most relevant intramolecular non-covalent interactions are indicated and circled in red. b) The electrostatic potential of the corresponding monomer, projected on a  $\rho(\mathbf{r}) = 0.1$  a.u. isosurface (red: 0.00 a.u., blue: 0.70 a.u.).

dynamics, which could play an important role in its biological activity [71].

Lastly, the  $\text{Cu}^{+1}$  complex with tinidazole,  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}]$ , is examined [71]. The NCI isosurface and BCPs of this system are depicted in Fig. 60. In this compound, the nitro and sulfone groups can form  $\text{C-H}\cdots\text{O}$  hydrogen bonds to stabilize it. As in the kinetic conformer of  $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$ , only a weak van der Waals interaction is found between the two tinidazole rings, which corresponds to the small flat green surface (Fig. 60a). Moreover, the  $\text{lp}\cdots\pi$  between the O atom of sulfone and the imidazole ring of the same molecule, which was discussed above (Fig. 46), is absent according to the QCT analysis. Finally, this system shows a dual electrophile/nucleophile character in the crystalline environment, contributing to the stability of this copper (I) complex.

#### 4.2. Non-covalent interactions in protein–ligand systems

In this final section, we provide a more detailed description about the non-covalent interactions that exist between CYP51 and the clotrimazole and tioconazole drugs, taking as reference the X-ray refined structures described in section 2.1. Particularly, the NCI method has shown enormous potential for a quantitative and qualitative characterization of non-covalent interactions in biological systems [103–105]. The strong/weak interaction integrals for the clotrimazole-CYP51 and tioconazole-CYP61 complexes are 1.67/8.76 and 2.43/8.16, respectively. This means that, even though van der Waals interactions are predominant, specific strong interactions have an important contribution to the stability and the accommodation of the drug inside the active site of the

protein (see Fig. 61). The specific interactions between the drug and each amino acid of CYP61, identified from the NCI isosurfaces, are listed in Table 1 for each case. It is notorious that tioconazole forms more interactions, which is in part a consequence of the presence of the thiophene group. Moreover, while in clotrimazole  $\text{C-H}\cdots\pi$  and very weak  $\text{H}\cdots\text{H}$  predominate, tioconazole shows more diverse and stronger interactions such as  $\text{C-H}\cdots\text{O}$ ,  $\text{C-H}\cdots\text{N}$  and  $\text{C-H}\cdots\text{Cl}$  hydrogen bonds, as well as a  $\text{lp}\cdots\pi$  interaction between the sulphur atom of the thiophene ring and Phe82. The strongest interaction in both systems is the  $\text{N} \rightarrow \text{Fe}$  dative bond, which is observed as blue disk in the NCI isosurface (Fig. 61). Because of abundance of specific interactions between the rests of the tioconazole group with the protein, the coordination bond is slightly weaker in this system.

#### 5. Conclusions and outlook

Due to the versatility of the azole and nitro derivatives there were obtained a variety of coordination compounds, with transition metals from the first to the third row. There were obtained different coordination numbers that stabilised diverse geometries. The mononuclear compounds showed lineal, T-shaped, trigonal planar, tetrahedral, square planar and octahedral structures, while the dinuclear compounds stabilised square planar pyramidal and trigonal bipyramidal. On the other side, the organometallic compounds presented piano-stool and octahedral geometries. Among these, several compounds have shown to be biologically active. Most of the compounds were tested for antibacterial and antifungal activity, and some of them presented antiparasitic

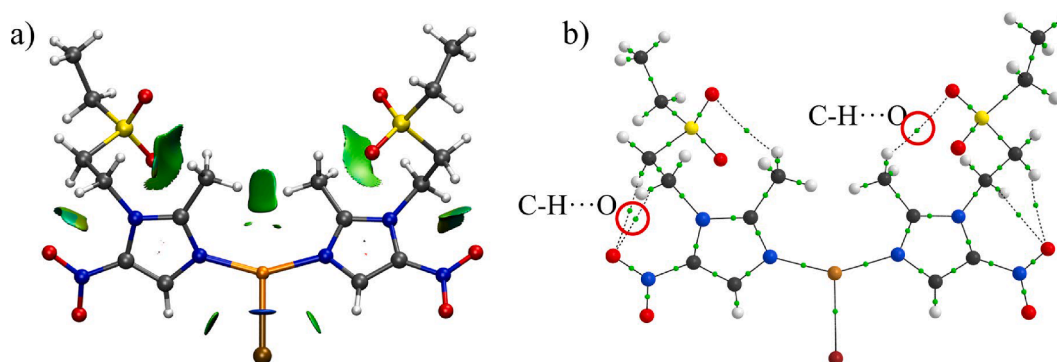
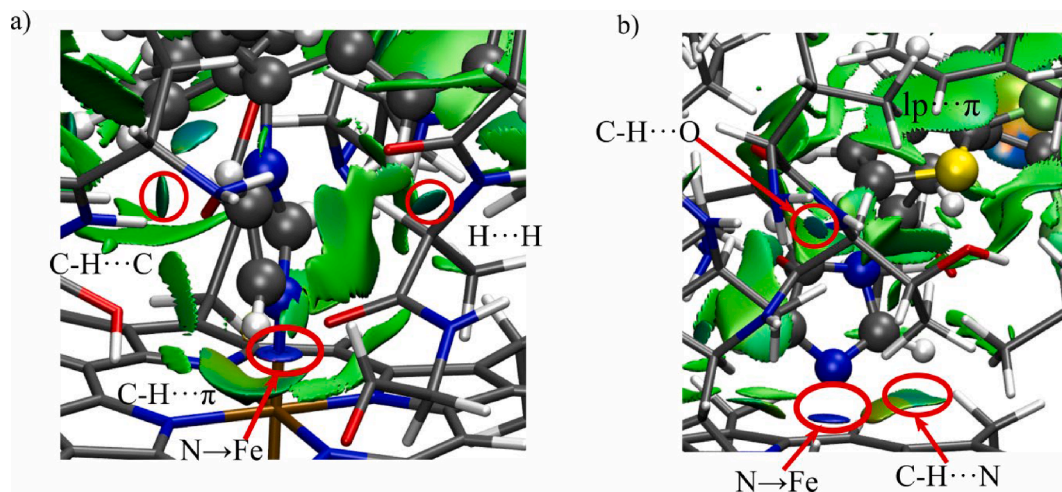


