



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ANNA KARLA DOS SANTOS PEREIRA

**COMPLEXOS METÁLICOS DE Ag(I) E Pt(II) COM AMINOADAMANTANOS:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E INVESTIGAÇÃO DE SUAS
ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS E ANTIVIRAIS**

CAMPINAS

2021

ANNA KARLA DOS SANTOS PEREIRA

**COMPLEXOS METÁLICOS DE Ag(I) E Pt(II) COM AMINOADAMANTANOS:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E INVESTIGAÇÃO DE SUAS
ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS E ANTIVIRAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi

O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Anna Karla dos Santos Pereira e orientada pelo Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

P414c Pereira, Anna Karla dos Santos, 1992-
Complexos metálicos de Ag(I) e Pt(II) com aminoadamantanos : síntese, caracterização estrutural e investigação de suas atividades antibacterianas e antivirais / Anna Karla dos Santos Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Pedro Paulo Corbi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Complexos metálicos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Metalofármacos. I. Corbi, Pedro Paulo, 1974-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Metal complexes of Ag(I) and Pt(II) with aminoadamantanes : synthesis, structural characterization and evaluation of their antibacterial and antiviral activities

Palavras-chave em inglês:

Metal complexes

Antimicrobial activity

Metallodrugs

Área de concentração: Química Inorgânica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Pedro Paulo Corbi [Orientador]

Italo Odone Mazali

Paulo Cesar de Sousa Filho

Alexandre Cuin

Ana Carolina Gomes Jardim

Data de defesa: 01-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3278-9387>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7842789007525774>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (Orientador)

Prof. Dr. Italo Odone Mazali (UNICAMP)

Prof. Dr. Paulo Cesar de Sousa Filho (UNICAMP)

Prof. Dr. Alexandre Cuin (UFJF)

Profª. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim (UFU)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **Anna Karla dos Santos Pereira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 1 de dezembro de 2021.

Agradecimentos

À Deus;

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi pela confiança e oportunidade de pertencer ao grupo de pesquisa e por toda atenção, dedicação e ensinamentos oferecidos;

Ao meu esposo e Prof. Dr. Douglas pela compreensão e incentivo como companheiro e pela contribuição com os dados teóricos do projeto;

Aos meus pais, Joana e Laurindo, e aos meus irmãos, Carlos e Kaio, e toda minha família pelo apoio e incentivo;

Aos meus colegas de laboratório pela convivência e parceria durante esses anos e todos os amigos que fiz em Campinas;

Ao Prof. Dr. Wilton R. Lustri pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos antibacterianos dos compostos sintetizados nesta tese;

À Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim e seu grupo de pesquisa pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos antivirais;

Ao Prof. Dr. Fernando Pavan e seu grupo de pesquisa pela colaboração com o desenvolvimento de experimentos de atividade anti-*M. tuberculosis*;

Ao Prof. Dr. Fernando Bergamini pela parceria e auxílio;

À Profa. Dra. Flávia Resende Nogueira pela colaboração na execução dos experimentos de mutagenicidade dos complexos sintetizados;

Aos Professores Dr. Wdeson Pereira Barros e Dr. Italo Odone Mazali pelas excelentes contribuições ao trabalho no exame de qualificação de área;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida, processo nº. 164658/2018-1;

Ao Instituto de Química da UNICAMP e a todo aqueles que tornaram possível a execução deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Obrigada!

Resumo

Doenças infecciosas chamam a atenção devido aos dados alarmantes de propagação e mortalidade. Em meados do século XX, os avanços na área da saúde possibilitaram a descoberta de diversos fármacos antimicrobianos que deram à população maior expectativa de vida. Entretanto, o uso indiscriminado desses medicamentos levou ao surgimento de microrganismos multirresistentes, tornando a busca por novos fármacos uma área de pesquisa crescente e de extrema importância. Dentro deste contexto, complexos metálicos de prata(I) e platina(II) com os ligantes bioativos amantadina (atd), rimantadina (rtd) e memantina (mtn) foram sintetizados, caracterizados e avaliados como potenciais fármacos antibacterianos e antivirais. As análises químicas e espectroscópicas revelaram a fórmula de coordenação $[Ag(\text{ligante})_2]NO_3$ para os complexos de Ag(I) e $[PtCl_2(\text{ligante})(\text{dmso})]$ para os complexos de Pt(II), nos quais o ligante pode ser atd, rtd ou mtn. As estruturas cristalinas dos complexos foram determinadas por difração de raios-X de monocristal. No caso dos complexos de prata, as moléculas do ligante se coordenam pelo nitrogênio do grupo amino ao metal, formando geometrias lineares com número de coordenação (NC) igual a 2. Já no caso dos complexos de Pt(II), os estudos por difração de raios X evidenciaram a formação de complexos quadrados, nos quais uma única molécula do aminoadamantano está coordenada ao metal. A esfera de coordenação é completada por uma molécula de dmso e dois cloretos. Estudos teóricos dos complexos e ligantes foram realizados e combinados com os dados experimentais para apoiar as características estruturais dos compostos sintetizados. Os ensaios de atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos mostraram que a amantadina não é ativa sobre as cepas testadas, enquanto a rimantadina e a memantina mostraram uma baixa atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Por outro lado, os complexos de Ag(I) tiveram uma atividade antibacteriana pronunciada sobre as mesmas cepas com valores de concentração inibitória mínima (CIM) na faixa micromolar, enquanto os complexos de platina mostraram-se mais ativos sobre as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas, sendo o complexo de platina(II) com memantina (Pt-mtn) o mais ativo. Ensaios biofísicos baseados em espectroscopia de fluorescência indicaram que os complexos de prata(I) e platina(II) interagem fracamente com a albumina de soro bovino, enquanto experimentos de ligação competitiva por espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular revelaram que os compostos de Ag(I) interagem com o DNA por interações não covalentes e os complexos de Pt(II) interagem com o DNA por ligações covalentes. Os complexos de prata apresentaram também potencial *in vitro*

para inibição do crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*. Por fim, os aminoadamantanos e seus complexos de prata apresentaram atividade sobre o vírus Chikungunya (CHIKV), causador da Febre Chikungunya que é uma doença sem nenhum medicamento específico descrito na literatura médica. De maneira surpreendente, o cloridrato de memantina (mtnH), que é utilizado atualmente na clínica médica na terapia do Alzheimer, apresentou um percentual inédito de 72,7% para inibição *in vitro* da infecção por CHIKV. Tal resultado mostra o potencial de reposicionamento do mtnH para o tratamento desta enfermidade.

Abstract

Infectious diseases draw attention due to alarming data on spread and mortality. In the mid-twentieth century, advances in the area of health led to the development of novel antimicrobial drugs that extended people's life expectancy. However, the indiscriminate use of these drugs has led to the emergence of multiresistant microorganisms, making the search for new drugs an extremely important area of research. In this context, metal complexes of silver(I) and platinum(II) with amantadine (atd), rimantadine (rtd) and memantine (mtn) were synthesized and characterized. The chemical and spectroscopic analyses revealed the coordination formula $[\text{Ag}(\text{ligand})_2]\text{NO}_3$ for the Ag(I) complexes and $[\text{PtCl}_2(\text{ligand})(\text{dms})]$ for the Pt(II) complexes, in which the ligand can be atd, rtd or mtn. The crystal structures of the complexes were determined by single crystal X-ray diffraction. In the case of silver complexes, the ligand molecules are coordinated by nitrogen from the amino group to the metal, forming linear geometries with coordination number (CN) equal to 2. In the case of Pt(II) complexes, the studies by X-ray diffraction showed the formation of square complexes, in which a single molecule of aminoadamantane is coordinated to the metal by its nitrogen atom. The coordination sphere is completed by a dms molecule and two chlorides. Theoretical studies of complexes and ligands were also performed and combined with the experimental data to support the structural features of the synthesized compounds. The *in vitro* antibacterial activity assays of the compounds showed that amantadine is not active over the tested strains while rimantadine and memantine showed low activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. On the other hand, the Ag(I) complexes had a pronounced antibacterial activity over the same strains with minimum inhibitory concentration (MIC) values in the micromolar range, while platinum complexes showed to be more active over Gram-positive bacteria than the Gram-negative ones. The platinum(II) memantine complex (Pt-mtn) was shown to be the most active one. Biophysical assays based on fluorescence spectroscopy indicated that silver(I) and platinum(II) complexes interact weakly with bovine serum albumin, while competitive binding experiments by fluorescence spectroscopy and circular dichroism revealed that Ag(I) compounds interact with DNA by non-covalent interactions and Pt(II) complexes by covalent ones. The silver complexes showed *in vitro* potential for inhibiting the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. Finally, the aminoadamantanes and the silver complexes showed activity against the Chikungunya virus (CHIKV) that causes Chikungunya Fever, which is a disease without any specific medication

