

UNIARA - UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Nayara Aparecida Simei Aquaroni

**Síntese, caracterização e análise das atividades biológicas de
complexos metálicos de prata(I) com ligantes bioativos**

ARARAQUARA – SP

2021

Nayara Aparecida Simei Aquaroni

Síntese, caracterização e análise das atividades biológicas de complexos metálicos de prata(I) com ligantes bioativos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

Co-Orientadora: Profa. Dra. Eliane Trovatti

Araraquara, SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

A666s Aquaroni, Nayara Aparecida Simei
Síntese, caracterização e análise das atividades biológicas de complexos metálicos de prata (I) com ligantes bioativos/Nayara Aparecida Simei Aquaroni. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021.
107f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

1. Complexos metálicos. 2. Síntese. 3. Ligantes bioativos. I. Título.

CDU 57.089

NAYARA APARECIDA SIMEI AQUARONI

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 24 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI (Orientador)

Universidade de Araraquara – UNIARA



Profª Drª FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA

Universidade de Araraquara – UNIARA



Prof. Dr. PEDRO PAULO CORBI

Instituto de Química de Campinas - UNICAMP



Prof. Dr. ALZIR AZEVEDO BATISTA

Depto de Química de São Carlos – UFSCar



Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

Dedicatória

À você, Marcelo M. G.,
por tudo que vivi e por me mostrar algo novo,
pelo dia 10 de Agosto,
que me fez chegar até aqui com mais determinação.
Sou grata pelos seus ensinamentos.
A vida exige sonhos
E o amor é só um jeito de sonhar
E não há mais segredo se a gente falar.

(Oswaldo Montenegro)

"O lobo sempre será mau, se você continuar
a ouvir só a versão da chapeuzinho vermelho."
(Callegari)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos nesta vida.

Ao meu filho, meu menino José Francisco que com seus ensinamentos e amor me modificou profundamente.

À minhas amadas avós, minha querida D. Constância Di Pietro Michelin (Vó do Sítio), em memória, sou eternamente grata por tudo que fez por mim nessa vida e minha querida D. Gertrudes Bernardes da Silva Martins (D. Tudinha), minha gratidão por te encontrar e por tudo que sempre fez por mim e meu filho. Os ensinamentos permanecerão sempre comigo. Vocês são amor.

Ao amigo e orientador professor Dr. Wilton Rogério Lustrri, não há palavras que expressem minha gratidão, você é um exemplo que quero seguir, muito obrigada por seu apoio, compreensão, paciência e acompanhamento em cada etapa deste trabalho, sou imensamente grata por tudo.

Ao meu companheiro nessa vida Gustavo F. Aquaroni, obrigada pelo apoio, compreensão, por ter acreditado e me proporcionado essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Obrigada por me ajudar a realizar meus sonhos e objetivos. Eu te amo e sou grata por tudo que estamos construindo juntos.

À minha família e especialmente minha querida avó Elvide Michelin, meus amados pais José e Rosângela, e minha querida sogra Vera Aquaroni, que com o apoio de vocês e muito amor me proporcionaram sempre o melhor

e me ajudaram até esse momento. Grata por permitirem a realização de todos os meus sonhos.

Ao meu irmão, Muriel Fernando Simeí, você é um exemplo, eu tenho um imenso orgulho de você por tudo que faz por nossa família, por tudo que você sustenta com determinação. Simplesmente te amo incondicionalmente.

À querida amiga Maria Leonor B. Donadon, meus sinceros agradecimentos por todas as vezes que me ajudou, me escutou com paciência e respeito e me guiou com os melhores conselhos. Gratidão Manola pela sua amizade. Não fazemos amigos, reconhecemos.

As amigas que a vida me deu de presente, queridas sempre, Amanda Tobal Verro e Letícia Maria do Prado, muito obrigada por tudo e por proporcionarem dias leves e alegres.

Aos amigos de jornada, e especialmente meus queridos alunos e alunas de Iniciação Científica, companheiros de laboratório, a equipe grandiosa e excepcional, minhas amigas Silmara e Caroline, muito obrigada por todo auxílio e ajuda em diversos momentos dessa caminhada.

Agradeço imensamente ao professor Dr. Pedro P. Corbi por toda ajuda e parceria no desenvolvimento desse trabalho, sou imensamente grata por todo seu auxílio e orientação para conosco.

Ao amigo e parceiro de trabalhos, querido Dr. Douglas H. Nakahata, muito obrigada por toda a sua ajuda e orientação para comigo, agradeço todas as vezes que mesmo longe me ajudou. Sou imensamente agradecida por sua amizade.

À Professora Dra. Flávia Rezende Nogueira, muito obrigada por todo auxílio e parceria nesse trabalho e por seus ensinamentos que levarei comigo para sempre.

Ao Prof. Dr. Hernane Barud por seu auxílio e parceria em etapas de nossos trabalhos.

À amiga e co-orientadora Professora Dra. Eliane Trovatti, muito obrigada pelo seu auxílio e ensinamentos.

À minha querida amiga Sandra R. Pavanelli, meus agradecimentos por todo auxílio e sua atenção extrema.

À secretaria de pós-graduação por todo apoio, em todos os momentos que necessitei, ao professor e coordenador Dr. André Capaldo Amaral, gostaria de agradecer por todo auxílio e assessoria para com nós alunos do programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UNIARA.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal (PPG-MRQM) da UNIARA de Araraquara, por fornecer aos seus alunos do programa uma grande estrutura de ensino.

Ao apoio financeiro recebido pela agência de fomento desta pesquisa, a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) que me proporcionou a oportunidade de estudo.

À todos os funcionários da UNIARA, aos professores do PPG-MRQM, sempre solícitos em ajudar seus alunos, auxiliando nessa etapa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Aspectos Gerais.....	1
1.2 Complexos metálicos empregados no tratamento do câncer.....	2
1.3 Complexos metálicos antimicrobianos.....	3
1.4 Ligantes bioativos utilizados.....	7
1.4.1 Ácido 4-aminobenzóico (<i>p</i> ABA)	7
1.4.2 1-Hidroxibenzotriazol hidratado (HoBt)	8
1.4.3 Probenecida (PROB).....	10
2. OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.1 Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Materiais.....	11
3.1.1 Reagentes para a síntese dos complexos.....	11
3.1.2 Reagentes utilizados no teste de mutagenicidade (<i>Ames</i>).....	12
3.1.3 Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo de ensaios antimicrobianos e citotóxicos.....	12
3.1.4 Cepas bacterianas.....	12
3.1.5 Células.....	13
3.2 Métodos	14
3.2.1 Sínteses de complexos metálicos	14
3.2.1.2 Complexo de Ag(I) com ligante ácido 4-aminobenzóico (<i>p</i> ABA)	14
3.2.1.3 Complexo Ag(I) com o ligante hidroxibenzotriazol (HoBt).....	14
3.2.1.4 Complexo Ag(I) com ligante probenecida (PROB).....	15
3.2.2 Caracterização físico químicas dos complexos.....	15
3.2.2.1 Análise Elementar.....	15
3.2.2.2 Análise Termogravimétrica.....	15
3.2.2.3 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho.....	16
3.2.2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	16
3.2.2.5 Espectrometria de Massas de Alta Resolução	16
3.2.2.6 Difração de Raios X (DRX).....	17
3.2.2.7 Estratégia computacional para determinação da estrutura dos complexos..	17

3.2.2.7.1 Modelagem Molecular.....	17
3.2.3. Análises das atividades biológicas dos complexos.....	19
3.2.3.1 Método por difusão em disco.....	19
3.2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos obtidos.....	20
3.2.3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos obtidos sobre a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
3.2.3.4 Avaliação da viabilidade celular e atividade mutagênica dos complexos metálicos.....	22
3.2.3.4.1 Avaliação da viabilidade celular.....	22
3.2.4 Determinação dos índices de seletividade (IS).....	24
3.2.5 Avaliação de mutagênese.....	25
3.2.6. Ensaio de interação com DNA.....	27
3.2.7. Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Complexo Ag- <i>p</i> ABA.....	28
4.1.1 Caraterização do complexo Ag- <i>p</i> ABA.....	29
4.1.1.1 Difração de raios X de monocristais.....	29
4.1.1.2 Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear.....	31
4.1.1.3 Espectrometria de massas de alta resolução.....	35
4.2 Complexo Ag-PROB.....	36
4.2.1 Caraterização do complexo Ag-PROB.....	37
4.2.1.1 Análise termogravimétrica.....	37
4.2.1.2 Espectroscopia vibracionais de absorção na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR).....	37
4.2.1.3 Estratégia computacional para determinação da estrutura do complexo por modelagem Molecular	39
4.2.1.4 Espectrometria de massas de alta resolução.....	43
4.2.1.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	44
4.3 Complexo Ag-HoBt.....	47
4.3.1 Caraterização do complexo Ag-HoBt.....	48
4.3.1.1 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR).....	48

4.4. Atividades biológicas dos complexos metálicos Ag- <i>p</i> ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt.....	49
4.4.1 Atividade biológica de Inibição de Crescimento de Microrganismos por Difusão em discos dos complexos metálicos obtidos.....	49
4.4.2 Atividade Biológica de inibição de crescimento de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e <i>M. tuberculosis</i> por concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos obtidos	52
4.4.3 Atividade biológica de inibição de crescimento de microrganismos por determinação da CIM, de isolados clínicos e oportunistas pelo complexo Ag- <i>p</i> ABA.....	58
4.4.4 Atividade Antiproliferativa dos complexos metálicos Ag- <i>p</i> ABA e Ag-PROB sobre linhagens celulares normais e tumorais.....	61
4.4.4.1 Atividade Antiproliferativa dos complexos metálicos Ag- <i>p</i> ABA e Ag-PROB sobre a linhagens celulares normais.....	61
4.4.4.2 Atividade Antiproliferativa dos complexos metálicos Ag- <i>p</i> ABA e Ag-PROB sobre a linhagens celulares tumorais e índice de seletividade (IS).....	64
4.4.4.2.1 Atividade Antiproliferativa do complexo metálico Ag- <i>p</i> ABA sobre as linhagens celulares tumorais e índice de seletividade (IS).....	64
4.4.4.2.2 Análise da atividade antiproliferativa do complexo metálico Ag-PROB, PROB e AgNO ₃ sobre a linhagens celulares tumorais e índice de seletividade (IS).....	68
4.4.5 Atividade Mutagênica dos complexos metálicos Ag- <i>p</i> ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt.....	71
4.4.6 Ensaio de interação dos complexos metálicos Ag- <i>p</i> ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt com DNA plasmidial pGEX-4T1.....	77

4.4.7 Avaliação da Estabilidade dos complexos metálicos Ag-pABA, Ag-PROB e Ag-HoBt à exposição ao ar e luz	80
4.4.7.1. Ensaio antimicrobiano por difusão em disco após exposição dos complexos metálicos ao ar e luz.....	83
5. CONCLUSÕES.....	88
6. PERSPECTIVAS.....	89
7. REFERÊNCIAS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fórmula estrutural da sulfadiazina de prata.....	4
FIGURA 2. Fórmula estrutural do ácido 4-aminobenzóico (<i>p</i> ABA).....	8
FIGURA 3. Fórmula estrutural do 1-Hidroxibenzotriazol Hidratado (HoBt).....	9
FIGURA 4. Fórmula estrutural da Probenecida.....	10
FIGURA 5. Representação esquemática do teste de Ames	27
FIGURA 6. Visão molecular da estrutura do composto Ag- <i>p</i> ABA.....	30
FIGURA 7. Espectro de RMN de ¹ H do complexo (a) Ag- <i>p</i> ABA e ligante (b) <i>p</i> ABA em DMSO-d ⁶	32
FIGURA 8. Espectro de RMN de ¹³ C do complexo (a) Ag- <i>p</i> ABA e ligante (b) <i>p</i> ABA em DMSO-d ⁶	34
FIGURA 9. Gráficos de contorno ¹⁵ N- ¹ H HSQC RMN do complexo (a) Ag- <i>p</i> ABA e ligante (b) <i>p</i> ABA em DMSO-d ⁶	35
FIGURA 10. Espectros de massas de alta resolução do complexo Ag- <i>p</i> ABA e seus padrões isotópicos.....	36
FIGURA 11. Curva termogravimétrica do complexo Ag-PROB.....	37
FIGURA 12. Análise por FTIR do complexo metálico Ag-PROB.....	38
FIGURA 13. Estrutura do complexo Ag-PROB otimizado.....	41
FIGURA 14. Orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO) e de espaço para: (a) Ligante Probenecida (PROB) e (b) Complexo Ag-PROB.....	42
FIGURA 15. Espectro de massa do complexo Ag-PROB.....	43
FIGURA 16. Espectro de RMN de ¹ H (a) Complexo Ag-PROB e (b) Ligante	

PROB em DMSO-d ₆	44
FIGURA 17. Espectros de RMN de ¹³ C do complexo (a) Ag-PROB e ligante (b) PROB em DMSO-d ₆	45
FIGURA 18. Gráficos de correlação de { ¹³ C, ¹ H} 2D RMN: (a) HSQC e (b) HMBC do complexo Ag-PROB e (c) HSQC e (d) HMBC do ligante PROB. Os compostos dissolvidos em DMSO-d ₆ para este experimento.....	46
FIGURA 19. Análise por FTIR do complexo metálico Ag-HoBt.....	48
FIGURA 20. Capacidade de interação do complexo Ag- <i>p</i> ABA com o DNA plasmidial pGEX-4T1.....	77
FIGURA 21. Capacidade de Interação dos complexos Ag-PROB e Ag-HoBt com o DNA plasmidial pGEX-4T1.....	78
FIGURA 22. Discos de Ag- <i>p</i> ABA expostos ao ar / luz de 0 -120 horas.....	81
FIGURA 23. Discos de Ag-PROB expostos ao ar / luz de 0 -120 horas.....	81
FIGURA 24. Discos de Ag-HoBt expostos ao ar / luz de 0 -120 horas.....	81
FIGURA 25. Halos de inibição do complexo Ag- <i>p</i> ABA durante período de exposição ao ar e a Luz. A: 0-24 horas, B:24-48 horas, C:48-72 horas, D: 72-96 horas, E: 96-120 horas.....	84
FIGURA 26. Halos de inibição do complexo Ag-PROB durante período de exposição ao ar e a luz. A: 0-24 horas, B:24-48 horas, C:48-72 horas, D: 72-96 horas, E: 96-120 hora.....	85
FIGURA 27. Halos de inibição do complexo Ag-HoBt durante período de exposição ao ar e a Luz. A: 0-24 horas, B:24-48 horas, C:48-72 horas, D: 72-96 horas, E: 96-120 horas.....	86

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Dados cristalográficos da estrutura do complexo Ag- <i>p</i> ABA.....	30
TABELA 2. Atribuição de sinal de RMN de ¹ H do ligante <i>p</i> ABA e complexo Ag- <i>p</i> ABA.....	32
TABELA 3. Modos vibracionais atribuídos ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo C=O.....	39
TABELA 4. Valores de parâmetros topológicos para complexo Ag-PROB.	41
TABELA 5. Atribuição de sinais de RMN de ¹ H do ligante PROB e complexo Ag-PROB.....	45
TABELA 6. Atribuição de sinais de RMN de ¹³ C do ligante PROB e complexo Ag-PROB.....	46
TABELA 7. Atividade biológica de Inibição de Crescimento de Microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> dos complexos metálicos Ag- <i>p</i> ABA, Ag-PROB, Ag-HoBt, e sal de partida AgNO ₃	50
TABELA 8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos metálicos e AgNO ₃ sobre cepas de Microrganismos <i>S.aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B.cereus</i> , <i>P.aeruginosa</i> e <i>M. Tuberculosis</i> H37Rv em mmol·L ⁻¹	53
TABELA 9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do complexo Ag- <i>p</i> ABA sobre os microrganismos cepas multirresistentes de Isolados Clínicos Uropatogênicos de <i>E. coli</i> (ECUP) EC958, UTI89, CFT073, BR43 e BR64, patógeno oportunista <i>P. aeruginosa</i> PAO1, patógeno diarrenogenico e enterohemorrágico de <i>E. coli</i> 86-24 (ECEH) O157:H7, Enteroagregativo de <i>E. coli</i> (EAEC) O104:H4 e <i>S. Typhimurium</i> SL1344 em mmol·L ⁻¹	59
TABELA 10. Índice de citotoxicidade (IC ₅₀) sobre linhagens celulares de macrófagos murinos (J774A.1), fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5), fibroblastos não transformantes (GM) queratinócitos (HaCat) e endotélio vascular de cordão umbilical	

(HUV-EC) do sal AgNO_3 , Ag-pABA , Ag-PROB e ligantes $p\text{ABA}$ e PROB . Os valores são obtidos da média.....62

TABELA 11. Análise da atividade antiproliferativa do complexo metálico Ag-pABA , $p\text{ABA}$ e AgNO_3 em $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a linhagens celulares tumorais selecionadas.....64

TABELA 12. Índice de seletividade (IS) do sal de partida AgNO_3 , Ag-pABA e $p\text{ABA}$ calculado como $\text{IC}_{50}(\text{HaCat}) / \text{IC}_{50}(\text{linhagem de células tumorais})$65

TABELA 13. Análise da atividade antiproliferativa do complexo metálico Ag-PROB , PROB e AgNO_3 em $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a linhagens celulares tumorais selecionadas.....69

TABELA 14. Índice de Seletividade (IS): $\text{IC}_{50}(\text{células normais}) / \text{IC}_{50}(\text{células tumorais})$ do complexo Ag-PROB sobre o painel celular analisado.....70

TABELA 15. Revertentes / placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* após tratamento com várias concentrações de Ag-pABA , com ativação (+ S9) e sem ativação (-S9) metabólica.....74

TABELA 16. Revertentes / placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* após tratamento com várias concentrações de Ag-PROB , com ativação (+ S9) e sem ativação (-S9) metabólica.....75

TABELA 17. Revertentes / placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* após tratamento com várias concentrações de Ag-HoBt , com ativação (+ S9) e sem ativação (-S9) metabólica.....76

TABELA 18. Perfis de sensibilidade do Microrganismo *S.aureus* aos complexos Ag-pABA Ag-PROB e Ag-HoBt após período de exposição de 0 a 120 horas.....83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AgNO₃ : Nitrato de prata

Ag-*p*ABA: Complexo de Prata(I) com ácido 4-aminobenzóico

Ag-PROB: Complexo de Prata(I) com probenecida

Ag-HoBt: Complexo de Prata(I) com Hidroxibenzotriazol

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Brain-heart infusion

CIM: Concentração Inibitória mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DP: Desvio padrão

ERO: Espécies reativas de oxigênio

EtOH: Etanol (Álcool etílico)

HCl: Acido clorídrico

HoBt: Hidroxibenzotriazol Hidratado

HSQC: Coerência quântica única heteronuclear

IS: Índice de seletividade

IM: Índice de mutagêneses

MeOH: metanol (Álcool metílico)

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão fosfato salina

*p*ABA: 4-aminobenzoico ácido

PROB: Probenecida

RPMI1640: Roswell Park Memorial Institute Medium 1640

RMN: Ressonância magnética Nuclear

UFC: Unidade formadora de colônia

USP: *United States Pharmacopeia*

UV-vis: Ultra-violeta visível

RESUMO

Complexos metálicos têm sido utilizados, desde épocas remotas, em medicina, para tratamento de várias doenças como, por exemplo, a auranofina, utilizada no tratamento da artrite reumatoide e a sulfadiazina de prata, utilizada topicamente para tratamento e prevenção de infecções bacterianas, e os complexos metálicos de platina, como a cisplatina, para o tratamento do câncer. Entretanto, tem-se relatado a ocorrência de infecções por espécies bacterianas e tipos de câncer resistentes aos fármacos atualmente disponíveis. Com a proposta para ampliar o arsenal terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas e câncer, o presente trabalho teve como objetivos a síntese e caracterização, por técnicas de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise elementar (AE), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e análise por difração de Raios-X (DRX), de complexos metálicos de prata(I) (Ag) com os ligantes bioativos ácido 4-aminobenzóico (*p*ABA), probenecida (PROB) e hidroxibenzotriazol hidratado (HoBt), bem como a análise, *in vitro*, da atividade inibitória de crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e *Mycobacterium tuberculosis*, por difusão em discos e determinação da concentração inibitória mínima (CIM), atividade antiproliferativa, sobre linhagens de células tumorais e não tumorais, a análise do potencial mutagênico e a determinação da capacidade de interação com DNA. Os complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt, obtidos e caracterizados, apresentaram atividade inibitória de crescimento sobre todas as espécies bacterianas testadas e não apresentaram atividade mutagênica. Foram obtidos mono cristais apenas do complexo Ag-*p*ABA, o qual também apresentou atividade antiproliferativa sobre um painel de oito tipos de células tumorais, com significativo índice de seletividade. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade de todos os complexos obtidos para aplicação em medicina, para o tratamento de infecções bacterianas e do complexo Ag-*p*ABA também para o tratamento de alguns tipos de câncer.

Palavras-chave: Complexos metálicos, síntese, ligantes bioativos.

ABSTRACT

Metal complexes have been used, since remote times, in medicine, for the treatment of various diseases, such as auranofin, used in the treatment of rheumatoid arthritis and silver sulfadiazine, used topically for the treatment and prevention of bacterial infections, and platinum metal complexes, such as cisplatin, for the treatment of cancer. However, infections by bacterial species and types of cancer resistant to the drugs currently available have been reported. With the proposal to expand the therapeutic arsenal for the treatment of bacterial infections and cancer, the present work aimed at the synthesis and characterization, by spectroscopy techniques in the infrared region by Fourier transform (FTIR), elementary analysis (AE), nuclear magnetic resonance (NMR), high resolution mass spectrometry (EMAR) and X-ray diffraction (XRD) analysis of silver (I) (Ag) metal complexes with the bioactive ligands 4-aminobenzoic acid (*p*ABA), probenecid (PROB) and hydrated hydroxybenzotriazole (HoBt), as well as the *in vitro* analysis of the growth inhibitory activity of Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*, by diffusion in discs and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), antiproliferative activity, on tumor and non-tumor cell lines, analysis of mutagenic potential and determination of the ability to interact with DNA. The Ag-*p*ABA, Ag-PROB and Ag-HoBt complexes, obtained and characterized, showed growth inhibitory activity on all tested bacterial species and did not show mutagenic activity. Mono crystals were obtained only from the Ag-*p*ABA complex, which also showed antiproliferative activity on a panel of eight types of tumor cells, with a significant selectivity index. The results obtained demonstrate the potential of all complexes obtained for application in medicine, for the treatment of bacterial infections and for the Ag-*p*ABA complex also for the treatment of some types of cancer.

Keywords: Metal complexes, synthesis, and bioactive ligands.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos Gerais

Os primeiros relatos da utilização terapêutica de complexos com metais de transição em medicina datam do século XVI. No final dos anos 1960, as atividades antitumorais da cisplatina foram relatadas por Rosenberg, na década de 1970, começou a ser utilizada em todo o mundo no tratamento de vários tipos de câncer, principalmente de testículos, ovários, cabeça e pescoço. Desde sua descoberta os complexos de platina surpreenderam pesquisadores em virtude de sua eficiência na inibição da proliferação de vários tipos de tumores (1–3). Entretanto, outros estudos descrevem complexos metálicos com significativa atividade antimicrobiana (4–8), como a arsfenamina (Salvarsan®), sulfadiazina de prata, utilizada no tratamento e prevenção de lesões por queimaduras (9,10). Outro exemplo de complexo metálico de ouro é a auranofina (Ridaura®) empregado no tratamento da artrite (9,11).

Neste contexto, o planejamento e desenvolvimento de novos complexos metálicos com ligantes bioativos, mais eficientes e seguros para a utilização por seres humanos, despertam grande interesse na área da química medicinal, por possuírem vários números de coordenação e geometrias variadas que oferecem grande diversidade estrutural para o fármaco projetado e muitas propriedades que podem ser modificadas para um uso específico (9,12–14).

Assim, a busca de novos complexos metálicos com ligantes bioativos, para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes e seguros para a utilização por seres humanos e estudos *in vitro* e *in vivo*, para determinação e compreensão dos mecanismos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e moleculares de ação constitui uma abordagem de grande interesse na área da química medicinal.

1.2 Complexos metálicos empregados no tratamento do câncer

A resistência à terapia antitumoral continua sendo o principal fator limitante no tratamento de pacientes com câncer (15). O uso da quimioterapia no tratamento do câncer tem sido o foco de muitos estudos nas últimas quatro décadas. O desenvolvimento de compostos inorgânicos, principalmente contendo metais, foi muito limitado até a demonstração, por Rosenberg e colaboradores (16), da atividade antitumoral de um complexo de platina, a cisplatina. Assim, introduzida em aplicações clínicas há muito tempo, os compostos de platina são ainda uma das principais classes de agentes utilizados na quimioterapia para o câncer (17,18), principalmente no tratamento de determinados tipos de tumores, como, por exemplo, de testículo, cabeça e ovário sendo seu principal mecanismo de ação relacionado a interações com DNA e a formação de ligações cruzadas intra e interfitas, que causa distorção da dupla hélice do DNA e por fim um processo de lesões celulares que resultam na inibição da sua replicação, causando a morte celular (19,20).

Dentre esses complexos, compostos baseados na estrutura da cisplatina podem ser citados, como exemplos, a carboplatina, a oxaliplatina, a nedaplatina e a lobaplatina, que também apresentam especial destaque no tratamento de diversos tipos de tumores, como para tratamento de cânceres de ovário, cabeça, pescoço, testículo, bexiga e pulmão (1–3,21).

Complexos de Cu(II), conhecidos como Casiopeínas® demonstraram promissora atividade antineoplásica sobre células tumorais *in vitro* e tumores e *in vivo*, promovendo a degradação do DNA e a morte celular por apoptose (9,22,23).

Outros exemplos podem ser citados, como complexos N-heterocíclicos de carbeno que apresentaram toxicidade sobre linhagens celulares de carcinoma pulmonar (A549), carcinoma colorretal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama

(MCF-7) (24), compostos de platina(II) e Ag(I) com acesulfame biologicamente ativos, apresentam atividade antitumoral (25) e complexo de paládio(II) sobre células de adenocarcinoma gástrico (26).

A coordenação da prata a ligantes bioativos em potencial é uma grande alternativa para possíveis aplicações clínicas desses compostos, possibilitando o seu uso como promissores agentes antitumorais, pois exibem atividades citotóxicas interessantes, bem como uma diversidade de geometrias de coordenação, com ligantes doadores de O, N, S e P (27–29).

1.3 Complexos metálicos antimicrobianos

A descoberta e desenvolvimento de antibióticos pode ser considerada algumas das conquistas mais significativas da ciência moderna (30). Dentre os metais mais utilizados como antimicrobianos, o cobre e a prata se destacam. Desde os tempos antigos, utiliza-se da prata para fins medicinais. No entanto relatos mais consistentes e descritivos se iniciam na idade média, com o uso de objetos de prata metálica em cirurgias e posteriormente o uso de nitrato de prata no tratamento de ferimentos e queimaduras (9).

