

Artículo recibido 15 de febrero de 2024.

Artículo aceptado 15 de junio de 2024.

Artículo publicado 31 de octubre de 2024.

## **Propiedades antimicrobianas de compuestos de coordinación**

Martínez Medina, Juan J.<sup>1</sup>; López Tévez, Libertad L.<sup>2</sup>; Okulik, Nora B.<sup>1</sup>; Ferrer, Evelina G.<sup>3</sup>; Williams Patricia A.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>INIPTA (CONICET-UNCAUS), Universidad Nacional del Chaco Austral, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

[juanjoc\\_mm09@uncaus.edu.ar](mailto:juanjoc_mm09@uncaus.edu.ar) [nora@uncaus.edu.ar](mailto:nora@uncaus.edu.ar)

<sup>2</sup>Universidad Nacional del Chaco Austral, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

[leolopez@uncaus.edu.ar](mailto:leolopez@uncaus.edu.ar)

<sup>3</sup>CEQUINOR (CONICET-UNLP asociado a CIC), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

[evelina@quimica.unlp.edu.ar](mailto:evelina@quimica.unlp.edu.ar) [williams@quimica.unlp.edu.ar](mailto:williams@quimica.unlp.edu.ar)

ORCID Juan J. Martínez Medina 0000-00025592-1048

ORCID Libertad L. López Tévez 0000-00030334-0310

ORCID Nora B. Okulik 0000-0001-7568-3393

ORCID Evelina G. Ferrer 0000-0002-63435170

ORCID Patricia A. M. Williams 0000-00021549-5873

### **Resumen**

En nuestro grupo de investigación hemos sintetizado y caracterizado varios complejos de cobre, cinc y cadmio con diversos ligandos orgánicos, tanto naturales (5-hidroxitriptófano) como sintéticos (fenantrolina), e incluso fármacos empleados en medicina humana (sertralina, telmisartán, entre otros), pero que no se usan como antimicrobianos. En este trabajo nos enfocamos en las determinaciones de la actividad antimicrobiana a distintos niveles de complejidad, desde un cribado general con detección de halos de inhibición, continuando con la medición de concentración inhibitoria mínima, para finalmente evaluar el efecto post-agente y la actividad

antibiofílica. En general, los complejos binarios mantienen el perfil antimicrobiano del ligando, mientras que los ternarios (con fenantrolina) exhiben perfiles mejorados.

*Palabras clave:* complejos de coordinación, resistencia antimicrobiana, concentración inhibitoria mínima, efecto post-antibiótico, actividad antibiofílica.

### **Abstract**

*Antimicrobial properties of coordination compounds*

In our research group, we have synthesized and characterized various copper, zinc, and cadmium complexes with different organic ligands, including both natural ones (such as 5-hydroxytryptophan) and synthetic ones (like phenanthroline), as well as pharmaceuticals used in human medicine (such as sertraline, telmisartan, among others), although they are not typically employed as antimicrobials. In this study, our focus has been on determining the antimicrobial activity at different levels of complexity. This includes a general screening with the detection of inhibition halos, followed by the measurement of minimum inhibitory concentration, and ultimately assessing post-agent effects and antibiofilm activity. In general, binary complexes maintain the antimicrobial profile of the ligand, while ternary complexes (with phenanthroline) exhibit enhanced profiles.

*Keywords:* coordination complexes, antimicrobial resistance, minimum inhibitory concentration, post-antibiotic effect, antibiofilm activity.

### **INTRODUCCIÓN**

En los últimos años, las infecciones causadas por cepas resistentes a los antimicrobianos se han convertido en un desafío para la salud a nivel mundial (Regiel-Futyra et al., 2017). La Organización Mundial de la Salud ha publicado un informe en el que se enumeran doce patógenos multirresistentes que requieren atención urgente, destacando la necesidad de desarrollar nuevos agentes antibacterianos efectivos (Singh et al., 2017). Los principales patógenos que generan resistencia fueron agrupados bajo la sigla ESKAPE, debido a su capacidad de “escapar” de los tratamientos antibacterianos comunes. Estas cepas incluyen a los patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

*aeruginosa* y *Enterobacter spp.* Son particularmente preocupantes las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina, las cepas de *Enterococcus* resistente a vancomicina, y las cepas de *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* y *K. pneumoniae* con producción de  $\beta$ -lactamasas y carbapenemasas de espectro extendido (Mulani et al., 2019; Viganor et al., 2017). La aparición de resistencia a la vancomicina entre las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina es preocupante y pone de manifiesto la necesidad urgente de nuevas clases de antibióticos (Cushnie et al., 2003). Al problema de la multiresistencia se le suman los factores de virulencia como la formación de biopelículas (*biofilms*) las cuales permiten una mejor adherencia de los microorganismos a las superficies inanimadas (como dispositivos biomédicos) o a las de origen biológico (como piel o mucosa), dificultando el acceso de los antibióticos y causando complicaciones (Radulović et al., 2018).

El aumento en la frecuencia de las infecciones debido a diferentes causas ha llevado a un mayor consumo de agentes antimicrobianos y ha favorecido la aparición de cepas multiresistentes (Berahou et al., 2007; Recio Despaigne et al., 2012), lo que limitó las opciones terapéuticas disponibles y obligó a incursionar en nuevas estrategias antimicrobianas. La terapia farmacológica clásica combinada con un diagnóstico rápido y detallado (sobre los perfiles de resistencia) sigue siendo la principal herramienta disponible en la práctica clínica, pero el arsenal terapéutico es cada vez menos eficiente. Como alternativas para la búsqueda de nuevos antimicrobianos pueden mencionarse: la utilización de bacteriófagos (Kakasis y Panitsa, 2019), péptidos antimicrobianos (Mahlapuu et al., 2016) y aislamiento de compuestos de origen vegetal (Gyawali e Ibrahim, 2014), estrategias que poseen limitaciones de diversa naturaleza, o bien la obtención de nanopartículas (Sportelli et al., 2016) o formación de co-cristales (El Hamdani et al., 2018) que permiten mejorar la biodisponibilidad de ciertas drogas, pero no solucionan la problemática de la multiresistencia. Además, la síntesis química de moléculas orgánicas nuevas (Man et al., 2018) o modificadas a partir de fármacos ya conocidos suele dar lugar a compuestos que sólo presentan un único mecanismo de acción. Esto facilita la aparición de resistencia ya que debido a los procesos evolutivos de los procariontes sólo es cuestión de tiempo encontrar una ruta de escape. Por el contrario, la síntesis de compuestos de coordinación implica la obtención de una entidad química nueva (el complejo) que combina varios mecanismos de acción (del metal o del