Fig. 60. A) NCI isosurface and b) bond critical points (green dots) of  $[\text{Cu}(\text{ctz})_2\text{Br}]$ . The most relevant intramolecular non-covalent interactions are indicated and circled in red.





**Fig. 61.** NCI isosurface of a) clotrimazole-CYP51 and b) tioconazole-CYP51 complexes. The most relevant intramolecular non-covalent interactions are indicated and circled in red.

**Table 1**

Specific interactions between clotrimazole and tioconazole with the amino acids of CYP51 identified from the NCI isosurfaces.

Clotrimazole/CYP51: interaction	Tioconazole/CYP51: interaction
Imidazole ring/HEM501: N → Fe	Imidazole ring/HEM502: N → Fe
Imidazole ring/HEM501: C-H... $\pi$	Imidazole ring/HEM502: C-H...N
Imidazole ring/ T268: C-H... $\pi$	Imidazole/A264: C-H...O
Chlorophenyl ring/A264: H...H	Imidazole/T268: C-H...C
Phenyl ring 1/ HEM501: C-H...C	Dichlorophenyl ring/L347: H...H
Phenyl ring 1/L75: H...H	Dichlorophenyl ring/A74: C-H...Cl
Phenyl ring 2/ L437: C-H...O	Dichlorophenyl ring/L75: C-H...C
Phenyl ring 2/ T438: H...H	Thiophene/L437: H...H
	Thiophene/T260: C-H...O
	Thiophene/V78: C-H...Cl
	Thiophene/F82: lp... $\pi$

or anticancer activity.

The coordination compounds with the azole derivatives may present different biological activity than that of the free ligand and do not follow a similar mechanism of action. These ligands gave place to different structural motifs for the transition metal compounds, which stabilised intramolecular interactions as C-H... $\pi$ , Cl... $\pi$ , as well as intermolecular  $\pi$ ... $\pi$  and Cl...Cl. These interactions may play a key role on their mechanism of action, as seen for the antiparasitic compound [Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(ctz)]PF<sub>6</sub>, which presented DNA major groove electrostatic interactions, mainly by a C-H... $\pi$  contact. Similarly, the anticancer copper(II) [Cu(ctz)<sub>3</sub>(NO<sub>3</sub>)]NO<sub>3</sub> compound, changes the DNA tertiary structure through electrostatic groove binding.

On the other hand, for the series of the nitroimidazole coordination compounds, the nitro group is still involved in the mechanism of action. Additionally, the molecular volume for these compounds is such that it can bind to the DNA minor groove. Non-covalent interactions as the lp... $\pi$ , play a relevant role in their mechanism of action, as in the case of the copper(II) [Cu(tnz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] compound, that presented very good antiparasitic and anticancer activities. This compound first interacts electrostatically with DNA minor groove, followed by bonding to oxygen atoms (phosphates) from the DNA helix. This adduct favours the reduction of Cu(II) to Cu(I), changing from a tetrahedral copper(II) to a trigonal planar copper(I) geometry. Both processes occur simultaneously causing DNA damage by generation of ROS. Additionally, the results obtained from Quantum Chemical Topology stresses the importance of completing geometrical analysis with a well-grounded theoretical approach.

Throughout this review it has been shown that coordination compounds readily interact with biomolecules, highlighting their potential

therapeutic uses. Thus, non-covalent interactions should be taken into consideration for the rational design of new compounds with potential applications in bioinorganic and medicinal inorganic chemistry.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgments

Financial support from DGAPA IN206922 and PAIP 5000-9035 (UNAM) is acknowledged. R. N.-P. thanks to CONACyT PhD scholarship (772020). B. L.-R. acknowledges DGTIC-UNAM (project LANCAD-UNAM-DGTIC-426) for supercomputer time.