Embora a prata tenha sido extensivamente utilizada como um composto antimicrobiano eficaz no combate às infecções, a prata de uso tópico em feridas, queimaduras e úlceras crônicas, mesmo em baixas concentrações em curativos, cremes e soluções, levam a atividade tóxica para células de queratinócitos e fibroblastos, e podem apresentar efeitos adversos locais, como processo pró inflamatório devido a limitação de espécies de prata liberadas, falta de penetração e presença de nitrato as bases de cremes, além de outros problemas como manchas e

desequilíbrio eletrolítico afetando negativamente a cicatrização de feridas (31–34), pois a prata é tóxica e altamente reativa com a pele (9,31).

Fox e Modak (35) investigaram os efeitos sobre queimaduras e a atividade antimicrobiana de combinações de diversas sulfonamidas, como a sulfadiazina, um ligante da classe das sulfonamidas, com o nitrato de prata. Esta investigação culminou no desenvolvimento da sulfadiazina de prata (Figura 1), sendo esse composto amplamente utilizado para tratar e prevenir o desenvolvimento de infecções bacterianas em queimaduras de pele, mantendo a atividade antimicrobiana sem apresentar efeitos adversos nas feridas (31,36).

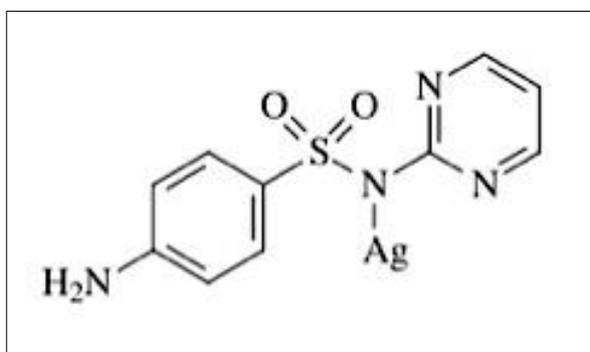


Figura 1. Fórmula estrutural da sulfadiazina de prata.

Fonte: Topalã e colaboradores (37).

A utilização de sulfonamidas complexadas ao íon prata trouxe novas perspectivas a química inorgânica medicinal, pois seu potencial antibacteriano relatado é maior em comparação ao uso de sulfonamidas individualmente (38).

Como agente antibacteriano, foi demonstrado que os íons Ag(I) interagem com o DNA, interfere em enzimas essenciais que causam rompimento da parede celular, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e causam assim disfunções mitocondriais (39,40).

Na literatura, encontram-se poucas informações em relação à resistência microbiana à prata, porém algumas cepas resistentes foram isoladas após uso a longo

prazo da sulfadiazina de prata (41), por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, que apresenta resistência à prata produzindo um metabólito redox ativo piocianina que reduz Ag^+ a Ag^0 , não tóxico(42). A vantagem da utilização da prata em comparação com outros metais é que o corpo humano pode tolerar a presença de prata em doses baixas sem efeitos tóxicos (43).

Seguindo nesta abordagem, a obtenção de complexos com outros metais, com sulfonamida, foi estudada e os compostos apresentaram resultados antimicrobianos promissores, como ouro(I) com sulfametoxazol (37,44), Ni(II) com sulfisoxazol, sendo esse quatro vezes mais ativo em comparação ao ligante livre e ao íon Ni(II) (37,45).

Outros complexos metálicos de prata também podem ser citados devido a seu potencial antimicrobiano, como complexos de prata(I) com os aminoácidos glicina, asparagina e ácido aspártico, que demonstraram um amplo espectro de atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* e Gram – positivas como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, bem como sobre as leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (46). Trabalhos realizados com complexos de prata(I) com os ligantes N-acetil-L-cisteína e nimesulida, sobre bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa* e positiva como *S. aureus* descreveram a efetiva atividade inibitória de crescimento, *in vitro* sobre várias cepas bacterianas (4,12), sulfadoxinato (4,47), penicilamina (5), sobre Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*, triptofano (48,49), sobre cepas bacterianas Gram-negativas de *E. coli* e *P. aeruginosa* e positivas como *S. aureus* e *E. faecalis*, sulfatiazol e sulfametoxazol (6) sobre as cepas bacterianas Gram – negativas, como *P. aeruginosa* e *Salmonella enterica* e positiva como *S. aureus*, e furosemida sobre Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* e positiva como *S. aureus* (1,7). Outros

estudos descrevem a atividade antibacteriana, sobre espécies Gram-negativas *P. aeruginosa*, *E. coli* e Gram-positiva *S. aureus*, de complexos de ouro(I) com N-acetil-L-cisteína (1), com mercaptotiazolina (4) e ibuprofeno (50).

O uso de complexos de prata(I) contendo os ligantes carbeno N-heterocíclico e cumarina apresentaram efeito inibitório sobre cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. A avaliação do mesmo complexo quanto à atividade antifúngica apresentou a inibição do crescimento de *C. albicans* (51).

Também é descrita na literatura a atividade antibacteriana de complexos de ouro(I) contendo ligantes heterocíclicos N-doadores e trifenilfosfina que apresentaram atividade seletiva sobre as bactérias *B. subtilis* e *S. aureus* (52). Complexos de ouro (III) com ligantes heterocíclicos N-doadores e trifenilfosfina apresentaram atividade seletiva sobre as bactérias *B. subtilis* e *S. aureus* e bactéria *Streptococcus pneumoniae* (52,53).

O ligante ácido 3-carboxicumarina e metais de Cd(II), Cu(II), Ni(II), Pd(II) e Zn(II) submetidos a avaliação da atividade antibacteriana para cepas Gram-positivas (*S. pneumoniae*, *B. subtilis* e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella Typhi*) resultaram na inibição do crescimento das cepas Gram-positivas de forma mais expressiva em comparação com as Gram-negativas (54).

Segundo Guerra et al. (55), os complexos de paládio(II) com tetraciclina apresentaram atividade antibacteriana tão eficaz quanto a tetraciclina livre na inibição do crescimento de duas cepas de *E. coli* sensíveis e sendo mais potente do que a tetraciclina livre contra a espécie de *E. coli* HB101/pBR322, uma variedade resistente à tetraciclina. Também, complexos de paládio(II) e platina(II) com bases de Schiff

bioativas, demonstraram a atividade antibacteriana desses complexos sobre as espécies bacterianas *E. coli* e *P. cepacicola* (55,56).

É evidente, portanto, que a combinação dos metais com ligantes específicos é capaz de reduzir a toxicidade dos mesmos, além de atribuir propriedades benéficas aos complexos sintetizados, tanto no diagnóstico quanto no tratamento de doenças (13). O fato de os complexos metálicos serem extensivamente aplicados ao tratamento de várias doenças em todo o mundo faz com que o conhecimento e a compreensão de suas propriedades químicas e farmacológicas sejam alvo de estudos que visam o desenvolvimento de terapias medicamentosas cada vez mais eficazes e seguras ao organismo humano (57).

Os dados obtidos dos trabalhos citados anteriormente justificam a relevância do desenvolvimento de estudos para a síntese de novos complexos à base de metais para a utilização como agentes antibacterianos e antitumorais.

1.4 Ligantes bioativos utilizados

Neste trabalho foram selecionados três ligantes bioativos diferentes, como o ácido 4-aminobenzóico (*p*ABA), 1- hidroxibenzotriazol hidratado e probenecida para a síntese de complexos de prata e avaliação das atividades biológicas, como atividade antimicrobiana e antitumoral.

1.4.1 Ácido 4-aminobenzóico (*p*ABA)

O ácido *p*ABA desempenha papéis importantes em uma ampla variedade de processos metabólicos, sendo um substrato essencial da enzima di-hidropteroato sintase para a via biossintética do ácido fólico em bactérias. Segundo Wang (58) o *p*ABA, Figura 2, é importante para crescimento bacteriano pois é utilizado como precursor de purinas e pirimidinas, essenciais para a síntese de DNA e RNA

bacteriano (59) e foi identificado como um precursor de coenzima Q, abrindo novas possibilidades para sua aplicação em medicina (60,61).

O interesse em compostos carboxilados, mais especificamente os derivados ácidos benzóicos, ocorre devido às suas propriedades químicas podendo ser considerados ligantes versáteis para coordenação á íons metálicos pelos grupos carboxílicos e ou/amino (58,62,63).

O *p*ABA constitui um ligante versátil que pode ser coordenados por íons de metais de transição tanto pelo grupo carboxilato quanto pelo grupo amina ou até ambos ao mesmo tempo, dependendo do metal utilizado na síntese (64).

Guedes, et al. (64), em trabalho realizado de síntese de um composto monomérico de cobre(II), no qual o íon metálico coordena duas moléculas *p*ABA, relataram que os grupos carboxílicos são importantes para o conformação estrutural da molécula, sendo o ligante responsável pelo caráter polimérico estabelecido.

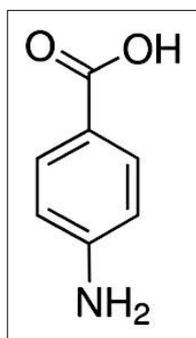


Figura 2. Fórmula estrutural do ácido 4-aminobenzóico (*p*ABA)

Fonte: GUEDES e colaboradores (64).

1.4.2 1-Hidroxibenzotriazol hidratado (HoBt)

Os compostos que contém anéis azóis presentes na molécula possuem uma grande variedade de coordenação por íons metálicos. Apenas alguns complexos são

descritos na literatura com o derivado benzotriazol, não sendo encontrado relatos de complexos com o íon metálico prata(I) (65).

A estrutura molecular do HoBt (Figura 3) mostra um substituinte de hidroxila do hidrogênio (H) que se liga ao nitrogênio (N) do anel de azol, e o átomo de oxigênio (O) da hidroxila e dois átomos de nitrogênio (N) do anel de azol são responsáveis pela coordenação com íons metálicos. Sendo um ligante composto com anel azol na molécula têm uma ampla variedade de modos de coordenação e capacidade de ligação com íons metálicos de transição ao átomo de oxigênio (O) na hidroxila e o átomo de nitrogênio (N) do anel azol, mostram que a HoBt pode fornecer vários pontos de coordenação formando complexos sob condições adequadas de síntese (65).

Hammud e colaboradores (66) estudaram a complexação do ligante HoBt com diferentes metais, como cobalto (II), cobre(II), níquel(II) e ferro(III), e a formação de polímeros de coordenação com os diferentes metais. Em conclusão, o ligante 1-hidroxitriazol (HoBt) mostrou ser um ligante importante, uma vez que possui uma química de coordenação rica especificamente em formar polímeros e se agrupar, também com propriedades magnéticas interessantes.

A estrutura química do HoBt possibilita sua utilização como um ligante bioativo para a síntese de complexo com metal prata (I) proposto nesse trabalho.

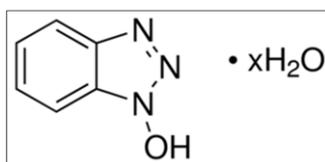


Figura 3. Fórmula estrutural do 1-hidroxibenzotriazol hidratado (HoBt)

Fonte: ZHONG-QIANG e colaboradores (65).

1.4.3 Probenecida (PROB)

A probenecida, 4-(di-*n*-propilsulfamila)-benzoico (Figura 4), uma sulfonamida lipossolúvel é um dos principais medicamentos uricosúricos utilizados no tratamento da gota úrica, atua como um inibidor da enzima xantina oxidase diminuindo a produção de ácido úrico (67,68).

A probenecida não apresenta atividade antibacteriana ou antitumoral, sendo empregado em combinações para aumentar as concentrações plasmáticas de medicamentos como penicilina e fármacos antirretrovirais, alterando seu comportamento farmacocinético, prolongando os efeitos desses fármacos (68–70). A estrutura química da probenecida possibilita a sua utilização como ligante bioativo para a síntese de complexos metálicos, assim como o *p*ABA, é ligante versátil em química de coordenação, podendo se coordenar a íons de metais de transição pelo grupo carboxílico.

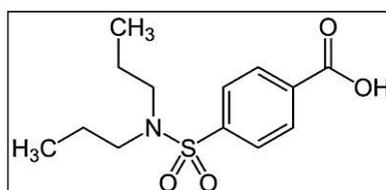


Figura 4. Fórmula estrutural da probenecida (PROB)

Fonte: ROBBINS e colaboradores(71).

2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos a síntese, caracterização, análise da atividade antibacteriana, citotóxica, mutagênica e a determinação da capacidade de interação com DNA dos complexos metálicos Ag(I) com os ligantes bioativos ácido *p*ABA, PROB e HoBt.

2.1 Objetivos específicos

- Síntese e caracterização dos novos complexos de Ag(I) com os ligantes bioativos *p*ABA, PROB e HoBt;
- Otimização das técnicas de síntese em relação aos valores de pH ideais;
- Avaliação da solubilidade dos complexos de prata obtidos em solventes distintos como dimetil sulfóxido (DMSO), água e metanol;
- Caracterização dos novos complexos obtidos utilizando as técnicas instrumentais de análise elementar (AE), espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{15}N , espectrometria de massas de alta resolução e análise térmica (TGA);
- Avaliação da ação inibitória, *in vitro*, por testes de difusão em discos, dos complexos obtidos, dos ligantes livres, sais de partida e fármaco antimicrobiano rifampicina de uso clínico, sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos que apresentaram atividade antibacteriana por difusão em discos;
- Avaliação da viabilidade celular e atividade mutagênica e determinação da capacidade dos complexos metálicos sintetizados interagirem com DNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes para a síntese dos complexos

Os ligantes *p*ABA, PROB e HoBt, nitrato de prata (AgNO_3) (99%), utilizados no presente trabalho foram adquiridos dos laboratórios Sigma Aldrich[®], Acros[®],

Fluka[®] e LKTlabs[®]. Hidróxido de Potássio (KOH) (85%) foi adquirido da Sigma Aldrich[®].

3.1.2 Reagentes utilizados no teste de Mutagenicidade (Ames)

Os reagentes utilizados no teste de *Ames*, DMSO, sal de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, D-glicose-6-fosfato, cloreto de magnésio, L-histidina mono-hidratada, D-biotina, 4-nitro-o-fenilenodiamina, azida de sódio, mitomicina C, 2-antramina e 2-aminofluorina foram adquiridos da Sigma Aldrich[®]. Os meios de cultivo utilizados nos ensaios de mutagenicidade e os reagentes ácido cítrico monoidratado, fosfato de potássio dibásico anidro, fosfato de amônio monobásico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e cloreto de sódio foram adquiridos dos laboratórios Merck[®]

3.1.3 Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo de ensaios antimicrobianos e citotóxicos

Rifampicina, ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (Sigma Aldrich[®]), Resazurina, Sabouraud dextrose líquido (SD) (Kasv[®]) e meio de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco[®]), RPMI, DMEM e soro bovino fetal (VitroCell[®]).

3.1.4 Cepas bacterianas

As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 27853) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579), utilizadas nos ensaios foram obtidas da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello. A cepa de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, do Laboratório de

Pesquisa em Tuberculose da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP de Araraquara. As cepas protótipos de *Escheriachia coli* uropatogênica (UPEC) EC958, UTI89, CFT073, e dois isolados clínicos brasileiros denominados BR43 e BR64, patógenos oportunistas *P. aeruginosa* PAO1, patógenos diarreioagênicos como *E. coli* enterohemorrágica 86-24 (EHEC O157: H7) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC O104: H4) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Cristiano Gallina Moreira, coordenador do Laboratório PASIQUIBAC, também da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP de Araraquara.

3.1.5 Células

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido utilizando linhagens de células tumorais humanas: A549 (Adenocarcinoma pulmonar (ATCC CCL-185), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano (ATCC HB-8065), Hela (Adenocarcinoma cervical humano (ATCC CCI-2), MCF-7 (adenocarcinoma de Mama (ATCC HTM-22), U251 (glioma), NCI-ADR / RES (fenótipo expressivo de ovário de múltipla resistência a fármacos), 786-O (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (adenocarcinoma do cólon) e K-562 (leucemia mielóide crônica), fornecidas pelo centro Frederick Cancer Research & Development, National Cancer Institute, Frederick, MA, EUA e pela Profa. Flávia Ap. Resende Nogueira obtidas dos Laboratórios de Micobacteriologia e Laboratório de Mutagênese da FCF - UNESP, Araraquara. Também foram utilizadas células não tumorais da linhagem HaCat (queratinócito humano) fornecido pelo Dr. Ricardo Della Coletta (Universidade de Campinas, UNICAMP, Brasil) e linhagens celulares não tumorais, MRC-5 (células normais derivadas de tecido pulmonar humano (ATCC CCL-171) e J774A.1 (macrófagos murinos (ATCC TIB-67) fornecidas pelo Prof. Dr. Fernando Rogério

Pavan (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil), e células GM (fibroblastos não transformados (17 YR) e HUV-EC-C [HUVEC] (cordão umbilical-endotélio vascular (ATCC CLR 1730) fornecidas pela Profa. Flávia Ap. Resende Nogueira para os ensaios de Citotoxicidade.

3.2 Métodos

3.2.1 Sínteses de complexos metálicos

3.2.1.2 Complexo de Ag(I) com ligante *p*ABA

O complexo foi sintetizado pela reação de 10 mL de solução aquosa 1 mmol (0,137 g) de *p*ABA e 1 mmol (0,0549g) de KOH (pH ideal 8) com 2 mL de uma solução aquosa contendo 1mmol (0,1699 g) AgNO₃. A síntese foi realizada sob agitação constante, a temperatura ambiente. Após 2 horas de reação, um precipitado branco foi obtido e separado por filtração utilizando filtro de papel Whatman®, lavado com água destilada gelada e armazenado por 24 horas na estufa com temperatura entre 35°C e 37°C e ao abrigo da luz. O complexo referido como Ag-*p*ABA foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo da luz até o momento do uso. Cristais simples adequados para estudos de difração foram obtidos por evaporação lenta do filtrado da síntese.

3.2.1.3 Complexo Ag(I) com o ligante HoBt

O complexo foi sintetizado pela reação de 10 mL de solução metanólica 1 mmol (0,135 g) de HoBt e 1 mmol (0,0549g) de KOH (pH ideal 5) com 2 mL de uma solução aquosa contendo 1mmol (0,1699 g) de AgNO₃. A síntese foi realizada sob agitação constante, a temperatura ambiente. Após 2 horas de reação, um precipitado branco foi obtido e coletado por filtração utilizando filtro de papel Whatman®, lavado

com água destilada gelada e armazenado por 24 horas na estufa com temperatura entre 35°C e 37°C e ao abrigo da luz. O complexo denominado Ag-HoBt foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo da luz até o momento do uso. Não foram obtidos monocristais do complexo Ag-HoBt.

3.2.1.4 Complexo Ag(I) com ligante PROB

O complexo foi sintetizado pela reação de 10 mL de solução metanólica 1 mmol (0,285 g) de PROB e 1 mmol (0,0549g) de KOH (pH ideal 8) com 2 mL de uma solução aquosa contendo 1 mmol (0,1699 g) de AgNO₃. A síntese foi realizada sob agitação constante, a temperatura ambiente. Após 2 horas de reação, um precipitado branco foi obtido e separado por filtração utilizando filtro de papel Whatman®, lavado com água destilada gelada e armazenado por 24 horas na estufa com temperatura entre 35°C e 37°C e ao abrigo da luz. O complexo denominado de Ag-PROB foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo da luz até o momento do uso. Não foram obtidos monocristais do complexo Ag-HoBt.

3.2.2 Caracterização físicoquímicas dos complexos

3.2.2.1 Análise Elementar

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um equipamento Perkin-Elmer modelo 2400 CHNS/O.

3.2.2.2 Análise Termogravimétrica

Os estudos por análise termogravimétrica (TGA) foram realizados em um termoanalisador TGA SDT Q600 da TA Instruments com cadinho de alumina e

utilizando um fluxo de ar de $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ em atmosfera de oxigênio e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ em uma faixa de 25°C a 900°C . As curvas foram analisadas com o software CurTiPot 3.6.1. Estes estudos foram realizados em colaboração o prof. Dr. Hernane da Silva Barud, do laboratório de Biopolímeros e Biomateriais-BioPolMat da Universidade de Araraquara - UNIARA.

3.2.2.3 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Para a obtenção de espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos sintetizados as amostras foram analisadas em um espectrômetro FTIR Cary 630 Agilent, no laboratório de Celulose Bacteriana e Química Medicinal – CBQUIM da Universidade de Araraquara-UNIARA usando o acessório EasiDiff (Pike Technology) de reflectância difusa em uma faixa de $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ com resolução de 4 cm^{-1}

3.2.2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear em solução (RMN) de ^{13}C , ^1H e ^{15}N (unidimensionais e bidimensionais) foram obtidos utilizando-se os equipamentos Bruker 400 MHz e 500 MHz. Os espectros de ^{13}C foram adquiridos desacoplados. Estes estudos foram realizados em colaboração o prof. Dr. Pedro Paulo Corbi, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

3.2.2.5 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

As análises dos espectros de massa foram realizadas em um instrumento Xevo QToF MS, analisador de tempo em quadrupolo por ionização e eletropulverização de

alta resolução. Estes estudos foram realizados em colaboração o prof. Dr. Pedro Paulo Corbi, do Instituto de Química da UNICAMP.

3.2.2.6 Difração de raios X (DRX)

Os dados de difração de raios X de monocristais foram obtidos em um difratômetro Bruker Apex II CCD com radiação de cobre monocromado de grafite K_{α} ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). As dimensões das celas unitárias e matrizes de orientação foram determinadas pelo refinamento dos mínimos quadrados das reflexões obtidas por varredura θ - χ . Os dados foram indexados e escalonados com ApexII Suite. Bruker (2010) (72), SAINT e SADABS foram utilizados para integrar os dados e para correção da absorção, respectivamente. A estrutura foi resolvida com ShelXT usando métodos diretos e refinada com ShelXL em Olex2 (72,73). Todos os átomos não hidrogênicos foram refinados anisotropicamente e átomos de hidrogênio foram adicionados em posições idealizadas e refinados de acordo com o modelo de equitação. Gráficos moleculares foram obtidos usando Mercury (v. 3.9). Estes estudos foram realizados em colaboração o prof. Dr. Pedro Paulo Corbi, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

3.2.2.7 Estratégia computacional para determinação da estrutura dos complexos

3.2.2.7.1 Modelagem Molecular

As estruturas do ligante PROB e do complexo Ag-PROB foram otimizadas ao mínimo de energia usando a teoria do funcional da densidade (DFT) com o funcional híbrido M06-2X. O modelo inicial usado para o complexo foi baseado nos resultados das caracterizações espectroscópicas. O conjunto de funções de base 6-31+G(d,p) foi usado para os átomos de H, S, N e O, enquanto o conjunto LANL2DZ foi usado para

a prata. Para confirmar que as estruturas otimizadas estavam em seu mínimo de energia, cálculos de frequência foram realizados e nenhuma frequência imaginária foi encontrada. Para corrigir o erro associado com as frequências harmônicas do método, o fator de escala de 0.952 foi usado. Todos os cálculos foram realizados com o programa Gaussian 09. As estruturas foram geradas usando o programa Gauss View 5.09. Para caracterizar a ligação química do ligante ao metal e para entender a natureza da ligação, análises fundamentadas na teoria quântica de átomos em moléculas, QTAIM, foram realizadas. As análises topológicas das moléculas foram realizadas usando a teoria QTAIM no nível M06-2X/6-31+G(d,p)/LANL2DZ, no pacote AIMALL. Em uma análise QTAIM, pode-se descrever a natureza da ligação ou interação por alguns parâmetros como a densidade eletrônica ($\rho(r)$), Laplaciano da densidade eletrônica ($\nabla^2\rho(r)$), energia cinética ($G(r)$), energia potencial ($V(r)$) e energia eletrônica total ($H(r)$), sendo $H(r) = G(r)+V(r)$. De acordo com a QTAIM, quando dois átomos interagem, um caminho de ligação é formado. A formação dessas trajetórias de gradiente de densidade se origina de um ponto entre dois átomos, conhecido como o ponto crítico de ligação. As propriedades analisadas nesses pontos fornecem informações relacionadas às características da ligação. Valores negativos de ($\nabla^2\rho(r)$) indicam ligações covalentes, enquanto valores positivos indicam interações intermoleculares. Além disso, a razão entre o valor de energia cinética $G(r)$ e potencial $V(r)$ no ponto crítico é usado para caracterizar a natureza da ligação. Estes estudos foram realizados em colaboração o prof. Dr. Douglas Henrique Pereira, do Programa de Química da Universidade Federal do Tocantins.

3.2.3 Análises das atividades biológicas dos complexos

3.2.3.1 Método por difusão em disco

O teste de sensibilidade das cepas de bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922) e cepas Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923 e *B. cereus* ATCC 14579) foi realizado utilizando técnica de difusão em discos seguindo método CLSI, 2017 (74,75). As cepas ATCC foram inoculadas em tubos contendo 2,0 mL de caldo BHI estéril até a turbidez igual a escala 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e incubadas durante 18 h a 35-37°C. Discos de papel de filtro estéril de 10,0 mm de diâmetro (Whatman 3) foram impregnados assepticamente, utilizando solução aquosa de DMSO 10% com 0,0013 mmol de complexo Ag-PROB, 0,0021 mmol de Ag-*p*ABA, 0,0021 mmol de Ag-HoBt, 0,0017 mmol de ligante livre PROB, 0,0036 mmol de *p*ABA e 0,0037 mmol de HoBt e DMSO 10% como controles negativos. Discos contendo 0,0030 mmol de AgNO₃ foram utilizados como controle positivo de atividade antibacteriana de difusão. Todos os discos impregnados foram colocados na superfície do ágar sólido inoculado com a suspensão bacteriana na escala nefelométrica de McFarland 0,5 ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) usando cotonetes esterilizados. As placas foram incubadas durante 18 h a 35- 37°C e examinadas a seguir. Foram medidas zonas de inibição livres ao redor dos discos e a sensibilidade do complexo utilizado a partir do diâmetro da inibição em milímetros. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A difusão e as zonas de inibição para antibiótico padrão podem ser encontradas no CLSI 2018 (75). Esse experimento foi realizado no laboratório de Celulose Bacteriana e Química Medicinal – CBQUIM da Universidade de Araraquara-UNIARA.

3.2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos obtidos

Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos utilizando diluição em microplaca, segundo a Norma M100 do CLSI 2017 (75). Os testes foram realizados utilizando as cepas bacterianas Gram-negativas *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922) e cepas Gram-positivas *S. aureus* (ATCC 25923) e *B. cereus* (ATCC 14579), e cepas protótipos de *E. coli* uropatogênica (UPEC) EC958 (76), UTI89 (77), CFT073 (78) e dois isolados clínicos brasileiros denominados BR43 e BR64, patógenos oportunistas *P. aeruginosa* PAO1(79), patógenos diarreioagênicos como *E. coli* enterohemorrágica 86-24 (EHEC O157: H7) (80), *E. coli* enteroagregativa (EAEC O104: H4) (78) apenas para o complexo Ag-*pABA*.

Estas amostras foram mantidas em estoque em glicerol 20% na coleção no Laboratório CBQUIM-UNIARA, em freezer à -80°C.

Para os ensaios realizados, as cepas bacterianas ATCC foram cultivadas em caldo BHI a 37°C por 18 horas. A partir desse cultivo, as bactérias foram diluídas no mesmo meio, até atingirem a densidade óptica (DO) equivalente à escala turbidimétrica 1,0 de McFarland ($\sim 3 \times 10^8$ UFC/mL).