described in the medical literature. Surprisingly, memantine hydrochloride (mtnH), which is currently used in clinical medicine for Alzheimer's therapy, presented an unprecedented percentage of 72.7% for *in vitro* inhibition of CHIKV infection. This result shows the potential for repositioning mtnH for the treatment of this infectious disease.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular da (a) sulfadiazina de prata, (b) cisplatina, (c) carboplatina e (d) oxaliplatina.	22
Figura 2: Estrutura molecular da (a) amantadina, (b) rimantadina e (c) memantina.....	23
Figura 3: Estrutura molecular da (a) aspirina, (b) talidomida e (c) sildenafil.....	25
Figura 4: Representação dos compostos (a) Ag-atd e (b) Ag-mtn. Elipsóides de deslocamento são representadas no nível de probabilidade de 50%. A desordem do grupo nitrato do complexo Ag-atd é representada por elipsóides translúcidos. As moléculas de água desordenadas do complexo Ag-mtn não são mostradas. Apenas um dos ligantes mtn em Ag-mtn é marcado e os átomos de hidrogênio não foram marcados, para maior clareza. Códigos de simetria: (i) - x + 1, - y + 2, - z + 1; (ii) - x + 1, y, - z + 1/2.....	42
Figura 5: Espectros no infravermelho de (a) Ag-atd, (b) atdH, (c) Ag-mtn, (d) mtnH.....	44
Figura 6: Estruturas dos complexos (a) $[Ag(atd)_2]^+$ (topo) e $[Ag(mtn)_2]^+$ (baixo): (a) Otimizado no nível wB97XD/6-31+G(d, p)/LANL2DZ e (b) Estruturas cristalinas experimentais.....	45
Figura 7: HOMO, LUMO e gap para: (a) atd e (b) $[Ag(atd)_2]^+$	47
Figura 8: HOMO, LUMO e gap para: (a) mtn e (b) $[Ag(mtn)_2]^+$	47
Figura 9: As curvas de TG e DTA de (a) Ag-atd e (b) Ag-mtn.....	48
Figura 10: Espectro de massas para (a) Ag-atd e (b) Ag-mtn.....	50
Figura 11: Padrões isotópicos para os íons $[Ag(L)_2]^+$: (a) experimental e (b) calculado para Ag-atd - $[Ag(C_{10}H_{17}N)_2]^+$, enquanto (c) e (d) correspondem à Ag-mtn - $[Ag(C_{12}H_{21}N)_2]^+$	50
Figura 12: Espectros de RMN 1H para (a) atdH, (b) Ag-atd. Os espectros dos ligantes protonados e dos complexos de prata foram registrados em DMSO- d_6	51
Figura 13: Espectros de RMN 1H para (a) mtnH, (b) Ag-mtn. Os espectros dos ligantes protonados e dos complexos de prata foram registrados em DMSO- d_6	52
Figura 14: Mapas de correlção de HMBC $\{^{15}N, ^1H\}$ para (a) atdH, (b) Ag-atd, (c) mtnH e (d) Ag-mtn em DMSO- d_6	53
Figura 15: Espectros de RMN de 1H para Ag-atd registrados por 24 h em DMSO- d_6 à 25 °C.....	54
Figura 16: Espectros de RMN de 1H para Ag-mtn registrados por 24 h em DMSO- d_6 à 25 °C	54

Figura 17: Espectros de supressão da fluorescência de BSA por (a)Ag-mtn (b)Ag-atd e (c) AgNO ₃	58
Figura 18: Eletroforese em gel de agarose do DNA circular na presença de atdH, mtnH, Ag-atd, Ag-mtn, AgNO ₃ e cisplatina em diferentes concentrações. OC = circular aberta, LF = forma linear e SC = formas superenoveladas do plasmídeo pGEX-4T1.....	60
Figura 19: Intensidades de fluorescência de SG na presença de DNA livre e DNA incubado com atdH, mtnH, Ag-atd e Ag-mtn na proporção (composto/DNA) 0,3.....	61
Figura 20: Representação molecular dos compostos (a) Pt-atd*, (b) Pt-rtd e (c) Pt-mtn. Elipsóides representadas com 50% de probabilidade. Os átomos de hidrogênio não foram rotulados, para maior clareza. *Apenas uma das quatro unidades assimétricas da estrutura do cristal do complexo Pt-atd é mostrada.....	62
Figura 21: Espectros no infravermelho dos complexos de platina.....	64
Figura 22: Espectros no infravermelho dos ligantes e do precursor metálico.....	64
Figura 23: HOMO, LUMO e gap para: A1) atd, A2) <i>cis</i> -[PtCl ₂ (atd)(DMSO)], A3) <i>trans</i> -[PtCl ₂ (atd)(DMSO)], M1) mtn, M2) <i>cis</i> -[PtCl ₂ (mtn)(DMSO)], M3) <i>trans</i> -[PtCl ₂ (mtn)(DMSO)], R1) rtd, R2) <i>cis</i> -[PtCl ₂ (rtd)(DMSO)], R3) <i>trans</i> -[PtCl ₂ (rtd)(DMSO)]. Dados obtidos no nível teórico B3LYP/6-31+G(d, p)/LANL2DZ.....	66
Figura 24: Curvas TG (azul) e DTG (preto) de (a) Pt-atd, (b) Pt-rtd e (c) Pt-mtn.....	68
Figura 25: Padrões isotópicos do pico do íon molecular (a) experimental e (b) calculado para Pt-atd, enquanto (c) e (d) correspondem a Pt-rtd e (e) e (f) correspondem a Pt-mtn.....	69
Figura 26: Espectros de massas de (a) Pt-atd, (b) Pt-rtd e (c) Pt-mtn.....	70
Figura 27: Espectros de RMN ¹ H de (a) atdH, (b) rtdH e (c) mtnH em DMSO- <i>d</i> ₆ e de (d) Pt-atd, (e) Pt-rtd e (f) Pt-mtn em CD ₂ Cl ₂	71
Figura 28: Mapa de correlção { ¹⁵ N, ¹ H} HMBC de (a) atdH, (b) rtdH, (c) mtnH em DMSO- <i>d</i> ₆ e de (d) Pt-atd, (e) Pt-rtd e (f) Pt-mtn em CD ₂ Cl ₂	73
Figura 29: RMN de ¹⁹⁵ Pt e deslocamentos químicos (ppm) dos complexos metálicos.....	73
Figura 30: Estudos cinéticos de Pt-atd por 24 horas à 25 °C por RMN ¹ H. Os sinais de DMSO coordenado (3,27 ppm) e DMSO não coordenado (2,55 ppm) são indicados pelas setas.....	75
Figura 31: Estudos cinéticos de Pt-rtd durante 24 horas à 25 °C por RMN ¹ H. Os sinais de DMSO coordenado (3,31 ppm) e DMSO não coordenado (2,55 ppm) são indicados pelas setas. A intensidade dos sinais entre 1,20 e 2,00 ppm foi aumentada para melhor visualização.....	76

Figura 32: Estudos cinéticos de Pt-mtn durante 24 horas à 25 °C por RMN ¹ H. Os sinais de DMSO coordenado (3,47 ppm) e DMSO não coordenado (2,55 ppm) são indicados pelas setas. A intensidade dos sinais entre 1,00 e 1,80 ppm foi aumentada para melhor visualização.....	76
Figura 33: Cinética de troca de DMSO nos três complexos de platina.....	77
Figura 34: Espectros da supressão de fluorescência de BSA por (a) Pt-atd, (b)Pt-rtd, (c)Pt-mtn e (d) <i>cis</i> -[PtCl ₂ (DMSO) ₂].....	83
Figura 35: Eletroforese em gel de agarose para DNA plasmidial pGEX-4T1 na presença dos compostos na concentração de 80 μmol·L ⁻¹	84
Figura 36: Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA (100 μmol·L ⁻¹ em tampão fosfato e 1% de DMSO, linhas tracejadas) na presença de (a) atdH, (b) mtnH e (c) rtdH nas razões molares r = 0,1, 0,3 e 0,5 (cinza claro, cinza e cinza escuro, respectivamente).....	86
Figura 37: Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA (100 μmol·L ⁻¹ em tampão fosfato e 1% de DMSO, linhas tracejadas) na presença de (a) Pt-atd, (b) Pt-rtd, (c) Pt-mtn e (d) <i>cis</i> -[PtCl ₂ (DMSO) ₂] nas razões molares r = 0,1, 0,3 e 0,5 (cinza claro, cinza e cinza escuro, respectivamente).....	87
Figura 38: Porcentagem de replicação de CHIKV (quadrado fechado) e a viabilidade celular (círculo fechado) de células BHK–21 infectadas com CHIKV- <i>nanoluc</i> na presença ou ausência de mtnH* com concentrações variando de 500 a 1,45 μmol L ⁻¹	88