#### References

- T. Steiner, The hydrogen bond in the solid state, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 48–76, [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020104\)41:1<48::AID-ANIE48>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020104)41:1<48::AID-ANIE48>3.0.CO;2-U).
- S. Scheiner, *Non covalent forces*, Springer Int. Switzerland (2015), <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14163-3>.
- A.M. Maharramov, K.T. Mahmudov, M.N. Kopylovich, A.J.L. Pombeiro, Non-covalent interactions in the synthesis and design of new compounds, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, N.J. 2016. <https://doi.org/10.1002/9781119113874>.
- E.A. Meyer, R.K. Castellano, F. Diederich, Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42 (2003) 1210–1250, <https://doi.org/10.1002/anie.200390319>.
- J.W. Steed, J.L. Atwood, *Supramolecular Chemistry, third ed.*, John Wiley & Sons, Ltd, 2022.
- L. Liu, S. Rahali, R. Maurice, C. Gomez Pech, G. Montavon, J.-Y. Le Questel, J. Graton, J. Champion, N. Galland, An expanded halogen bonding scale using astatine, *Chem. Sci.* 12 (2021) 10855–10861, <https://doi.org/10.1039/D1SC02133H>.
- K.T. Mahmudov, M.N. Kopylovich, M.F.C. Guedes da Silva, A.J.L. Pombeiro, Non-covalent interactions in the synthesis of coordination compounds: recent advances, *Coord. Chem. Rev.* 345 (2017) 54–72, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.09.002>.
- G. Cavallo, P. Metrangolo, R. Milani, T. Pilati, A. Priimagi, G. Resnati, G. Terraneo, The halogen bond, *Chem. Rev.* 116 (2016) 2478–2601, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00484>.
- J. Kozelka, Lone pair- $\pi$  interactions in biological systems: occurrence, function, and physical origin, *J. Eur. Biophys.* 46 (2017) 729–737, <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1210-1>.