Foram preparadas suspensões estoque ($20,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) de cada um dos complexos metálicos utilizados em solução aquosa de DMSO 10%. A partir da solução estoque, os complexos metálicos foram submetidos a diluições seriadas, com concentrações variando de 1:2, intervalo usado de 5000 a $78,125 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em 50 μL de solvente DMSO 10% em uma microplaca de 96 poços. Após foi adicionado em cada poço 50 μL de caldo BHI estéril e por último 100 μL da suspensão bacteriana na escala 1,0 de McFarland para um volume final de 200 μL /poço, levando à diluição das

suspensões bacterianas para a DO equivalente à escala nefelométrica 0,5 de MacFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Como controle positivo, foram utilizados os sais de partida nas mesmas diluições seriadas dos complexos metálicos. As microplacas foram incubadas a 37°C por 18 horas para posterior análise da CIM. Após o período de incubação, foram adicionados em cada poço das microplacas 15 µL de resazurina a 0,02% em solução aquosa estéril. Após 4 h de incubação, a leitura foi realizada. Esse experimento foi realizado no laboratório de Celulose Bacteriana e Química Medicinal – CBQUIM da Universidade de Araraquara-UNIARA.

3.2.3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos obtidos sobre a *M. tuberculosis*

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do complexo metálico, ligante livre e sal de partida e rifampicina (antibiótico controle) sobre a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), foi utilizado um método de microdiluição em placas de 96 poços, com a resazurina usada como um indicador de viabilidade celular (81).

Os compostos analisados foram suspensos em DMSO e as suspensões estoque preparadas na concentração de 10 mg·mL⁻¹. O composto foi diluído seriadamente (Diluição seriada 1:2, com intervalo usado de 25 a 0.098 µg·mL) em volume de 100 µL em microplaca de 96 poços.

M. tuberculosis foi cultivada em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) á 37°C sob agitação constante e sua concentração ajustado para 5×10^5 UFC / mL.

Foram adicionados 100 µL do inóculo aos poços contendo as amostras. As placas foram incubadas á 37°C por sete dias e após esse período de incubação foi adicionado 30 µL de uma solução de resazurina (0,01% em água destilada estéril).

A leitura da fluorescência foi realizada após 24 horas em comprimento de onda de 530 / 590nm (emission / excitation) (Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Biotek®). A CIM é a concentração mais baixa do fármaco capaz de inibir o crescimento de 90% do inóculo em comparação com o controle positivo (crescimento bacteriano de 100%), calculado por regressão linear. Os testes foram realizados em triplicata. Esses experimentos foram realizados Estes experimentos foram realizados em colaboração o prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, laboratório de Pesquisa em tuberculose do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP - Araraquara.

3.2.3.4 Avaliação da viabilidade celular e atividade mutagênica dos complexos metálicos.

Para os estudos das atividades antiproliferativas e citotóxicas dos complexos metálicos sobre células tumorais, por exemplo, linhagem de adenocarcinoma de glândulas mamárias (MCF-7) e de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e não tumorais, como por exemplo, das linhagens de fibroblasto humano (FH e NIHT3TK), MRC-5 (células normais derivadas de tecido pulmonar humano) e J774A.1 (macrófagos murinos) *in vitro* foram realizados como descrito na literatura (4,25,82) e a análise de mutagenicidade realizada através do teste de AMES et al. (83).

3.2.3.4.1 Avaliação da viabilidade celular

A atividade antiproliferativa dos complexos analisados foram investigadas utilizando linhagens de células tumorais humanas: A549 (Adenocarcinoma pulmonar), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), Hela (Adenocarcinoma

cervical humano) U251 (glioma), MCF-7 (adenocarcinoma de Mama), NCI-ADR / RES (fenótipo expressivo de ovário de múltipla resistência a fármacos), 786-O (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (adenocarcinoma do cólon) e K-562 (leucemia mielóide crônica). Também foram utilizadas para o presente estudo de viabilidade celular, células não tumorais da linhagem HaCat (queratinócito humano) e linhagens celulares não tumorais, MRC-5 (células normais derivadas de tecido pulmonar humano) e J774A.1 (macrófagos murinos) para o ensaio de Citotoxicidade e células GM (fibroblastos não transformados) e HUV-EC-C [HUVEC] (cordão umbilical-endotélio vascular).

As culturas em estoque foram cultivadas em 5 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal (RPMI / FBS 5% Gibco®, EUA) a 37°C em 5% de CO₂ com 1% de penicilina: mistura de estreptomicina (Nutricell®, Brasil, 1000 µL) (meio completo) (82,84).

Os compostos foram preparados diretamente em meio completo (5 mg·mL⁻¹) e após diluídos no mesmo meio proporcionando as concentrações finais de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg·mL⁻¹ os metais utilizados como controles, por exemplo, AgNO₃, nas concentrações finais de 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg·mL⁻¹ em meio completo. As placas de 96 poços contendo as células (100 µL / poço, em densidade de inoculação: 3,5 a 6 x10⁴ células mL) foram expostas a diferentes concentrações das amostras e controles (100 µL / poço) em triplicata, incubadas durante 48 h a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Antes a adição das amostras (placa T0) e após a adição das amostras (placa T1), as células foram fixadas com 50% de ácido tricloroacético e para a avaliação da proliferação celular realizada a quantificação espectrofotométrica a 540 nm usando o ensaio com sulforodamina B (85).

Os valores de CI_{50} (concentração que inibe 50% de crescimento celular ou efeito citostático) foi determinado através da regressão não-linear tipo sigmoideal, analisada usando o Software Origem 8.0® (OriginLab Corporation, EUA) (86). O ensaio foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

3.2.4 Determinação dos Índices de Seletividade

O índice de seletividade (IS) pode ser calculado dividindo-se o valor de IC_{50} pelo valor da CIM_{90} . Um IS maior ou igual a 10 indica que o composto analisado pode ser aplicado em uma concentração dez vezes maior que o seu valor de CIM sem exibir citotoxicidade (87).

O índice de Seletividade (IS) para o ensaio de atividade antimicrobiana sobre *M. tuberculosis* foi calculado pela divisão dos valores de IC_{50} / CIM_{90} , que demonstra o quanto um composto é mais seletivo na morte do microrganismo sem causar danos celulares (88), estudos realizados em colaboração com prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, do Laboratório de Pesquisa em Tuberculose da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP– Araraquara, e a análise do IS para os ensaios antiproliferativos determinado por IC_{50} da célula normal / IC_{50} da célula tumoral analisada (89) realizados em colaboração com a Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e Prof. Dr. Flávia Resende Nogueira do Laboratório de Mutagênese da Universidade de Araraquara – UNIARA.

3.2.5 Avaliação da atividade mutagênica dos complexos metálicos obtidos

A avaliação da atividade mutagênica para os complexos utilizados foi avaliada pelo método de *Salmonella* / microsoma ou teste de Ames. A atividade mutagênica dos complexos foi avaliada no laboratório de Mutagênese da UNIARA sob a coordenação da Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira. Os testes foram realizados de acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron & Ames, 1983 (90) sobre as linhagens TA100, TA98, TA102 e TA97a de *Salmonella*, em experimentos com e sem ativação metabólica. As cepas de *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Essas linhagens foram inicialmente adquiridas por meio do Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA. Diferentes concentrações dos complexos foram solubilizadas em DMSO e avaliadas. Essas concentrações foram selecionadas com base em testes preliminares de toxicidade. A toxicidade foi evidenciada pela redução no número de revertentes His⁺ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar mínimo. Para a avaliação da mutagenicidade, as diferentes concentrações foram misturadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M; pH 7,4 e 0,1 mL de cultura de bactérias, incubadas por 30 minutos a 37°C. Nos ensaios com ativação metabólica, foram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 500 µL da fração microssomal S9 (S9 mix) preparada a partir de homogeneizados de fígado de ratos *SpragueDawley*, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos sob a forma liofilizada da *Moltox Molecular Toxicology Inc., Boone, USA*. Essa mistura S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica.

Decorrido o tempo de incubação, 2mL de “*top agar*” (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados nos tubos. O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “*top ágar*”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa em experimentos sem a mistura S9 foram 4- nitro-*o*-fenilenodiamina (10µg/placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25µg/placa) para TA100 e mitomicina C (0,5µg/placa) para TA102. 2-antramine (1,25µg/placa) foi utilizado para TA98, TA97a, TA100 e TA102 nos experimentos de ativação metabólica. DMSO foi utilizado como controle (solvente) negativo (100µL/placa). Os resultados serão analisados utilizando o programa estatístico Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*), adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982) (91). Os dados (revertentes/ placa) serão avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. Além disso, o índice de mutagenicidade (IM) será calculado para cada concentração testada, sendo este a média do número de revertentes/placa com o composto-teste (revertentes induzidas) dividida pela média do número de revertentes/placa com o controle (solvente) negativo. A amostra será considerada mutagênica quando houver uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (92). Esse estudo foi

realizado em colaboração com a Prof. Dr. Flávia Resende Nogueira do Laboratório de Mutagênese da Universidade de Araraquara – UNIARA.

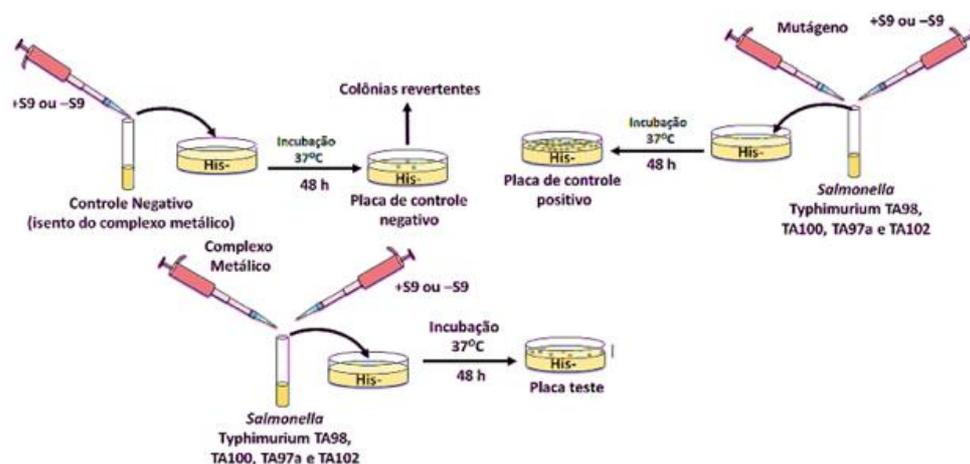


Figura 5. Representação esquemática do teste de Ames

Fonte: (adaptado de Copyright © 2006, Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings).

3.2.6. Ensaio de interação com DNA

A capacidade de interação dos complexos metálicos obtidos com DNA pelos complexos metálicos sintetizados foi estudada usando eletroforese em gel de agarose como descrito por Shahabadi e colaboradores (93). O teste foi avaliado utilizando uma solução de DNA plasmidial pGEX-4T-1 (50 µmol) em tampão Tris-EDTA 0,050 mol (pH 8,0) e diferentes concentrações de complexos metálicos. As misturas serão incubadas a 37°C durante 24 horas e após serão misturadas com tampão de corrida (2 µL) contendo 25% de azul de bromofenol 0,25% de xileno e cianol e 30% de glicerol. Cada amostra (10 µL) foi depositada em gel de agarose 0,8% (m/v) em TAE/brometo de etídio. A eletroforese realizada durante 1 hora a 100 mA em tampão Tris-acetato-

EDTA (TAE) 1 x concentrado. Após a eletroforese, o gel foi fotografado utilizando o equipamento de Fotodocumentação Locus. A cisplatina utilizada como controle e testes foram realizados em triplicata, nas mesmas condições. Esse experimento foi realizado no laboratório CBQUIM da Universidade de Araraquara-UNIARA.

3.2.7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média de três determinações \pm os desvios-padrões dos valores obtidos, e quando necessário foi realizado a análise de variância (ANOVA) e aplicado teste de Tukey. Para a análise estatística foi considerado como significante valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Complexo Ag-*p*ABA

O complexo Ag-*p*ABA foi obtido após reação de 10 mL de uma solução metanólica contendo 1,0 mmol (0,137g) de *p*ABA ($C_7H_7NO_2$) e 1,0 mmol (0,0549g) de KOH (pH10) com 2,0 mL de uma solução aquosa contendo 1,0 mmol (0,1699g) de $AgNO_3$. Após duas horas de reação, um precipitado sólido de coloração branca foi obtido e coletado por filtração, lavado com água destilada gelada e mantido por 24 horas na estufa com temperatura entre 35°C e 37°C para secagem. Após secagem, o complexo foi submetido às análises, cujos resultados se encontram descritos a seguir. Os resultados da análise elementar permitiram determinar a proporção metal:ligante de 1:2. Análise elementar: Anal. Cal. $AgC_{14}H_{14}N_3O_7 \cdot 2H_2O$ (%): C, 35,0; H, 3,78; N, 8,75. Encontrado (%): C, 34,6; H 2,41; N 8,74. O complexo foi insolúvel em água, etanol, metanol e é altamente solúvel em DMSO. Os monocristais adequados para difração foram obtidos após evaporação lenta do filtrado em temperatura ambiente,

sob proteção da luz, após três dias.

4.1.1 Caracterização do complexo Ag-*p*ABA

Após a síntese do complexo Ag-*p*ABA como descrito anteriormente, foi obtido um sólido branco, insolúvel em água, etanol e metanol e solúvel em DMSO.

4.1.1.1 Difração de raios X de monocristais

A estrutura cristalina do complexo Ag-*p*ABA foi determinada através da difração de raios X de monocristal. A obtenção de monocristais do complexo para a difração de raios X foi obtido a partir da evaporação lenta do filtrado de síntese do complexo à temperatura ambiente.

As informações cristalográficas do complexo metálico Ag-*p*ABA estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados cristalográficos da estrutura do complexo Ag-*p*ABA

Fórmula Química	AgC₁₄H₁₄N₃O₇·2H₂O
M_r	444.15
Sistema cristalino, Grupo espacial	Ortorrômico, <i>Pcca</i>
Temperatura (K)	150
a, b, c (Å)	28.014 (2), 4.5326 (4), 11.7846 (11)
Volume (Å³)	1496.4 (2)
Z Densidade Calculada g/cm³	4
Tipo de radiação	Cu Kα
μ (mm⁻¹) Dimensões do Cristal	11.26
T_{min}, T_{max} Transmissão	0.572, 0.753
No. De medidas, reflexões independente e observado	9361, 1332, 1166
[I > 2σ(I)]	
R[F² > 2σ(F²)], wR(F²), S	0.070, 0.198, 1.03
No. De reflexões coletadas	1332
No. De parâmetros	116
Δρ_{max}, Δρ_{min} Densidade eletrônica residual (e Å⁻³)	2.69, -1.75

Os comprimentos e ângulos de ligação relevantes são apresentados na Tabela 1, sendo que o composto Ag-*p*ABA cristalizou no grupo espacial ortorrômico de *Pcca* e sua estrutura mostrada na Figura 6.

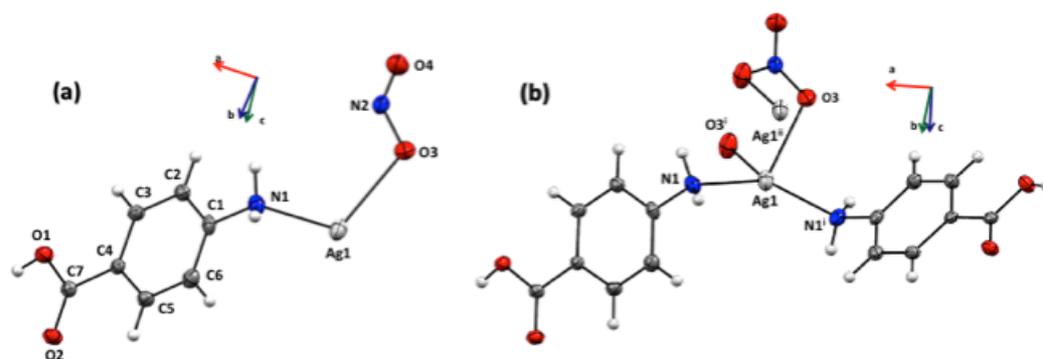


Figura 6. Visão molecular da estrutura do composto Ag-*p*ABA, onde (a): unidade assimétrica e (b): representação da esfera de coordenação da prata. Elipsoides de deslocamento são desenhados no nível de probabilidade de 40% e os códigos de simetria (i) $-x+1/2, -y+1, z$; (ii) $x, y-1, z$.

Essa estrutura foi publicada anteriormente (94), mas apenas os dados cristalográficos foram discutidos naquele momento. A estrutura consiste em uma cadeia polimérica de uma dimensão onde cada íon de prata(I) é coordenado por duas moléculas de *p*ABA, com os átomos de nitrogênio do grupo amino sendo os átomos doadores (comprimento da ligação Ag-N1 de 2.228 (3) Å). Os outros sítios de coordenação são completados por átomos de oxigênio a partir de íons nitrato, com um comprimento de ligação Ag-O3 de 2,565 (3) Å. As ligações de hidrogênio entre os grupos amino e os íons nitrato contribuem para a construção da estrutura supramolecular do Ag-*p*ABA. Além disso, as interações de C-H aromáticos com átomos de oxigênio de íons nitrato também contribuem para a formação de rede cristalina. Os grupos de ácidos carboxílicos livres formam dímeros.

4.1.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O complexo Ag-*p*ABA foi analisado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C a fim de atribuir os locais de coordenação do ligante ao centro metálico e propor a estrutura do composto. Os espectros do complexo foram analisados em comparação com os espectros do ligante livre. Os espectros de RMN - ^1H do ligante *p*ABA e do complexo Ag-*p*ABA são apresentados na Figura 7. A Tabela 2 apresenta a atribuição do sinal dos espectros de RMN de ^1H .

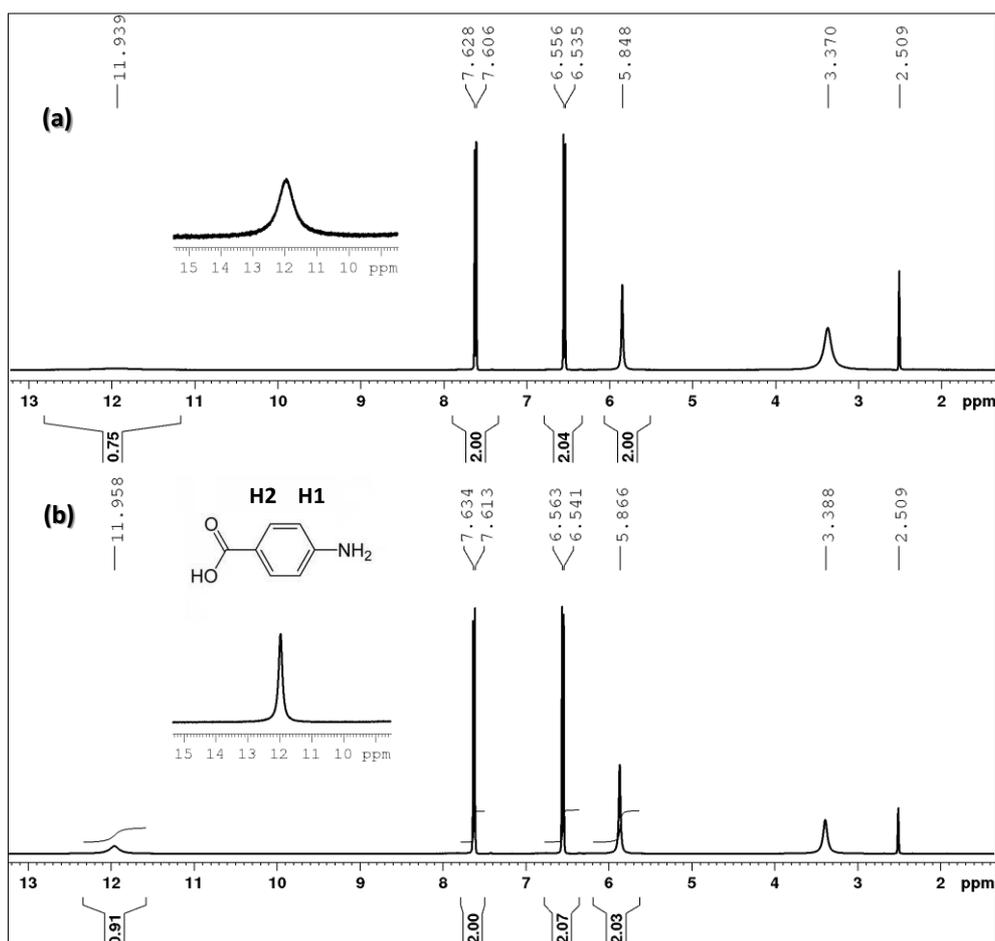


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H do complexo (a) Ag-pABA e ligante (b) pABA em DMSO-d_6

Tabela 2. Atribuição de sinal de RMN de ^1H do ligante pABA e complexo Ag-pABA .

Atribuição	δ_{PABA} (ppm)	δ_{AgPABA} (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	Multiplicidade (J, Hz)	Integral
-NH_2 -	5.857	5.839	-0.018	s	2
-COOH	11.949	11.930	-0,019	s (br)	1
H1	6.543	6.537	-0.006	d (8.4)	2
H2	7.614	7.608	-0.006	d (8.4)	2

Como esperado a partir da estrutura cristalina determinada, o espectro de RMN – ^1H do complexo Ag-pABA apresenta o pico pouco intenso com o

deslocamento químico característico de um átomo de hidrogênio de um grupo carboxila, o que sugere que o ligante pode não estar coordenando pelo grupo carboxila. As mudanças mais significativas nos deslocamentos químicos foram observadas para os átomos de hidrogênio do grupo $-NH_2$ do *pABA* que está envolvido na coordenação e para o hidrogênio do grupo carboxílico, o que provavelmente está relacionado a diferenças nas interações intermoleculares. Os desvios químicos ou mudanças químicas e os acoplamentos dos átomos de hidrogênio aromáticos não são afetados pela coordenação.

Os espectros de RMN de ^{13}C do ligante *pABA* e complexo *Ag-pABA* são mostrados na Figura 8. Não foram observados desvios químicos significativos, fato esse que corrobora que o *pABA* é neutro no complexo, uma vez que a desprotonação do grupo ácido carboxílico leva a mudanças significativas em seu espectro de ^{13}C . A atribuição de sinal é dada no espectro e foi baseada em dados reportados por Laufer e colaboradores, 1984 (95).

(a)

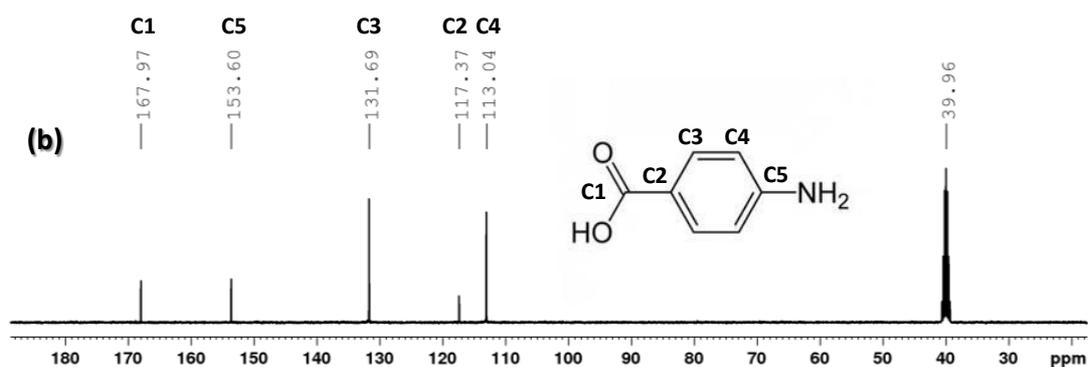


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C do complexo (a) Ag-*p*ABA e ligante (b) *p*ABA em DMSO-d^6

Os gráficos de contorno ^{15}N - ^1H HSQC (Figura 9) apresentados mostram que nenhuma alteração significativa foi observada para os desvios químicos dos átomos de nitrogênio do grupo amino antes (70,2 ppm) e após a coordenação (69,8 ppm). Isso provavelmente está relacionado à doação eletrônica de densidade do nitrato, que compensa a perda de densidade eletrônica do grupo amino- NH_2 .

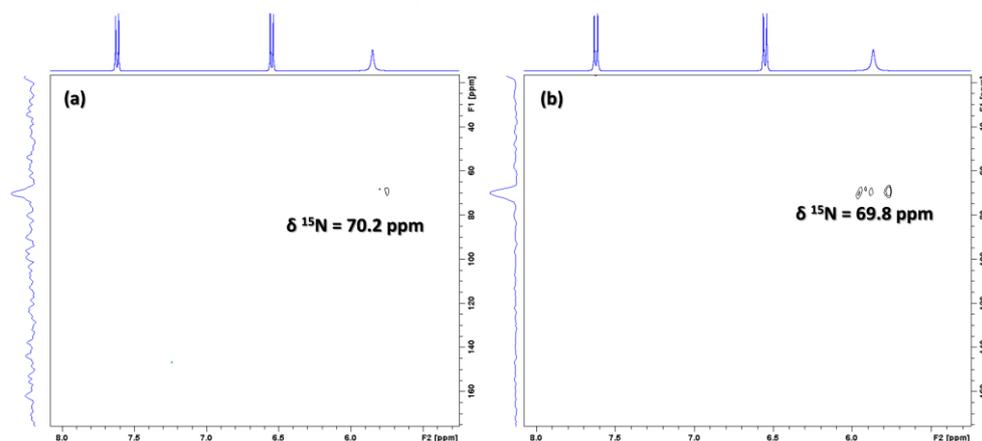


Figura 9. Gráficos de contorno $\{^{15}\text{N}-^1\text{H HSQC}\}$ RMN do complexo (a) *Ag-pABA* e ligante (b) *pABA* em DMSO-d^6

4.1.1.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro de massas de alta resolução do complexo *Ag-pABA* é apresentado na Figura 10. Dois sinais apresentam a composição de dois ligantes *pABA* e um íon de prata, como observado a partir de análise elementar e dos dados de cristalografia de raios-X. O sinal a 421.0061 m/z (Figura 10b) corresponde a $[\text{Ag}(\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2)(\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2) + \text{Na} + \text{H}_2\text{O}]^+$, onde um dos ligantes *pABA* parece estar desprotonado e a carga é compensada por um adicional de íon sódio, que se origina das condições experimentais utilizadas nesse experimento. Da mesma forma, o íon a 444.2176 m/z (Figura 10c) corresponde a $[\text{Ag}(\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2)(\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2) + \text{Na} + \text{CH}_3\text{CN}]^+$.