Lista de Tabelas

Tabela 1: Detalhes experimentais para determinação da estrutura cristalina e refinamento de Ag-atd e Ag-mtn.....	31
Tabela 2: Detalhes experimentais para determinação da estrutura cristalina e refinamento de Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn.....	32
Tabela 3: Comprimentos de ligação experimentais e teóricos (em Å) e frequências vibracionais (em cm^{-1}) para os complexos $[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$ e $[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$	46
Tabela 4: Atribuições de RMN de ^1H e desvios químicos (ppm) para atdH, Ag-atd, mtnH e Ag-mtn. Para a numeração dos átomos de hidrogênio, consulte a Figura 12 e 13.....	52
Tabela 5: Comparação entre os valores de concentração inibitória mínima de Ag-atd, Ag-mtn, atdH, mtnH e AgNO_3 contra as quatro cepas bacterianas testadas.....	55
Tabela 6: Atividade antimicobacteriana dos complexos Ag(I) e dos compostos de partida. Os valores são apresentados em $\mu\text{g mL}^{-1}$	56
Tabela 7: Infecção por CHIKV e viabilidade de BHK-21 para os compostos de Ag(I) e seus precursores a 10 μM e 50 μM	57
Tabela 8: Constante de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de ligação (K_b) e porcentagem de redução na intensidade de fluorescência para a interação de Ag-atd, Ag-mtn e AgNO_3 com BSA.....	59
Tabela 9: Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos ($^\circ$) para as estruturas cristalinas Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn.....	63
Tabela 10: Energias calculadas para os complexos $[\text{PtCl}_2(\text{atd})(\text{DMSO})]$, $[\text{PtCl}_2(\text{mtn})(\text{DMSO})]$ e $[\text{PtCl}_2(\text{rtd})(\text{DMSO})]$ em Hartree e a diferença de energia entre as conformações <i>cis</i> e <i>trans</i> ($\Delta E_{\text{cis} - \text{trans}}$, em kcal mol^{-1}). Os valores foram obtidos com a função de base 6-31+G(d, p)/LANL2DZ.....	65
Tabela 11: Dados de comportamento térmico dos complexos.....	68
Tabela 12: Atribuições de RMN de ^1H e desvios químicos (ppm) para atdH, rtdH e mtnH em $\text{DMSO}-d_6$ e Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn em CD_2Cl_2 . Para o esquema de numeração do átomo de hidrogênio consultar Figura 27.....	72
Tabela 13: Comparação entre os valores de concentração inibitória mínima de Pt-atd, Pt-rtd, Pt-mtn, atdH, rtdH, mtnH e $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ contra as quatro cepas bacterianas testadas.....	79

Tabela 14: Atividade antimicobacteriana dos complexos de Pt(II) e dos materiais de partida.....	80
Tabela 15: Infecção por CHIKV e viabilidade de BHK-21 para os compostos de Pt(II) e seus precursores a 10 μ M e 50 μ M.....	80
Tabela 16: Revertentes/placa, desvio padrão e índice mutagênico (entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>S. typhimurium</i> após tratamento com várias doses de Pt-rtd, Pt-mtn e Pt-atd com (+ S9) e sem (- S9) ativação metabólica.....	82
Tabela 17: Constante Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b) e porcentagem de redução na intensidade de fluorescência para a interação dos compostos com BSA.....	84

Lista de abreviaturas e siglas

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção;

ATCC – Do inglês: American type collection cell;

BSA – Do inglês: Bovine Serum Albumin

CHIKV – Vírus Chikungunya

CIM – Concentração inibitória mínima;

CT-DNA – Do inglês: Calf Thymus DNA

DFT – Do inglês: Density Functional Theory

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DNA – Ácido Desoxirribonucleico;

FBS – Do inglês: Fetal Bovine Serum

HSA – Do inglês: Human serum albumin

LANL2DZ – Los Alamos National Laboratory – 2nd version on double zeta function;

MOI – Do inglês: multiplicity of infection

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

NMDA – N-metil D-aspartato

OADC – Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase

PBS – Do inglês: phosphate buffered saline

REMA – Do inglês: Resazurin Microtiter Plate Assay

SSD – Do inglês: silver sulfadiazine

SYBR Green – Corante de DNA: N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine;

TB – Tuberculose

ESI – Do inglês: Electrospray ionization

IV – Infravermelho

RMN – Ressonância magnética nuclear

DC – Dicroísmo circular

HMBC – Do inglês: heteronuclear multiple bond correlation

RIF – Rifampicina

MOX – Moxifloxacina

INZ – Isoniazida

Ligantes estudados na Tese:

atdH – Cloridrato de amantadina;

atd – Amantadina;

mtnH – Cloridrato de memantina;

mtn – Memantina;

rtdH – Cloridrato de rimantadina

rtd – Rimantadina;

Complexos metálicos estudados na tese:

Ag-atd – Complexo de prata(I) com amantadina;

Ag-mtn – Complexo de prata(I) com memantina;

Pt-atd – Complexo de platina(II) com amantadina;

Pt-rtd – Complexo de platina(II) com rimantadina;

Pt-mtn – Complexo de platina(II) com memantina;

Sumário

1.	Introdução	20
1.1.	Doenças infecciosas e o impacto na saúde pública	20
1.2.	Uso de complexos de prata e platina na medicina	21
1.3.	Uso clínico de aminoadamantanos	23
1.4.	Reposicionamento de fármacos	24
2.	Objetivos	26
2.1.	Objetivo Geral	26
2.2.	Objetivos específicos.....	26
3.	Parte experimental	27
3.1.	Materiais e equipamentos	27
3.2.	Sínteses	27
3.2.1.	<i>Síntese dos complexos de Ag(I) com amantadina (Ag-atd) e memantina (Ag-mtn).....</i>	<i>27</i>
3.2.2.	<i>Síntese dos complexos de Pt(II) com amantadina (Pt-atd) e rimantadina (Pt-rtd).....</i>	<i>28</i>
3.2.3.	<i>Síntese do complexo de Pt(II) com memantina (Pt-mtn).....</i>	<i>29</i>
3.3.	Determinação estrutural	30
3.3.1.	<i>Análise estrutural dos complexos Ag-atd e Ag-mtn por difração de raios X de monocristais</i>	<i>30</i>
3.3.2.	<i>Análise estrutural dos complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn por difração de raios X de monocristais.</i>	<i>31</i>
3.4.	Simulação computacional	33
3.4.1.	<i>Simulação computacional para os complexos Ag-atd e Ag-mtn.....</i>	<i>33</i>
3.4.2.	<i>Simulação computacional para os complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn</i>	<i>33</i>
3.5.	Ensaio biológico	33
3.5.1.	<i>Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM).....</i>	<i>33</i>

3.5.2.	<i>Ensaio de atividade dos compostos frente ao Mycobacterium tuberculosis</i>	34
3.5.3.	<i>Ensaio de mutagenicidade para os complexos de Pt(II)</i>	35
3.5.4.	<i>Ensaaios antivirais</i>	36
3.5.4.1.	Linhagem celular BHK-21	36
3.5.4.2.	CHIKV-nanoluciferase	36
3.5.4.3.	Viabilidade celular – Ensaio MTT	37
3.5.4.4.	Ensaaios de infecção viral <i>in vitro</i>	37
3.6.	Ensaaios biofísicos	38
3.6.1.	<i>Estudos de interação com proteína sérica bovina</i>	38
3.6.2.	<i>Estudos de interação com o DNA</i>	39
3.6.2.1.	Eletroforese em gel de agarose.....	39
3.6.2.2.	Interação dos complexos de Ag(I) com DNA por espectroscopia de fluorescência.....	40
3.6.2.3.	Interação dos complexos de Pt(II) com DNA por dicroísmo circular.....	40
3.7.	Avaliação do potencial antiviral do cloridrato de memantina	40
4.	Resultados e Discussões	42
4.1.	Complexos de Ag(I) com amantadina e memantina	42
4.1.1.	<i>Caracterização</i>	42
4.1.1.1.	Estruturas cristalinas.....	42
4.1.1.2.	Espectroscopia de absorção no infravermelho	43
4.1.1.3.	Simulação computacional.....	44
4.1.1.4.	Análise termogravimétrica	48
4.1.1.5.	Espectrometria de massas.....	49
4.1.1.6.	Ressonância magnética nuclear	50
4.1.2.	<i>Atividade antibacteriana</i>	55
4.1.3.	<i>Atividade antimicobacteriana</i>	56
4.1.4.	<i>Atividade antiviral</i>	56

4.1.5.	<i>Estudo de interação com BSA por espectroscopia de fluorescência</i>	57
4.1.6.	<i>Estudo de interação com DNA por eletroforese em gel de agarose</i>	59
4.1.7.	<i>Estudo de interação com DNA por espectroscopia de fluorescência</i>	60
4.2.	Complexos de Pt(II) com amantadina, rimantadina e memantina.....	61
4.2.1.	<i>Caracterização</i>	61
4.2.1.1.	<i>Estruturas cristalinas.....</i>	61
4.2.1.2.	<i>Espectroscopia de absorção da região do infravermelho</i>	63
4.2.1.3.	<i>Propriedades eletrônicas e estruturais teóricas dos complexos de platina</i>	65
4.2.1.4.	<i>Análise termogravimétrica</i>	67
4.2.1.5.	<i>Espectrometria de massas.....</i>	69
4.2.1.6.	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	70
4.2.2.	<i>Atividade antibacteriana</i>	78
4.2.3.	<i>Atividade antimicobacteriana</i>	79
4.2.4.	<i>Atividade antiviral.....</i>	80
4.2.5.	<i>Ensaio de mutagenicidade.....</i>	81
4.2.6.	<i>Estudos de interação com BSA por espectroscopia de fluorescência.....</i>	83
4.2.7.	<i>Estudo de interação com DNA por eletroforese em gel de agarose</i>	84
4.2.8.	<i>Estudo de interação com DNA por dicroísmo circular.....</i>	85
4.3.	Cloridrato de memantina: Reposicionamento de fármaco.....	87
5.	Considerações finais.....	89
	Referências.....	90