ligando) lo cual ralentiza o extiende los tiempos de aparición de resistencia (Regiel-Futyra et al., 2017). Esto los convierte en una estrategia prometedora para el diseño de antimicrobianos en la era de la multirresistencia. De forma adicional, algunos complejos metálicos mostraron una marcada actividad disruptiva de la biopelícula generada por cepas con alta resistencia a los antibióticos (Cushnie et al., 2003), lo que representa una importante ventaja terapéutica.

Los complejos metálicos pueden diseñarse empleando diferentes metales y diversos ligandos, desde moléculas de síntesis química como las sulfonamidas hasta moléculas de origen natural como los flavonoides. La diversidad de ligandos incluye tanto moléculas de uso en medicina humana como moléculas que no tienen aplicaciones clínicas, y dentro del primer grupo es destacable el descubrimiento de moléculas que no se emplean como antimicrobianos pero que poseen dicha propiedad biológica. Boughougal *et al.* (2018) sintetizaron un complejo ternario de Zn(II) con sulfadiazina y enrofloxacin, dos antibióticos diferentes pero complementarios, resultando más activo que los complejos binarios (efecto potenciador) frente a *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*. Los ligandos auxiliares, como la 1,10-fenantrolina (fen), resultan interesantes en la síntesis de compuestos ternarios ya que pueden potenciar o diversificar las propiedades biológicas del sistema binario. Se ha reportado que la fen tiene propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Zoroddu et al., 1996). Cabe destacar que los complejos de coordinación basados en fen se han postulado como una alternativa terapéutica en la era de la resistencia antibiótica (Viganor et al., 2017). Chandraleka *et al.* (2014) demostraron que el mecanismo de acción de los complejos metálicos que contienen fen está relacionado con la actividad de clivaje del ADN. Para sistemas ternarios que combinan ligandos de diferente origen como el complejo de Cd(II) con quercetina y fen (Srivastava et al., 2020), la actividad de escisión del ADN por parte del ligando fen, combinada con el efecto prooxidante del ligando flavonoide, podría ser responsable de la acción antibacteriana mejorada.

La ciudad de Presidencia Roque Sáenz Peña tiene un hospital de nivel de complejidad 6 (Hospital 4 de Junio) que es un centro de referencia zonal y provincial. Además, nuestra universidad cuenta con una Unidad Médica Educativa (UME) que brinda servicios de distinta complejidad tanto en pacientes ambulatorios como de internación. Esta ciudad se encuentra ubicada en el centro de la provincia del Chaco, lo

que propicia la asistencia de pacientes de localidades cercanas (de nuestra provincia y de provincias vecinas como Santiago del Estero) a los diferentes centros de salud, por lo que los perfiles de resistencia microbiana son particularmente heterogéneos. Según datos provistos por el laboratorio de análisis clínicos de la UME, las principales especies aisladas en pacientes ambulatorios con infecciones urinarias son *E. coli* y *K. pneumoniae* con un notorio incremento de cepas con genes productores de resistencia, principalmente betalactamasas de espectro extendido.

## **DESARROLLO**

El Grupo de Investigación en Química Bioinorgánica (GINQUIBIO) viene desarrollando proyectos desde el año 2010 financiados por la Secretaría de Investigación, Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS) en colaboración con investigadores del Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR, CONICET-UNLP), centro donde fueron diseñados y sintetizados los complejos metálicos de coordinación. Este grupo lleva a cabo sus actividades en los laboratorios del Instituto de Procesos Tecnológicos Avanzados (INIPTA, CONICET-UNCAUS). En este artículo resumimos los principales hallazgos vinculados al estudio de agentes antimicrobianos.

### ***Preparación de los complejos***

La síntesis de los complejos se realiza por diferentes técnicas, y en su gran mayoría la coordinación entre el metal y los ligandos se produce en el seno de una solución. Cada complejo posee requerimientos específicos para ser obtenido, como ser: el tipo de solvente, valor de pH, condiciones de agitación y temperatura, entre otras. La preparación de los complejos  $[\text{Cu}(\text{propiltiouracilo})_2]_2$  (Cu-PTU) (Urquiza et al., 2016),  $\text{Cu}(5\text{-hidroxitriptófano})_2$  (Cu-5HTP) (Martínez Medina et al., 2019),  $[\text{Zn}(\text{cumaríncarboxilato})_2]_2 \cdot 1,10\text{-fenantrolina} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Zn-CCA-fen) (Islas et al., 2018) y  $[\text{Cu}(\text{metimazol})_2(1,10\text{-fenantrolina})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$  (Cu-Met-fen) (Urquiza et al., 2013) consiste en agregar una solución del metal sobre los ligandos disueltos bajo agitación continua para obtener un precipitado (sin lograr la formación de monocristales). Sin embargo, cuando la mezcla de reacción se deja evaporando lentamente, como en los complejos  $(\text{sertralina})_2[\text{CuCl}_4]$  (Cu-Ser) (Martini et al., 2017),  $[\text{Cd}(1,10-$

fenantrolina)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>O)](cianoguanidina)·5H<sub>2</sub>O (Cd-cnge-fen) (López Tévez et al., 2011), [Cu(1,10-fenantrolina)(cianoguanidina)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (Cu-cnge-fen) (Ferrer et al., 2007), [Zn(1,10-fenantrolina)<sub>2</sub>(cianoguanidina)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (Zn-cnge-fen) (López Tévez et al., 2012) y [Cu(5-hidroxitriptófano)(1,10-fenantrolina)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)·2H<sub>2</sub>O (Cu-5HTP-fen) (Naso et al., 2020), pueden obtenerse monocristales. Otras alternativas para la obtención de monocristales son: la disolución del sólido amorfo en un solvente adecuado seguido de la recristalización por evaporación como en el complejo [Cu<sub>8</sub>temisartan<sub>16</sub>]·24H<sub>2</sub>O (Cu-Tel) (Islas et al., 2014), o la difusión en geles contenidos en tubos de vidrio con forma de U como el complejo [Zn(cumaríncarboxilato)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (Islas et al., 2018).