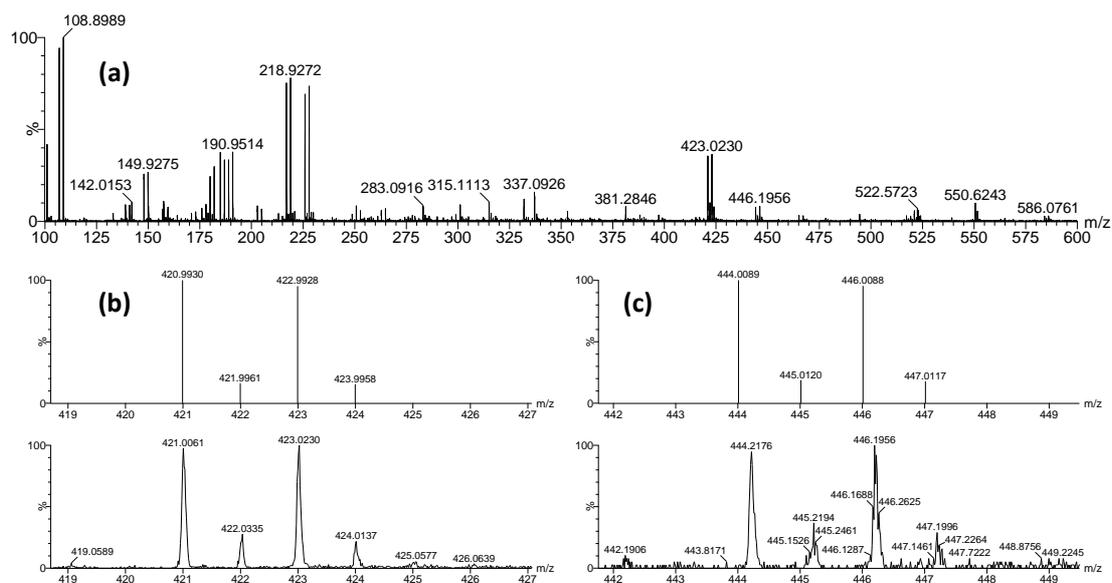


Figura 10. (a) Espectros de massas de alta resolução do complexo Ag-*p*A BA e seus padrões isotópicos de (b) $[Ag(C_7H_6NO_2)(C_7H_7NO_2) + Na + H_2O]^+$ e (c) $[Ag(C_7H_6NO_2)(C_7H_7NO_2) + Na + CH_3CN]^+$.

4.2 Complexo Ag-PROB

O complexo Ag-PROB foi obtido após reação de 10 mL de uma solução metanólica contendo 1,0 mmol (0,285g) de Probenecida ($C_{13}H_{19}NO_4S$) e 1,0 mmol (0,0549g) de KOH (pH8) com 2,0 mL de uma solução aquosa contendo 1,0 mmol (0,1699g) de $AgNO_3$. Após duas horas de reação, um precipitado sólido de coloração branca foi obtido e coletado por filtração, lavado com água destilada gelada e mantido por 24 horas na estufa com temperatura entre $35^\circ C$ e $37^\circ C$ para secagem. Após secagem, o complexo foi submetido às análises, cujos resultados se encontram descritos a seguir. Através dos resultados da análise elementar foi possível determinar a proporção metal:ligante de 1:1. Análise elementar: Anal. Cal. $[Ag(C_{13}H_{18}NO_4S)] \cdot H_2O$ (%):C, 38,07; H, 4,91; N, 3,41. Encontrado (%):C, 37,71; H, 4,30; N, 3,29. O complexo foi insolúvel em água, etanol, metanol e solúvel em DMSO.

4.2.1 Caracterização do complexo Ag-PROB

Após a síntese do complexo Ag-PROB como descrito anteriormente na metodologia, foi obtido um sólido branco que é insolúvel em água, etanol e metanol e solúvel em DMSO. Não foram obtidos monocristais para esse complexo.

4.2.1.1 Análise termogravimétrica

A curva termogravimétrica é mostrada na Figura 11. De acordo com os dados experimentais, a composição do complexo, formulado como $[Ag(C_{13}H_{18}NO_4S)] \cdot H_2O$ foi confirmada. O ligante é perdido nas temperaturas de 267°C a 341°C. A porcentagem calculada para a perda do ligante foi de 74,74%. O resíduo final é consistente com a formação de prata metálica calculado para Ag^0 (%): 25,26%.

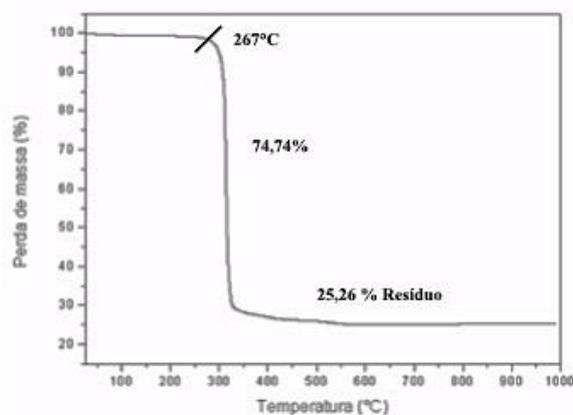


Figura 11: Curva termogravimétrica do complexo Ag-PROB

4.2.1.2 Espectroscopia vibracionais de absorção na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR) do ligante probenecida (PROB), Na-PROB e do complexo Ag-PROB são mostrados na Figura 12.

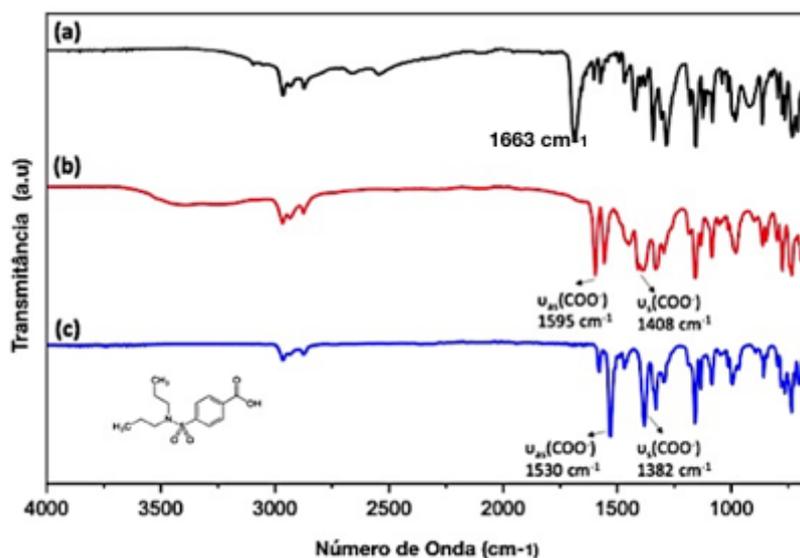


Figura 12. Análise por FTIR do complexo metálico Ag-PROB, onde (A): ligante Probencida (PROB), (B): sal de sódio do ligante (Na-PROB) e (C): Complexo Ag-PROB.

Bandas de estiramento assimétrico (1663 cm^{-1}) do grupo carbonila (C=O) são observados no espectro vibracional do ligante probencida (Figura 12a). No entanto, essas bandas aparecem deslocadas para regiões de menores energias nos espectros do sal do ligante e no complexo Ag-PROB. Esse deslocamento é devido à diminuição da ordem de ligação devido à coordenação dos ligante ao íon metálico através do carboxilato. Os valores dos números de onda atribuídos as bandas característicos do grupo carbonila e os deslocamentos estão apresentados na Tabela 3. O alongamento da ligação carbonila C = O é observado a 1663 cm^{-1} no PROB, que é afetado após a coordenação (1530 cm^{-1} Ag-PROB), indicando assim que este grupo está envolvido na coordenação.

Tabela 3. Modos vibracionais atribuídos ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo C=O

	$\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
Ligante Probenecida (PROB)	1663	-
Na-PROB	1595	1408
Ag-PROB	1530	1382

O grupo carboxilato do ligante PROB, quando desprotonado, pode coordenar com a prata(I) em um modo monodentado, bidentado (quelante ou em ponte), em que dois íons de prata se coordenam com cada átomo de oxigênio de dois ânions do ligante PROB. Para investigar qual modo seria mais adequado para descrever a estrutura do complexo Ag-PROB, foi realizada uma análise do valor $\Delta\nu$, [ν assimétrico (COO^-) – ν assimétrico (COO^-)], para o complexo de prata e para Na-PROB (a forma iônica do ligante PROB). Para Na-PROB, o $\Delta\nu$ foi de 187 cm^{-1} , enquanto para Ag-PROB, o valor foi de 148 cm^{-1} . Assim, a diferença entre $\Delta\nu$ é de 39 cm^{-1} , que é uma pequena diferença que indica um modo de coordenação em ponte. Para os modos monodentado e bidentado, a diferença entre $\Delta\nu$ do AgNO_3 e do complexo metálico seria diferente em mais de 60 cm^{-1} (96).

4.2.1.3 Estratégia computacional para determinação da estrutura do complexo por modelagem Molecular

Como os espectros de infravermelho do sal de Na-PROB e do complexo Ag-PROB sugeriram um modo de coordenação em ponte para o complexo, foram realizados cálculos de modelagem molecular. O modelo otimizado para o composto Ag-PROB, mostrado na Figura 13, valida a estrutura que foi proposta por estudos espectroscópicos no infravermelho, que indicaram uma estrutura dimérica em que dois íons de prata interligam os grupos carboxilato de dois ânions de PROB.

Para a análise do comprimento da ligação, o foco foi dado nos comprimentos da ligação Ag-O e na interação argentofílica Ag \cdots Ag, Figura 13A. Os resultados mostram que para as ligações Ag-O as distâncias são aproximadamente 2,18 Å, que são consistentes com os comprimentos médios de ligação de carboxilato de prata. Para a interação argentofílica, a distância encontrada entre os íons prata foi de 2.889 Å. Os resultados encontrados são semelhantes aos apresentados em estruturas cristalinas relatadas por estudos de nossos grupos de pesquisa. Por exemplo, o complexo de prata(I) com sulfametaxazol (Ag-SFM) foi estudado e a distância de interação argentofílica determinada foi de 2,89 Å (6).

Os cálculos da Teoria Quântica de Átomos em Moléculas (QTAIM) e dos Orbitais Moleculares de Fronteira (FMOs) foram usados para entender melhor a estrutura eletrônica do complexo Ag-PROB. A análise QTAIM fornece informações sobre a natureza das ligações químicas e / ou interações. Os resultados da análise QTAIM das ligações Ag-O e interação argentofílica Ag \cdots Ag e o gráfico molecular correspondente são mostrados na Tabela 4 e na Figura 13 (B), respectivamente. A Figura 13 (B) indica a formação de um ponto crítico de ligação entre os íons de prata com densidade de elétrons ($\rho(r)$) valores de 0,022785 au. As ligações Ag-O têm densidade eletrônica semelhante com valores em torno de 0,066 au.

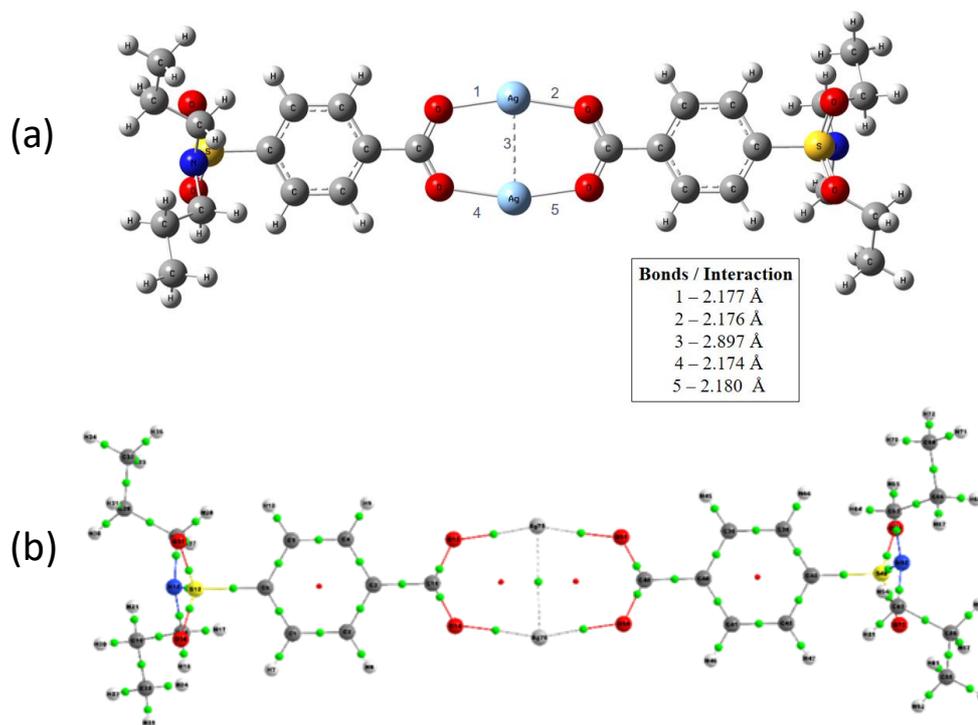


Figura 13. (a) Estrutura do complexo Ag-PROB otimizado ao nível M062X/6-31+G(d,p)/ LANL2DZ e (b) gráfico molecular do complexo Ag-PROB gerado por QTAIM: Os pontos críticos da ligação são representados por círculos amarelos e os círculos vermelhos são pontos críticos do anel.

Tabela 4. Valores de parâmetros topológicos para o complexo Ag-PROB.

BCP	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$\varepsilon(r)$	$V(r)$	$G(r)$	$H(r)$
Ag-O	0,066125	+0,367269	0,022542	-0,098786	+0,095288	-0,003498
Ag-O	0,066540	+0,371275	0,020935	-0,099842	+0,096317	-0,003525
Ag \cdots Ag	0,022785	+0,089441	0,067103	-0,021515	+0,021937	0,000422

Dos valores de $\nabla^2\rho(r)$ e $H(r)$ apresentados na tabela a seguir, é possível afirmar a natureza da interação ou ligação (isto é, covalente, parcialmente covalente ou iônica). Quando os valores de $\nabla^2\rho(r)$ e $H(r)$ são positivos, a natureza da interação ou ligação é eletrostática, enquanto um positivo $\nabla^2\rho(r)$ e negativo $H(r)$ indica caráter parcialmente covalente. Os resultados mostram que $\nabla^2\rho(r)$ é positivo e $H(r)$ é negativo para Ag-O indicando o caráter parcialmente covalente esperado das ligações Ag-O no

complexo. A interação argentofílica tem caráter eletrostático, pois os valores foram positivos para ambos $\nabla^2\rho(r)$ e $H(r)$.

Finalmente, na análise dos orbitais moleculares, os orbitais HOMO, LUMO e gap de energia foram calculados e estão descritos na Figura 14 para o ligante e o complexo Ag-PROB. Os resultados indicam que o orbital HOMO para o ligante PROB está mais localizado no $-\text{SO}_2$ e grupo $-\text{NR}_2$ (onde R é $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) e o LUMO nos carbonos aromáticos do anel e no grupo $-\text{COOH}$. Para o complexo Ag-PROB, o HOMO é mais localizado no Ag-O enquanto o LUMO está localizado nos átomos de carbono do anel aromático.

A diferença de energia encontrada mostrou que tanto o PROB quanto o complexo apresentaram resultados semelhantes $\Delta E = 7,27 \text{ eV}$ e $7,26 \text{ eV}$, respectivamente conforme figura abaixo. Os resultados do gap de energia indicam que ambas as espécies têm a mesma reatividade.

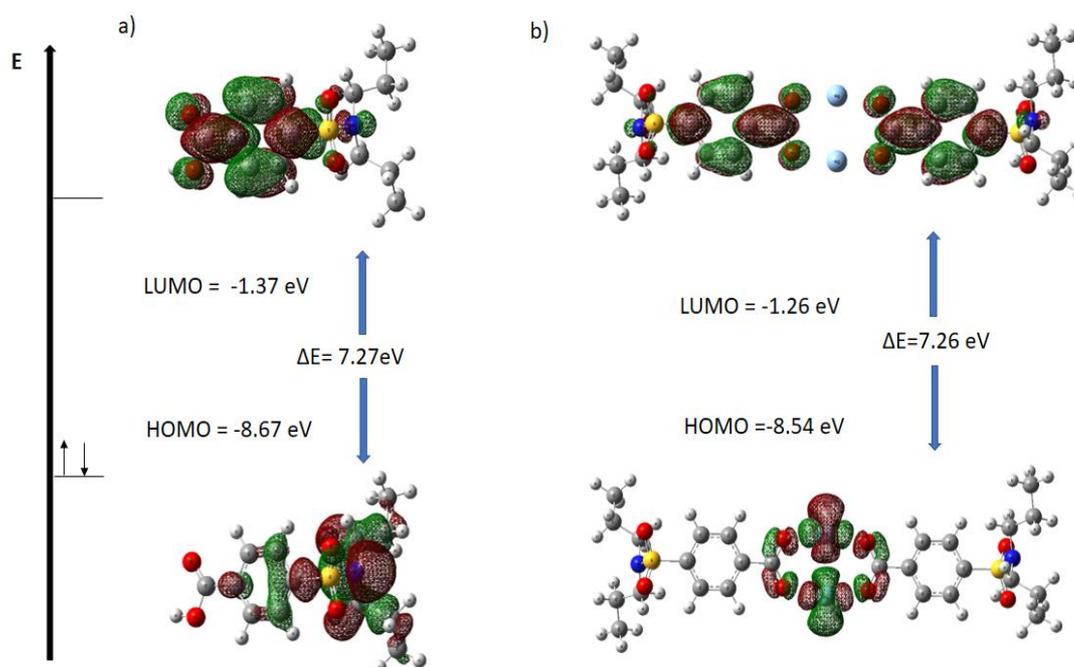


Figura 14. Orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO) e de espaço para: (a) Ligante Probencida (PROB) e (b) Complexo Ag-PROB.

4.2.1.4 Espectrometria de massas de alta resolução

O espectro de massas de alta resolução do complexo Ag-PROB está apresentado na Figura 15(a). O sinal em razão m/z 391.9540 corresponde a $[\text{Ag}(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{S}) + \text{H}]^+$ (Figura 15(b)). O aduto contendo dois ligantes de probenecida $[\text{Ag}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{S})_2 + 2\text{H}]^+$ é observado na razão m/z 677.1121. Finalmente, o modo de coordenação dimérico proposto para o complexo Ag-PROB, $[\text{Ag}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{S})_2 + \text{H}]^+$ (Figura 15(c)), é observado em m/z 784.9519, com padrão isotópico correspondente. O sinal em m/z 892.8397 foi designado como $[\text{Ag}_3(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{S})_2 + \text{H}]^+$ e é provavelmente uma consequência da recombinação na fase gasosa. A observação das espécies diméricas corrobora com o modelo estrutural proposto a partir dos resultados da espectroscopia no infravermelho e modelagem molecular.

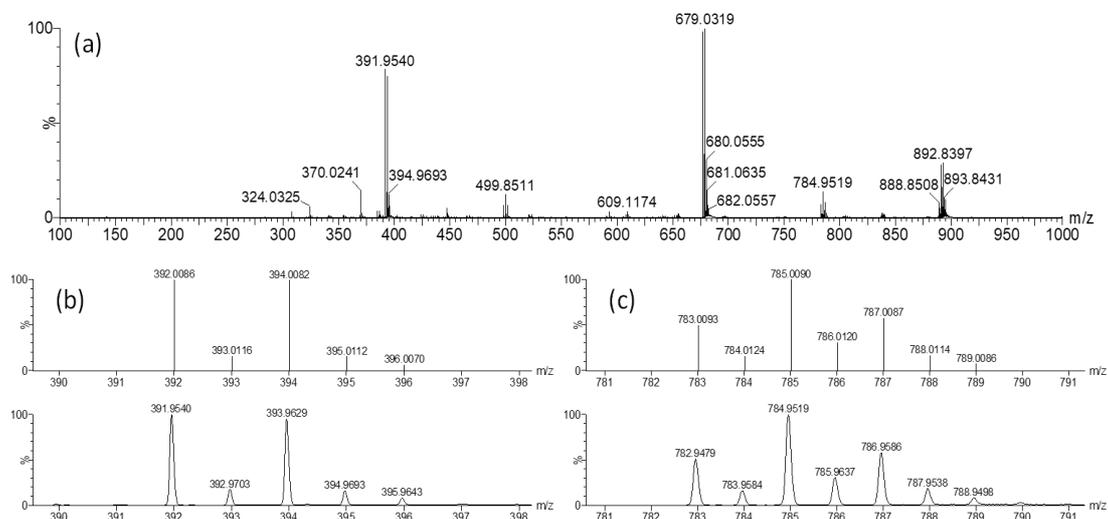


Figure 15. (a) Espectro de massa total do complexo Ag-PROB. (b) Padrões isotópicos calculados e experimentais para $[\text{Ag}(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{S}) + \text{H}]^+$ e (c) $[\text{Ag}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{S})_2 + \text{H}]^+$.

4.2.1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para observar que a coordenação do ligante ao íon metálico é mantida em solução, o espectro de RMN ^1H do ligante PROB e complexo Ag-PROB foram obtidos e são apresentados na Figura 16 abaixo, e a atribuição do sinal é apresentada na Tabela 5. O espectro do complexo não apresenta o átomo de hidrogênio do grupo carboxilato, indicando desprotonação. Além disso, o H5, que é o átomo de hidrogênio mais próximo do grupo carboxilato, sofre uma alteração de 0,137 ppm ao comparar o ligante livre e o complexo Ag-PROB. Isso indica que o grupo carboxilato está envolvido na coordenação e suporta a estrutura proposta pela modelagem molecular.

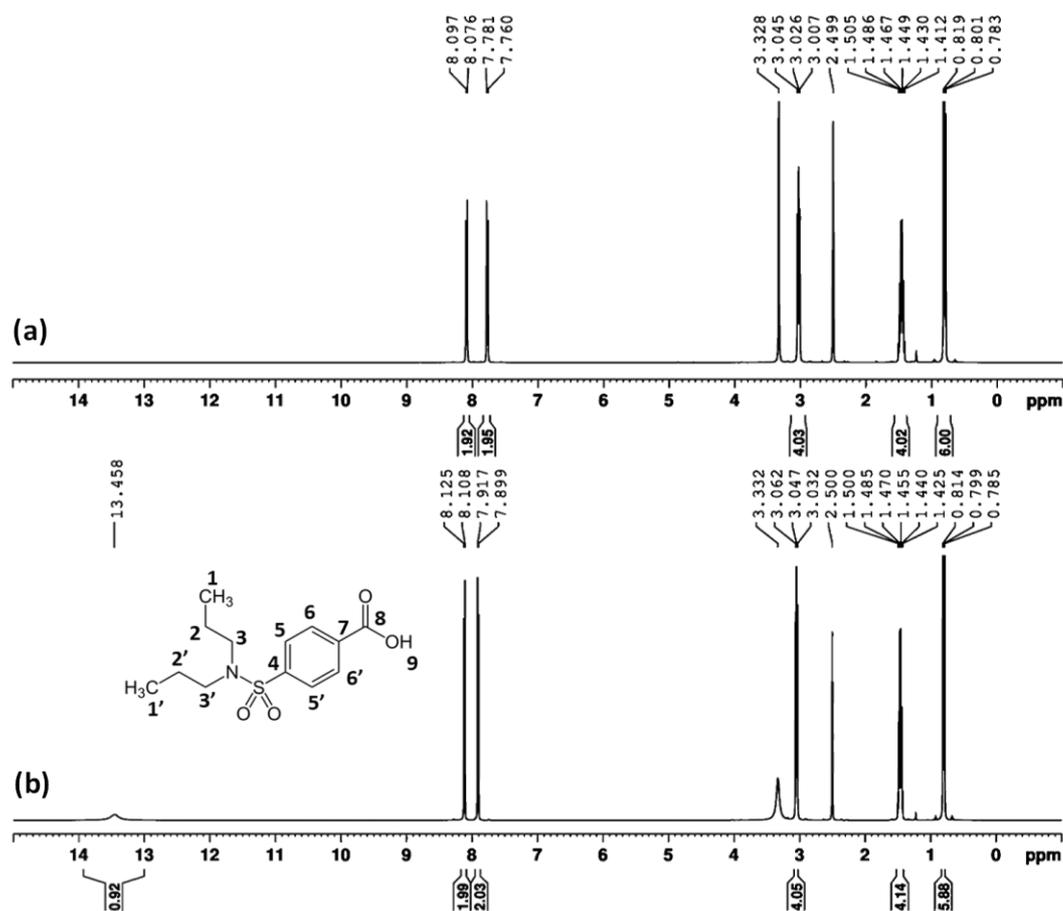


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (a) Complexo Ag-PROB e (b) Ligante PROB em DMSO- d_6 .

Tabela 5. Atribuição de sinais de RMN de ^1H do ligante PROB e complexo Ag-PROB (veja esquema de numeração de átomos na Figura 16).

Atribuição	δ_{PROB} (ppm)	$\delta_{\text{Ag-PROB}}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	Multiplicid. (J, Hz)	Integral
H1	0,799	0,801	-0,002	t (7,5)	6
H2	1,463	1,459	0,004	sext (7,5)	4
H3	3,047	3,026	0,021	t (7,5)	4
H5	7,908	7,771	0,137	d (8,5)	2
H6	8,116	8,088	0,028	d (8,5)	2
H9	13,458	-	-	s (br)	1

Para obter mais informações sobre o envolvimento do grupo carboxilato na coordenação da Ag(I) espectro de RMN de ^{13}C foram obtidos para o ligante PROB e complexo Ag-PROB. A atribuição dos sinais está apresentada na Figura 17 e na Tabela 6, e realizada com a correlação dos mapas $\{^{13}\text{C}, ^1\text{H}\}$ HSQC e HMBC apresentados na Figura 18 (a)-(d).

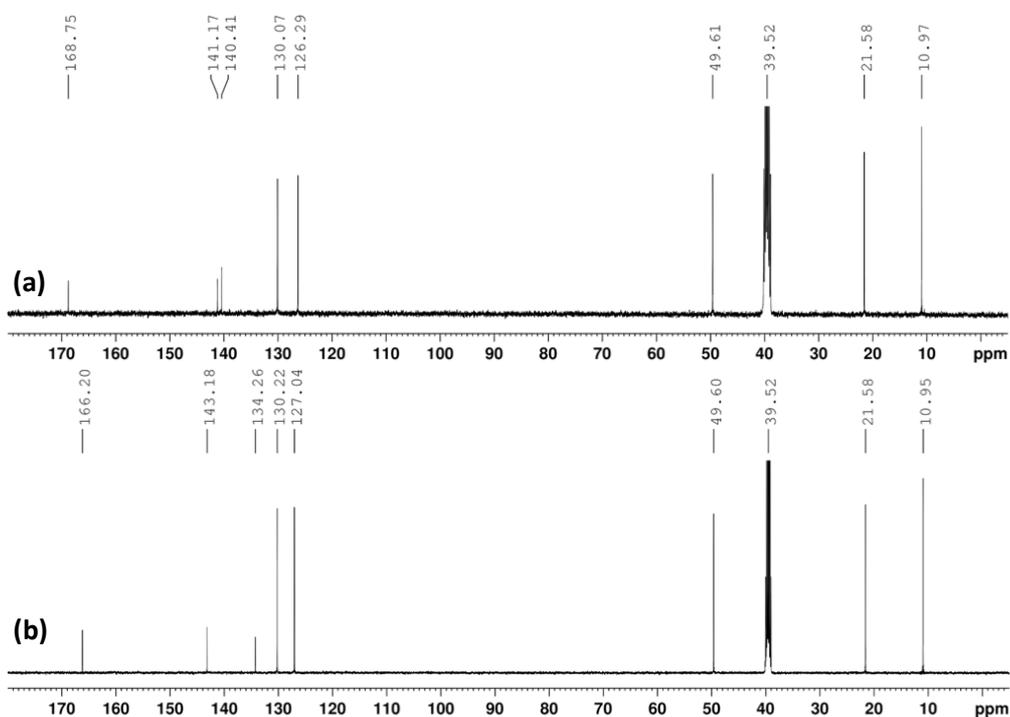


Figura 17. Espectros de RMN de ^{13}C do complexo (a) Ag-PROB e ligante (b) PROB em DMSO- d_6 .