1. Introdução

1.1. Doenças infecciosas e o impacto na saúde pública

Em meados do século XX, importantes descobertas na área da saúde foram realizadas trazendo tratamento para enfermidades até então consideradas fatais, principalmente no que diz respeito a doenças infecciosas. Um importante marco nesse cenário foi a descoberta da penicilina por Alexander Fleming [1]. Nesse período, estudos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos tornaram-se mais intensos, e novas moléculas foram descobertas, proporcionando uma melhora na expectativa e na qualidade de vida das pessoas. Não obstante, o uso inadequado destes fármacos tem levado ao surgimento da resistência bacteriana aos medicamentos disponíveis, o que pode se tornar um desafio aos sistemas de saúde pública no mundo todo [1].

No contexto das infecções bacterianas, a Tuberculose (TB), apesar de existir há muitos séculos, continua sendo um problema de saúde global e está entre as 10 principais causas de morte por infecção. O agente etiológico de TB é o *Mycobacterium tuberculosis* e, segundo dados da Organização Mundial de Saúde, em 2020 mais de 9 milhões de pessoas foram infectadas por esse microrganismo no mundo todo, sendo ele o responsável pela morte de 1,5 milhões de pessoas nesse ano [2]. Após a descoberta da penicilina, Selman Waksman descobriu, em 1944, a estreptomicina, antibiótico pioneiro no tratamento da tuberculose [3]. No decorrer dos anos o crescimento das taxas de resistência à estreptomicina e o risco de toxicidade ocasionou um declínio gradativo na sua utilização [4].

Atualmente, os fármacos de primeira linha comumente utilizados no tratamento da tuberculose são a rifampicina e isoniazida. Quando a micobactéria causadora da TB não é sensível aos medicamentos de primeira linha, tem-se a chamada tuberculose multirresistente. O tratamento da tuberculose resistente é mais longo, oneroso e realizado com antibióticos de segunda linha, os quais há poucas opções [2].

Outras doenças que também chamam a atenção pelas epidemias provocadas anualmente são aquelas causadas por vírus. Atualmente, estamos diante da maior crise sanitária global do século de Síndrome respiratória aguda grave causada pelo coronavírus 2 (SARS-CoV-2), que só no Brasil, causou a morte de mais de 500 mil pessoas até setembro de 2021. Em 2013, um grande surto do vírus chikungunya (CHIKV) atingiu o continente americano [5] e em 2014 mais de 1 milhão de casos suspeitos já haviam sido notificadas [6]. Este vírus também é considerado um grave problema de saúde pública, pois mesmo possuindo uma elevada taxa de

morbidade e de propagação, não há vacinas ou medicamentos antivirais disponíveis [7]. O tratamento é apenas paliativo, focado principalmente para o alívio dos sintomas (febre e dores nas articulações).

O ressurgimento de doenças infecciosas já conhecidas há tempos é um tanto quanto desafiador para a medicina, pois estas crescem em número e alcançam longas distâncias geográficas. O aumento na incidência dessas enfermidades pode ser, em parte, devido à falta de tratamento ou a resistência adquirida dos microrganismos aos medicamentos já existentes. Por estes motivos, o desenvolvimento de novas substâncias com potencial antibacteriano e antiviral se impõe como prioridade de investigação. Assim, a modificação dos fármacos já existentes, buscando contornar a resistência microbiana, ou a coordenação de tais fármacos a metais, com reconhecidas atividades antimicrobianas, tem se mostrado uma alternativa interessante e promissora.

1.2. Uso de complexos de prata e platina na medicina

Sabe-se que os íons metálicos desempenham funções relevantes nos organismos vivos e um dos principais temas de interesse em química bioinorgânica é o estudo da ação de metais em sistemas biológicos, sobretudo de metalofármacos [8]. O uso terapêutico de complexos metálicos como metalofármacos surge no final do século XIX, quando Robert Koch demonstrou que o dicianidoaurato(I) de potássio, $K[Au(CN)_2]$, possuía atividade contra a bactéria *M. tuberculosis*. A partir de então, vários complexos de ouro foram avaliados como potenciais agentes antimicrobianos, o que levou a conhecida “década dourada”, nos anos de 1920 a 1930 [9].

A aplicação da prata na medicina tem sido relatada há séculos. Tais aplicações, embora feitas de forma puramente empírica por um longo tempo, estavam majoritariamente relacionadas às suas propriedades antimicrobianas. Somente com o avanço da ciência, o uso da prata passou a ser feito de maneira racional. No entanto, seu uso foi reduzido drasticamente com a introdução da penicilina na segunda metade do século XX, bem como de outros antibióticos que vieram posteriormente. Mais tarde, com o surgimento de cepas multirresistentes, a prata e seus compostos voltaram a ser considerados clinicamente. Um complexo metálico de prata com um ligante bioativo (uma sulfonamida) amplamente utilizado na medicina para tratar e evitar infecções em pacientes com queimaduras é a sulfadiazina de prata (SSD) [10] (Figura 1a). As propriedades antimicrobianas dos complexos de $Ag(I)$ estão associadas ao próprio íon metálico, ou seja, uma interação de $Ag(I)$ com os alvos biológicos,

sendo as moléculas utilizadas como ligantes responsáveis por desempenhar um papel de carreador de íons prata(I) para o organismo [11].

Outro complexo metálico de vasta aplicação é a cisplatina (Figura 1b), que é um fármaco à base de Pt(II). Apesar de ter sido descoberta como agente anticâncer há mais de 50 anos, ainda é muito utilizada no tratamento de diversos tipos de neoplasias. O mecanismo de ação desse composto se dá pela sua ativação ao entrar na célula quando, no citoplasma, a molécula sofre uma reação de hidrólise e o produto interage covalentemente com as bases nitrogenadas de ácidos nucleicos, bloqueando a divisão celular e resultando na morte programada da célula [12]. Com o intuito de amenizar os efeitos adversos do uso da cisplatina e contornar mecanismos de resistência em tumores, foram formulados novos complexos metálicos, também à base de platina, a partir da estrutura apresentada pela cisplatina. A carboplatina e a oxaliplatina (Figura 1c e 1d) são dois fármacos conhecidos como de segunda geração em relação à cisplatina e também amplamente utilizados na clínica médica [8].

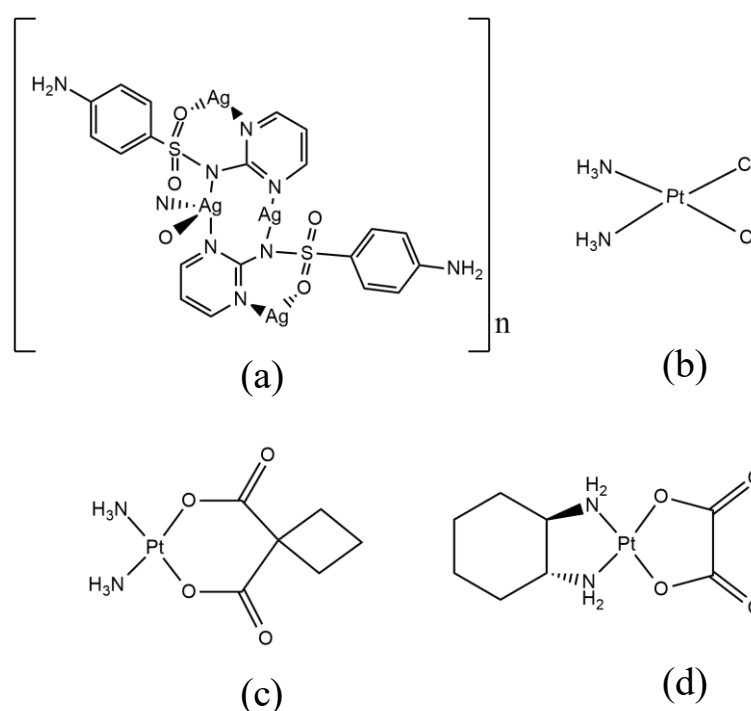


Figura 1: Estrutura molecular da (a) sulfadiazina de prata, (b) cisplatina, (c) carboplatina e (d) oxaliplatina.