- [10] K.A. Wilson, J.L. Kellie, S.D. Wetmore, DNA-protein  $\pi$ -interactions in nature: abundance, structure, composition and strength of contacts between aromatic amino acids and DNA nucleobases or deoxyribose sugar, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 6726–6741, <https://doi.org/10.1093/nar/gku269>.
- [11] T.J. Mooibroek, P. Gamez, J. Reedijk, Lone pair- $\pi$  interactions: a new supramolecular bond? *CrstEngComm* 10 (2008) 1501–1515, <https://doi.org/10.1039/B812026A>.
- [12] M. Egli, S. Sarkhel, Lone pair-aromatic interactions: To stabilize or not to stabilize, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 197–205, <https://doi.org/10.1021/ar068174u>.
- [13] J. Novotny, S. Bazzi, R. Marek, J. Kozelka, Lone-pair- $\pi$  interactions: analysis of the physical origin and biological implications, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 19472–19481, <https://doi.org/10.1039/C6CP01524G>.
- [14] M. Shafiei, L. Peyton, M. Hashemzadeh, A. Foroumadi, History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action, *Bioorganic Chem.* 104 (2020), 104240, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104240>.
- [15] D. Allen, D. Wilson, R. Drew, J. Perfect, Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 13 (2015) 787–798, <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1032939>.
- [16] K.V. Drozd, A.N. Manin, A.P. Voronin, D.E. Boycov, A.V. Churakov, G. L. Perlovich, A combined experimental and theoretical study of miconazole salts and cocrystals: crystal structures, DFT computations, formation thermodynamics and solubility improvement, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23 (2021) 12456–12470, <https://doi.org/10.1039/D1CP00956G>.
- [17] J. Kljun, A.J. Scott, T.L. Rizner, J. Keiser, I. Turel, Synthesis and biological evaluation of organoruthenium complexes with azole antifungal agents. First crystal structure of a tioconazole metal complex, *Organometallics* 33 (2014) 1594–1601, <https://doi.org/10.1021/om401096y>.
- [18] P.B. Pansuriya, H.B. Friedrich, G.E.M. Maguire, Crystal structure of 1-[2-[(2-chloro-3-thienyl)methoxy]-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1H-imidazole, *C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S*, *Z. Kristallogr. NCS* 230 (2015) 5–6, <https://doi.org/10.1515/ncrs-2014-0210>.
- [19] H. Song, H.-S. Shin, The antifungal drug clotrimazole, *Acta Cryst. C* 54 (1998) 1675–1677, <https://doi.org/10.1107/S0108270198006386>.
- [20] M. Zhao, H.-B. Wang, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 8360–8375, <https://doi.org/10.1039/C3CS60162E>.
- [21] S.A. Cook, E.A. Hill, A.S. Borovik, Lessons from nature: a bio-inspired approach to molecular design, *Biochemistry* 54 (2015) 4167–4180, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00249>.
- [22] E. Giavini, E. Menegola, Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? *Toxicol. Lett.* 198 (2010) 106–111, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.07.005>.
- [23] M.V. Keniya, M. Sabherwal, R.K. Wilson, M.A. Woods, A.A. Sagatova, J.D.A. Tyndall, B. C. Monk, Crystal structures of full-length lanosterol 14 $\alpha$ -demethylases of prominent fungal pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata* provide tools for antifungal discovery, *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018) e01134-18, <https://doi.org/10.1128/AAC.01134-18>.
- [24] F. Hannemann, A. Bichet, K.M. Ewen, R. Bernhardt, Cytochrome P450 systems biological variations of electron transport chains, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1770 (2007) 330–344, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.017>.
- [25] T.Y. Hargrove, Z. Wawrzak, D.C. Lamb, F.P. Guengerich, G.I. Lepsheva, Structure-functional characterization of cytochrome P450 Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and molecular basis for the development of antifungal drugs, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 23916–23934, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677310>.
- [26] B.C. Monk, A.A. Sagatova, P. Hosseini, Y.N. Ruma, R.K. Wilson, M.V. Keniya, Fungal Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase: A target for next-generation antifungal design, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1868 (2020) 140206, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.02.008>.
- [27] L.N. Jeffreys, H. Poddar, M. Golovanova, C.W. Levy, H.M. Girvan, K.J. McLean, M.W. Voice, D. Leys, A.W. Munro, Novel insights into P450 BM3 interactions with FDA-approved antifungal azole drugs, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1577, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37330-y>.
- [28] K. Stryjska, L. Radko, L. Checinska, J. Kusz, A. Posyniak, J. Ochocki, Synthesis, spectroscopy, light stability, single-crystal analysis, and *in vitro* cytotoxic activity on HepG2 liver cancer of two novel silver(I) complexes of miconazole, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3629, <https://doi.org/10.3390/ijms21103629>.
- [29] K. Stryjska, I. Korona-Glowniak, L. Checinska, J. Kusz, J. Ochocki, Synthesis, spectroscopy, single-crystal structure analysis and antibacterial activity of two novel complexes of silver(I) with miconazole drug, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1510, <https://doi.org/10.3390/ijms22041510>.
- [30] H.F. Abd El-Halim, F.A.N. El-Dien, G.G. Mohamed, N.A. Mohamed, Synthesis, spectroscopic, thermal characterization, and antimicrobial activity of miconazole drug and its metal complexes, *J. Therm. Anal. Calorim.* 109 (2012) 883–892, <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1784-2>.
- [31] H.F. Abd El-Halim, F.A. Nour El-Dien, G.G. Mohamed, N.A. Mohamed, Chelating behavior, thermal studies and biocidal efficiency of tioconazole and its complexes with some transition metal ions, *J. Therm. Anal. Calorim.* 111 (2013) 173–181, <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2333-3>.
- [32] C. Crisóstomo-Lucas, P. García-Holley, S. Hernández-Ortega, F. Sánchez-Bartéz, I. Gracia-Mora, N. Barba-Behrens, Structural characterization and cytotoxic activity of tioconazole coordination compounds with cobalt(II), copper(II), zinc (II) and cadmium(II), *Inorg. Chim. Acta* 438 (2015) 245–254, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.09.029>.