Tabela 6. Atribuição de sinais de RMN de ^{13}C do ligante PROB e complexo Ag-PROB (veja esquema de numeração de átomos na Figura 24).

Atribuição	$\delta_{\text{Prob}}(\text{ppm})$	$\delta_{\text{AgProb}}(\text{ppm})$	$\Delta\delta(\text{ppm})$
C1	10.95	10.97	-0.02
C2	21.58	21.58	0.00
C3	49.60	49.61	-0.01
C4	143.18	140.41	2.77
C5	127.04	126.29	0.75
C6	130.22	130.07	0.15
C7	134.26	141.17	-6.91
C8	166.20	168.75	-2.55

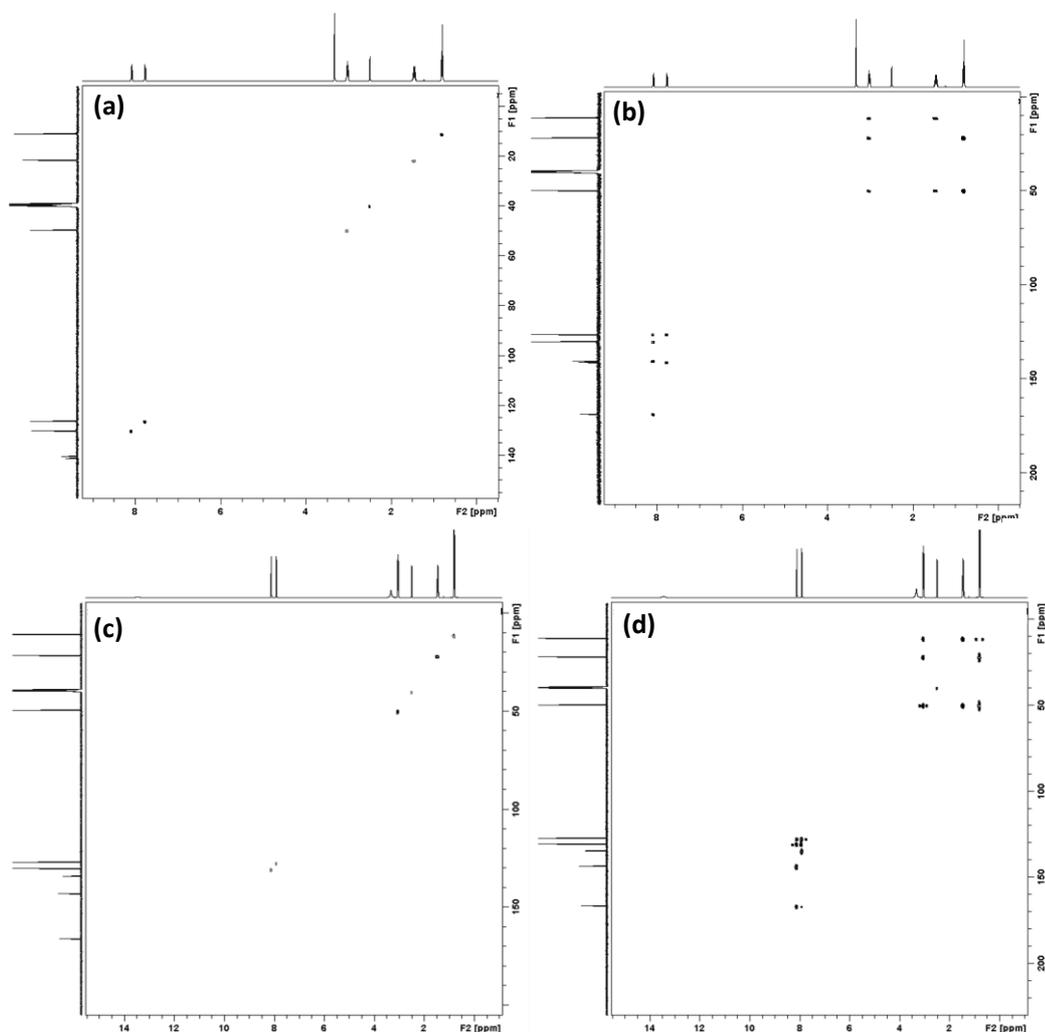


Figura 18. Gráficos de correlação de $\{^{13}\text{C}, ^1\text{H}\}$ 2D RMN: (a) HSQC e (b) HMBC do complexo Ag-PROB e (c) HSQC e (d) HMBC do ligante PROB. Os compostos dissolvidos em DMSO- d_6 para este experimento.

O sinal de carbono do grupo carboxilato foi deslocado em -2,55 ppm, indicando seu envolvimento na coordenação. Os átomos de carbono C7 do anel fenil, ao qual o grupo carboxilato está ligado, sofrem o deslocamento mais expressivo de -6,91 ppm, o que também é consistente com a coordenação do grupo carboxilato. Os átomos de carbono alifáticos próximos ao átomo de nitrogênio da probenecida (C1-C3) não são alterados no espectro do complexo, o que indica que o átomo de nitrogênio do grupo sulfonamida não está envolvido na coordenação.

4.3 Complexo Ag-HoBt

O complexo Ag-HoBt foi obtido após reação de 10 mL de uma solução metanólica contendo 1,0 mmol (0,135g) de 1-hidroxibenzotriazol hidratado ($C_6H_5N_3O \cdot H_2O$) e 1,0 mmol (0,0549g) de KOH (pH5) com 2,0 mL de uma solução aquosa contendo 1,0 mmol (0,1699g) de $AgNO_3$. Após duas horas de reação, um precipitado sólido de coloração branca foi obtido e coletado por filtração, lavado com água destilada gelada e mantido por 24 horas na estufa com temperatura entre 35°C e 37°C para secagem. Após secagem, o complexo foi submetido às análises, cujos resultados se encontram descritos a seguir. Através dos resultados da análise elementar foi possível determinar a proporção metal:ligante de 1:1. Análise elementar: Anal. Cal. $[AgC_6H_4N_3O] \cdot H_2O$ (%): C, 29,78; H, 1,67; N, 17,36. Encontrado (%): C, 29,99; H, 1,49; N, 17,4. O complexo foi insolúvel em água, etanol, metanol e solúvel em DMSO.

4.3.1 Caracterização do complexo Ag-HoBt

Foi sintetizado o complexo de Ag(I), com o ligante bioativo HoBt como descrito anteriormente na metodologia, e foi obtido um sólido branco que é insolúvel em água, etanol e metanol e solúvel em DMSO. Não foram obtidos monocristais para esse complexo até o presente momento.

4.3.1.1 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados da análise realizada por FTIR são apresentados na Figura 20.

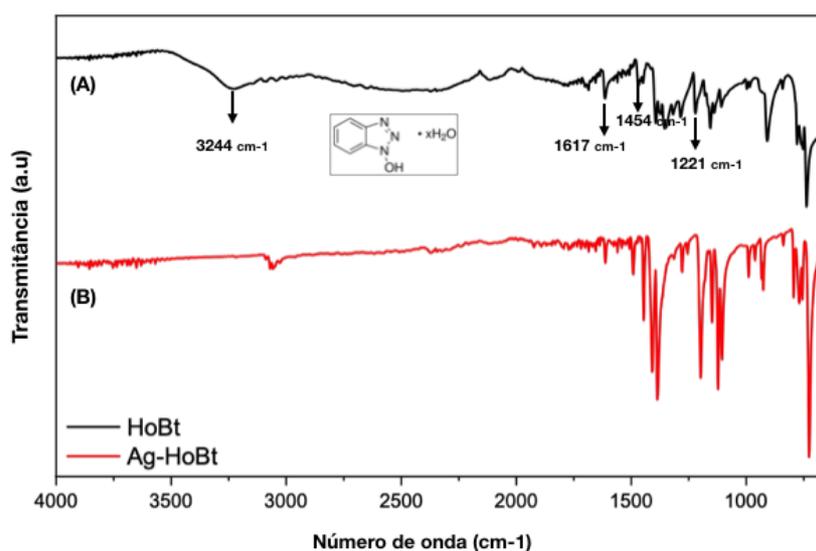


Figura 19. Análise por FTIR do complexo metálico Ag-HoBt, onde (A): ligante 1-Hidroxibenzotriazol Hidratado e (B): Complexo Ag-HoBt

A leitura dos padrões de bandas dos gráficos da Figura 20 possibilitou observar que houve provável coordenação do metal à estrutura do ligante bioativo. O padrão (A) refere-se ao HoBt isolado. Já o padrão (B) refere-se ao complexo Ag-HoBt. Existem três átomos de coordenação na molécula de HoBt, dois átomos de N no anel azol e átomo de O da hidroxila. Os deslocamentos em de 1400 a 1220 cm⁻¹ é

característico á estiramentos de anel benzênico presente na estrutura e pode-se verificar também alargamento no comprimento de onda 3244,214 cm^{-1} correspondendo ao grupo hidroxila (OH), possivelmente envolvido na coordenação.

4.4 Atividades biológicas dos complexos metálicos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt

4.4.1 Atividade biológica de Inibição de Crescimento de Microrganismos por Difusão em discos dos complexos metálicos obtidos

Os resultados do teste de atividade biológica pela técnica de difusão em discos realizados para os complexos estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* dos complexos metálicos Ag-*p*ABA, Ag-PROB, Ag-HoBt, e sal de partida AgNO_3

Halos de Inibição em Milímetros				
Microrganismo Composto	<i>S. aureus</i> ATCC 25924	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
AgNO_3	13,2	12,8	13,0	14,5
<i>p</i> ABA	R	R	R	R
PROB	R	R	R	R
HoBt	R	R	R	R
DMSO 10%	R	R	R	R
Ag- <i>p</i> ABA	16,0	13,5	18,6	15,7
Ag- PROB	15,7	13,0	14,5	13,6
Ag-HoBt	13,8	12,0	14,1	15,6

(R): Microrganismo Resistente

Cepas bacterianas Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) e Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 6569)

foram utilizadas para a realização do teste de atividade antimicrobiana por difusão em discos assim como para a avaliação da CIM, a fim de analisar a eficácia dos complexos metálicos obtidos como agentes antimicrobianos. Os resultados são comparados aos do AgNO₃ e ligantes *pABA*, *PROB* e *HoBt* e estão apresentados na Tabela acima.

As cepas bacterianas Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) utilizadas para uma avaliação inicial da atividade antibacteriana dos complexos metálicos, são patógenos mais comuns envolvidos em infecções da superfície da pele e ferimentos por queimadura (97).

Conforme apresentado na Tabela 7, os complexos metálicos foram ativos na inibição dos microrganismos testados. Os ligantes livres *pABA*, *PROB* e *HoBt*, bem como o solvente utilizado para diluição do complexo, DMSO, não apresentaram atividade inibitória de crescimento nas concentrações utilizadas. Como observado para os complexos obtidos, a inibição de crescimento das cepas bacterianas testadas foi próxima ou superior á observada pelo AgNO₃.

Em relação aos resultados obtidos para os complexos, o Ag-*pABA* e Ag-*PROB* apresentaram pouca diferença em relação a atividade antimicrobiana sobre os microrganismos *S. aureus* e *B. cereus* analisados, assim como os complexos Ag-*PROB* e Ag-*HoBt* apresentaram pouca diferença de inibição sobre o microrganismo *E. coli*, e Ag-*pABA* e Ag-*HoBt* sobre *P. aeruginosa*. Também pode-se observar que o composto Ag-*pABA* foi o complexo que apresentou maior atividade de inibição sobre o microrganismo *E. coli*.

O complexo Ag-*HoBt* apresentou atividade de inibição superior àquela observada pelo AgNO₃ sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Apenas em relação a

B. cereus que o AgNO₃ demonstrou um halo de inibição ligeiramente maior que o do Ag-HoBt.

Os resultados obtidos para os complexos metálicos são semelhantes em relação ao perfil de inibição de crescimento sobre as espécies bacterianas analisadas. A atividade observada pode ter relação aos íons prata e sua capacidade antimicrobiana por ligação à membrana celular e inibição da divisão celular (98).

Estudos indicam que íons prata(I) são capazes de se ligar à membrana celular e por interação com DNA inibe a divisão celular (98). A prata(I) possui efeito bactericida por mecanismos múltiplos, atua penetrando na membrana celular bacteriana e alterando a estrutura da parede celular através de proteínas de transmembrana, e interferência no sistema de transporte de elétrons, assim dentro da célula, os alvos de íons prata(I) são principalmente as proteínas, mas também podem interagir por ligação com o DNA (12,46,99). Essa toxicidade atribuída a diferentes fatores, apresenta perturbação da homeostase e a geração de ERO que danificam componentes celulares como o DNA e lipídios(100). Estudos demonstraram que os principais locais-alvo de Ag(I) em bactérias Gram-negativas são intracelulares e exibem alta atividade biocida sobre bactérias, como *E. coli* e *P. aeruginosa* (101,102).

Outros trabalhos realizados descreveram uma efetiva atividade inibitória de crescimento, *in vitro* sobre várias cepas bacterianas de complexos de Ag(I) com ligantes variados, como por exemplo, N-acetil-L-cisteína, nimesulida e sulfadoxina (4,7,12) sobre cepa de bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa* e positiva como *S. aureus*.

4.4.2 Atividade biológica de inibição de crescimento de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e *M. tuberculosis* por concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos metálicos obtidos

A atividade antibacteriana dos complexos metálicos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt foi avaliada também pelo ensaio de Concentração inibitória mínima (CIM). Devida a atividade inibitória de cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, foi introduzida para os complexos metálicos cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), e para o complexo Ag-*p*ABA cepas de microrganismos multirresistentes de isolados clínicos nos ensaios de CIM. Os valores de CIM para os complexos em DMSO (2,5%) estão apresentados na Tabela 8 e tabela 9 e mostraram uma atividade inibidora significativa contra as cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas analisadas, além de cepas de micro-organismos multirresistentes e isolados clínicos.

Tabela 8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos metálicos e AgNO₃ sobre cepas de microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *M. tuberculosis* H37Rv em mmol·L⁻¹

Compostos	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. tuberculosis</i>
	ATCC 25924	ATCC 14579	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 27294
AgNO ₃	0,11	0,22	0,11	0,11	0,033
<i>p</i> ABA	R	R	R	R	R
PROB	R	R	R	R	R
HoBt	R	R	R	R	R
DMSO 2,5%	R	R	R	R	R
Ag- <i>p</i> ABA	0,16	0,16	0,04	0,08	0,051
Ag- PROB	0,05	0,01	0,01	0,02	0,019
Ag-HoBt	0,64	1,29	1,29	1,29	0,046
Rifampicina	n.a	n.a	n.a	n.a	0,00001
Ciprofloxacino	0,00075	0,00038	0,00012	0,01	n.a

(R): Microrganismo Resistente, (n.a): Não aplicado

Os complexos analisados mostraram efetiva atividade inibitória de crescimento sobre as cepas testadas. O solvente DMSO utilizado não apresentou atividade antibacteriana nas mesmas condições experimentais.

O composto Ag-*p*ABA foi ativo na inibição do crescimento de todas as bactérias testadas em concentrações mais baixas do que aquelas apresentadas pelo AgNO₃, sendo mais ativo sobre as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. O composto Ag-PROB em comparação aos demais complexos obtidos foi o mais ativo sobre as cepas bacterianas testadas, necessitando de menores concentrações para inibir o crescimento bacteriano. As linhagens *B. cereus* e *E. coli* foram as linhagens mais suscetíveis ao Ag-PROB, apresentando CIM de 0,01 mmol·L⁻¹, concentração menor que o observado para o AgNO₃ sobre os mesmos microrganismos. Em relação ao microrganismo Gram-positivo *S. aureus*, o composto foi ativo em concentrações de 0,05 mmol·L⁻¹, mas ainda assim, mais ativo que o AgNO₃. Ainda apresentou atividade de inibição sobre o microrganismo *P. aeruginosa* com CIM de 0,02 mmol·L⁻¹. Em relação ao complexo Ag-HoBt, esse mostrou-se efetivo sobre as cepas testadas com CIM de 0,64 mmol·L⁻¹ e 1,29 mmol·L⁻¹ sobre as cepas Gram-positivas e Gram-negativas e apresentou concentrações mais baixas de atividade antimicrobiana sobre o microrganismo *S. aureus*.

Os compostos também apresentaram atividade antimicobacteriana sobre a cepa de *M. tuberculosis*, sendo o Ag-PROB o composto mais ativo e em menor concentração quando comparada ao AgNO₃.

Os ligantes analisados não apresentaram atividade inibidora de crescimento sobre as cepas bacterianas analisadas neste trabalho, o que era esperado, uma vez que, por exemplo, o *p*ABA é um substrato essencial para a via biossintética do ácido fólico em bactérias (63), a probenecida é um medicamento uricosúrico que não apresenta

atividade antibacteriana ou antitumoral e o HoBt é um derivado benzotriazol utilizado na síntese de peptídeos (65,67,68). Assim denota-se a relevância da sua atividade após sua coordenação á íons prata, sendo que o complexo metálico é mais ativo que os componentes separados (íon metálico e ligante), o que indica que é uma molécula com potencial utilização em medicina. Além de que, mesmo tendo seu mecanismo de atividade inibitória de crescimento bacteriano amplamente descrito na literatura, o AgNO₃ é tóxico para os tecidos em concentrações superiores a 1% (103).

Os resultados obtidos com os complexos metálicos sintetizados nesse trabalho podem ser comparados a outros complexos metálicos de prata sintetizados e estudados em relação à sua atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos para outros complexos de prata com sulfonamidas por exemplo, como complexo de Ag(I) com o ligante furosemida (7) que apresentou concentrações inibitórias mínimas (CIM) maiores de 0,39 mmol·L⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli* e 0,19 mmol·L⁻¹ sobre *P. aeruginosa*, mostra que o composto Ag-*p*ABA necessitou de concentrações bem menores de CIM sobre os mesmos microrganismos analisados. Estes resultados indicam que as estruturas químicas distintas dos complexos de prata com sulfonamidas influenciam diretamente suas atividades antibacterianas.

Ainda, em relação ao complexo metálico Ag-PROB, os resultados obtidos também podem ser comparados aos de outros complexos de prata com sulfonamidas, por exemplo complexo de Ag(I) com ligante furosemida (Ag-FSE) (7), sulfatiazol (Ag-SFT) e sulfametoxazol (Ag-SFM)(6), mostrando a efetividade maior do composto Ag-PROB em relação a outros complexos com íon prata. O composto Ag-FSE apresentou valores de CIM de 0,39 mmol·L⁻¹ sobre *S. aureus* e *E. coli*, e 0,19 mmol·L⁻¹ sobre *P. aeruginosa*, Ag-SFT apresentou valores de CIM de 6,90 e 3,45 mmol·L⁻¹ sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente, enquanto o composto Ag-

SFM apresentou CIM de 13,9 e 1,74 mmol·L⁻¹ sobre as mesmas cepas. Conforme descrito por Lustrì e colaboradores (7), o modo de coordenação da furosemida no complexo Ag-FSE, ocorreu pelos átomos de oxigênio do carboxilato, conforme observado para o complexo Ag-PROB, dois ions de prata fazem a ponte dos grupos carboxilato de dois ânions PROB. Considerando que a coordenação sulfatiazol e sulfametoxazol nos complexos Ag-SFT e Ag-SFM (6) ocorre pelo átomo de nitrogênio da sulfonamida podemos sugerir que a coordenação pelos átomos de oxigênio do grupo carboxilato pode ser responsável pela diferença e maior atividade nas mesmas cepas bacterianas observadas nos resultados obtidos para os complexos Ag-PROB e Ag-FSE.

Outros estudos com complexos de prata, realizados por Nakahata e colaboradores (104) foi realizada a síntese e caracterizado um complexo de prata com sulfameter, também conhecido como sulfametoxidiazina (SMTR), observando a coordenação química do ligante ao metal pelos átomos de nitrogênio do grupo sulfonamida. O composto Ag-SMTR apresentou valores de MIC de 320 µmol·L⁻¹ sobre *S. aureus* e, 40,9 µmol·L⁻¹ sobre *E. coli* e *P. aeruginosa*, demonstrando assim o potencial antimicrobiano do complexo Ag-PROB. Além disso, não há relatos referentes a atividade antibacteriana do ligante livre PROB descritas na literatura. O complexo Ag-PROB foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, podendo ser considerado um agente antibacteriano promissor, uma vez que um critério na CIM <25 µM foi proposto para compostos anti-infecciosos (105).

Um estudo com complexo de prata(I) com ligante nimesulida demonstrou a efetiva atividade do uso de ligantes com o ion prata, e sua atividade antibacteriana sobre cepas Gram-positivos (*S. aureus*) e Gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa*), e

seus resultados foram semelhantes aos observados para o complexo metálico Ag-HoBt e o AgNO_3 (12).

Como pode ser observado, a atividade inibitória de crescimento bacteriano dos complexos Ag-*p*ABA e Ag-PROB foi alcançada com concentrações inferiores às observadas para o AgNO_3 . Apenas o complexo Ag-HoBt apresentou-se ativo em concentração superior a observada para o AgNO_3 . Porém, vale ressaltar que o mesmo é mais tóxico, sendo que a rápida liberação do íon Ag(I) do sal inorgânico limitam o uso de AgNO_3 na terapia, uma vez que concentrações de Ag(I) superiores a 1% exibem toxicidade para os tecidos (37).

Quando analisado o antibiótico ciprofloxacina, os complexos metálicos foram menos ativos sobre cepas dos microrganismos *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*, porém o complexo Ag-*p*ABA e Ag-PROB apresentaram concentrações de inibição próximas a observada para o antibiótico ciprofloxacina sobre cepas de *P. aeruginosa*. Bactérias clinicamente importantes resistentes a fármacos de amplo espectro como ciprofloxacina inclui *P. aeruginosas*, sendo que a resistência bacteriana é de grande preocupação para os tratamentos atuais e assim torna-se relevante a investigação de novos fármacos como complexos metálicos que podem ser uma alternativa terapêutica no tratamento antimicrobiano (106,107).

Em relação à cepa analisada de *M. tuberculosis* foi observado que o complexo Ag-PROB apresentou-se ativo na inibição de crescimento em concentração menor que o AgNO_3 , enquanto os complexos Ag-*p*ABA e Ag-HoBt, a atividade inibitória de crescimento do foi superior. Entretanto, não há relatos na literatura de ação antimicobacteriana do sal AgNO_3 (108).

Embora os complexos tenham sido menos ativos que a rifampicina, um dos antibióticos de primeira linha, utilizados para o tratamento da tuberculose, estudos

demonstram taxas elevadas de resistência de *M. tuberculosis* a antimicobacterianos como a rifampicina, isoniazida, fluoroquinolona e aminoglicosídeos (109,110), o que constitui um preocupante problema de saúde pública. Sendo assim, o desenvolvimento de novos fármacos, dentre eles os complexos metálicos, podem contribuir para aumentar o arsenal terapêutico no tratamento da tuberculose. Diante destes resultados, pode se sugerir que a atividade inibitória de crescimento do bacilo é decorrente da presença do íon prata, uma vez que a literatura já demonstra seu mecanismo através da sua ligação a enzimas de transporte da membrana, atingindo proteínas celulares e interação com os ácidos nucléicos causando atividade bactericida da prata (111).

Segundo estudos recentes desenvolvidos por Montelongo 2019 e colaboradores (112), utilizando a combinação de isoniazida com prata(I) houve potente efeito bactericida sobre cepas clínicas resistentes de *M. tuberculosis*, observando valores de CIM baixos em relação aos dos componentes separados, os pesquisadores desse estudo afirmaram que o aumento da atividade pode ser devido ao aumento da produção de ERO, que leva ao estresse oxidativo e à morte celular bacteriana (112).

De acordo com Gu et al. (2004) compostos que apresentam valor de CIM igual ou inferior a $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são considerados promissores contra o *M. tuberculosis* (113). Além disso, o fármaco de primeira linha na terapêutica contra tuberculose, a pirazinamida, um medicamento antibiótico, apresenta CIM de $20\text{-}100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (114).

O agente causador da tuberculose é responsável por elevado índice de mortalidade no mundo, levando a cerca de 1,7 milhões de pessoas a óbito, mostrando assim a grande necessidade de novos quimioterápicos mais efetivos no combate à tuberculose (115).

Relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que a tuberculose é a doença infecciosa que apareceu como uma das 10 principais causas de morte no mundo em 2016, com estimativa de 490.000 novos casos de tuberculose multirresistente e mais 110.000 pessoas com tuberculose resistente à rifampicina, sendo a mesma a principal causa de mortalidade humana por doenças infecciosas. A descoberta de novos fármacos com atividade sobre micobactéria representa um desafio, pois esses são patógenos de crescimento lento (116,117).

4.4.3. Atividade biológica de inibição de crescimento de microrganismos, por determinação da CIM, de isolados clínicos e oportunistas pelo complexo Ag-*pABA*

Diante dos resultados de atividade inibitória de crescimento sobre cepas bacterianas ATCC e foram realizados experimentos de determinação da CIM para o complexo Ag-*pABA* sobre cepas multirresistentes de Isolados Clínicos Uropatogênicos de *E. coli* (ECUP) EC958, UTI89, CFT073, BR43 e BR64, patógeno oportunista *P. aeruginosa* PAO1, patógeno diarrenogênico e enterohemorrágico de *E. coli* 86-24 (ECEH) O157:H7, Enteroagregativo de *E. coli* (EAEC) O104:H4 e *S. Typhimurium*. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos nos testes.

Tabela 9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do complexo Ag-*p*ABA sobre os microrganismos cepas multirresistentes de Isolados Clínicos Uropatogênicos de *E. coli* (ECUP) EC958, UTI89, CFT073, BR43 e BR64, patógeno oportunista *P. aeruginosa* PAO1, patógeno diarrenogênico e enterohemorrágico de *E. coli* 86-24 (ECEH) O157:H7, Enteroagregativo de *E. coli* (EAEC) O104:H4 e *S. Typhimurium* SL1344 em mmol·L⁻¹

Cepas		AgNO ₃	<i>p</i> ABA	Ag- <i>p</i> ABA	Ciprof
		CIM	CIM	CIM	CIM
		(mmol·L ⁻¹)	(mmol·L ⁻¹)	(mmol·L ⁻¹)	(mmol·L ⁻¹)
ECUP	EC958	0,11	R	0,04	R
	UTI89	0,057	R	0,04	0,0001
	CFT073	0,11	R	0,04	0,0001
	BR43	0,11	R	0,04	R
	BR64	0,11	R	0,02	R
ECEA	O104:H4	0,057	R	0,02	0,0004
ECEH	O157:H7	0,11	R	0,02	0,0002
<i>S. Typhimurium</i>	SL1344	0,057	R	0,02	0,0004
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	0,057	R	0,04	0,0009

(R): Microrganismo Resistente

Os resultados obtidos para o complexo de Ag-*p*ABA (Tabela 9) mostram a ação inibitória de crescimento de todas as cepas analisadas em concentrações de 0,02 mmol·L⁻¹ a 0,04 mmol·L⁻¹, sendo essas concentrações inferiores à observada para o AgNO₃, que foi de 0,11 mmol·L⁻¹ a 0,057 mmol·L⁻¹

O composto mostrou atividade sobre todas as cepas analisadas, incluindo as cepas multirresistentes como EC958 e O104:H4 (76) e cepas produtoras de biofilme como *E. coli* EC958 (76), UTI98 CFT073, O104:H4, e *P. aeruginosa* PAO1 (118), demonstrando a capacidade do Ag-*p*ABA em atuar como alternativa terapêutica antimicrobiana e abrir assim uma nova perspectiva de tratamento para bactérias multirresistentes e produtoras de biofilme.