Além das aplicações citadas acima para os complexos de prata e platina, há diversos outros estudos demonstrando atividade anticâncer, antibacteriana [13–16], antimalária, antiviral [17,18], antifúngica [19] e antineurodegenerativa [20] para esses complexos. Tais estudos

demonstram a potencialidade do desenvolvimento de novos complexo para fins terapêuticos. A síntese de novos complexos metálicos de Ag(I) e Pt(II) utilizando ligantes bioativos é uma alternativa para formação de moléculas com múltiplos alvos biológicos.

1.3. Uso clínico de aminoadamantanos

Os derivados do adamantano, de forma especial, os aminoadamantanos, constituem uma classe de compostos com várias aplicações farmacêuticas [21]. O adamantano é um hidrocarboneto isolado do petróleo com átomos de carbono e hidrogênio em forma de gaiolas ($C_{10}H_{16}$) [22]. A amantadina (atd) e a rimantadina (rtd) são derivados da funcionalização do adamantano com o grupo amina ($-NH_2$) e o grupo etanoamino ($-CH(NH_2)CH_3$), respectivamente, enquanto a memantina (mtn) é o derivado dimetílico da amantadina, conforme representados na Figura 2.

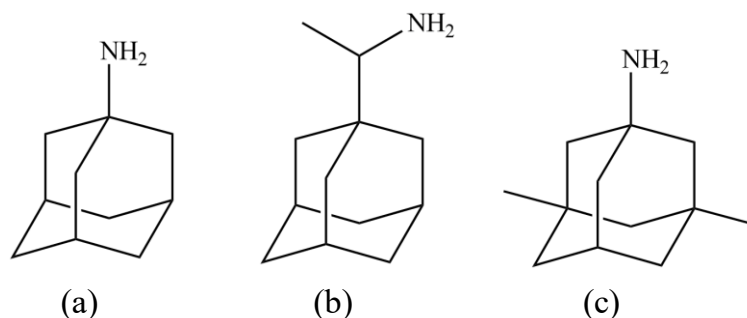


Figura 2: Estrutura molecular da (a) amantadina, (b) rimantadina e (c) memantina.

A amantadina e a rimantadina são fármacos utilizados no tratamento e prevenção de infecções causadas pelo vírus *influenza A* e agem por ligação ao canal de próton da proteína viral M2, bloqueando a entrada dos íons H^+ nos endossomos contendo as partículas virais internalizadas, e impedindo o processo de liberação do genoma viral no citoplasma celular, e consequentemente a replicação viral [21]. Modificações na cadeia de aminoácidos desta proteína causam resistência do patógeno à essas substâncias [23,24]. A memantina, em altas concentrações, também apresenta atividade antiviral contra o vírus *influenza A*, porém esse medicamento é utilizado clinicamente para o tratamento da Doença de Alzheimer [25], atuando como um antagonista não competitivo do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), inibindo a excitotoxicidade causada pela entrada de altos níveis de íons Ca^{2+} nas células [26].

Além disso, a presença de nitrogênio como átomo doador nas estruturas desses fármacos os tornam interessantes do ponto de vista da química de coordenação. Ao se coordenar à metais,

o fármaco livre pode apresentar alterações em seu perfil farmacológico, o que confere à ele uma melhoria da função já existente ou novas aplicações terapêuticas.

1.4. Reposicionamento de fármacos

Reposicionar um fármaco é uma estratégia usada para dar uma nova indicação a um insumo farmacêutico já implementado na clínica médica. Uma das vantagens deste método é a redução do tempo total de desenvolvimento e de custos [27]. De acordo com a literatura, o desenvolvimento completo de um novo fármaco, desde a sua descoberta até os estudos finais de fase III, pode levar cerca de dez anos e atingir um custo de mais 1 bilhão de dólares [28].

Em um cenário ideal, um fármaco para ser um candidato ao reposicionamento deve atender à algumas exigências: 1) Não deve requerer otimização química adicional, pois isso exigiria novos testes clínicos e pré-clínicos, 2) O intervalo de concentração deve estar dentro daquele pretendido para seu uso original, visto que uma concentração mais alta da substância pode não ser tolerada/segura para o uso, e 3) Apresentar propriedades semelhantes de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) na nova indicação [29].

O exemplo mais antigo de fármaco reposicionado é a aspirina. O ácido acetilsalicílico, que é o princípio ativo da aspirina, foi inicialmente desenvolvido e comercializado como analgésico e, décadas mais tarde, foi reposicionado para atuar como um medicamento antiagregante plaquetário [27]. Outro exemplo é sildenafil desenvolvido para tratar hipertensão, mas que agora é comercializado para o tratamento da disfunção erétil [30]. Há também o caso da talidomida que, inicialmente prescrita a mulheres grávidas para prevenir enjoos, teve o uso descontinuado devido seus efeitos teratogênicos. No entanto, com aplicações de medidas contraceptivas rigorosas, foi reposicionada para tratar o eritema nodoso hansênico [31]. As estruturas dos respectivos fármacos são apresentadas na Figura 3.

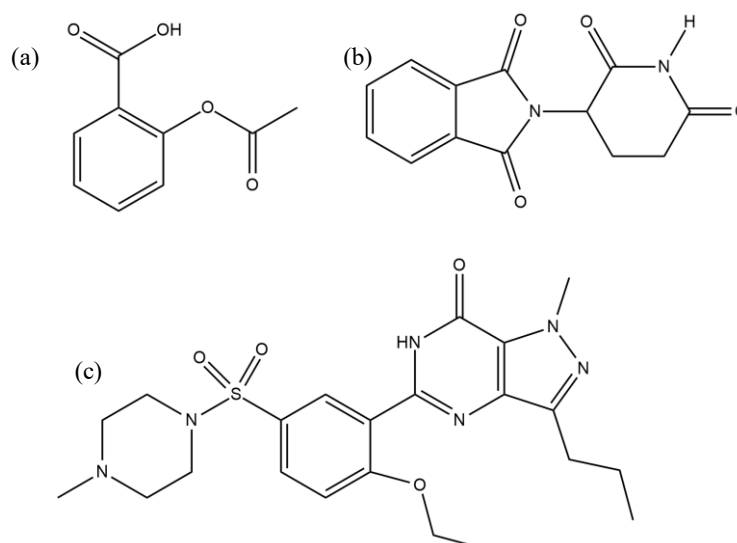


Figura 3: Estrutura molecular da (a) aspirina, (b) talidomida e (c) sildenafil.

A reavaliação de aminoadamantanos para atuarem como potenciais inibidores de infecções causadas por COVID-19 foi sugerida recentemente devido ao seu espectro antiviral já relatado para essas moléculas [32]. A memantina, em especial, já foi reavaliada como um agente antiproliferativo *in vitro* de células de câncer de mama [33] e de células de câncer de próstata [34]. Esta molécula foi ainda reavaliada como um agente antibacteriano capaz de bloquear a bacteremia e meningite causadas por *E. coli* [35] e como um fármaco tripanocida [36,37]. Neste sentido, ao identificar uma nova aplicação para um fármaco, este pode avançar rapidamente pelos ensaios clínicos, reduzindo tempo e recursos financeiros por já apresentarem parâmetros farmacológicos conhecidos.

Nesta tese de doutorado, apresentamos duas abordagens distintas quanto aos aminoadamantanos: a primeira delas trata do uso desta classe de ligantes na síntese de complexos de Ag(I) e Pt(II) e suas atividades antimicrobianas. Já na segunda parte desta tese, mostramos o potencial de reposicionamento dos aminoadamantanos no tratamento da febre Chikungunya, uma arbovirose que tem causado sérios problemas de saúde principalmente em países tropicais como o Brasil.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desta tese foi desenvolver novos complexos de Ag(I) e Pt(II) com ligantes da classe dos aminoadamantanos, bem como avaliar o potencial de ação dos ligantes e complexos sobre bactérias patogênicas e CHIKV.

2.2. Objetivos específicos

- I)* Síntese de complexos de Ag(I) e Pt(II) com amantadina, rimantadina e memantina;
- II)* Caracterização dos complexos por análises químicas e espectroscópicas;
- III)* Avaliação da atividade anti(mico)bacteriana dos complexos;
- IV)* Avaliação das atividades dos compostos sobre CHIKV;
- V)* Avaliação da interação dos complexos com ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteína albumina sérica bovina (BSA).
- VI)* Avaliação de mutagenicidade dos complexos.