- [33] C. Crisóstomo-Lucas, R. Navarro-Peñaloza, N. Ortiz-Pastrana, F. Sánchez-Bartéz, I. Gracia-Mora, N. Barba-Behrens, Synthesis, characterization and cytotoxic activity of tioconazole coordination compounds with nickel(II), palladium(II) and platinum(II), *J. Mex. Chem. Soc.* 4 (2018) 225–237, <https://doi.org/10.29356/jmcs.v62i4.563>.
- [34] S. Betanzos-Lara, C. Gómez-Ruiz, L.R. Barrón-Sosa, I. Gracia-Mora, M. Flores-Álamo, N. Barba-Behrens, Cytotoxic copper(II), cobalt(II), zinc(II), and nickel(II) coordination compounds of clotrimazole, *J. Inorg. Biochem.* 114 (2012) 82–93, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.05.001>.
- [35] S. Betanzos-Lara, N.P. Chmel, M.T. Zimmerman, L.R. Barrón-Sosa, C. Garino, L. Salassa, A. Rodger, J.L. Brumaghim, I. Gracia-Mora, N. Barba-Behrens, Redox-active and DNA-binding coordination complexes of clotrimazole, *Dalton Trans.* 44 (2015) 3673–3685, <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt02883j>.
- [36] R.A. Sánchez-Delgado, M. Navarro, K. Lazardia, R. Atencio, M. Capparelli, F. Vargas, J.A. Urbina, A. Bouillez, A.F. Noels, D. Masi, Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, *Inorg. Chim. Acta* 275–276 (1998) 528–540, [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(98\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(98)00114-5).
- [37] R.A. Sanchez-Delgado, K. Lazardi, L. Rincon, J.A. Urbina, A.J. Hubert, A.N. Noels, Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in RuCl<sub>2</sub>(clotrimazole)<sub>2</sub>, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 2041–2043, <https://doi.org/10.1021/jm00066a014>.
- [38] A. Martínez, T. Carreon, E. Iniguez, A. Anzellotti, A. Sanchez, M. Tyan, A. Sattler, L. Herrera, R.A. Maldonado, R.A. Sanchez-Delgado, Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium–clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against leishmania major and trypanosoma cruzi and low toxicity toward normal mammalian cells, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 3867–3877, <https://doi.org/10.1021/jm300070h>.
- [39] E. Rodríguez Arce, C. Sarniguet, T.S. Moraes, M. Vieites, A.I. Tomaz, A. Medeiros, M.A. Comini, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, F. Marques, M.H. García, L. Otero, D. Gambino, A new ruthenium cyclopentadienyl azole compound with activity on tumor cell lines and trypanosomatid parasites, *J. Coord. Chem.* 68 (2015) 2923–2937, <https://doi.org/10.1080/00958972.2015.1062480>.
- [40] M. Soba, G. Scalese, F. Casuriaga, N. Pérez, N. Veiga, G.A. Echeverría, O.E. Piro, R. Faccio, L. Pérez-Díaz, G. Gasser, I. Machado, D. Gambino, Multifunctional organometallic compounds for the treatment of Chagas Disease: Re(I) tricarbonyl compounds with two different bioactive ligands, *Dalton Trans.* (2023), <https://doi.org/10.1039/D2DT03869B>.
- [41] Y. Cortat, M. Nedyalkova, K. Schindler, P. Kadakia, G. Demirci, S. N. Sovari, A. Crochet, S. Salentinig, M. Lattuada, O.M. Steiner, F. Zobi, Computer-aided drug design and synthesis of rhenium clotrimazole antimicrobial agents, *Antibiotics* 12 (2023) 619.
- [42] J.A. de Azevedo-França, L. Pereira Borba-Santos, G. de Almeida Pimentel, C.H. J. Franco, C. Souza, J. de Almeida Celestino, E. Figueiredo de Menezes, N. Pinheiro dos Santos, E. Guimaraes Vieira, A.M. Da Costa Ferreira, W. de Souza, S. Rozental, M. Navarro, Antifungal promising agents of zinc(II) and copper(II) derivatives based on azole drugs, *J. Inorg. Biochem.* 219 (2021), 111401, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111401>.
- [43] V. Midlej, F. Rubim, W. Villarreal, É.S. Martins-Duarte, M. Navarro, W. de Souza, M. Benchimol, Zinc-clotrimazole complexes are effective against *Trichomonas vaginalis*, *Parasitol.* 146 (2019) 1206–1216, <https://doi.org/10.1017/S003118201900043X>.
- [44] M. Navarro, N. Prieto Peña, I. Colmenares, T. González, M. Arsenak, P. Taylor, Synthesis and characterization of new palladium–clotrimazole and palladium–chloroquine complexes showing cytotoxicity for tumor cell lines *in vitro*, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 152–157, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.10.013>.
- [45] M. Navarro, A.R. Higuera-Padilla, M. Arsenak, P. Taylor, Synthesis, characterization, DNA interaction studies and anticancer activity of platinum–clotrimazole complexes, *Transition Met Chem* 34 (2009) 869–875, <https://doi.org/10.1007/s11243-009-9276-y>.
- [46] P.V. Simpson, C. Nagel, H. Bruhn, U. Schatzschneider, Antibacterial and antiparasitic activity of manganese(I) tricarbonyl complexes with ketoconazole, miconazole, and clotrimazole ligands, *Organometallics* 34 (2015) 3809–3815, <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.5b00458>.
- [47] C.W. Ang, A.M. Jarrad, M.A. Cooper, M.A.T. Blaskovich, Nitroimidazoles: molecular firework that combat a broad spectrum of infectious diseases, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 7636–7657, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00143>.
- [48] S. Patterson, S. Wyllie, Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects, *Trends Parasitol.* (TREPAP) 30 (2014) 289–298, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>.
- [49] D.F. Harp, I. Chowdhury, Trichomoniasis: evaluation to execution, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 157 (2011) 3–9, <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.02.024>.
- [50] N. Galván-Tejada, S. Bernés, S.E. Castillo-Blum, H. Nöth, R. Vicente, N. Barba-Behrens, Supramolecular structures of metronidazole and its copper(II), cobalt(II) and zinc(II) coordination compounds, *J. Inorg. Biochem.* 91 (2002) 339–348, [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00468-3](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00468-3).
- [51] I. Alfaro-Fuentes, H. López-Sandoval, E. Mijangos, A.M. Duarte-Hernández, G. Rodríguez-López, M.I. Bernal-Uruchurtu, R. Contreras, A. Flores-Parra, N. Barba-Behrens, Metal coordination compounds derived from tinidazole and