Também, pode ser observada a relevância do Ag-*p*ABA que apresentou CIM bem menores sobre as cepas multirresistentes em comparação a CIM observadas sobre os microrganismos ATCC analisados *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*.

Cepas de *P. aeruginosa*, com mecanismos distintos de resistência, constituem causas de inúmeras infecções crônicas como, infecções do trato urinário, bexiga, em pacientes que utilizam cateter permanente e pacientes intubados, e o tratamento com antibióticos utilizados atualmente na clínica são ineficazes para erradicar infecções causadas por esses microrganismos (119).

Da mesma forma, patógenos uropatogênicos, diarrenogênicos e enterohemorrágicos de *E. coli* O157: H7, por exemplo, podem ser portadores de genes que conferem múltiplas formas de resistência a fármacos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento de infecções causadas por estes patógenos(78,120).

Os novos mecanismos de resistência e a diminuição da eficácia no tratamento de doenças infecciosas comuns leva a doenças prolongadas e com riscos maiores a saúde (121), por exemplo, estudos anteriores se referem a resistência a antibióticos como cefalosporinas e fluoroquinolonas por *E. coli*, *S. aureus* resistentes a metilina (122). Assim podemos observar a relevância da atividade antimicrobiana apresentada do complexo Ag-*p*ABA, como uma alternativa terapêutica antimicrobiana de tratamento de bactérias multirresistentes e produtoras de biofilme, que são a causa de inúmeras infecções crônicas, como infecções do trato urinário, infecções de bexiga(122).

4.4.4 Avaliação da viabilidade celular dos complexos metálicos Ag-pABA e Ag-PROB sobre a linhagens celulares normais e tumorais

Foram realizadas a avaliação da viabilidade celular *in vitro* dos complexos metálicos Ag-pABA e Ag-PROB sobre células normais de macrófagos murinos (J774A.1), fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5), fibroblastos não transformantes (GM) queratinócitos (HaCat) e endotélio vascular de cordão umbilical (HUV-EC), e atividade antiproliferativa *in vitro* sobre um painel de células tumorais humanas. Foram realizados ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* determinando o IC₅₀ (concentração que inibe 50% de crescimento celular ou efeito citostático). Os resultados estão expressos a seguir.

4.4.4.1 Avaliação da viabilidade celular dos complexos metálicos Ag-pABA e Ag-PROB sobre a linhagens celulares normais

Tabela 10. Índice de citotoxicidade (IC₅₀) sobre linhagens celulares de macrófagos murinos (J774A.1), fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5), fibroblastos não transformantes (GM) queratinócitos (HaCat) e endotélio vascular de cordão umbilical (HUV-EC) do AgNO₃, Ag-*p*ABA, Ag-PROB e ligantes *p*ABA e PROB. Os valores são obtidos da média.

Compostos	Células	IC ₅₀				
	J774A.1	MRC-5	HaCat	GM	HUV-EC	(mmol·L ⁻¹)
	(mmol·L ⁻¹)					
AgNO ₃	0,430	0,160	0,023	0,019	0,012	0,012
<i>p</i> ABA	>0,73	>0,73	>1,82	n.a	n.a	n.a
PROB	n.a	>3,50	n.a	>3,50	>3,50	>3,50
Ag- <i>p</i> ABA	0,390	0,260	0,012	n.a	n.a	n.a
Ag- PROB	n.a	0,040	n.a	0,031	0,012	0,012

IC₅₀: concentração que inibe o crescimento celular de 50% ou efeito citostático após 48h de exposição. Linhagens celulares J774A1 (macrófagos murinos); MRC-5 (fibroblastos normais pulmão humano); GM (fibroblastos não transformados); HUV-EC (endotélio vascular de cordão umbilical) e Linhagem não tumoral humana HaCat (queratinócito) e n.a (não aplicado).

A atividade citotóxica foi expressa como o parâmetro IC₅₀ representando a concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular. Os resultados são obtidos pela concentração estimada em mmol·L⁻¹ conforme mostrado na Tabela acima.

O complexo Ag-*p*ABA apresentou efeito de inibição de 50% das células sobre todas as linhagens celulares com concentrações citotóxicas (IC₅₀) de IC₅₀: 0,012 mmol·L⁻¹ a 0,39 mmol·L⁻¹ e o complexo Ag-PROB apresentou efeito de inibição de 50% das células sobre todas as linhagens celulares com concentrações citotóxicas (IC₅₀) de IC₅₀: 0,031 mmol·L⁻¹ a 0,206 mmol·L⁻¹.

O complexo Ag-*p*ABA e o AgNO₃ apresentaram concentrações próximas de IC₅₀ para as linhagens celulares J774A.1 e HaCat e menos tóxico que o AgNO₃ sobre

células MRC-5, necessitando de maiores concentrações para reduzir a viabilidade celular. O complexo Ag-PROB e o AgNO₃ apresentaram concentrações iguais de IC₅₀ para a linhagem celular HUV-EC e menos tóxico que o AgNO₃ sobre células de fibroblastos GM, necessitando de maiores concentrações para reduzir a viabilidade celular. Ressalta-se que AgNO₃ é um antisséptico tópico com conhecida atividade antimicrobiana, mas apresenta efeitos citotóxicos sobre fibroblastos e células endoteliais quando da exposição prolongada. (123). A concentrações de AgNO₃ normalmente utilizadas na prática clínica (0,5%), apresenta efeito citotóxico dependente do tempo que afeta a função mitocondrial celular (124) sendo indutor da apoptose celular (125,126).

Com a obtenção do IC₅₀ dessas células, podemos determinar um índice de seletividade (IS) por exemplo do AgNO₃, complexo Ag-*p*ABA e *p*ABA calculado com o IC₅₀ das linhagens celulares de macrófagos murinos (J774A.1), fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5) e queratinócitos (HaCat) sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) da *M. tuberculosis* H37Rv por exemplo.

O Índice de seletividade (IS) foi calculado dividindo os valores IC₅₀ / CIM₉₀, o que demonstra quanto um composto é mais seletivo ao matar o microrganismo sem causar danos celulares. Os compostos promissores são aqueles que possuem CIM₉₀ <10µg·mL⁻¹ e IS >10 (82,88).

Tabela 11. Índice de seletividade (IS) do AgNO₃, complexo Ag-*p*ABA e *p*ABA sobre a concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) da *M. tuberculosis* H37Rv.

Composto \ Células	IS	IS	IS
	J774A.1	MRC-5	HaCat
AgNO ₃	13,0	4,83	0,7
<i>p</i> ABA	>4	>4	>10
Ag- <i>p</i> ABA	7,59	5,08	0,23

IS: Índice de Seletividade

Com a avaliação do IS do complexo, podemos verificar que apesar da atividade sobre *M. tuberculosis*, o composto Ag-*p*ABA foi tóxico para células eucarióticas analisadas, pois apresentou como IS valor menor que 10 (82,88)

4.4.4.2 Atividade Antiproliferativa dos complexos metálicos Ag-*p*ABA e Ag-PROB sobre a linhagens celulares tumorais e índice de seletividade (IS)

4.4.4.2.1 Avaliação da viabilidade celular do complexo metálico Ag-*p*ABA sobre as linhagens celulares tumorais e índice de seletividade (IS)

Foram realizados ensaios de avaliação da viabilidade celular determinando a atividade antiproliferativa *in vitro* determinando o IC₅₀ (concentração que inibe 50% de crescimento celular ou efeito citostático) do complexo metálico Ag-*p*ABA fornecido por uma avaliação *in vitro* sobre um painel de oito células tumorais humanas e em queratinócitos humanos imortalizados e determinado o índice de seletividade do compostos, outro aspecto importante em relação células tumorais e a células normais, sendo considerado um candidato antitumoral altamente promissor, o composto que apresenta um índice de seletividade altos (> 3), onde mais altos os valores de IS, maior a seletividade de um composto em relação a uma célula tumoral quando comparada a uma célula normal (89,127).

A atividade antiproliferativa foi comparada aos controles positivos (*p*ABA, cisplatina e doxorubicina e AgNO₃). Os resultados foram expressos em mmol·L⁻¹ e estão descritos nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Análise da atividade antiproliferativa do complexo metálico Ag-*p*ABA, *p*ABA e AgNO₃ em mmol·L⁻¹ sobre a linhagens celulares tumorais selecionadas.

Células Tumorais Compostos	IC ₅₀								
	U251	MCF-7	NCI-ADR / RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT-29	K562	HaCat
Ag- <i>p</i> ABA	0,014	0,010	0,031	0,012	0,013	0,012	0,014	0,002	0,012
<i>p</i> ABA	>1,82	>1,82	>1,82	>1,82	>1,82	>1,82	>1,82	>1,82	>1,82
AgNO ₃	0,016	0,017	0,003	0,002	0,031	0,001	0,002	0,017	0,015
Doxorrubicina	0,00005	0,00005	0,0005	0,00009	0,00005	0,0002	0,0004	0,0008	0,0001
Cisplatina	0,006	0,006	0,014	0,004	0,002	0,010	0,020	0,012	0,005

IC₅₀: concentração que inibe o crescimento celular de 50% ou efeito citostático após 48h de exposição. Linhagens celulares de tumor humano: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR / RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo de célula não pequena); PC-3 (próstata); HT-29 (côlon); K562 (leucemia); Linhagem não tumoral humana: HaCat (queratinócito).

Tabela 13. Índice de seletividade (IS) do sal de partida AgNO₃, Ag-*p*ABA e *p*ABA calculado como IC₅₀ (HaCat) / IC₅₀ (linhagem de células tumorais).

Células Compostos	U251	MCF-7	NCI-ADR / RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT-29	K562
	Ag- <i>p</i> ABA	0,90	1,2	0,38	1	0,92	0,85	0,88
<i>p</i> ABA	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
AgNO ₃	0,88	0,88	5	7,5	0,5	11	11	0,8
Doxorrubicina	2	2	0,2	1,1	2	0,5	0,25	0,12
Cisplatina	0,83	0,83	0,35	1,25	2,5	0,5	0,25	0,41

IS (Índice de Seletividade): Linhagens celulares de tumor humano: Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR / RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo de célula não pequena); PC-3 (próstata); HT-29 (côlon); K562 (leucemia).

Foi avaliada a atividade antiproliferativa do composto em comparação com o ligante livre, o sal de partida AgNO_3 e com os antitumorais doxorrubicina e cisplatina, droga essa muito utilizada no tratamento de vários tipos de câncer (110), bem como determinado o índice de seletividade dos mesmos em relação à célula normal HaCat e as linhagens de células tumorais, sendo considerado um candidato antitumoral altamente promissor, o composto que apresenta um índice de seletividade maior, sendo portanto mais seletivo para a linhagem celular tumoral analisada e menos tóxico em relação a linhagem celular normal (89,127).

O IC_{50} do Ag-pABA variou de 0,031 a 0,002 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ para inibir 50% da proliferação celular. A menor concentração obtida para atividade antiproliferativa do complexo foi para a célula K562 (leucêmica), sendo mais seletivo para esta linhagem, e apresentando um $\text{IS} >3$, portanto menos tóxico para a célula normal HaCat analisada, demonstrando que o complexo metálico é um candidato antitumoral altamente promissor, pois compostos que apresenta um índice de seletividade altos, >3 , apresentam maior seletividade em relação a uma célula tumoral quando comparada a uma célula normal (89,127)

O complexo Ag-pABA também se apresentou seletividade sobre as linhagens celulares U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão) e K562 (leucêmica) em comparação ao AgNO_3 , sendo necessário concentrações menores do que o AgNO_3 para inibir a proliferação celular.

Em comparação com os antitumorais utilizados como controle (cisplatina e a doxorrubicina), o complexo Ag-pABA se mostrou menos seletivo sobre as linhagens celulares de tumor humano U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR / RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo de célula não pequena), porém o Ag-pABA é menos seletivo para a linhagem normal

analisada HaCat ($IC_{50} : 0,012 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) necessitando de uma maior concentração para reduzir a viabilidade celular para 50% e portanto menos tóxico que os antitumorais analisados.

O Ag-*p*ABA apresentou-se mais seletivo que a cisplatina sobre as linhagens celulares PC-3 (Próstata), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia) necessitando de concentrações menores para causar a inibição celular, ou seja, mais seletivo e menos tóxico sobre a linhagem celular normal de HaCaT analisada. Analisando juntamente o IS dos compostos, onde maiores valores do índice de seletividade (IS), indica que o composto analisado é mais ativo contra a linhagem tumoral e menos citotóxico à linhagem normal (HaCaT). Portanto, o composto Ag-*p*ABA é mais seletivo as linhagens tumorais de PC-3 (próstata), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia) e menos tóxico a linhagem normal HaCat em relação ao antitumoral cisplatina.

O AgNO_3 necessita de concentrações maiores, 0,002 a $0,049 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ para apresentar efeito de redução da proliferação celular sobre as células tumorais analisadas, e concentrações bem mais baixas sobre 4 linhagens tumorais analisadas (NCI-ADR / RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0 (rim), PC-3 (próstata) e HT-29 (cólon) em comparação ao composto Ag-*p*ABA. O nitrato de prata também apresentou toxicidade seletiva sobre essas 4 linhagens tumorais analisadas, indicando ser ativo sobre a linhagem tumoral e menos citotóxico à linhagem normal analisada (HaCaT).

Apesar de ser revelada a atividade antitumoral da prata, não se pode extrapolar que esta poderia ser aplicada no tratamento de qualquer tipo de tumor, uma vez que cada tumor tem suas características e especificidades. Estudos recentes demonstraram que a citotoxicidade do nitrato de prata depende do tipo de linhagem celular (128,129)

e complexos de Ag(I) mostram citotoxicidade seletiva em relação a vários tipos de células, dependente do tipo de ligante coordenado aos íons prata (I) (29).

Nos resultados obtidos foi possível observar que o ligante analisado não teve uma atividade antiproliferativa considerável o que indica que apenas o complexo demonstrou bom resultado, o complexo Ag-*p*ABA foi mais ativo na inibição do crescimento das células estudadas, em função das concentrações empregadas.

De acordo com Zaharevitz e colaboradores (130) a cisplatina, um quimioterápico conhecido, é uma droga reativa ao DNA que induz danos ao mesmo pela coordenação dos íons Pt(II) com as bases de nitrogênio, principalmente a guanina causando as diferenças no perfil antiproliferativo de um painel de células tumorais (131,132). Assim, em relação ao complexo Ag-*p*ABA, os íons prata(I) podem exercer múltiplos mecanismos, como por exemplo, ser capazes de se ligar à proteínas e ao DNA (39,133). Segundo a literatura, os complexos Ag(I) apresentam também citotoxicidade seletiva em relação a vários tipos de células, e isso é dependente do tipo de ligante coordenado aos íons prata(I) (29,128).

4.4.4.2 Avaliação da viabilidade celular do complexo metálico Ag-PROB, PROB e AgNO₃ sobre a linhagens celulares normais e tumorais e índice de seletividade (IS)

Foram realizados ensaios de atividade antiproliferativa determinando o IC₅₀ (concentração que inibe 50% de crescimento celular ou efeito citostático) do complexo metálico Ag-PROB fornecido por uma avaliação *in vitro* sobre um painel de quatro células tumorais humanas e em três células normais e determinado o índice de seletividade do compostos, outro aspecto importante em relação células tumorais e a células normais, sendo considerado um candidato antitumoral altamente promissor,

o composto que apresenta um índice de seletividade altos (> 3), onde mais altos os valores de IS, maior a seletividade de um composto em relação a uma célula tumoral quando comparada a uma célula normal (89,127).

As concentrações do complexo de 0,98 a 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram analisadas e, apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14. Análise da atividade antiproliferativa do complexo metálico Ag-PROB, PROB e AgNO_3 em $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre a linhagens celulares normais e tumorais selecionadas.

Compostos \ Células	IC ₅₀						
	GM	MRC-5	HUVEC	MCF-7	HepG2	A549	HeLa
Ag-PROB	0,031	0,044	0,206	0,062	0,058	0,035	0,058
PROB	>3,50	>3,50	>3,50	>3,50	>3,50	>3,50	>3,50
AgNO_3	0,019	0,039	0,012	0,035	0,071	0,019	0,038

IC₅₀: concentração que inibe o crescimento celular de 50% ou efeito citostático após 48h de exposição. Linhagens celulares de tumor humano: A549 (adenocarcinoma pulmonar); MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); Hela (adenocarcinoma cervical humano); Linhagem não tumoral humana: GM (fibroblastos não transformados), MRC-5 (fibroblastos normais de pulmão humano) e HUV-EC (endotélio vascular de cordão umbilical).

O complexo Ag-PROB apresentou atividade antiproliferativa, conforme observado na Tabela 14 com IC₅₀ em concentrações de 0,031 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a 0,206 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, sobre as células analisadas.

Em relação as linhagens celulares tumorais, apresentou citotoxicidade sobre as células A549 (ATCC ® CCL-185™) de adenocarcinoma pulmonar em concentrações baixas, 0,035 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e maior concentração de IC₅₀ sobre células do endotélio vascular do cordão umbilical - HUV-EC-C [HUVEC], 0,206 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo menos seletivo para essa linhagem portanto menos tóxico sobre essa linhagem de célula normal. Outro aspecto importante da atividade antiproliferativa é a seletividade (Tabela 21) em relação às células tumorais e às células normais, sendo considerado

um candidato antitumoral altamente promissor, o composto que apresenta um índice de seletividade altos, >3, onde quanto mais altos os valores de IS, maior a seletividade de um composto em relação a uma célula tumoral quando comparada a uma célula normal (89,127).

Experimentalmente, essa seletividade pode ser estimada usando um índice de seletividade (IS), definido por Muller e Milton, 2012 (134).

Em relação ao IS para as células analisadas, o complexo apresentou inibição seletiva promissora sobre as linhagens tumorais A549 (adenocarcinoma pulmonar), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), Hela (adenocarcinoma cervical humano) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) com IS maior que 3, sendo assim mais seletivo para essas linhagens tumorais que para as células normal HUV-EC (endotélio vascular de cordão umbilical) analisadas. Hipoteticamente, quanto maior o valor de IS, maior a dose que pode ser administrada com segurança (134). O composto Ag-PROB também apresentou seletividade para célula A549 (adenocarcinoma pulmonar) em relação a linhagem normal MRC-5 (fibroblasto normais de pulmão humano), onde quanto maior o valor do índice de seletividade (IS) do composto analisado é indicativo do mesmo ser mais ativo contra a linhagem tumoral e menos citotóxico à linhagem normal.

Tabela 15. Índice de Seletividade (IS): $IC_{50}(\text{células normais}) / IC_{50}(\text{células tumorais})$ do complexo Ag-PROB sobre o painel celular analisado.

Células tumorais Células Normais	HepG2	A549	HeLa	MCF-7
	IS			
GM07492	0.54	0.87	0.53	0.5
MRC-5	0.77	1.25	0.76	0.72
HUVEC	3.48	5.65	3.44	3.24

IS: Índice de Seletividade

Como citado anteriormente, como agente antibacteriano, foi demonstrado que os íons Ag(I) atuam por interação com o DNA, prejudicando enzimas essenciais, causando rompimento da parede celular, e assim induzem a formação ERO e causam disfunções mitocondriais (39,40). Assim, as interações dos íons prata(I) com diferentes componentes celulares mostram que os compostos de prata(I) também podem ser agentes antitumorais (135), pois sabe-se que a ação anticâncer dos compostos de prata difere da dos derivados de platina em termos de interações com o DNA, sendo que estudos indicam que os compostos de prata(I) têm um mecanismo de ação tendo as mitocôndrias como alvo (43,136).

Outros trabalhos relatam a atividade antitumoral de compostos coordenados a Ag(I), como complexos com carbono N-heterocíclicos, apresentaram-se ativos contra as linhagens celulares de câncer de ovário e de mama (129), complexos de prata com derivados de cumarina demonstraram atividade antitumoral contra certos tipos de câncer (135) e complexos de Ag(I) com fosfina apresentaram-se ativos, mesmo contra linhas celulares resistentes à cisplatina (137).

4.4.5 Atividade Mutagênica dos complexos metálicos Ag-pABA, Ag-PROB e Ag-HoBt

Para a determinação da atividade mutagênica, foram testadas cinco concentrações diferentes dos complexos Ag-pABA, Ag-PROB e Ag-HoBt (0,31 - 2,5 µg / placa), diluídas em DMSO. A mutagenicidade foi avaliada pelo ensaio *Salmonella* / microssoma, utilizando as cepas de *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA97a e TA102, com (+S9) e sem (-S9) metabolização, pelo método de pré-incubação (92).

Os resultados do número médio de revertentes / placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice mutagênico (IM) após os tratamentos com os complexos metálicos, observados nas cepas de *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica estão apresentados nas tabelas 16,17 e 18.

O teste de Ames é conhecido por sua capacidade de detectar mutações pontuais causadas por diferentes agentes. Este teste emprega cepas indicativas de *S. Typhimurium* que são sensíveis a substâncias que induzem tipos distintos de mutações. Com base no teste de Ames, é possível estabelecer a ação mutagênica de um composto em função da concentração de *S. Typhimurium* (90,138).

É frequente a exposição aos diversos agentes químicos causadores de danos celulares. Esses danos podem afetar processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, podendo levar a processos neoplásicos por exemplo. Um agente quando mutagênico pode desencadear diversas respostas de acordo com o organismo afetado, sendo que a mutação pode ser o primeiro estágio no processo de formação de um tumor (139). Quando causam lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como substâncias mutagênicas e/ou genotóxicas. Assim, é essencial a aplicação de ensaios que detectam componentes genotóxicos e que permitem a identificação de substâncias com risco potencial para desenvolvimento de neoplasias em seres humanos. (140).

Os ensaios de mutagenicidade aqui realizados mostraram que nenhuma das cepas de *S. Typhimurium*, expostas a diferentes concentrações de complexos, induziu um aumento duas vezes ou maior no número médio de revertentes em relação ao grupo controle negativo, indicando ausência de atividade mutagênica, sob as condições utilizadas neste estudo(141). Os complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-

HoBt não induziram aumento no número de colônias revertentes nas cepas analisadas, na presença ou na ausência de ativação metabólica. Pesquisas com outros ligantes, utilizando íons prata, também demonstraram a ausência de atividade mutagênica desses compostos (7,142).

Tendo em vista a atividade antibacteriana observada dos complexos metálicos e seu potencial como composto para o desenvolvimento de drogas, a ausência de efeito mutagênico sobre cepas bacterianas de *S. Typhimurium* por teste de Ames é altamente relevante.

Tabela 16. Revertentes / placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium* após tratamento com várias concentrações de Ag-*p*ABA , com ativação (+S9) e sem ativação (-S9) metabólica.

Ag- <i>p</i> ABA		Número de Revertentes (M ± SD)/ placa e IM						
Tratamentos	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
µg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	15 ± 2	18 ± 5	86 ± 12	92 ± 4	330 ± 26	312 ± 34	99 ± 6	143 ± 18
1,25	17 ± 6 (1.08)	23 ± 8 (1.25)	101 ± 13 (1.17)	105 ± 6 (1.14)	381 ± 20 (1.15)	293 ± 30 (0.94)	125 ± 12 (1.27)	139 ± 16 (0.97)
2,5	18 ± 3 (1.17)	20 ± 2 (1.09)	116 ± 10 (1.35)	100 ± 5 (1.09)	334 ± 23 (1.01)	308 ± 22 (0.99)	142 ± 22 (1.43)	141 ± 5 (0.98)
5,0	18 ± 4 (1.17)	15 ± 3 (0.82)	110 ± 14 (1.28)	99 ± 1 (1.08)	352 ± 33 (1.06)	249 ± 16 (0.80)	133 ± 18 (1.34)	131 ± 11 (0.91)
7,5	20 ± 2 (1.27)	16 ± 2 (0.87)	107 ± 11 (1.24)	111 ± 6 (1.21)	377 ± 36 (1.14)	267 ± 15 (0.86)	98 ± 13 (0.99)	131 ± 18 (0.91)
10	20 ± 1 (1.30)	16 ± 1 (0.87)	80 ± 5 (0.93)	111 ± 4 (1.21)	288 ± 25 (0.87)	281 ± 15 (0.90)	73 ± 18 (0.73)	111 ± 10 (0.78)
C+	727 ± 56 ^a	909 ± 61 ^d	1239 ± 102 ^b	1121 ± 85 ^d	1882 ± 103 ^c	1959 ± 101 ^e	1028 ± 62 ^a	1152 ± 83 ^d

M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98, TA97a); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA97a e TA100); ^f2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

Tabela 17. Revertentes / placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium* após tratamento com várias concentrações de Ag-PROB , com ativação (+S9) e sem ativação (-S9) metabólica.

Ag-PROB		Número de Revertentes (M ± SD)/ placa e IM						
Tratamentos	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
µg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	28 ± 2	33 ± 4	140 ± 24	143 ± 12	266 ± 28	346 ± 29	189 ± 14	146 ± 10
1,25	30 ± 8 (1,09)	34 ± 4 (1,02)	178 ± 10 (1,27)	148 ± 11 (1,04)	354 ± 12 (1,33)	410 ± 16 (1,18)	201 ± 12 (1,06)	179 ± 5 (1,22)
2,5	27 ± 1 (0,96)	36 ± 3 (1,08)	166 ± 15 (1,19)	153 ± 15 (1,07)	297 ± 14 (1,11)	373 ± 16 (1,08)	190 ± 11 (1,01)	152 ± 13 (1,04)
5,0	25 ± 2 (0,91)	39 ± 1 (1,17)	167 ± 8 (1,19)	152 ± 13 (1,06)	272 ± 8 (1,02)	321 ± 24 (0,93)	180 ± 5 (0,95)	142 ± 7 (0,97)
7,5	27 ± 1 (0,96)	32 ± 2 (0,97)	141 ± 11 (1,01)	169 ± 13 (1,18)	285 ± 10 (1,07)	314 ± 23 (0,91)	169 ± 8 (0,89)	155 ± 0 (1,06)
10	21 ± 1 (0,76)	31 ± 0 (0,94)	121 ± 5 (0,86)	174 ± 6 (1,22)	235 ± 18 (0,88)	344 ± 22 (0,99)	138 ± 4 (0,73)	153 ± 4 (1,04)
C+	624 ± 83 ^a	1410 ± 77 ^d	1665 ± 62 ^b	1790 ± 92 ^d	1960 ± 79 ^c	1465 ± 81 ^e	1102 ± 78 ^a	1958 ± 143 ^d

M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/placa – TA98, TA97a); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/placa – TA98, TA97a e TA100); ^f2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

Tabela 18. Revertentes / placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade das cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium* após tratamento com várias concentrações de Ag-HoBt, com ativação (+ S9) e sem ativação (-S9) metabólica.