3. Parte experimental

3.1. Materiais e equipamentos

Todos os reagentes foram de grau comercial e usados sem purificação adicional. O cloridrato de amantadina (atdH) e o cloridrato de rimantadina foram obtidos da Merck, enquanto o cloridrato de memantina (mtnH) foi obtido da Acros Organics. Albumina sérica bovina (BSA), *cis*-dicloridobis(dimetilsulfóxido)platina(II) [PtCl₂(DMSO)₂], nitrato de prata (AgNO₃), SYBR Green e cisplatina foram obtidos da Sigma-Aldrich. O ácido desoxiribonucleico (DNA) Ladder 1Kb Plus foi adquirido da Invitrogen. As análises elementares foram realizadas em um equipamento Perkin-Elmer modelo 2400 CHNS/O. Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR, usando o método de refletância total atenuada (ATR), na faixa de 4000-400 cm⁻¹ e com resolução de 4 cm⁻¹. As análises termogravimétricas (TG e DTG) e térmicas diferenciais (DTA) foram realizadas em um equipamento TA Instruments 2050 TGA e em um analisador térmico simultâneo TGA/DTA SEIKO EXSTAR 6000 nas seguintes condições: ar sintético, vazão de 100 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 25 °C a 1000 °C. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram registrados em espectrômetros Bruker AVANCE III 400 e 500 MHz. Estudos por ESI(+)-QTOF-MS foram realizadas em um instrumento Waters Xevo Q-ToF e as amostras dos complexos foram dissolvidas em uma solução de H₂O/metanol 50:50 com 0,1% de ácido fórmico e diluídas para concentração apropriada. A solução resultante foi infundida diretamente na fonte de ESI do instrumento. Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse com utilização de cubeta de quartzo com 4 faces polidas e caminho óptico de 1,0 cm. A velocidade de varredura foi ajustada para lenta (BSA) e média (DNA) e fendas de excitação e de emissão ajustadas para 5 e 5 nm. Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em um espectrofotômetro Jasco J-720 com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

3.2. Sínteses

3.2.1. Síntese dos complexos de Ag(I) com amantadina (Ag-atd) e memantina (Ag-mtn).

Com o intuito de eliminar os íons cloreto dos ligantes que, inicialmente, se encontravam na forma de cloridrato (atdH e mtnH), uma etapa preliminar foi realizada. Assim, 2,0 mmol de atdH (375,4 mg) foram dissolvidos em 24 mL de H₂O e a solução foi tratada com 16,0 mL de

uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 5% (NaOH) e 1,3 g de cloreto de sódio (NaCl). A mistura reacional foi submetida à extração (4×) com 10,0 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). Uma porção de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) foi adicionada à fração orgânica para remover a água e filtrada em seguida. O solvente foi removido em um evaporador rotativo. Rendimento de 94% (284,3 mg). O mesmo processo foi realizado para mtnH, mas ajustado para 1,14 mmol de ligante de partida (245 mg). Rendimento de 56,8% (116,2 mg).

Em seguida, os ligantes na forma livre foram suspensos em 5,0 mL de água destilada e 1,0 mL de ácido nítrico 1,25 mol L⁻¹, e permaneceram sob agitação até total solubilidade. A solução de memantina foi submetida a um rápido aquecimento (~ 55°C). Posteriormente, uma quantidade de nitrato de prata foi pesada (proporção 1:2 metal/ligante), solubilizada em 2,0 mL de água destilada e adicionada à respectiva solução do ligante (atd ou mtn) em solução. Para ajustar o pH do meio, uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,44 M foi gotejada até aproximadamente pH=7,0, sendo observada a formação de um precipitado branco levemente acinzentado tanto no caso do complexo de Ag(I) com amantadina quanto para o complexo de Ag(I) com memantina. O sólido de interesse foi filtrado, lavado com água destilada e seco em dessecador na presença de P₂O₅.

Resultados de análise elementar para o complexo **Ag-atd** (C₂₀H₃₄N₃O₃Ag): Calculado – C% 50,9, H% 7,20, N% 8,89; Experimental – C% 50,1, H% 7,17, N% 8,85. IV: $\nu(\text{C—H})$ 2914 e 2837 cm⁻¹, $\nu(\text{NH}_2)$ 3257 cm⁻¹ e 3147 cm⁻¹, $\nu(\text{N—O})$ 1343 cm⁻¹. RMN ¹H δ : 4,00 (s, 2H), 1,57 (dd, 6H), 1,65 (d, 6H), 2,05 9 (s, 3H). RMN ¹⁵N δ : 51,6. ESI-QTOF-MS (*m/z*): 152,1512 [(C₁₀H₁₇N) + H⁺], 409,1615 [Ag(C₁₀H₁₇N)₂]⁺. Cristais adequados para estudos de difração de raios X foram obtidos por evaporação lenta de uma solução em etanol do complexo.

Resultados de análise elementar para o complexo **Ag-mtn** (C₂₄H₄₂N₃O₃Ag·H₂O): Calculado – C% 52,7, H% 8,05, N% 7,68; Experimental – C% 53,1, H% 8,21, N% 7,67. IV: IR: $\nu(\text{C—H})$ 2914 e 2837 cm⁻¹, $\nu(\text{NH}_2)$ 3270 e 3154 cm⁻¹, $\nu(\text{N—O})$ 1321 cm⁻¹. RMN ¹H δ : 4,09 (s, 2H), 1,32 (m, 4H), 1,07 (dd, 2H), 1,23 (mm, 4H), 1,50 (dd 2H), 2,12(hep, 1H), 0,84 (s, 6H). RMN ¹⁵N δ : 49,7. ESI-QTOF-MS (*m/z*): 465,2338 [Ag(C₁₂H₂₁N)₂]⁺. Cristais adequados para estudos de difração de raios X foram obtidos por evaporação lenta de uma solução em acetona do complexo.

3.2.2. Síntese dos complexos de Pt(II) com amantadina (Pt-atd) e rimantadina (Pt-rtd).

Para a síntese do complexo Pt-atd, 0,50 mmol de do ligante atdH (94,2 mg) foi dissolvido em 10 mL de metanol e 0,25 mmol (105,6 mg) do precursor metálico, *cis*-

dicloridobis(dimetilsulfóxido)platina(II), foi adicionado no estado sólido. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 1 h e então foi submetida a um rápido aquecimento para completa solubilização dos reagentes. Após essa etapa, 0,50 mmol (28,5 mg) de hidróxido de potássio previamente dissolvido em metanol foi adicionado à solução. Um sólido amarelo se formou e permaneceu sob agitação por 1h, sendo que, após esse período, o precipitado de interesse foi filtrado, lavado com metanol e seco em dessecador na presença de P_2O_5 .

Resultados de análise elementar para o complexo **Pt-atd** ($C_{12}H_{23}NSOPtCl_2$): Calculado (%) C 29,1, H 4,68, N 2,83; Experimental (%) C 28,8, H 4,66, N 2,73. RMN 1H δ : 3,91 (s, 2H), 3,32 (s, 6H), 2,12 (s, 3H), 1,96 (d, 6H), 1,65 (dd, 6H). RMN ^{15}N δ : 36,2. RMN ^{195}Pt δ : -3049,49. ESI-QTOF-MS (m/z): 460,0752 $[Pt(atd)(DMSO)Cl]^+$, 496,0482 $[Pt(atd)(DMSO)Cl_2 + H]^+$. Cristais adequados para estudos de difração de raios X foram obtidos por evaporação lenta de uma solução de CD_2Cl_2 do complexo dentro de um tubo fino de vidro.

O mesmo procedimento foi aplicado para a síntese do complex **Pt-rtd**, usando 0,50 mmol (107,9 mg) do ligante rtdH e 0,25 mmol do precursor metálico (105,9 mg). Resultado da análise elementar para o complexo **Pt-rtd** ($C_{14}H_{27}NSOPtCl_2$): Calculado (%) C 32,1, H 5,20, N 2,68; Experimental (%) C 32,4, H 5,39, N 2,73. RMN 1H δ : 4,10 (s, 1H), 3,49 (s, 1H), 3,35 (s, 6H), 2,80 (m, 1H), 2,01 (s, 3H), 1,68 (dd, 6H), 1,53 (dd, 6H), 1,36 (d, 3H) . RMN ^{15}N δ : 10,0. RMN ^{195}Pt δ : -3090,20. ESI-QTOF-MS (m/z): 566,1272 $[Pt(rtd)(DMSO)_2Cl]^+$, 602,1131 $[Pt(rtd)(DMSO)_2Cl_2 + H]^+$. Cristais adequados para estudos de difração de raios X foram obtidos pela técnica de difusão líquido-vapor, sendo que éter etílico foi difundido em uma solução de etanol/ CH_2Cl_2 do complexo.

3.2.3. Síntese do complexo de Pt(II) com memantina (Pt-mtn)

Para a síntese do complexo Pt-mtn 0,50 mmol do ligante mtnH (107,9mg) foi dissolvido em 10 mL de metanol e 0,25 mmol (106,3 mg) do precursor metálico, *cis*-dicloridobis(dimetilsulfóxido)platina(II) foi adicionado no estado sólido. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 1 h e, após esse período, 0,50 mmol (28,3 mg) de KOH dissolvido em 1,0 mL de metanol foi adicionado. A solução permaneceu em agitação por 48 h e então deixada em repouso à temperatura ambiente para evaporação lenta do solvente e formação de cristais.

Resultados da análise elementar para o complexo **Pt-mtn** ($C_{16}H_{33}NS_2O_2PtCl_2$): Calculado (%) C 32,1, H 5,20, N 2,68; Experimental (%) C 32,4, H 5,25, N 2,65. RMN 1H δ : 3,97 (s, 2H), 3,33 (s, 6H), 2,19 (m, 1H), 1,83 (s, 2H), 1,60 (dd, 4H), 1,32 (dd, 4H), 1,14 (s, 2H), 0,88 (s, 6H).