- transition metals. Halogen and oxygen lone pair- $\pi$  interactions, *Polyhedron* 67 (2014) 373–380, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.09.030>.
- [52] L. Deng, W. Wang, J. Lv, Ornidazole hemihydrate, *Acta Cryst.* 63 (2007) o4204, <https://doi.org/10.1107/S1600536807045680>.
- [53] H. Novoa de Armas, R. González, A. Boza, R. Pomés, I. Herrera, Crystal pseudopolymorphism of secnidazole bulk drug, *C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>*, *Powder Diff.* 14 (1999) 136–141, <https://doi.org/10.1017/S0885715600010459>.
- [54] S. Mishra, D. Chaturvedi, P. Tandon, V.P. Gupta, A.P. Ayala, S.B. Honorato, H. W. Siesler, Molecular Structure and vibrational spectroscopic investigation of secnidazole using density functional theory, *J. Phys. Chem. A* 113 (2009) 273–281, <https://doi.org/10.1021/jp805399h>.
- [55] P. Nyirjesy, J.R. Schwelke, Secnidazole: next-generation antimicrobial agent for bacterial vaginosis treatment, *Future Microbiol.* 13 (2018) 507–524, <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0270>.
- [56] N. Kunal, L. Hsueh-Yun, L. Jing-Ping, Nitro-group-containing drugs, *J. Med. Chem.* 62 (2019) 2851–2893, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00147>.
- [57] U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, K. Zawadzka, E. Patyna, K. Lisowska, J. Ochocki, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water-soluble silver(I) complexes of metronidazole drug and selected counter-ions, *Dalton Trans.* 44 (2015) 8178–8189, <https://doi.org/10.1039/c5dt00403a>.
- [58] A. Waszczykowska, D. Żyro, P. Jurowski, J. Ochocki, Effect of treatment with silver(I) complex of metronidazole on ocular rosacea: Design and formulation of new silver drug with potent antimicrobial activity, *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 61 (2020), 126531, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126531>.
- [59] J.R. Bale, P.J. Sadler, C.J. Coulson, M. Laverick, A.H.W. Nias, Hypoxic cell sensitization to radiation damage by a new radiosensitizer: cis-dichloro-bis(1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole-*N*<sup>3</sup>)platinum(II) (Flap), *Br. J. Cancer.* 46 (1982) 701–705, <https://doi.org/10.1038/bjc.1982.261>.
- [60] J.R. Bale, C.J. Coulson, D.W. Gilmour, M.A. Mazid, S. Neidle, R. Kuroda, B. J. Peart, C.A. Ramsden, P.J. Sadler, The preparation and isomerization of platinum metronidazole complexes: X-ray crystal and molecular structures of cis- and trans- dichlorobis[1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole]-platinum(II), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1983) 432–433, <https://doi.org/10.1039/C39830000432>.
- [61] J.R. Bale, M.A. Mazid, P.J. Sadler, A. Aggarwal, R. Kuroda, S. Neidle, D. W. Gilmour, B.J. Peart, C.A. Ramsden, Platinum(II) complexes of nitroimidazoles: synthesis, characterisation, and X-Ray crystal structures of cis-dichlorobis[1-(2'-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole]platinum(II) and trans-Dichloro-bis[1-(2'-hydroxy-3'-methoxypropyl)-2-nitroimidazole] platinum(II), *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1985) 795–802, <https://doi.org/10.1039/DT9850000795>.
- [62] N. Farrell, K.A. Skov, Radiosensitizers targeted to DNA using Platinum. Synthesis, Characterisation, and DNA Binding of cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (Nitroimidazole), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1987) 1043–1044, <https://doi.org/10.1039/C39870001043>.
- [63] J.H. Palmer, J. Wu, R.K. Upmacis, Coordination of metronidazole to Cu(II): Structural characterization of a mononuclear square-planar compound, *J. Molec. Struct.* 1091 (2015) 177–182, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.02.057>.
- [64] A.A. Ajibola, J.A. Obaleye, L. Sieron, W. Maniukiewicz, A. Wojciechowska, A. Ozarowski, Structural, spectroscopic insights, and antimicrobial properties of mononuclear and dinuclear metal(II) carboxylate derivatives with metronidazole, *Polyhedron* 194 (2021), 114931, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114931>.
- [65] T.M. Dyson, E.C. Morrison, D.A. Tocher, L.D. Dale, D.I. Edwards, Metal complexes of radiosensitization drugs: the characterization of the metronidazole adducts of dirhodium(II)tetracarboxylate compounds, *Inorg Chim Acta.* 169 (1990) 127–131, [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)82045-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)82045-9).
- [66] J.A. Obaleye, A.A. Ajibola, V.B. Bernardus, E.C. Hostenb, A. Ozarowski, Synthesis, spectroscopic, structural and antimicrobial studies of a dimeric complex of copper(II) with trichloroacetic acid and metronidazole, *Inorg. Chim. Acta* 503 (2020), 119404, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119404>.
- [67] A.C. Tella, N.J. Shamle, J.A. Obaleye, A.C. Whitwood, S.A. Bourne, P.A. Ajibade, Synthesis, characterization, crystal structures and electrochemical properties of heteroleptic Cu(II), Mn(II) and Zn(II) complexes of metronidazole with benzoic acid derivatives, *J. Molec. Struct.* 1209 (2020), 127925, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127925>.
- [68] N. Barba-Behrens, A.M. Mutio-Rico, P. Joseph-Nathan, R. Contreras, Preparation and characterization of new transition metal complexes of nitroimidazoles. X-Ray crystal structures of two copper complexes: Bis-[( $\mu$ -chloro)chloro-bis(1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole)copper(II)] and dichloro-bis(2-methyl-5-nitroimidazole)copper(II). First observation of nitro group coordination to the metal ion in these heterocycles, *Polyhedron* 10 (1991) 1333–1341, [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(00\)81266-8](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(00)81266-8).
- [69] A.T. Gordon, O.O. Abosede, S. Ntsimango, S. van Vuuren, E.C. Hosten, A. S. Ogunlaj, Synthesis, characterization, molecular docking and antimicrobial activity of copper(II) complexes of metronidazole and 1,10 phenanthroline, *Inorg. Chim. Acta* 510 (2020), 119744, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119744>.
- [70] A. Wu, D.C. Kennedy, B.O. Patrick, B.R. James, Ruthenium(II) sulfoxide-maltolato and -nitroimidazole complexes: synthesis and MTT Assay, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 7579–7586, <https://doi.org/10.1021/ic030119j>.
- [71] L.G. Ramírez-Palma, R. Castro-Ramírez, L. Lozano-Ramos, R. Galindo-Murillo, N. Barba-Behrens, F. Cortés-Guzmán, DNA recognition site of anticancer tinidazole copper(II) complexes, *Dalton Trans.* 52 (2023) 2087–2095, <https://doi.org/10.1039/D2DT02854A>.