Ag-HoBt		Número de Revertentes (M ± SD)/ Placa e IM						
Tratament	TA98		TA100		TA102		TA97a	
µg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	20 ± 0	16 ± 3	102 ± 8	93 ± 11	228 ± 22	289 ± 31	166 ± 18	153 ± 12
0,31	24 ± 1 (1.20)	18 ± 2 (1.09)	117 ± 19 (1.15)	102 ± 6 (1.09)	307 ± 23 (1.35)	311 ± 23 (1.08)	214 ± 32 (1.29)	186 ± 9 (1.22)
0,62	23 ± 2 (1.15)	19 ± 1 (1.16)	103 ± 22 (1.01)	96 ± 10 (1.03)	325 ± 11 (1.43)	332 ± 12 (1.15)	225 ± 28 (1.36)	151 ± 13 (0.99)
1,25	21 ± 4 (1.05)	20 ± 4 (1.25)	102 ± 14 (1.00)	100 ± 8 (1.08)	314 ± 48 (1.38)	296 ± 26 (1.03)	168 ± 14 (1.01)	123 ± 8 (0.81)
1,87	22 ± 0 (1.10)	15 ± 3 (0.91)	121 ± 27 (1.19)	91 ± 6 (0.98)	274 ± 34 (1.20)	272 ± 10 (0.94)	135 ± 16 (0.81)	130 ± 5 (0.85)
2,5	20 ± 3 (1.00)	14 ± 1 (0.88)	98 ± 11 (0.97)	89 ± 4 (0.96)	181 ± 16 (0.80)	235 ± 25 (0.81)	137 ± 22 (0.82)	128 ± 11 (0.84)
C +	398 ± 47 ^a	927 ± 21 ^d	1346 ± 152 ^b	1886 ± 175 ^d	2180 ± 235 ^c	1266 ± 101 ^e	612 ± 45 ^a	1015 ± 53 ^d

M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/placa – TA98, TA97a); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/placa – TA98, TA97a e TA100); ^f2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9

4.4.6 Ensaio de interação dos complexos metálicos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt com DNA plasmidial pGEX-4T1

Estudos sobre a interação dos compostos com biomoléculas são geralmente realizados para investigar seus possíveis alvos moleculares. A capacidade do complexo de prata correspondente para alterar a conformação do DNA do plasmídeo foi monitorada por ensaio de eletroforese em gel de agarose (143,144).

A cisplatina em diferentes concentrações foi utilizada como controle positivo conforme Figuras abaixo. O plasmídeo de DNA pGEX-4T1 apresenta três formas diferentes no gel de eletroforese em agarose. A forma que apresenta uma migração mais lenta é a forma circular relaxada (RCF), a forma que mostra a migração intermediária é a superenovelada parcial (SCP) e a forma que apresenta a migração mais rápida é a forma superenovelada (SCF) (143,144). As Figuras 20 e 21 mostram os resultados da capacidade de interação dos complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt como o plasmídeo DNA pGEX-4T1 em comparação com a cisplatina, que é um complexo metálico que conhecidamente interage com DNA (131,132).

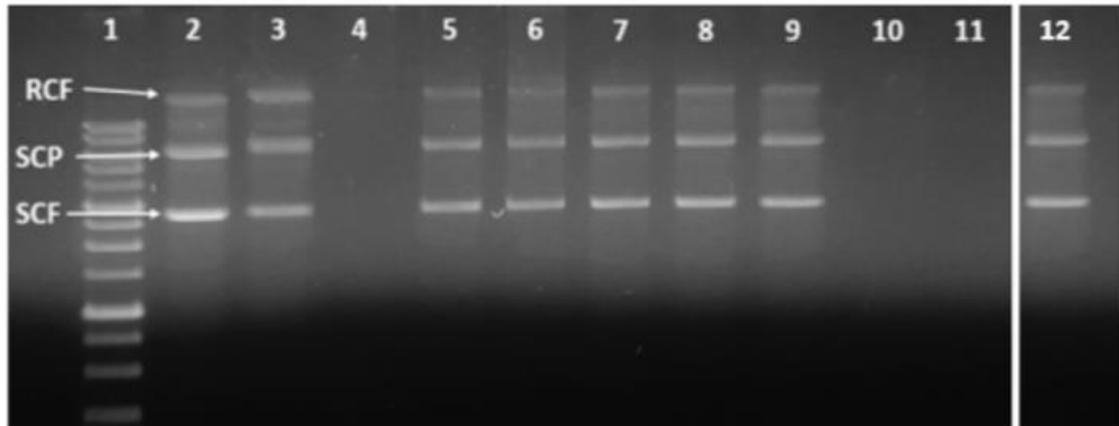


Figura 20. Capacidade de Interação do complexo Ag- *pABA* com o DNA plasmidial pGEX-4T1

Na Figura 21, a faixa 1 corresponde ao DNA Ladder (1kb), a faixa 2 ao controle pGEX-4T1 suspenso em TE e a faixa 3 a pGEX-4T1 suspenso em *pABA* 0,05 mmol·L⁻¹ em 5% de DMSO. As faixas 4 a 9 apresentaram os resultados obtidos após a incubação do plasmídeo pGEX-4T1 incubado com diluições de Ag-*pABA* de 0,05 mmol·L⁻¹ a 0,0015 mmol·L⁻¹ em DMSO 5%, as faixas 10 e 11 plasmídeo pGEX-4T1 incubados com controle cisplatina 0,05 mmol·L⁻¹ e 0,025 mmol·L⁻¹ em DMSO 5% e a faixa 12 corresponde a plasmídeo pGEX-4T1 incubado com AgNO₃ 0,05 mmol·L⁻¹ em DMSO 5%.

O desaparecimento de RCF, SPF e SCF (faixa 4) ou seja, o perfil de migração das bandas de DNA foi alterado, devido à interação do complexo Ag-*pABA* com o DNA plasmidial na concentração de 0,05 mmol·L⁻¹, sugerindo interação com o DNA nas condições experimentais, demonstrando assim um possível mecanismo de inibição do crescimento bacteriano e ação antiproliferativa.

Os resultados obtidos demonstraram efeito semelhante de interação de DNA observada no controle com cisplatina. O nitrato de prata não levou a alterações

perceptíveis no perfil eletroforético do DNA, pois o padrão das bandas é o mesmo do controle (pGEX-4T1 suspenso em TE - faixa 3). Outros estudos mostraram que não houve alterações no perfil eletroforético do DNA do pGEX-4T1 quando submetido ao tratamento com AgNO_3 em concentrações de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (142).

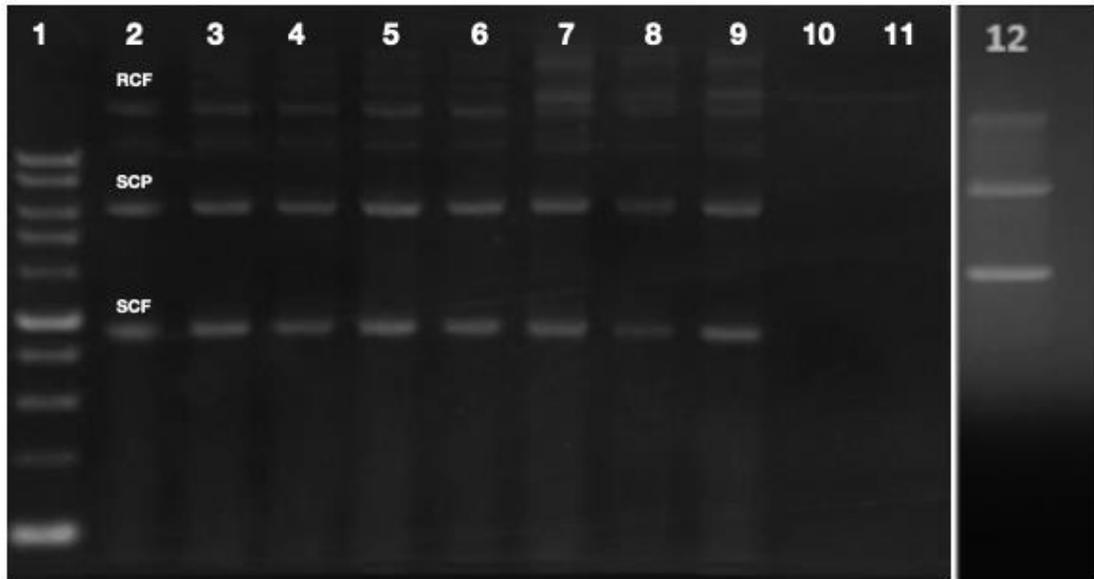


Figura 21. Capacidade de Interação dos complexos Ag-PROB e Ag-HoBt com o DNA plasmidial pGEX-4T1

Na Figura 21, a faixa 1 corresponde ao DNA Ladder (1kb), a faixa 2 ao controle plasmidial pGEX-4T1 suspenso em TE e a faixa 3 a pGEX-4T1 suspenso em DMSO a 5% como controle do solvente utilizado.

As faixas 4, 5 e 6 apresentaram os resultados obtidos após a incubação do plasmídeo pGEX-4T1 incubado com diluições de Ag-PROB de $1000 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $250 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, as faixas 7,8 e 9 apresentaram os resultados obtidos após a incubação do

plasmídeo pGEX-4T1 incubado com diluições de Ag-HoBt de 1650 mmol·L⁻¹ a 412,5 mmol·L⁻¹ e as faixas 10 e 11 incubadas com plasmídeo pGEX-4T1 incubado com cisplatina (0,05 mmol·L⁻¹ e 0,025 mmol·L⁻¹ em DMSO 5%), e a faixa 12 corresponde ao plasmídeo pGEX-4T1 incubado com AgNO₃ (0,05 mmol·L⁻¹ em DMSO 5%).

O não desaparecimento de RCF, SPF e SCF nas faixas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 mostra que o perfil de migração das bandas de DNA não foi alterado, não ocorrendo à interação dos complexos metálicos Ag-PROB e Ag-HoBt ao DNA plasmidial nas concentrações analisadas, demonstrando assim que os complexos metálicos não interagem com o DNA nas condições experimentais. Como descrito anteriormente, a prata(I) possui atividade por múltiplos mecanismos de ação, podendo apresentar atividade antibacteriana por atuar penetrando na membrana celular do microrganismo e alterar a estrutura da parede celular através de proteínas de transmembrana, e interferência no sistema de transporte de elétrons, assim dentro da célula, os alvos de íons prata(I) são principalmente as proteínas, além de interagir com o DNA (12,46,145).

Assim como observado para o Ag-*p*ABA, os resultados obtidos demonstraram efeito semelhante de interação de DNA observada no controle com cisplatina e o nitrato de prata não levou a alterações perceptíveis no perfil eletroforético do DNA, pois o padrão das bandas é o mesmo do controle.

4.4.7 Avaliação da Estabilidade dos complexos metálicos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt à exposição ao ar e luz

Os discos impregnados com os complexos metálicos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt foram mantidos expostos ao ar/luz por 120 horas. Foi observado para o complexo Ag-*p*ABA que os discos apresentaram mudanças de cor, indicando que um processo de

decomposição lento pode ter ocorrido durante esse período exposição ao ar/luz e que o complexo Ag-*p*ABA apresentou estabilidade. Foi observado que o composto começou a ficar marrom após 24 horas intensificando a tonalidade e após 96 horas. Mesmo após 120 horas de exposição ar/luz, os resultados do teste antimicrobiano por difusão em disco mostram que a atividade antimicrobiana foi pouco afetada.

Os, discos contendo o complexo Ag-PROB não apresentaram mudanças significativas de cor, indicando que o tempo de exposição não altera a coloração do mesmo. Entretanto, o composto alterou um pouco a cor inicial após 24 horas, mas não de forma significativa. Mesmo após 120 horas de exposição ao ar/luz, os resultados do teste antimicrobiano por difusão em disco mostram que a atividade antimicrobiana foi pouco afetada.

Para o complexo Ag-HoBt os discos apresentaram mudanças significativas de cor, indicando alteração da estabilidade na presença de ar/luz. Foi observado que o composto começou a ficar marrom após 24 horas e até 72 horas, após 96 horas, ficou mais escuro. Mesmo após 120 horas de exposição ao ar/luz, os resultados do teste antimicrobiano por difusão em disco mostram que a atividade antimicrobiana foi pouco afetada.

Os dados obtidos referentes a cor dos complexos estão resumidos nas Figuras 22, 23 e 24 a seguir.



Figura 22. Discos de Ag-*p*ABA expostos ao ar/luz de 0 -120 horas

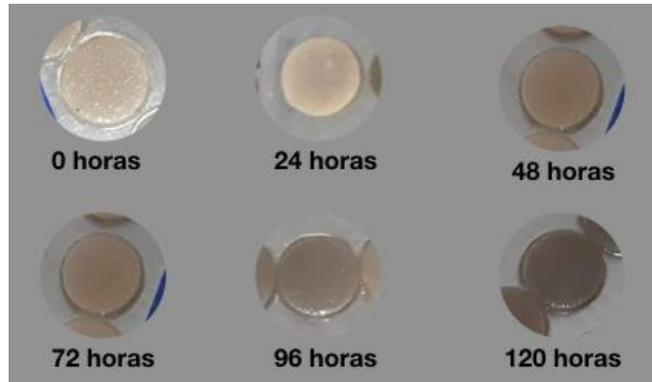


Figura 23. Discos de Ag-PROB expostos ao ar/luz de 0 -120 horas

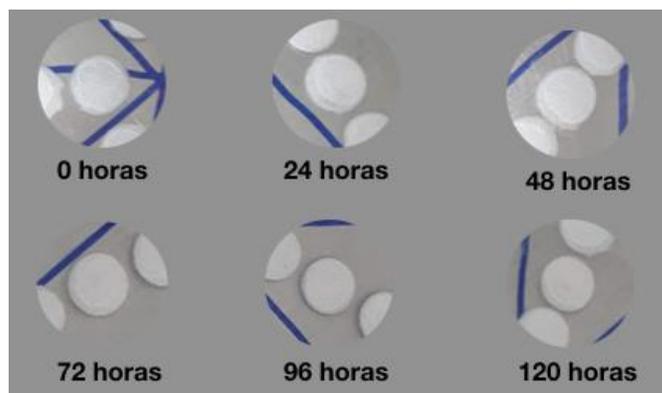


Figura 24. Discos de Ag-HoBt expostos ao ar/luz de 0 -120 horas

4.4.7.1. Ensaio antimicrobiano por difusão em disco após exposição dos complexos metálicos ao ar e luz

Foi realizado a avaliação da atividade antimicrobiana do complexo metálico após o período de exposição de 0 a 120 horas na presença de ar e luz. Foi utilizado cepa bacteriana gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922). Os resultados do teste de atividade biológica pela técnica de difusão em discos realizados para os complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19. Perfis de sensibilidade do Microrganismo *S. aureus* aos complexos Ag-*p*ABA Ag-PROB e Ag-HoBt após período de exposição de 0 a 120 horas

Halos de inibição em mm					
	0-24 horas	24-48 horas	48-72 horas	72-96 horas	96-120 horas
Ag- <i>p</i> ABA	13,3	13,1	13,0	13,0	12,0
Ag-PROB	15,3	14,6	14,5	12,0	12,0
Ag-HoBt	12,4	12,0	13,1	13,0	13,0

Conforme tabela 18, os complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt apresentaram atividade inibitória sobre a cepa testada mesmo após o período de 120 horas de exposição. Como observado, nas figuras abaixo o diâmetro do halo de inibição pelos complexos foi diminuindo em função do tempo, devido à exposição, assim confirmando que o processo de decomposição lento que ocorreu durante esse período para os complexos que altera a sua estabilidade e influencia em suas atividades biológicas.

Os resultados demonstram assim o potencial da utilização dos complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt para incorporação em suportes biocompatíveis para aplicação tópica como sistema de liberação sustentada, garantindo a ação do efeito do

complexo mesmo na exposição à luz, por um longo período, permitindo a manutenção do tratamento sem a necessidade de trocas diárias, promovendo maior eficácia do tratamento.

Nas Figuras 25, 26 e 27 encontra-se as imagens das zonas dos halos de inibição da liberação dos complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt no período de exposição de até 120 horas.

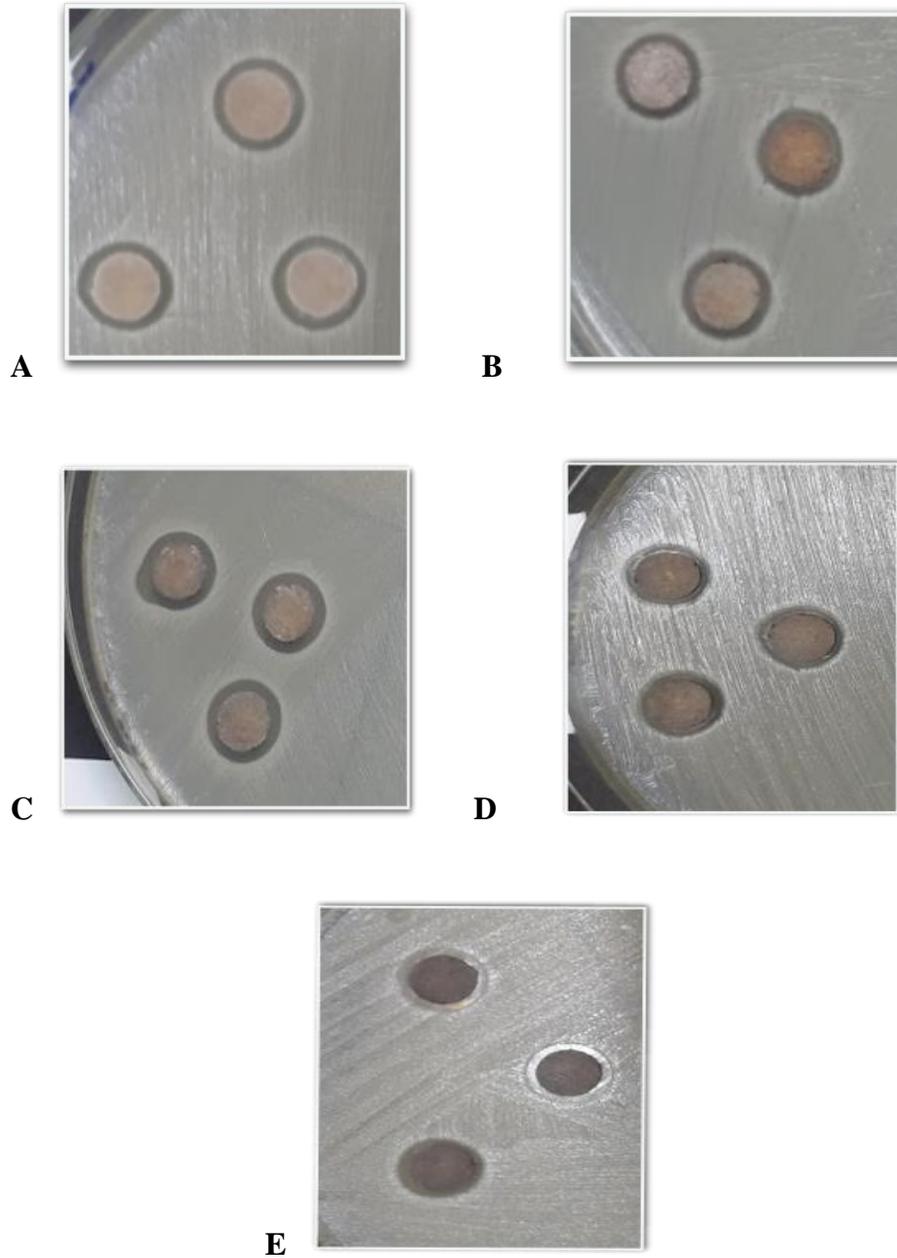


Figura 25. Halos de inibição do complexo Ag-*p*ABA durante período de exposição ao ár/luz. A: 0-24 horas, B:24-48 horas, C:48-72 horas, D: 72-96 horas, E: 96-120 horas

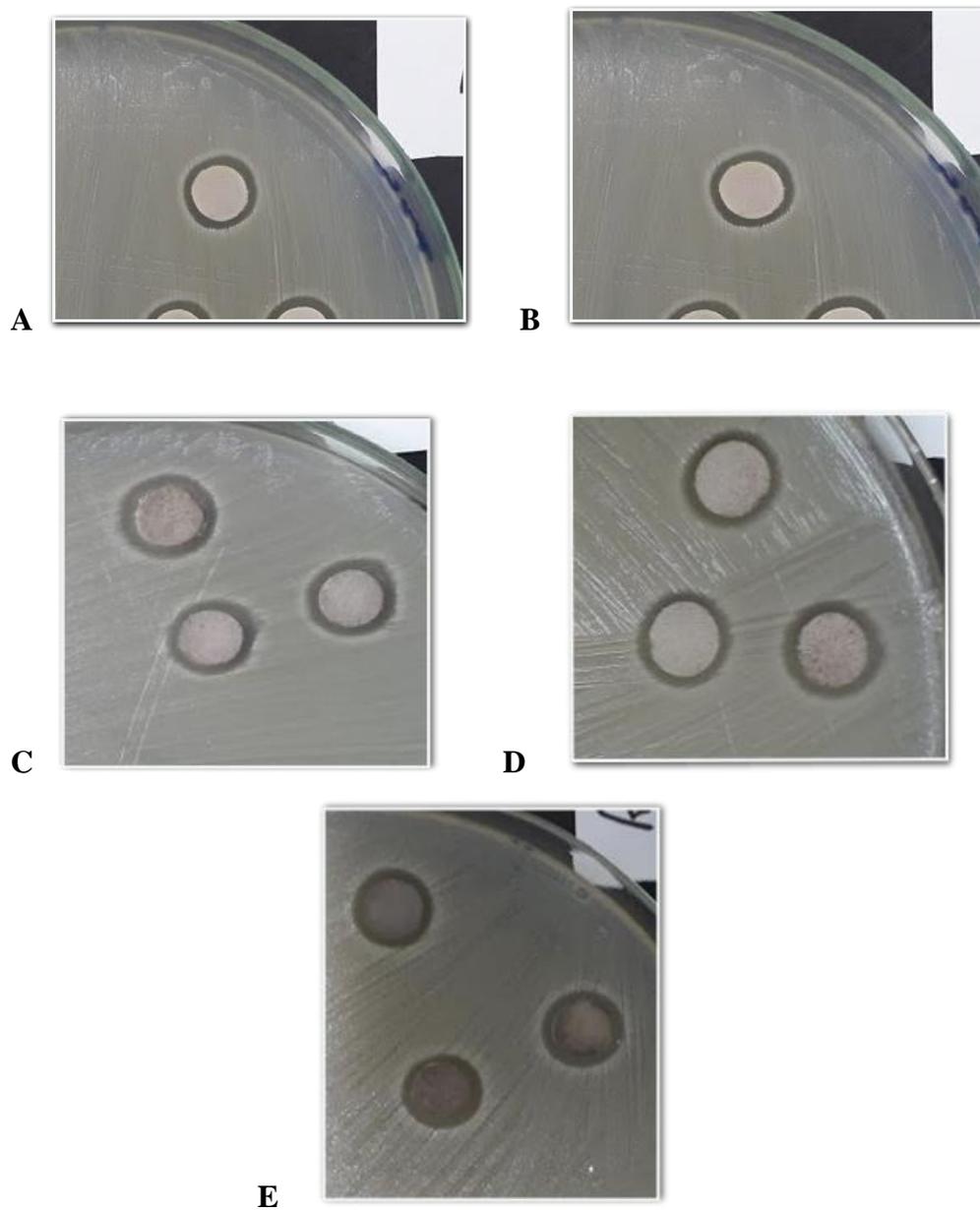


Figura 26. Halos de inibição do complexo Ag-PROB durante período de exposição ao ar/luz. A: 0-24 horas, B:24-48 horas, C:48-72 horas, D: 72-96 horas, E: 96-120 hora

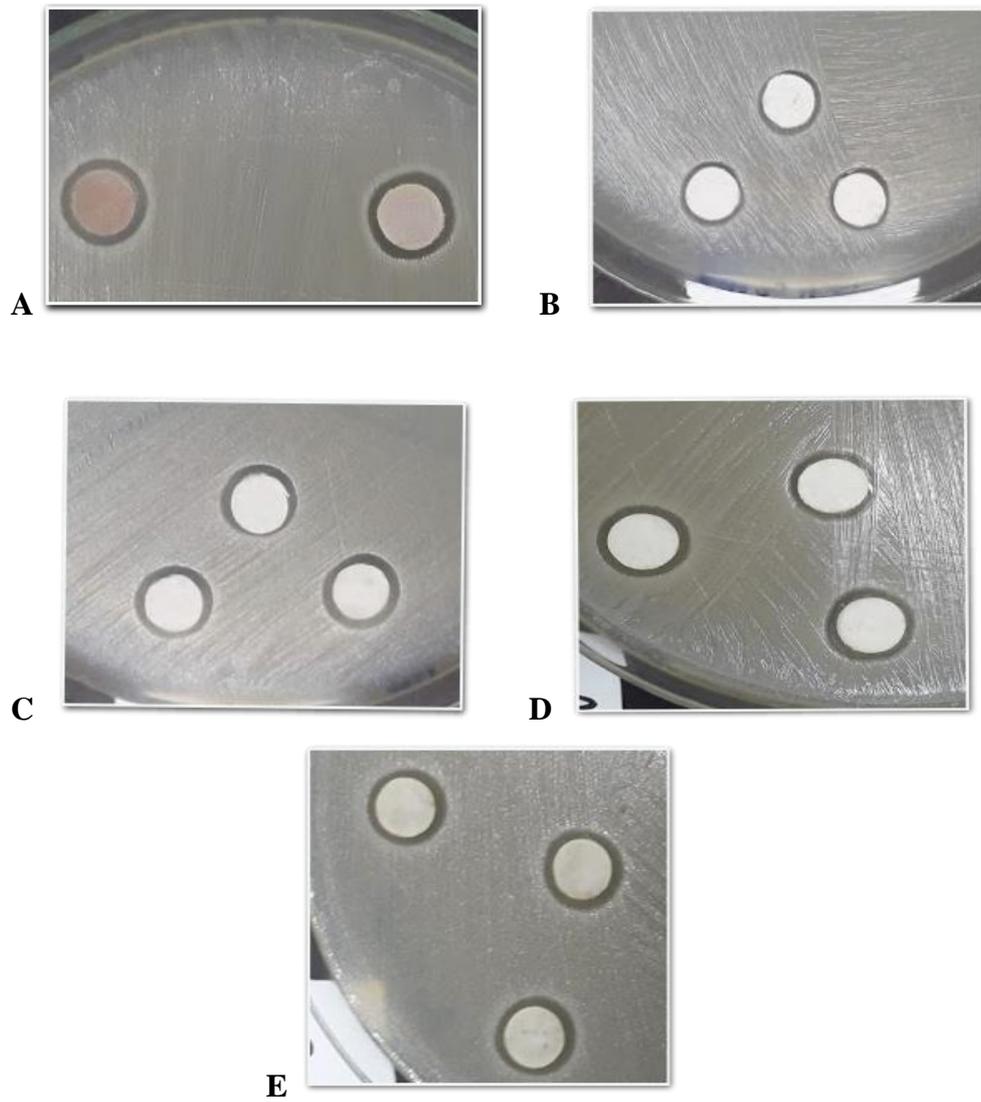


Figura 27. Halos de inibição do complexo Ag-HoBt durante período de exposição ao ar/luz. A: 0-24 horas, B:24-48 horas, C:48-72 horas, D: 72-96 horas, E: 96-120 horas

5. CONCLUSÕES

Foram obtidos três complexos metálicos de Ag(I) com *p*ABA, PROB e HoBt.