RMN ^{15}N δ : 34,8. RMN ^{195}Pt δ : 3085,69. ESI-QTOF-MS (m/z): 524,0769 $[\text{Pt}(\text{mtn})(\text{DMSO})\text{Cl}_2 + \text{H}]^+$, 703,2385 $[\text{Pt}(\text{mtn})_2(\text{DMSO})\text{Cl}_2 + \text{H}]^+$.

3.3. Determinação estrutural

3.3.1. *Análise estrutural dos complexos Ag-atd e Ag-mtn por difração de raios X de monocristais*

A coleta de dados para os monocristais de Ag-atd e Ag-mtn foi realizada em um difratômetro Bruker Apex II CCD com radiação Mo-K α ($\lambda = 0,71703 \text{ \AA}$). As dimensões das células unitárias e as matrizes de orientação foram determinadas pelo refinamento de mínimos quadrados das reflexões obtidas pelas varreduras *phi* e *omega*. Os dados foram indexados e escalados com o Bruker Apex2 Suite. As estruturas foram resolvidas com o programa de solução de estrutura SHELXT [38] usando fases intrínsecas e refinadas com SHELXL [39] no programa Olex2 (v. 1.2.10) [40]. Todos os átomos diferentes de hidrogênio foram refinados anisotropicamente e átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura em posições idealizadas e refinados de acordo com “*riding model*” com C—H = $0,99 \text{ \AA}$ e $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2U_{\text{eq}}(\text{C})$ e N—H = $0,91 \text{ \AA}$ e $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2U_{\text{eq}}(\text{N})$. Moléculas de água desordenadas foram incluídas no refinamento do cristal Ag-mtn. Gráficos moleculares foram gerados usando Olex2 e Mercury [41]. Pesquisas no Cambridge Structural Database (CSD, v. 5.39) [42] foram realizadas no ConQuest (v. 1.23) [43]. Informações cristalográficas de Ag-atd e Ag-mtn são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Detalhes experimentais para determinação da estrutura cristalina e refinamento de Ag-atd e Ag-mtn.

Parâmetro	Ag-atd	Ag-mtn
Fórmula química	$C_{20}H_{34}AgN_2 \cdot NO_3$	$C_{24}H_{42}AgN_2 \cdot NO_3 \cdot H_2O$
Massa molar ($g \cdot mol^{-1}$)	472,3	546,4
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, $C2/c$	Ortorrômbico, $Aea2$
Temperatura (K)	150	150
a, b, c (Å)	29.363 (3), 6.4685 (6), 11.6188 (10)	13.2609 (7), 33.3090 (19), 11.6693 (6)
β (°)	113.278 (2)	90
V (Å ³)	2027.2 (3)	5154.4 (5)
Z	4	4
Tipo de radiação	Mo $K\alpha$	Mo $K\alpha$
μ (mm ⁻¹)	1.02	0.82
Tamanho do cristal (mm)	$0.23 \times 0.09 \times 0.05$	$0.38 \times 0.16 \times 0.06$
T_{min}, T_{max}	0.595, 0.746	0.656, 0.746
No. de reflexões medidas, independentes e observadas	6369, 2320, 1779	59904, 7922, 6910
$[I > 2\sigma(I)]$		
R_{int}	0.026	0.036
$R[F^2 > 2s(F^2)], wR(F^2), S$	0.025, 0.057, 1.04	0.029, 0.068, 1.05
No. de parâmetros	142	301
No. de restrições	0	1
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e ⁻ Å ⁻³)	0.40, -0.28	0.75, -0.29
Parâmetro de estrutura absoluta	-	0.400 (7)

3.3.2. Análise estrutural dos complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn por difração de raios X de monocristais.

A coleta de dados da difração de raios X de monocristal dos complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn foi realizada em um difratômetro Bruker APEX II duo com radiação MoK α ($\lambda = 0,71703$ Å) a 150 K. As dimensões da células unitárias e as matrizes de orientação foram determinadas pelo refinamento dos mínimos quadrados das reflexões obtidas pelas varreduras φ e ω . Para todos os conjuntos de dados, SAINT e SADABS foram utilizados para integração de dados e correção de absorção de varredura múltipla [21,22]. As estruturas foram resolvidas com o programa de solução de estrutura SHELXT [46] usando fases intrínsecas e refinadas com SHELXL [39] no programa Olex2 (v. 1.2.10) [40]. Todos os átomos que não são hidrogênio foram refinados anisotropicamente, enquanto os átomos de hidrogênio foram refinados de

acordo com o “*riding model*”. Para o complexo Pt-atd, foi utilizada a rotina de máscara de solvente do Olex2, que mascarou a densidade eletrônica residual das moléculas de solvente desordenadas usando um raio de sonda de 1,2 Å, produzindo assim uma fração de volume de 177,4 Å³ e 50 elétrons. Isso sugeriu a presença de 2 moléculas de metanol relacionado ao centro de inversão e uma molécula de água colocada em canais moleculares ao longo do eixo *a*-cristalográfico. Gráficos moleculares foram gerados usando Mercury (v. 3.10.3) [41]. Informações cristalográficas para os complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Detalhes experimentais para determinação da estrutura cristalina e refinamento de Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn.

Parâmetro	Pt-atd	Pt-rtd	Pt-mtn
Fórmula química	C ₁₂ H ₂₃ Cl ₂ NOPtS	C ₁₄ H ₂₇ Cl ₂ NOPtS	C ₁₄ H ₂₇ Cl ₂ NOPtS
Massa molar (g·mol ⁻¹)	495,37	523,42	523,42
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, <i>P2₁/c</i>	Monoclínico, <i>P2₁/c</i>	Ortorrômico, <i>Pbca</i>
Temperatura (K)	150	150	150
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	12.7546 (18), 32.285 (5), 15.611(2)	13.405 (2), 9.4994 (14), 14.267(2)	19.6534 (16), 8.5150 (7), 21.5493 (17)
β (°)	90.421 (3)	102.871 (3)	90
<i>V</i> (Å ³)	6428.16	1771.1	3606.2 (5)
<i>Z</i>	16	4	8
Tipo de radiação	Mo K α	Mo K α	Mo K α
μ (mm ⁻¹)	9.183	8.338	8.190
Tamanho do cristal (mm)	0.12 x 0.11 x 0.07	0.18 x 0.08 x 0.07	0.33 × 0.25 × 0.13
<i>T</i> _{min} , <i>T</i> _{max}	0.615, 0.745	0.561, 0.746	0.551, 0.746
No. de reflexões medidas, independentes e observadas [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	121659, 13309, 10507	24304, 4378, 3547	84848, 5512, 5117
<i>R</i> _{int}	0.067	0.046	0.025
(sin θ /λ) _{max} (Å ⁻¹)	0.628	0.666	0.715
R[<i>F</i> ² > 2 σ (<i>F</i> ²)], wR(<i>F</i> ²), S	0.038, 0.065, 1.11	0.026, 0.058, 1.02	0.020, 0.039, 1.23
No. de reflexões	13309	4378	5512
No. de parâmetros	597	184	193
$\Delta\rho_{\text{max}}$, $\Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	1.22, -1.51	2.45, -1.04	1.22, -1.68

3.4. Simulação computacional

Os estudos por modelagem molecular foram feitos em colaboração com o Prof. Dr. Douglas Henrique Pereira, da Universidade Federal de Tocantins-UFT, Brasil. Os resultados obtidos são apresentados a seguir:

3.4.1. Simulação computacional para os complexos *Ag-atd* e *Ag-mtn*

Cálculos teóricos dos compostos foram realizados utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT – Density Functional Theory) com o funcional híbrido wB97XD [47]. O conjunto de função de base 6-31+G(d,p) [48–50] foi usado para amantadina e memantina e a função de base LANL2DZ [51] com potencial de núcleo efetivo foi usado para o átomo de prata. Para confirmar que as estruturas otimizadas estavam em sua energia mínima, cálculos de frequência foram empregados e nenhuma frequência imaginária foi encontrada. Para corrigir o erro associado às frequências harmônicas relacionadas ao método, foi utilizado o fator de escala 0,952. Todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian 09 [52].

3.4.2. Simulação computacional para os complexos *Pt-atd*, *Pt-rtd* e *Pt-mtn*

O estudo teórico dos complexos e ligantes foi realizado por dois métodos diferentes, um *ab initio*, MP2 [53–57], e outro baseado na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com funcional híbrido B3LYP [58–60]. O conjunto de função de base 6-31+G(d, p) [48–50] foi usado para os átomos C, H, S, N e O. A função de base com potencial de núcleo efetivo LANL2DZ [51] foi usado para átomos de Pt. Para confirmar que as estruturas otimizadas estavam em sua energia mínima, cálculos de frequência foram aplicados e nenhuma frequência imaginária foi encontrada. Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa Gaussiano 09 [52]. Algumas estruturas foram geradas utilizando o programa Gauss View 5.09 [61].