Para caracterizar el sólido obtenido se recurre a diversas técnicas, como ser: el análisis elemental para confirmar la estequiometría del complejo, la espectroscopía vibracional de infrarrojo, reflectancia difusa, y UV-visible para estudiar los procesos de desprotonación de los ligandos y su coordinación, la difracción de rayos X de monocristal para elucidar la estructura del complejo, y los métodos de análisis térmico para demostrar la presencia de moléculas de solvente dentro o fuera de la esfera de coordinación. Para conocer el entorno de coordinación se emplea la resonancia paramagnética electrónica para complejos paramagnéticos como los de cobre y la resonancia magnética nuclear para complejos diamagnéticos como los de cinc. Para los sistemas basados en cianoguanidina (Ferrer et al., 2007; López Tévez et al., 2011; López Tévez et al., 2012), se realizaron estudios computacionales empleando métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (Figura 1) para realizar comparaciones teórico-experimentales.

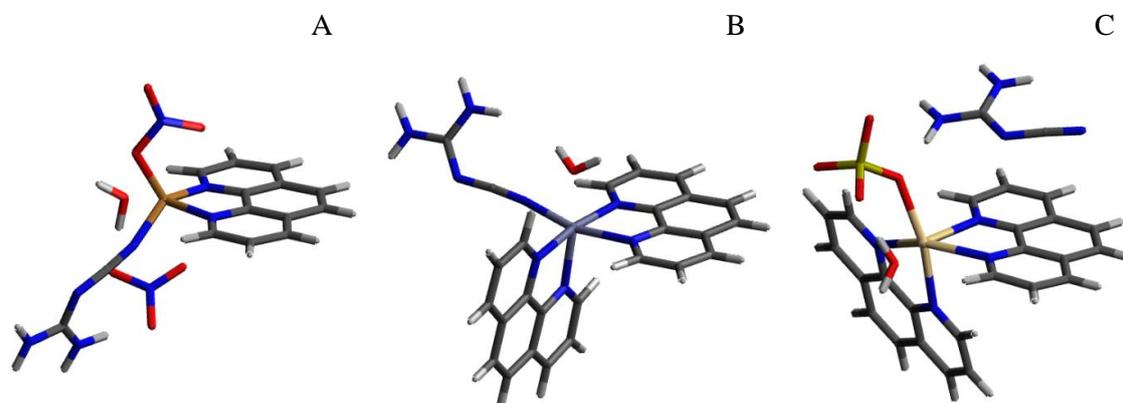


Figura 1. Estructuras de los complejos Cu-cnge-fen (A), Zn-cnge-fen (B) y Cd-cnge-fen (C).

### *Determinaciones de actividad antimicrobiana*

GINQUIBIO ha evolucionado y profundizado en el estudio de la actividad antimicrobiana de los complejos de coordinación. En los estadios iniciales se empleó la técnica de difusión en agar midiendo halos de inhibición (método cualitativo) (López Tévez et al., 2011; Martínez Medina et al., 2014; Martínez Medina et al., 2015), para luego avanzar hacia el método de macrodilución en agar (método cuantitativo) (Falkievich et al., 2022; Islas et al., 2014; Islas et al., 2018; López Tévez et al., 2012; Martínez Medina et al., 2014; Martini et al., 2017; Naso et al., 2020; Urquiza et al., 2013; Urquiza et al., 2015; Urquiza et al., 2016), y posteriormente incluir estudios de efecto post-agente (Martínez Medina et al., 2014; Martínez Medina et al., 2015; Naso et al., 2020) y estudios de inhibición de la formación de *biofilms* (Falkievich et al., 2022). Se emplearon las cepas de referencia derivadas de la American Type Culture Collections (ATCC) *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, y aislamientos de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*.

El método de difusión en agar basado en la técnica de Kirby-Bauer (Berahou et al., 2007) consiste en sembrar uniformemente la superficie de una placa con Mueller Hinton agar con un inóculo calibrado del microorganismo y seguidamente colocar discos embebidos en el complejo de coordinación permitiendo que este difunda desde el disco hacia el agar. Si el microorganismo es susceptible al agente podrían observarse halos de inhibición (Figura 2A). Esta técnica cualitativa es útil para el cribado de un gran número de compuestos sobre un determinado microorganismo. Sin embargo, la presencia de halos de inhibición y su tamaño están relacionados con la capacidad de difusión del complejo y no necesariamente con su potencia. Es decir que un compuesto que genere halos grandes podría no ser un antimicrobiano potente, como sucede con el  $\text{CuCl}_2$  frente a las cepas de *Candida* (Martínez Medina et al., 2014).

El método de macrodilución en agar (Berahou et al., 2007) consiste en preparar una serie de placas con concentraciones crecientes del complejo y sembrar una alícuota

de cada inóculo calibrado sobre la superficie del agar. Esta técnica cuantitativa permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se define como la menor concentración (expresada en  $\mu\text{g/mL}$ ) que inhibe el crecimiento visible del microorganismo tras el período de incubación (Figura 2B). La CIM representa un parámetro de interés clínico que indica que la actividad antimicrobiana es buena ( $\text{CIM} < 100$ ) moderada ( $100 > \text{CIM} < 500$ ), débil ( $500 > \text{CIM} < 1000$ ) o irrelevante ( $\text{CIM} > 1000$ ) (Tanaka et al., 2006). La ventaja de esta técnica es que permite ensayar un gran número de microorganismos de forma simultánea en un mismo set de placas y la limitación es que no permite establecer la concentración mínima a la que el microorganismo es inactivado irreversiblemente.