- [72] I. Alfaro-Fuentes, R. Castro-Ramírez, N. Ortiz-Pastrana, R.M. Medina-Guerrero, L. C. Soler-Jiménez, I. Martínez-Rodríguez, M. Betancourt-Lozano, I. Ibarra-Castro, N. Barba-Behrens, E.J. Fajera Avila, Novel anthelmintic activity of tinidazole coordination compounds. Relevance of the metal ion and structural properties, *J. Inorg. Biochem.* 176 (2017) 159–167, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.013>.
- [73] R. Castro-Ramírez, N. Ortiz-Pastrana, A.B. Caballero, M.T. Zimmerman, B. S. Stadelman, A.A.E. Gaertner, J.L. Brumaghim, L. Korrodi-Gregório, R. Pérez-Tomás, N. Patrick Gamez, Barba-Behrens, DNA interaction of non-chelating tinidazole-based coordination compounds. Structural, redox and cytotoxic properties, *Dalton Trans.* 47 (2018) 7551–7560, <https://doi.org/10.1039/C8DT00716K>.
- [74] A. Bauzá, T.J. Mooibroek, A. Frontera, Directionality of  $\pi$ -holes in nitro compounds, *Chem. Commun.* 51 (2015) 1491–1493, <https://doi.org/10.1039/C4CC09132A>.
- [75] R.C. Santra, K. Segupta, R. Dey, T. Shireen, P. Das, P.S. Guin, K. Mukhopadhyay, S. Das, X-ray crystal structure of a Cu(II) complex with the antiparasitic drug tinidazole, interaction with calf thymus DNA and evidence for antibacterial activity, *J. Coord. Chem.* 67 (2014) 265–285, <https://doi.org/10.1080/00958972.2013.879647>.
- [76] H.B. Fung, T. Doan, Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent, *Clin. Ther.* 27 (2005) 1859–1884, <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.12.012>.
- [77] R.C. Santra, D. Ganguly, S. Jana, N. Banyal, J. Singh, A. Saha, S. Chattopadhyay, K. Mukhopadhyay, S. Das, Synthesizing a Cu<sup>II</sup> complex of tinidazole to tune the generation of the nitro radical anion in order to strike a balance between efficacy and toxic side effects, *New J. Chem.* 41 (2017) 4879–4886, <https://doi.org/10.1039/C7NJ00261K>.
- [78] S. Betanzos-Lara, I. Gracia-Mora, P. Granada-Macías, M. Flores-Álamos, N. Barba-Behrens, Synthesis, characterization, and biological activity of cobalt(II), copper (II) and zinc(II) complexes of secnidazole, *Inorg. Chimica Acta.* 397 (2013) 94–100, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.11.026>.
- [79] S.A. Al-Aghbari, O. MAI-Shuja, A. Alasali, Anticancer activity studies of some new secnidazole-metal complexes, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 9 (2018) 315–320, [https://www.rjpbs.com/pdf/2018\\_9\(5\)\[38\].pdf](https://www.rjpbs.com/pdf/2018_9(5)[38].pdf).
- [80] R.C. Santra, D. Ganguly, J. Singh, K. Mukhopadhyay, S. Das, A study on the formation of the nitro radical anion by ornidazole and its significant decrease in a structurally characterized binuclear Cu(II)-complex: impact in biology, *Dalton Trans.* 44 (2015) 1992–2000, <https://doi.org/10.1039/C4DT03362K>.
- [81] P. Nandy, S. Singha, N. Banyal, S. Kumar, K. Mukhopadhyay, S. Das, A ZnII complex of ornidazole with decreased nitro radical anions that is still highly active on *Entamoeba histolytica*, *RSC Adv.* 10 (2020) 23286–23296, <https://doi.org/10.1039/D0RA02597F>.
- [82] P. Nandy, S. Das, In situ reactivity of electrochemically generated nitro radical anion on Ornidazole and its monomeric Cu(II) complex with nucleic acid bases and calf thymus DNA, *Inorg. Chim. Acta.* 501 (2020) 119267–119274, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119267>.
- [83] P. Nandy, A. Mukherjee, C. Pradhan, S. Das, Radio-sensitizing effects of CuII and ZnII complexes of ornidazole: role of nitro radical anion, *ACS Omega* 5 (2020) 25668–25676, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02811>.
- [84] P.L.A. Popelier, Non-covalent interactions from a Quantum Chemical Topology perspective, *J. Mol. Model.* 28 (2022) 276, <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05188-7>.
- [85] P.L.A. Popelier, The QTAIM perspective of chemical bonding, in *The Chemical Bond: Fundamental Aspects of Chemical Bonding*, Wiley & VCH Verlag GmbH & Co. in: G. Frenking, S. Shaik (Eds.), *The Chemical Bond: Fundamental Aspects of Chemical Bonding*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014, pp. 271–308.
- [86] R. F. Bader, T. T. Nguyen-Dang, Quantum theory of atoms in molecules-Dalton revisited. In *Advances in Quantum Chemistry*, Elsevier 14 (1981) 63–124. [https://doi.org/10.1016/S0065-3276\(08\)60326-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3276(08)60326-3).
- [87] E.R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sánchez, J. Contreras-García, A.J. Cohen, W. Yang, Revealing noncovalent interactions, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 6498–6506, <https://doi.org/10.1021/ja100936w>.
- [88] V. N. Khrustalev, M. M. Grishina, Z. V. Matsulevich, J. M. Lukiyanova, G. N. Borisov, V. K. Osmanov, A. S. Novikov, A. A. Kirichuk, A. V. Borisov, E. Solari, A. G. Tskhovrebov, Novel cationic 1,2,4-selenodiazoles: synthesis via addition of 2-pyridylselenenyl halides to unactivated nitriles, structures and four-center Se...N contacts, *Dalton Trans.* 50 (2021) 10689, <https://doi.org/10.1039/d1dt01322j>.
- [89] M.V. Grudova, A.S. Kubasov, V.N. Khrustalev, A.S. Novikov, A.S. Kritchenkov, V. G. Nenajdenko, A.V. Borisov, A.G. Tskhovrebov, Exploring supramolecular assembly space of cationic 1,2,4-selenodiazoles: effect of the substituent at the carbon atom and anions, *Molecules* 27 (2022) 1029, <https://doi.org/10.3390/molecules27031029>.
- [90] M. A. Kryukova, A. V. Sapagin, A. S. Novikov, M. Krasavin, D. M. Ivanov, New crystal forms for biologically active compounds. Part 2: anastrozole as N-substituted 1,2,4-triazole in halogen bonding and lp- $\pi$  interactions with 1,4-diiodotetrafluorobenzene, 10 (2020) 371. <http://dx.doi.org/10.3390/cryst10050371>.
- [91] S.V. Baykov, A.S. Mikherdov, A.S. Novikov, K.K. Geyl, M.V. Tarasenko, M. A. Gureev, V.P. Boyarskiy,  $\pi$ ... $\pi$  noncovalent interaction involving 1,2,4- and 1,3,4-oxadiazole systems: the combined experimental, theoretical, and data base study, *Molecules* 26 (2021) 5672, <https://doi.org/10.3390/molecules26185672>.
- [92] A.A. Artemjev, A.A. Astafiev, A.V. Vologzhanina, A.S. Kubasov, G.M. Burkin, A. S. Novikov, A.S. Kritchenkov, A.A. Kirichuk, G. Tskhovrebov, Triarylamidazole-ZnII, CdII, and HgII complexes: structures, photophysics, and antibacterial properties, *Crystals* 12 (2022) 680, <https://doi.org/10.3390/cryst12050680>.
- [93] S.N. Yunusova, A.S. Novikov, O.V. Khoroshilova, I.E. Kolesnikov, M. Y. Demakova, D.S. Bolotina, Solid-state fluorescent 1,2,4-triazole zinc(II)