O complexo Ag-*p*ABA $\text{AgC}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentou estequiometria 1:2, Ag-PROB $[\text{Ag}(\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{S})]\text{H}_2\text{O}$ 1:1 e Ag-HoBt 1:1 $[\text{Ag}(\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_3\text{O})]\text{H}_2\text{O}$.

Foram obtidos monocristais somente do complexo Ag-*p*ABA e sua estrutura foi determinada por DRX.

Os complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt apresentaram ação inibitória, *in vitro*, sobre as cepas de microrganismos ATCC Gram-positivos e Gram-negativos, cepas resistentes e *M. tuberculosis* evidenciando o potencial para aumento do arsenal terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas.

O complexo Ag-*p*ABA e Ag-PROB, apresentaram atividade antiproliferativa sobre um painel de células tumorais, com significativo índice de seletividade, resultados promissores para futura ampliação do arsenal terapêutico de agentes antitumorais.

Os complexos Ag-*p*ABA, Ag-PROB e Ag-HoBt foram isentos de atividade mutagênica.

O complexo Ag-*p*ABA apresentou a interação com DNA na concentração de $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Os complexos metálicos Ag-PROB e Ag-HoBt não apresentaram interação com DNA nas condições experimentais analisadas.

6. PERSPECTIVAS

Serão realizados os ensaios de caracterização do complexo Ag-HoBt por técnicas instrumentais de espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{15}N .

Avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa do complexo Ag-HoBt sobre linhagens celulares normais e tumorais.

Avaliação da atividade antibacteriana e antitumoral, *in vivo*, em modelo animal.

Avaliação da toxicidade sistêmica, *in vivo*, em modelos animais para a avaliação dos padrões de segurança para testes em humanos.

Realização de testes em humanos e entrada com documentação para aprovação em órgãos competentes.

7. REFERÊNCIAS

1. Corbi PP, Formiga ALB, Bonk FA, Quintão FA, Ferraresi DKD, Lustri WR, et al. Synthesis, spectroscopic characterization and molecular modeling of a tetranuclear platinum(II) complex with thiazolidine-4-carboxylic acid. *J Mol Struct* [Internet]. 2012;1019:21–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.03.074>
2. Navarro M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coord Chem Rev*. 2009;253(11–12):1619–26.
3. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:599–616.
4. Abbehausen C, Castro JF, Spera MBM, Heinrich TA, Costa-Neto CM, Lustri WR, et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies and biological assays of a novel gold(I) complex with 2-mercaptothiazoline. *Polyhedron* [Internet]. 2011;30(13):2354–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2011.06.021>
5. Costa GSM, Corbi PP, Abbehausen C, Formiga ALB, Lustri WR, Cuin A. Silver(I) and gold(I) complexes with penicillamine: Synthesis, spectroscopic characterization and biological studies. *Polyhedron*. 2012;34(1):210–4.
6. Bormio Nunes JH, De Paiva REF, Cuin A, Lustri WR, Corbi PP. Silver complexes with sulfathiazole and sulfamethoxazole: Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure and antibacterial assays. *Polyhedron* [Internet]. 2015;85:437–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2014.09.010>

7. Spectroscopic characterization and biological studies in vitro of a new silver complex with furosemide: Prospective of application as an antimicrobial agent.
8. Abu-Dief AM, Mohamed IMA. A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* [Internet]. 2015;4(2):119–33. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314853515000256>
9. Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*. 2000;26(2):131–8.
10. Charles L. Silver Sulfadiazine - A new topical. *Arch Surg*. 1968;4–8.
11. Abdullah NS, Hassan MA, Hassan RO. Spectrophotometric determination of chlorthalidone in pharmaceutical formulations using different order derivative methods. *Arab J Chem* [Internet]. 2014; Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.02.002>
12. De Paiva REF, Abbehausen C, Gomes AF, Gozzo FC, Lustri WR, Formiga ALB, et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies and antibacterial assays of a novel silver(I) complex with the anti-inflammatory nimesulide. *Polyhedron* [Internet]. 2012;36(1):112–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2012.02.002>
13. Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev*. 2014;114(8):4540–63.
14. Kenny RG, Marmion CJ. Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs - A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens? *Chem Rev*. 2019;119(2):1058–137.

15. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature*. 2019;575(November):299–309.
16. Barnett ROSENBERG, Loreta VANCAMP JET& VHM. Platinun Compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature*. 1969;222(5191):386–7.
17. Farrell NP. Multi-platinum anti-cancer agents. Substitution-inert compounds for tumor selectivity and new targets. *Chem Soc Rev*. 2015;44(24):8773–85.
18. Allardyce CS, Dyson PJ. Metal-based drugs that break the rules. *Dalt Trans*. 2016;45(8):3201–9.
19. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;42(3):317–25.
20. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev*. 2016;116(5):3436–86.
21. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: An historical perspective and an update. *Eur J Cancer*. 1998;34(10):1522–34.
22. Ruiz-Azuara L, E. Bravo-Gomez M. Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. *Curr Med Chem [Internet]*. 2010;17(31):3606–15. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78449254728&partnerID=tZOtx3y1>
23. Bravo-Gómez ME, Campero-Peredo C, García-Conde D, Mosqueira-Santillán MJ, Serment-Guerrero J, Ruiz-Azuara L. DNA-binding mode of antitumoral

- copper compounds (Casiopinas®) and analysis of its biological meaning. *Polyhedron*. 2015;102:530–8.
24. Samanta T, Munda RN, Roymahapatra G, Nandy A, Saha K Das, Al-Deyab SS, et al. Silver(I), Gold(I) and Gold(III)-N-Heterocyclic carbene complexes of naphthyl substituted annelated ligand: Synthesis, structure and cytotoxicity. *J Organomet Chem* [Internet]. 2015;791:183–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.05.049>
 25. Cavicchioli M, Massabni AC, Heinrich TA, Costa-Neto CM, Abrão EP, Fonseca BAL, et al. Pt(II) and Ag(I) complexes with acesulfame: Crystal structure and a study of their antitumoral, antimicrobial and antiviral activities. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2010;104(5):533–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.01.004>
 26. Zhang B, Luo H, Xu Q, Lin L, Zhang B. Antitumor activity of a Trans-thiosemicarbazone schiff base palladium (II) complex on human gastric adenocarcinoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(8):13620–31.
 27. Liang X, Luan S, Yin Z, He M, He C, Yin L, et al. Recent advances in the medical use of silver complex. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018;157:62–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.057>
 28. Basta AH, El-Saied H, Hasanin MS, El-Deftar MM. Green carboxymethyl cellulose-silver complex versus cellulose origins in biological activity applications. *Int J Biol Macromol*. 2018;107(PartA):1364–72.
 29. Banti CN, Hadjikakou SK. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(i) compounds. *Metallomics* [Internet]. 2013;5(6):569. Available from:

<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3mt00046j>

30. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria : Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers , Environmental Bacteria , and Clinical Pathogens. 2018;9(November):1–21.
31. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing : Review of the literature. 2007;33:139–48.
32. Poon VKM, Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: Implication for clinical wound care. Burns. 2004;30(2):140–7.
33. Warriner R, Burrell R. Infection and the Chronic Wound. Adv Skin Wound Care. 2005;18(Supplement 1):2–12.
34. Wright JB, Lam K, Hansen D BR. Efficacy of Topical Silver Against Fungal Burns Wounds Pathogens. Am J Infect 1999;(27):344–50.
35. Fox CL, Modak SM. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. Antimicrob Agents Chemother. 1974;5(6):582–8.
36. Clarke MJ. Ruthenium metallopharmaceuticals. Coord Chem Rev. 2002;232(1–2):69–93.
37. Topală T, Bodoki AE, Hangan A, Gheorghe-Cetean S, Oprean L. Revisiting therapeutic sulfonamides in the attempt to improve the antimicrobial properties through metal-ion coordination. Farmacia. 2019;67(5):749–58.
38. Mizdal CR, Stefanello ST, da Costa Flores V, Agertt VA, Bonez PC, Rossi GG, et al. The antibacterial and anti-biofilm activity of gold-complexed sulfonamides against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Microb

- Pathog. 2018;123(July):440–8.
39. Modak SM, Fox CL. Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Pharmacol.* 1973;22(19):2391–404.
 40. Marx DE, Barillo DJ. Silver in medicine: The basic science. *Burns.* 2014;40(S1):S9–18.
 41. Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial Silver. *Met Based Drugs.* 1994;1(5–6):467–82.
 42. Muller M. Bacterial silver resistance gained by cooperative interspecies redox behavior. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(8).
 43. Medici S, Peana M, Crisponi G, Nurchi VM, Lachowicz JI, Remelli M, et al. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coord Chem Rev* [Internet]. 2016;327–328:349–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2016.05.015>
 44. Marques LL, Manzoni de Oliveira G, Schulz Lang E, Anraku de Campos MM, Soccol Gris LR. New gold(I) and silver(I) complexes of sulfamethoxazole: Synthesis, X-ray structural characterization and microbiological activities of triphenylphosphine(sulfamethoxazolato-N₂)gold(I) and (sulfamethoxazolato)silver(I). *Inorg Chem Commun.* 2007;10(9):1083–7.
 45. Ramadan AM. Structural and biological aspects of copper (II) complexes with 2- methyl-3-amino-(3H)-quinazolin-4-one. *J Inorg Biochem.* 1997;65(3):183–9.
 46. Nomiya K, Yokoyama H. Syntheses, crystal structures and antimicrobial

- activities of polymeric silver(i) complexes with three amino-acids [aspartic acid (H₂asp), glycine (Hgly) and asparagine (Hasn)]Note: For ease of reference during discussion of their anions, H₂asp, Hgly and . J Chem Soc Dalt Trans [Internet]. 2002;(12):2483–90. Available from:
<http://xlink.rsc.org/?DOI=b200684g>
47. Zanvettor NT, Abbehausen C, Lustri WR, Cuin A, Masciocchi N, Corbi PP. Silver sulfadoxinate: Synthesis, structural and spectroscopic characterizations, and preliminary antibacterial assays in vitro. J Mol Struct. 2014;1082:180–7.
 48. Paiva IL, De Carvalho GSG, Da Silva AD, Corbi PP, Bergamini FRG, Formiga ALB, et al. Silver(I) complexes with symmetrical Schiff bases: Synthesis, structural characterization, DFT studies and antimycobacterial assays. Polyhedron [Internet]. 2013;62:104–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2013.06.031>
 49. Ghatak a, Brar MJ, Agarwal a, Goel N, Rastogi a K, Vaish a K, et al. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. Int J Cardiol. 1996;57(2):119–27.
 50. Fiori ATM, Lustri WR, Magalhães A, Corbi PP. Chemical, spectroscopic characterization and antibacterial activities in vitro of a novel gold(I)-ibuprofen complex. Inorg Chem Commun. 2011;14(5):738–40.
 51. Karataş MO, Olgundeniz B, Günal S, Özdemir İ, Alıcı B, Çetinkaya E. Synthesis, characterization and antimicrobial activities of novel silver(I) complexes with coumarin substituted N-heterocyclic carbene ligands. Bioorg Med Chem [Internet]. 2015;24(4):643–50. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808961530198X>

52. Kozubík A, Horváth V, Švihálková-Šindlerová L, Souček K, Hofmanová J, Sova P, et al. High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(3):373–83.
53. Budzisz E, Keppler BK, Giester G, Wozniczka M, Kufelnicki A, Nawrot B. Synthesis, crystal structure and biological characterization of a novel palladium(II) complex with a coumarin-derived ligand. *Eur J Inorg Chem.* 2004;(22):4412–9.
54. DIRCEU APARECIDO GONÇALVES DE SOUZA. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS METÁLICOS CONTENDO ÁCIDO-3-CARBOXICUMARINA. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA. Mestr EM Biotecnol E INOVAÇÃO EM SAÚDE. 2017;6:5–9.
55. Guerra W, De Andrade Azevedo E, De Souza Monteiro AR, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza E, Nascimento AMA, et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. *J Inorg Biochem.* 2005;99(12):2348–54.
56. Sharma K, Biyala MK, Swami M, Fahmi N, Singh R V. Coordination chemistry of palladium(II) and platinum(II) complexes with bioactive Schiff bases: Synthetic, spectral, and biocidal aspects. *Russ J Coord Chem [Internet].* 2009;35(2):142–8. Available from:

<http://link.springer.com/10.1134/S1070328409020092>

57. Corbi PP, Massabni AC, Costa-Neto CM. Synthesis and characterization of a new platinum(II) complex with L-mimosine. *J Coord Chem*. 2005;58(16):1477–83.
58. Wang R, Hong M, Luo J, Cao R, Shi Q, Weng J. Syntheses and Crystal Structures of Five Cadmium (II) Complexes Derived from 4-Aminobenzoic Acid. 2002;
59. Baran W, Adamek E, Ziemiańska J, Sobczak A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *J Hazard Mater*. 2011;196:1–15.
60. Wu J, Zheng Y, Song W, Luan J, Wen X, Wu Z, et al. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;102(1):762–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.093>
61. Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou Q. Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2009;777–91.
62. Chang TY, Hu ML. Concentrations and lipid peroxidation in tissues and toxicity of para-aminobenzoic acid fed to rats in drinking water. *J Nutr Biochem*. 1996;7(7):408–13.
63. Sagone ALJ, Husney RM, Davis WB. Biotransformation of para-aminobenzoic acid and salicylic acid by PMN. 1993;14:27–35.
64. Guedes GP, Farias FF, Novak MA, MacHado FLDA, Vaz MGF. Synthesis,

- crystal structure, magnetism and specific heat of a new copper(II) compound with p-aminobenzoic acid. *Inorganica Chim Acta*. 2011;378(1):134–9.
65. Zhang ZQ, Huang RD, Dong LJ, Xu YQ, Yu LQ, Jiao ZW, et al. Synthesis, structures, luminescence/magnetic properties of complexes of the M/1-hydroxybenzotriazole, M = cobalt, nickel, silver, zinc and copper. *Inorganica Chim Acta*. 2009;362(9):3056–64.
66. Hammud HH, Holman KT, Masoud MS, El-Faham A, Beidas H. 1-Hydroxybenzotriazole (HOBt) acidity, formation constant with different metals and thermodynamic parameters: Synthesis and characterization of some HOBt metal complexes - Crystal structures of two polymers: $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OBt})_2(\mu\text{-OBt})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{EtOH}$ (1A) an. *Inorganica Chim Acta*. 2009;362(10):3526–40.
67. Bakhtiar R, Ochiai EI. Pharmacological applications of inorganic complexes. *Gen Pharmacol*. 1999;32(5):525–40.
68. Ahmed MU, Bennett DJ, Hsieh TC, Doonan BB, Ahmed S, Wu JM. Repositioning of drugs using open-access data portal DTome: A test case with probenecid (Review). *Int J Mol Med*. 2016;37(1):3–10.
69. Roy A, Saha S, Roy MN. Exploration of inclusion complexes of probenecid with α and β -cyclodextrins: Enhancing the utility of the drug. *J Mol Struct*. 2017;1144:103–11.
70. Silverman W, Locovei S, Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Physiol*. 2008;295(3):C761–7.
71. Robbins N, Koch SE, Tranter M, Rubinstein J. The history and future of

- probenecid. *Cardiovasc Toxicol.* 2012;12(1):1–9.
72. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr.* 2008 Jan;A64(1):112–22.
73. Dolomanov O V., Bourhis LJ, Gildea RJ, Howard JAK, Puschmann H. OLEX2 : a complete structure solution, refinement and analysis program. *J Appl Crystallogr.* 2009 Apr;42(2):339–41.
74. Development M. *Standard for Quality in Your Laboratory With CLSI.* 2018;
75. CLSI. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th eDITI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15.\r. 2017. 282 p.
76. Forde BM, Zakour NL Ben, Stanton-cook M, Phan M, Totsika M, Peters KM, et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* EC958 : A High Quality Reference Sequence for the Globally Disseminated Multidrug Resistant E . coli O25b : H4-ST131 Clone. 2014;9(8).
77. Chen SL, Hung C, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, et al. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli* : A comparative genomics approach. 2006;103(15).
78. Welch RA, Burland V, Iii GP, Redford P, Roesch P, Rasko D, et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. 2002;

79. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 , an opportunistic pathogen. 2000;406(August):959–64.
80. Greene KD, Wells JG, Lewis JH, Blake PA. Illnesses Associated with *Escherichia coli* O157 : H7 Infections A Broad Clinical Spectrum. 2017;(November 1988):705–12.
81. Palomino J, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F, et al. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 2002;
82. Pavan FR, Maia PI d. S, Leite SRA, Deflon VM, Batista AA, Sato DN, et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem*. 2010;45(5):1898–905.
83. Felton JS, Wu RW. Ames/ *Salmonella* Assay: A Bacterial Test for Mutagens. *Encycl Life Sci* [Internet]. 2003;1–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0001413>
84. Bachiega P, Salgado JM, De Carvalho JE, Ruiz ALTG, Schwarz K, Tezotto T, et al. Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium. *Food Chem*. 2016;
85. Marchetti GM, Silva KA, Santos AN, Sousa IM, Tinti S V, Figueira GM, et al.

- The anticancer activity of dichloromethane crude extract obtained from *Calea pinnatifida*. *J Exp Pharmacol*. 2012;4:157–62.
86. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83(11):757–66.
 87. Orme I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(7):1943–6.
 88. Ekins S, Reynolds RC, Kim H, Koo MS, Ekonomidis M, Talaue M, et al. Bayesian models leveraging bioactivity and cytotoxicity information for drug discovery. *Chem Biol*. 2013;20(3):370–8.
 89. de Oliveira PF, Alves JM, Damasceno JL, Oliveira RAM, Júnior Dias H, Crotti AEM, et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Brazilian J Pharmacogn*. 2015;25(2):183–8.
 90. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*. 1983;113(3–4):173–215.
 91. Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*. 1982;97(4):267–81.
 92. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2000;455(1–2):29–60.
 93. Shahabadi N, Kashanian S, Mahdavi M, Sourinejad N. DNA interaction and DNA cleavage studies of a new platinum(II) complex containing aliphatic and

- aromatic dinitrogen ligands. *Bioinorg Chem Appl.* 2011;2011.
94. Wang R, Hong MC, Luo J, Jiang F, Han L, Lin Z, et al. Syntheses and characterizations of six hydrogen-bonded silver(I) complexes from assembly of silver(I) nitrate and aminobenzoic acid. *Inorganica Chim Acta.* 2004;357(1):103–14.
 95. Laufer DA, Gelb RI, Schwartz LM. Carbon-13 NMR determination of acid-base tautomerization equilibriums. *J Org Chem.* 1984 Feb;49(4):691–6.
 96. Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry.* *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd; 2008. 1–408 p.
 97. Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns.* 2004;30(4):357–61.
 98. Castellano JJ, Shafii SM, Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ, et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J.* 2007;4(2).
 99. Rizzotto M. http://cdn.intechopen.com/pdfs/39255/intech_metal_complexes_as_antimicrobial_agents.pdf (accessed Jan 25, 2016). *A Search Antibact Agents.* 2012;73–88.
 100. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.*

- 2013;11(6):371–84.
101. Mulley G, Jenkins ATA, Waterfield NR. Inactivation of the antibacterial and cytotoxic properties of silver ions by biologically relevant compounds. *PLoS One*. 2014;9(4):2–10.
 102. Shah N, Ul-Islam M, Khattak WA, Park JK. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;98(2):1585–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.018>
 103. Sim W, Barnard RT, Ziora ZM. Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications : A Patent Review of the Past Decade. 2018;(Figure 1):1–15.
 104. Nakahata DH, Lustrì WR, Cuin A, Corbi PP. Crystal structure, spectroscopic characterization and antibacterial activities of a silver complex with sulfameter. *J Mol Struct* [Internet]. 2016;1125:609–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.07.049>
 105. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe D Vanden, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *J Ethnopharmacol*. 2006;106(3):290–302.
 106. Van Duin D, Van Delden C. Multidrug-resistant gram-negative bacteria infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(SUPPL.4):31–41.
 107. Mendes MM, Carminatti M, Pinheiro HS. Severe sepsis from a Ciprofloxacin resistant salmonellosis in a kidney transplant recipient. *J Bras Nefrol*.

- 2017;39(1):82–5.
108. Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*. 2002;11(4):125–30.
 109. Tenover FC, McGowan JE. Antimicrobial resistance. *Int Encycl Public Heal*. 2008;211–9.
 110. Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem*. 2009;78(1):119–46.
 111. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* □. 2008;74(7):2171–8.
 112. Montelongo-Peralta LZ, León-Buitimea A, Palma-Nicolás JP, Gonzalez-Christen J, Morones-Ramírez JR. Antibacterial Activity of combinatorial treatments composed of transition-metal/antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2019;9(1):5–10.
 113. Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmermann BN. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med*. 2004;70(6):509–14.
 114. Jenkin G. Pyrazinamide. *Kucers Use Antibiot A Clin Rev Antibacterial, Antifung Antiparasit Antivir Drugs, Seventh Ed*. 2017;88:2361–8.
 115. Tripathi RP, Tewari N, Dwivedi N, Tiwari VK. Fighting tuberculosis: An old disease new challenges. *Med Res Rev*. 2005;25(1):93–131.
 116. Rando DG, Sato DN, Siqueira L, Malvezzi A, Leite CQF, Do-Amaral AT, et

- al. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-Nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorganic Med Chem.* 2002;10(3):557–60.
117. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–27.
118. Rafiee F, Hagi F, Bikas R, Heidari A, Gholami M, Kozakiewicz A, et al. Synthesis, characterization and assessment of anti-quorum sensing activity of copper(II)-ciprofloxacin complex against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *AMB Express.* 2020;10(1).
119. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Front Microbiol.* 2019;10(MAY).
120. Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockett C V., et al. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: Role of hemolysin in some strains. *Infect Immun.* 1990;58(5):1281–9.
121. Tanwar J, Das S, Fatima Z, Hameed S. Multidrug resistance: An emerging crisis. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2014;2014.
122. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):313–22.
123. Hidalgo E, Domínguez C. Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in

- human dermal fibroblasts. *Toxicol Lett.* 1998;98(3):169–79.
124. Hidalgo E, Bartolomé R, Barroso C, Moreno A, Domínguez C. Silver nitrate: Antimicrobial activity related to cytotoxicity in cultured human fibroblasts. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 1998;11(3):140–51.
125. Kolesarova A, Capcarova M, Sirotkin A V., Medvedova M, Kovacik J. In vitro assessment of silver effect on porcine ovarian granulosa cells. *J Trace Elem Med Biol.* 2011;25(3):166–70.
126. Kaplan A, Akalin Ciftci G, Kutlu HM. Cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of silver nitrate against H-ras transformed 5RP7. *Cytotechnology.* 2016;68(5):1727–35.
127. Chelopo MP, Pawar SA, Sokhela MK, Govender T, Kruger HG, Maguire GEM. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. *Eur J Med Chem.* 2013;66:407–14.
128. Radko L, Stypuła-Tr ebas S, Posyniak A, Zyro D, Ochocki J. Silver(I) complexes of the pharmaceutical agents metronidazole and 4-hydroxymethylpyridine: Comparison of cytotoxic profile for potential clinical application. *Molecules.* 2019;24(10).
129. Youngs WJ, Medvetz DA, Hindi KM, Panzner MJ, Ditto AJ, Yun YH. Anticancer activity of Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole. *Met Based Drugs.* 2008;2008:1–7.
130. Zaharevitz DW, Holbeck SL, Bowerman C, Svetlik PA. COMPARE: A web accessible tool for investigating mechanisms of cell growth inhibition. *J Mol*

- Graph Model. 2002;20(4):297–303.
131. Isanbor C, O'Hagan D. Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. *J Fluor Chem.* 2006;127(3):303–19.
 132. Priestman T. Cancer chemotherapy in clinical practice. *Cancer Chemotherapy in Clinical Practice.* 2012. 1–177 p.
 133. Nunes JHB, Bergamini FRG, Lustrri WR, de Paiva PP, Ruiz ALTG, de Carvalho JE, et al. Synthesis, characterization and in vitro biological assays of a silver(I) complex with 5-fluorouracil: A strategy to overcome multidrug resistant tumor cells. *J Fluor Chem.* 2017;195:93–101.
 134. Muller PY, Milton MN. index in drug development. 2012;11:751–61.
 135. Tan SJ, Yan YK, Lee PPF, Lim KH. Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs. *Future Med Chem.* 2010;2(10):1591–608.
 136. Pellei M, Gandin V, Marinelli M, Marzano C, Yousufuddin M, Dias HVR, et al. Synthesis and biological activity of ester- and amide-functionalized imidazolium salts and related water-soluble coinage metal N-heterocyclic carbene complexes. *Inorg Chem.* 2012;51(18):9873–82.
 137. Liu JJ, Galettis P, Farr A, Maharaj L, Samarasingha H, McGechan AC, et al. In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake. *J Inorg Biochem.* 2008;102(2):303–10.
 138. Zeiger E. Mutagens that are not carcinogens: Faulty theory or faulty tests?

- Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen. 2001;492(1–2):29–38.
139. Wushke S, Levin DB, Cicek N, Sparling R. Characterization of enriched aerotolerant cellulose-degrading communities for biofuels production using differing selection pressures and inoculum sources. *Can J Microbiol* [Internet]. 2013;59(10):679–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24102221>
140. Kovacic P, Somanathan R. Nitroaromatic compounds : Environmental toxicity , carcinogenicity , mutagenicity ,. 2014;(September 2013).
141. Escobar PA, Kemper RA, Tarca J, Nicolette J, Kenyon M, Glowienke S, et al. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2013;752(2):99–118.
142. Ciol MR, Manzano CM, Cuin A, Pavan FR, Ribeiro CM, Ruiz ALTG, et al. A Silver Complex with Cycloserine: Synthesis, Spectroscopic Characterization, Crystal Structure and In Vitro Biological Studies. *ChemistrySelect*. 2018;3(6):1719–26.
143. Levy MS. Quantitation of supercoiled circular content in plasmid DNA solutions using a fluorescence-based method. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):57e – 57.
144. Molloy MJ, Hall VS, Bailey SI, Griffin KJ, Faulkner J, Uden M. Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(16):1–10.
145. Rizzotto M. Metal Complexes as Antimicrobial Agents. In: *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology A Search for Antibacterial Agents*. 2012.