Figura 2. Método de difusión en agar (A) y método de macrodilución en agar (B).

Luego de determinar la CIM de un complejo sobre una especie bacteriana o fúngica, puede estudiarse el efecto post-agente del mismo que se denomina efecto post-antibiótico (PAE) o post-antifúngico (PAFE). La técnica consiste en monitorear espectrofotométricamente el crecimiento del microorganismo luego de una breve exposición al complejo a valores de hasta 2 veces la CIM (Ellepola, 2012). Si el complejo posee PAE/PAFE, hay un retardo en el inicio del crecimiento luego de la remoción del complejo. Valores menores a 20 minutos resultan insignificantes dada las limitaciones de la técnica (Rescott et al., 1988). El efecto post-agente resulta relevante en términos farmacocinéticos, ya que podría condicionar los intervalos de dosificación del agente antimicrobiano.

Por otra parte, algunos complejos tienen la capacidad de inhibir la formación de *biofilms* microbiano. El método del cristal violeta (Radulović et al., 2018) consiste en teñir el biofilm formado por el microorganismo, extraer el color con un solvente adecuado y cuantificarlo por espectrofotometría. Los complejos que tienen actividad

antibiofílmica ya sea por inhibición de la etapa de adhesión (ensayo preadhesión) o porque actúan sobre el biofilm ya formado (ensayo post-adhesión) generan una disminución de la cantidad de color. Una variante de esta técnica consiste en la tinción del biofilm formado sobre un cubreobjetos en presencia de diferentes dosis del agente en estudio y a diferentes tiempos para luego visualizarlos por microscopía óptica (Figura 3).

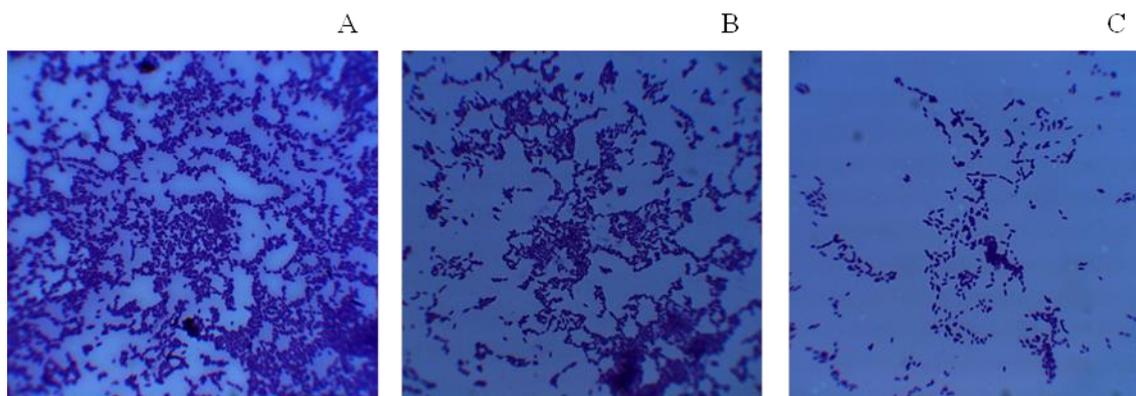


Figura 3. Tinción con cristal violeta del *biofilm* formado por *P. aeruginosa* en ausencia (control, A) y en presencia del ligando fenantrolina a 0,5 CIM (B) y 1 CIM (C). Aumento 400X.

### ***Evaluación de la seguridad***

En el diseño de fármacos resulta necesario complementar los estudios de propiedades biológicas (como la actividad antimicrobiana) con estudios de toxicidad. La seguridad de los complejos fue evaluada en dos niveles de experimentación (Falkievich et al., 2022; Martínez Medina et al., 2014; Martínez Medina et al., 2015; Naso et al., 2020): Nivel I (ensayos a nivel bacteriano *in vitro*) mediante el test de Ames y Nivel III (ensayos con organismos enteros *in vivo*) empleando el modelo de *Artemia salina*.

El test de Ames (Maron y Ames, 1983) permite detectar el potencial mutagénico de los complejos mediante el empleo de cepas bacterianas diseñadas por ingeniería genética que son incapaces de crecer en ausencia de histidina (a menos que sufran mutaciones específicas). Por ejemplo, las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 permiten detectar mutaciones del tipo corrimiento de marco de lectura o sustitución de pares de bases, respectivamente. El método de incorporación directa en placa consiste en poner en contacto el complejo con la cepa bacteriana en un medio semisólido que posteriormente se vierte sobre placas conteniendo agar mínimo. Luego

de la incubación se realiza el recuento del número de colonias revertantes (Figura 4A) y se calcula el índice mutagénico (IM) para determinar si el complejo es no mutagénico ( $IM < 1,5$ ), ligeramente mutagénico ( $1,5 < IM < 2$ ) o mutagénico ( $IM > 2$ ).

El ensayo de *Artemia salina* permite determinar la toxicidad aguda de moléculas nuevas de forma rápida y económica (Meyer et al., 1982). Los nauplios del crustáceo de mar se incuban en policubetas de 96 wells en presencia del complejo durante 24 horas, se realiza el conteo de larvas vivas en cada pocillo (Figura 4B) y se calcula la concentración letal media ( $CL_{50}$ ). Este modelo ha mostrado una buena correlación con los ensayos en ratones, lo que lo hace útil como alternativa al uso de animales vertebrados (Logarto Parra et al., 2001). Sin embargo, una limitante de la técnica es la baja solubilidad de algunos complejos en el agua de mar.