- complexes: Self-organization via bifurcated (N-H)<sub>2</sub>...Cl contacts, *Inorg. Chim. Acta* 510 (2020), 119660, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119660>.
- [94] A.G. Tskhovrebov, A.S. Novikov, B.S. Tupertsev, A.A. Nazarov, A.A. Antonets, A. A. Astafiev, A.S. Kritchenkov, A.S. Kubasov, V.G. Nenajdenko, V.N. Khrustalev, Azimidazole gold(III) complexes: synthesis, structural characterization and self-assembly in the solid state, *Inorg. Chim. Acta* 522 (2021), 120373, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120373>.
- [95] A.S. Mikhherdov, A.S. Novikov, M.A. Kinzhalov, A.A. Zolotarev, V.P. Boyarskiy, Intra-/intermolecular bifurcated chalcogen bonding in crystal structure of thiazole/thiadiazole derived binuclear (diaminocarbene)Pd II Complexes, *Crystals* 8 (2018) 112, <https://doi.org/10.3390/cryst8030112>.
- [96] R.A. Boto, F. Peccati, R. Laplaza, C. Quan, A. Carbone, J.P. Piquemal, Y. Maday, J. Contreras-Garcia, NCIPLLOT4: fast, robust, and quantitative analysis of noncovalent interactions, *J. Chem. Theor. Comput.* 16 (2020) 4150–4158, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00063>.
- [97] P. Politzer, J.S. Murray, T. Clark, The  $\pi$ -hole revisited, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23 (2021) 16458–16468, <https://doi.org/10.1039/D1CP02602J>.
- [98] S.Y. Sheu, D.Y. Yang, H.L. Selzle, E.W. Schlag, Energetics of hydrogen bonds in peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 12683–12687, <https://doi.org/10.1073/pnas.2133366100>.
- [99] K. Szalewicz, Symmetry-adapted perturbation theory of intermolecular forces, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* 2 (2012) 254–272, <https://doi.org/10.1002/wcms.86>.
- [100] A. Frantera Beccaria, A. Bauza Riera, Unveiling NO<sub>2</sub>... C=C  $\pi$ -hole interactions: A combined computational and crystallographic study, *Chem. Phys. Lett.* 633 (2015) 282–286, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.06.005>.
- [101] Y. An, J.W. Bloom, S.E. Wheeler, Quantifying the  $\pi$ -stacking interactions in nitroarene binding sites of proteins, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 14441–14450, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08126>.
- [102] F. Neese, F. Wennmohs, U. Becker, C. Riplinger, The ORCA quantum chemistry program package. *J. Chem. Phys.* 152 (2020) 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
- [103] F. Peccati, NCIPLLOT4 guide for biomolecules: An analysis tool for noncovalent interactions, *J. Chem. Inf. Model.* 60 (2020) 6–10, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00950>.
- [104] Y. Sixto-López, J. Correa-Basurto, M. Bello, B. Landeros-Rivera, J.A. Garzón-Tiznado, S. Montaña, Structural insights into SARS-CoV-2 spike protein and its natural mutants found in Mexican population, *Sci. Rep.* 11 (2021) 4659, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84053-8>.
- [105] X. Hong, X. Tong, J. Xie, P. Liu, X. Liu, Q. Song, S. Liu, S. Liu, An updated dataset and a structure-based prediction model for protein–RNA binding affinity. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, *Proteins* (2023) 1–9, <https://doi.org/10.1002/prot.26503>.