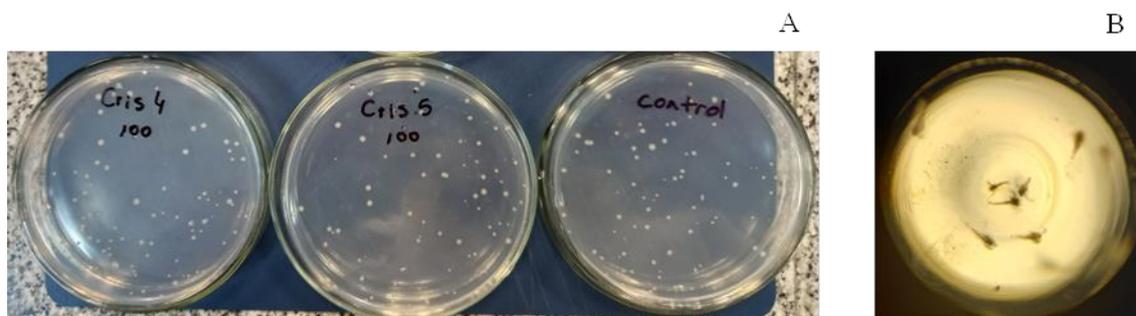


Figura 4. Placas del Test de Ames (A). Nauplios de *Artemia salina* (B). Aumento 30X.

### ***Resultados de actividad antimicrobiana de los distintos complejos sintetizados***

La búsqueda de nuevos fármacos basados en complejos de coordinación se sustenta en la Teoría de la Quelación. Esta propone que la quelación reduce la polaridad del ion metálico mediante la distribución parcial de su carga positiva a los ligandos, lo cual incrementa la liposolubilidad del complejo, permitiéndole pasar más fácilmente a través de la capa lipídica de la membrana bacteriana para interferir con su crecimiento (Qasem et al., 2024). En este contexto, evaluamos las propiedades antimicrobianas de diversos complejos (de cobre, cinc y/o cadmio) tanto binarios de telmisartán (Islas et al., 2014), sertralina (Martini et al., 2017) y propiltiouracilo (Urquiza et al., 2016), como ternarios que incluyen fen como segundo ligando de los sistemas basados en cianoguanidina (Falkievich et al., 2022; Martínez Medina et al., 2014; Martínez Medina et al., 2015), cumarín-3-carboxilato (Islas et al., 2018), 5-hidroxitriptofano (Naso et al., 2020) y metimazol (Urquiza et al., 2013; Urquiza et al., 2015).

### ***Complejo de cobre con telmisartán***

Telmisartán es un fármaco empleado como antihipertensivo y en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Esta molécula presenta buena actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y moderada frente a *E. faecalis* y *S. epidermidis*, pero no inhibe el crecimiento de las gramnegativas *E. coli* y *P. aeruginosa*. El complejo Cu-Tel muestra una actividad antimicrobiana semejante a la del ligando libre frente a las bacterias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, pero no es efectivo sobre *E. faecalis*. Cuando estudiamos el efecto de estas moléculas sobre levaduras del género *Candida*, pudimos ver que dos de ellas, *Candida albicans* y *C. parapsilosis* son sensibles a telmisartán y al complejo binario Cu-Tel (Islas et al., 2014).

### ***Complejo de cobre con sertralina***

La sertralina es un fármaco incorporado en el mercado en la década de 1990 como inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina para tratar la depresión. Esta molécula muestra muy buena actividad antifúngica (CIM < 12) y antibacteriana (CIM = 24), excepto para *P. aeruginosa* que es muy débil (CIM = 750). El complejo Cu-Ser muestra buena actividad para todas las cepas, excepto para *P. aeruginosa* (CIM > 1500). Es decir que la complejación no afecta la actividad antimicrobiana del fármaco antidepresivo frente a las levaduras. Por lo tanto, aunque la complejación no supone un mejoramiento del perfil antimicrobiano de la droga antidepresiva, tampoco afecta negativamente su potencial inhibitorio en la mayoría de los casos (Martini et al., 2017).

### ***Complejo de cobre con propiltiouracilo***

El propiltiouracilo es un compuesto químico empleado como agente antitiroideo de reconocida actividad farmacológica. Esta molécula orgánica no presenta actividad antimicrobiana sobre ninguno de los indicadores biológicos. El complejo binario Cu-PTU es más activo frente a bacterias grampositivas (actividad buena) que frente a gramnegativas (actividad moderadas). Es interesante observar que aunque las cepas fúngicas del género *Candida* no son inhibidas ni por el metal ni por ligando libre, son fuertemente afectadas por el complejo (CIM = 12), incluso la inhibición es mayor que con el fármaco control fluconazol (CIM > 375) (Urquiza et al., 2016).

### *Complejos de cobre, cinc y cadmio con cianoguanidina*

La cianoguanidina ha sido reconocida como sustrato de la enzima nitrogenasa y no posee actividad antimicrobiana. El complejo Cu-cnge-fen (Figura 1A) provoca inhibición del crecimiento de cepas bacterianas y fúngicas mostrando halos con diámetros medibles que muestran un orden decreciente de *C. albicans* > *C. tropicalis* > *E. faecalis* > *E. coli*, *S. aureus* > *C. parapsilosis*, sin halo para *P. aeruginosa*. Respecto de la CIM, el complejo muestra buena actividad antimicrobiana frente a las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis* (Tabla 1) pero no es relevante contra *P. aeruginosa*, lo cual se correlaciona con las medidas de los halos. El complejo Cu-cnge-fen inhibe el desarrollo de levaduras, siendo particularmente activo frente a *C. albicans* con mejor actividad (CIM= 12) que el fármaco fluconazol (CIM> 375). Respecto de los efectos post-agente, los PAEs más largos se observaron para *E. coli* y *S. aureus*, mientras que el PAFE más marcado fue el de *C. parapsilosis* (Martínez Medina et al., 2014).

Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria mínima (CIM en µg/mL) del ligando 1,10-fenantrolina (fen) y de los tres complejos de M(II)-cnge-fen (M= Cu, Zn o Cd).

Cepas microbianas	fen	Cu-cnge-fen	Zn-cnge-fen	Cd-cnge-fen
<i>E. coli</i> ATCC 35218	12	96	48	48
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	24	24	96	96
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	94	24	>1000	96
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3	12	6	3
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	12	48	12	24
<i>C. tropicalis</i>	12	48	12	12

El complejo Zn-cnge-fen (Figura 1B) presenta buena actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, pero es irrelevante frente a *E. faecalis* y *P. aeruginosa*. Frente a las cepas de *Candida*, tanto el complejo como el ligando fen, mostraron en algunos casos mayor actividad antifúngica que el fármaco fluconazol. El efecto PAFE más largo se observa en las cepas de *C. glabrata* y *C. krusei* y en *C. albicans* donde es incluso mayor que anfotericina B. Cabe mencionar que este complejo ha demostrado ser seguro en los modelos de *Artemia salina* y test de Ames (Martínez Medina et al., 2015).

El cadmio fue designado carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer debido a su toxicidad, sin embargo este puede modularse mediante la formación de complejos. En este sentido, no hemos detectado toxicidad aguda del complejo Cd-cnge-fen (Figura 1C) en *A. salina* ni mutagenicidad en el test de Ames debido a que el complejo presenta mejor perfil antimicrobiano que el metal libre sobre las cepas bacterianas, siendo el único activo frente a *P. aeruginosa* (CIM= 187), que es una bacteria formadora de biopelículas. Se evaluó su actividad antibiofílmica sobre este patógeno. El complejo de cadmio, a la concentración de 0,5 CIM, inhibió por encima del 40% la formación de biofilms con respecto al control en ambos ensayos (pre y post-adhesión). Además, a la concentración de 1 CIM ejerció un 72 % de inhibición en el ensayo de preadhesión, y un 42 % de inhibición en el ensayo de post-adhesión (Falkievich et al., 2022).

En el análisis global de los tres sistemas de M(II)-cnge-fen (M= Cu, Zn o Cd), se pudo ver que tienen buena actividad frente a las cepas bacterianas y fúngicas (Tabla 1). El complejo de cadmio es el único activo frente a *P. aeruginosa*. Por su parte, el complejo de cobre, exhibe los valores más bajos de CIM para *S. aureus* y *E. faecalis* y la actividad del complejo de cinc frente a *C. parapsilosis* es mejor que la de los otros dos complejos. Estos resultados sugieren que, ni el centro metálico ni el número de unidades del ligando fen condicionan la potencia antimicrobiana de los complejos (Figura 1). El ligando auxiliar fen posee buen perfil antimicrobiano frente a los indicadores biológicos elegidos (Tabla 1), incluso con mejor actividad que los complejos en algunos casos. Sin embargo, esta molécula no tiene aplicaciones clínicas debido a su toxicidad ( $CL_{50} = 93,70 \mu\text{g/mL}$ ) (Martínez Medina et al., 2015), la cual puede ser suprimida mediante la complejación, haciendo a los complejos más seguros (Falkievich et al., 2022; Martínez Medina et al., 2015; Naso et al., 2020).

### ***Complejos de cinc con cumarincarboxilato***

Las cumarinas son metabolitos secundarios, distribuidos principalmente en el reino vegetal, con actividades farmacológicas que dependen de sus patrones de sustitución. Cuando la posición 3 es sustituida por un grupo carboxílico se genera el cumarín 3 carboxilato. El complejo binario Zn-CCA no ha mostrado actividad antibacteriana ni tampoco antifúngica, mientras que el complejo ternario Zn-CCA-fen

exhibe una actividad débil frente a las bacterias grampositivas del género *Staphylococcus* (CIM= 750), moderada frente a *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (CIM= 188) y buena frente a *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. Krusei* (CIM= 12-24). Una situación disruptiva se vio sobre la cepa de *E. coli* donde tanto el cinc como la fen mostraron actividad inhibitoria, pero este comportamiento no se trasladó a los complejos (Islas et al., 2018).

#### ***Complejos de cobre con 5-hidroxitriptófano***

El 5-hidroxitriptófano es un precursor de la serotonina natural que se emplea en bajas dosis por vía oral como suplemento dietario. Esta molécula no mostró actividad antimicrobiana a las concentraciones ensayadas. El complejo binario Cu-5HTP mostró una débil actividad antimicrobiana únicamente frente a *S. aureus* (CIM= 750). El complejo ternario de 5-hidroxitriptófano fue diseñado mediante la sustitución de una unidad de 5-hidroxitriptófano del sistema binario por una unidad de fen, dando lugar a un compuesto con actividad antimicrobiana relevante contra todas las cepas bacterianas analizadas, excepto contra *P. aeruginosa*, y presenta buena actividad antifúngica frente a todas las cepas. En este contexto, se puede considerar que la inclusión de la fen mejoró el perfil antimicrobiano del complejo. El sistema ternario Cu-5HTP-fen mostró PAE frente a concentraciones de 2 CIM. En líneas generales el PAE disminuye y el PAE aumenta en el complejo respecto de la fen, excepto para *E. faecalis*. Además, ambos complejos resultaron seguros en términos de toxicidad aguda y genotoxicidad (Martínez Medina et al., 2019; Naso et al., 2020).

#### ***Complejos de cobre con metimazol***

El metimazol es un fármaco antitiroideo que actúa como inhibidor de la enzima peroxidasa tiroidea. Esta molécula no presenta actividad antibacteriana. El complejo Cu-Met presenta una actividad antibacteriana débil pero mejorada (CIM= 750) respecto al ligando libre y con un valor de dilución por encima de la CIM del metal. Por otro lado, el complejo ternario Cu-Met-fen mostró una actividad antibacteriana mejorada, respecto del binario Cu-Met, con un muy buen efecto antibacteriano, especialmente contra *E. faecalis* (CIM= 47), *S. aureus* y *S. epidermidis* (CIM= 94), mientras que frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* tuvo un efecto inhibitor moderado (CIM= 375) (Urquiza et al.,

2013). Por otro lado, la actividad antifúngica del cobre, metimazol, Cu–Met y Cu–Met–fen contra todas las cepas analizadas no se consideran relevantes (Urquiza et al., 2015).

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En general los complejos binarios mantienen el patrón antimicrobiano del ligando, mejorando incluso para algunos sistemas frente a determinadas cepas. Los complejos ternarios, que incorporan el ligando auxiliar fen, presentan mayor actividad con valores de CIM incluso menores que algunos antimicrobianos comerciales. El coligando fen posee una CIM baja (muy buen antimicrobiano) pero elevada toxicidad, lo que impide su uso como agente farmacoterapéutico. Sin embargo, coordinado con cationes metálicos en los complejos ternarios, la toxicidad desaparece y se mantiene su actividad antimicrobiana. Además, los resultados del complejo Cd–cng–fen, en concordancia con la literatura, sugieren que los demás complejos ternarios que incluyen el ligando fen también podrían inhibir la formación de *biofilms* microbianos.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los complejos han demostrado actividad antimicrobiana frente a bacterias ATCC, consideramos necesario extender nuestra investigación incluyendo bacterias multirresistentes aisladas en los principales centros de salud de la ciudad de Presidencia Roque Sáenz Peña. Además, comenzamos a incursionar en ensayos de sinergismo de los complejos con antimicrobianos comerciales, mecanismos de acción, inhibición de factores de virulencia, generación de resistencia y estudios de toxicidad.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berahou, A., Auhmani, A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M. y Gadhi, C. A. (2007).

Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 112(3), 426–429. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.032>.

Boughoual, A., Cherchali, F. Z., Messai, A., Attik, N., Decoret, D., Hologne, M.,

Sanglar, C., Pilet, G., Tommasino, J. B. y Luneau, D. (2018). *New Journal of Chemistry*, 42, 15346–15352. <https://doi.org/10.1039/C8NJ01774C>

- Chandraleka, S., Ramya, K., Chandramohan, G., Dhanasekaran, D., Priyadharshini, A. y Panneerselvam, A. (2014). Antimicrobial mechanism of copper (II) 1,10-phenanthroline and 2,2-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18, 953-962. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.020>
- Cushnie, T. P., Hamilton, V. E. y Lamb, A. J. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiological research*, 158(4), 281–289. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00206>
- El Hamdani, H., El Amane, M. y Duhayon, C. (2018). Studies on the syntheses, structural Characterization, antimicrobial of the CO-CRYSTAL 1,10-phenanthroline-1-IUM(1,10-phenH<sup>+</sup>)-caffeine(caf)-hexafluorophosphate. *Journal of Molecular Structure*, 1155, 789-796. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.11.076>
- Ellepola A. N. (2012). Amphotericin B-induced in vitro postantifungal effect on Candida species of oral origin. *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 21(5), 442–446. <https://doi.org/10.1159/000339080>
- Falkievich, D. B., Martínez Medina, J. J., Alegre, W. S., López Tévez, L. L., Franca, C. A., Ferrer, E. G. y Williams, P. A. M. (2022). *Applied Organometallic Chemistry*, 36, e6695. <https://doi.org/10.1002/aoc.6695>
- Ferrer, E. G., López Tévez, L. L., Baeza, N., Correa, M. J., Okulik, N., Lezama, L., Rojo, T., Castellano, E. E., Piro, O. E. y Williams, P. A. (2007). Molecular structure, bioavailability and bioactivity of [Cu(o-phen)<sub>2</sub>(cnge)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

- and [Cu(o-phen)(cnge)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] complexes. *Journal of inorganic biochemistry*, 101(5), 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.12.012>
- Gyawali, R. e Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Islas, M. S., Martínez Medina, J. J., López Tévez, L. L., Rojo, T., Lezama, L., Griera Merino, M., Calleros, L., Cortes, M. A., Rodriguez Puyol, M., Echeverría, G. A., Piro, O. E., Ferrer, E. G. y Williams, P. A. (2014). Antitumoral, antihypertensive, antimicrobial, and antioxidant effects of an octanuclear copper(II)-telmisartan complex with an hydrophobic nanometer hole. *Inorganic chemistry*, 53(11), 5724–5737. <https://doi.org/10.1021/ic500483p>
- Islas, M. S., Martínez Medina, J. J., Piro, O. E., Echeverría, G. A., Ferrer, E. G. y Williams, P. A. M. (2018). Comparisons of the spectroscopic and microbiological activities among coumarin-3-carboxylate, o-phenanthroline and zinc(II) complexes. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 198, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.003>
- Kakasis, A. y Panitsa, G. (2019). Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International journal of antimicrobial agents*, 53(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>
- Logarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I. y Iglesias Buela, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 8(5), 395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>

- López Tévez, L. L., Islas, M. S., Martínez Medina, J. J., Diez, M., Piro, O. E., Castellano, E. E., Ferrer, E. G. y Williams, P. A. M. (2012). *Journal of Coordination Chemistry*, 65, 2304-2318.  
<https://doi.org/10.1080/00958972.2012.693175>
- López Tévez, L. L., Martínez Medina, J. J., Islas, M. S., Piro, O. E., Castellano, E. E., Bruzzone, L., Ferrer, E. G. y Williams, P. A. M. (2011). Antibacterial activity assays of a new cadmium complex with o-phenanthroline and cyanoguanidine: crystal structure, fluorescence properties, and chemical speciation studies. *Journal of Coordination Chemistry*, 64, 3560-3574.  
<http://dx.doi.org/10.1080/00958972.2011.626854>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. y Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Man, N. Y. T., Knight, D. R., Stewart, S. G., McKinley, A. J., Riley, T. V. y Hammer, K. A. (2018). Spectrum of antibacterial activity and mode of action of a novel tris-stilbene bacteriostatic compound. *Scientific reports*, 8(1), 6912.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25080-w>
- Maron, D. M. y Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation research*, 113(3-4), 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Martínez Medina, J. J., Islas, M. S., López Tévez, L. L., Ferrer, E. G., Okulik, N. B. y Williams, P. A. M. (2014). Copper(II) complexes with cyanoguanidine and o-phenanthroline: Theoretical studies, in vitro antimicrobial activity and alkaline

phosphatase inhibitory effect. *Journal of Molecular Structure*, 1058, 298-307.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.014>

Martínez Medina, J. J., Naso, L. G., Pérez, A. L., Rizzi, A., Okulik, N. B., Valcarcel, M., Salado, C., Ferrer, E. G. y Williams, P. A. M. (2019). Synthesis, characterization, theoretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 111, 414–426.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.098>

Martínez Medina, J. J., Torres, C. A., Alegre, W. S., Franca, C. A., López Tévez, L. L., Ferrer, E. G., Okulik, N. B. y Williams, P. A. M. (2015). DFT vibrational assignments, *in vitro* antifungal activity, genotoxic and acute toxicity determinations of the  $[\text{Zn}(\text{phen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  complex. *Journal of Molecular Structure*, 1100, 366-375.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.07.061>

Martini, N., Parente, J. E., Toledo, M. E., Escudero, G. E., Laino, C. H., Martínez Medina, J. J., Echeverría, G. A., Piro, O. E., Lezama, L., Williams, P. A. M. y Ferrer, E. G. (2017). Evidence of promising biological-pharmacological activities of the sertraline-based copper complex:  $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ . *Journal of inorganic biochemistry*, 174, 76–89.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.012>

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. y McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica*, 45(5), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

<https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. y Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Naso, L. G., Martínez Medina, J. J., D'Alessandro, F., Rey, M., Rizzi, A., Piro, O. E., Echeverría, G. A., Ferrer, E. G. y Williams, P. A. M. (2020). Ternary copper(II) complex of 5-hydroxytryptophan and 1,10-phenanthroline with several pharmacological properties and an adequate safety profile. *Journal of inorganic biochemistry*, 204, 110933. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110933>
- Qasem, H. A., Sayed, F. N., Feizi-Dehneyebi, M., Al-Ghamdi, K., Omar, I., Mohamed, G. G. y Abu-Dief, A. M. (2024). Development of tripodal imine metal chelates: Synthesis, physicochemical inspection, theoretical studies and biomedical evaluation. *Inorganic Chemistry Communications*, 162, 112248. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112248>
- Radulović, N. S., Stojanović, N. M., Glišić, B. Đ., Randjelović, P. J., Stojanović-Radić, Z. Z., Mitić, K. V., Nikolić, M. G. y Djuran, M. I. (2018). Water-soluble gold(III) complexes with N-donor ligands as potential immunomodulatory and antibiofilm agents. *Polyhedron*, 141, 164-180. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.11.044>
- Recio Despaigne, A. A., Da Costa, F. B., Piro, O. E., Castellano, E. E., Louro, S. R. W. y Beraldo, H. (2012). Complexation of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones to copper(II) as an effective strategy for antimicrobial activity improvement, *Polyhedron*, 38, 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.03.017>

- Regiel-Futyr, A., Dąbrowski, J. M., Mazuryk, O., Śpiewak, K., Kyzioł, A., Pucelik, B., Brindell, M. y Stochel, G. (2017). Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. *Coordination Chemistry Reviews*, 351, 76-117.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.05.005>
- Rescott, D. L., Nix, D. E., Holden, P. y Schentag, J. J. (1988). Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effects of three antibiotics on *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(4), 450–453.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.32.4.450>
- Singh, N. P., Rani, M., Gupta, K., Sagar, T. y Kaur, I. R. (2017). Changing trends in antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates in a burn unit. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 43(5), 1083–1087.  
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2017.01.016>
- Sportelli, M. C., Picca, R. A. y Cioffi, N. (2016). Recent advances in the synthesis and characterization of nano-antimicrobials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 84, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.002>
- Srivastava, T., Mishra, S. K., Tiwari, O. P., Sonkar, A. K., Tiwari, K. N., Kumar, P., Dixit, J., Kumar, J., Singh, A. K., Verma, P., Saini, R., Singh, A. y Dwivedi, A. K. (2020). Synthesis, characterization, antimicrobial and cytotoxicity evaluation of quaternary cadmium (II)-quercetin complexes with 1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine ligands. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34, 999-1012. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1806732>
- Tanaka, J. C., Silva, C. C., Oliveira, A. J., Nakamura, C. V. y Dias Filho, B. P. (2006). Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*.

*Brazilian journal of medical and biological research*, 39(3), 387–391.

<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000300009>

Urquiza, N. M., Islas, M. S., Ariza, S. T., Jori, N., Martínez Medina, J. J., Lavecchia, M. J., López Tévez, L. L., Lezama, L., Rojo, T., Williams, P. A. y Ferrer, E. G. (2015). Anti-thyroid and antifungal activities, BSA interaction and acid phosphatase inhibition of methimazole copper(II) complexes. *Chemico-biological interactions*, 229, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.036>

Urquiza, N. M., Islas, M. S., Dittler, M. L., Moyano, M. A., Manca, S. G., Lezama, L., Rojo, T., Martínez Medina, J. J., Diez, M., López Tévez, L., Williams, P. A. M. y Ferrer, E. G. (2013). *Inorganica Chimica Acta*, 405, 243-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2013.05.022>

Urquiza, N. M., Naso, L. G., Martínez Medina, J. J., Moyano, M. A., Lezama, L., Williams, P. A. M. y Ferrer, E. G. (2016). *Journal of Coordination Chemistry*, 69, 1293-1312. <http://dx.doi.org/10.1080/00958972.2016.1167885>

Viganor, L., Howe, O., McCarron, P., McCann, M. y Devereux, M. (2017). The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10- phenanthroline: Potential as Alternative Therapeutics in the Era of Antibiotic Resistance. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(11), 1280–1302. <https://doi.org/10.2174/1568026616666161003143333>

Zoroddu, M. A., Zanetti, S., Pogni, R. y Basosi, R. (1996). An electron spin resonance study and antimicrobial activity of copper(II)-phenanthroline complexes. *Journal of inorganic biochemistry*, 63(4), 291–300. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(96\)00015-3](https://doi.org/10.1016/0162-0134(96)00015-3)