3.5. Ensaio biológicos

3.5.1. Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

Os valores de CIM foram obtidos de acordo com a metodologia descrita na literatura [62]. Cepas bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus cereus* ATCC 14579) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27583) foram inoculadas em tubos contendo 10,0 mL de BHI (Brain Heart Infusion KASVI) e incubadas por 18 h a 35-37 °C. Um inóculo suficiente de cada suspensão bacteriana foi adicionado em novos tubos de BHI estéril até atingir a turbidez 1,0 da escala nefelométrica de McFarland ($\sim 3,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, UFC = unidades formadoras de colônias). Um volume de 50 µL (10 mg mL⁻¹) dos compostos suspensos em solução 20% de DMSO, foram adicionados ao segundo poço da microplaca de 96 poços, seguido de 50 µL de meio BHI estéril e 100 µL das suspensões de microrganismos na escala McFarland 1,0, foram adicionadas a cada poço, atingindo a turbidez 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), em um volume final de 200 µL/poço. Foram feitas diluições em série dos compostos, atingindo concentrações finais de 5,0 mg mL⁻¹ a 0,078 mg mL⁻¹. Como controle de crescimento positivo, 50 µL de BHI estéril, 50 µL de solução aquosa de DMSO a 20% e 100 µL de suspensões bacterianas foram adicionados em poços devidamente identificados nas placas. A maior concentração de DMSO usada no experimento foi de 5%. As microplacas foram incubadas por 18 h a 35-37 °C em uma câmara úmida sob agitação a 150 rpm. Após o período de incubação, 15 µL de resazurina a 0,02% em solução aquosa estéril foram adicionados a cada orifício nas placas. Após 3 h de reincubação, a leitura foi realizada. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri da Universidade de Araraquara-UNIARA.

3.5.2. Ensaio de atividade dos compostos frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

A atividade dos complexos de Ag(I) e Pt(II) e seus precursores sobre o *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H₃₇Rv - ATCC 27294) foi determinada pelo método REMA (Resazurin Microtiter Plate Assay) [63] em uma microplaca de 96 poços. As soluções estoques dos antibióticos padrão RIF (rifampicina), MOX (moxifloxacina) e INZ (isoniazida), dos complexos e seus precursores foram preparadas em DMSO. As concentrações testadas estavam na faixa de 25 a 0,098 µg mL⁻¹. O *M. tuberculosis* foi cultivado em meio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), a 37 °C, sob agitação e a concentração foi ajustada a 5×10^5 UFC/mL. O volume de 100 µL deste inóculo micobacteriano foi adicionado aos poços contendo 100 µL dos compostos testados a diferentes concentrações. As placas foram incubadas a 37 °C por sete dias. Após esse período, 30 µL da solução de resazurina (0,01% em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC 10%) foram adicionados aos poços, seguido de incubação a 37 °C por 24 h. As leituras de fluorescência foram realizadas em comprimentos de onda 530/570nm (excitação/emissão) em um espectrofotômetro *Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader*, Biotek®.

Os resultados são apresentados como CIM₉₀, que é definida como a menor concentração de fármaco resultando em 90% de inibição do crescimento em comparação ao controle positivo. Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara-SP.

3.5.3. Ensaio de mutagenicidade para os complexos de Pt(II)

A atividade mutagênica dos complexos de platina foi avaliada em colaboração com o grupo de pesquisas da Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira, docente da Universidade de Araraquara – UNIARA, utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a, em experimentos com e sem metabolização pelo método de pré-incubação [64]. As cepas inicialmente congeladas foram cultivadas durante a noite por 12-14 h em Caldo Nutritivo Oxoid nº 2. A mistura de ativação metabólica (S9) foi preparada previamente a cada teste. Os complexos de platina foram solubilizados em DMSO e testados em cinco concentrações diferentes. As concentrações variaram de 12,5 a 100 µg/placa para Pt-rtd e 3,12 a 50 µg/placa para Pt-mtn e Pt-atd.

Aos complexos a serem testados foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 7,4) ou 0,5 mL de mistura S9 (4%) nos ensaios com ativação metabólica e 0,1 mL de cultura bacteriana e depois incubadas a 37 °C por 20-30 minutos. Após esse tempo, 2 mL de ágar de superfície (top-agar) foram adicionados à mistura e vertidos sobre uma placa contendo ágar mínimo.

As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e as colônias revertentes foram contadas manualmente. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotado por Bernstein *et al.* [65]. Os dados (revertentes/placa) foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida de regressão linear. O índice mutagênico (IM) também foi calculado para cada concentração testada, sendo este o número médio de revertentes por placa com o composto de teste dividido pelo número médio de revertentes por placa com o controle negativo (solvente). Uma amostra é considerada mutagênica quando uma relação dose-resposta foi detectada ou quando um índice de mutagenicidade maior ou igual a 2 ($IM \geq 2$) for observado em pelo menos uma concentração [66].

Os padrões mutagênicos utilizados como controle positivo em experimentos sem mistura S9 foram 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (10 µg/placa) para TA98 e TA97a, azida de sódio

(1,25 µg/placa) para TA100 e mitomicina (0,5 µg/placa) para TA102. A 2-antramina (1,25 µg/placa) foi usada com TA98, TA100 e TA97a e 2-aminofluoreno (1,25 µg/placa) com TA102 nos experimentos com ativação metabólica. O DMSO serviu como controle negativo (solvente, 100 µL/placa). Os ligantes e o complexo de platina precursor, $\text{cis-[PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$, também foram avaliados.

3.5.4. *Ensaio antivirais*

Os ensaios de atividade antiviral dos aminoadamantanos e de seus complexos foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, sob a coordenação da Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim.

3.5.4.1. Linhagem celular BHK-21

Células BHK-21 (Baby Hamster Kidney) foram utilizadas para se avaliar a atividade dos compostos frente a infecção viral por CHIKV. Estas células foram cultivadas em meio essencial mínimo de Glasgow (GMEM, GIBCO-BRLA, Grand Island, NY, USA), suplementado com 1% (v/v) penicilina e streptomina, 1%(v/v) de caldo de triptose fosfato (TBP) e 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado (FBS, GIBCO-BRL), e incubadas à 37°C e 5% de CO₂.

3.5.4.2. CHIKV-*nanoluciferase*

O CHIKV-*nanoluciferase* (CHIKV-*nanoluc*) [67] usado para os ensaios antivirais foi construído com base na cepa CHIKV LR2006-OPY1 (genótipo Leste/Central/África do Sul). O plasmídeo de cDNA infeccioso CMV-CHIKV-*nanoluc* contém o promotor CMV, SV40 e uma sequência a qual codifica a proteína nanoluciferase inserida na região que codifica o domínio C-terminal da proteína nsP3 viral [67,68]. Para produção dos vírus, $2,3 \times 10^7$ células BHK-21 foram transfectadas com 1,5 µg de plasmídeo CMV- CHIKV-*nanoluc*, usando lipofectamina 3000® e meio Opti-Mem. Quarenta e oito horas após a transfecção, o sobrenadante contendo partículas de CHIKV-*nanoluc* foi coletado, centrifugado e armazenado a –80 °C. Posteriormente, 5×10^5 células BHK-21 foram semeadas por poço em uma placa de 6 poços, 24 h antes da infecção. Em seguida, as células foram infectadas com diluições em série

de 10 vezes de CHIKV-*nanoluc* durante 1 h a 37 °C. Os inóculos foram removidos e as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) para remover o vírus não ligado e incubadas com meio de cultura celular suplementado com 1% de penicilina, 1% de estreptomicina, 2% de FBS e 1% de carboximetilcelulose (CMC). As células infectadas foram incubadas por 2 dias em uma incubadora umidificada de 5% de CO₂ a 37 °C, seguido por fixação com 4% de formaldeído e coradas com 0,5% de cristal violeta. As placas virais foram contadas para determinar o título de CHIKV-*nanoluc* [69].

3.5.4.3. Viabilidade celular – Ensaio MTT

As células BHK-21 foram cultivadas em placas de 48 poços e tratadas com diferentes concentrações de cada composto por 16 h a 37 °C com 5% de CO₂. Após o tratamento, o meio contendo o composto foi removido e as células foram adicionadas de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich®) a 1,0 mgmL⁻¹, incubado por 30 minutos e substituído por 300 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A absorvância foi medida a 490 nm no leitor de microplacas Glomax (Promega®). A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação $(T/C) \times 100\%$, em que T e C representaram a densidade óptica do poço tratado e dos grupos controle, respectivamente. O DMSO foi usado como controle não tratado.

3.5.4.4. Ensaios de infecção viral *in vitro*

As células BHK – 21 foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço em placas de 48 poços 24 h antes da infecção. O vírus CHIKV-*nanoluciferase* a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 e os compostos foram simultaneamente adicionados às células. As amostras foram colhidas em tampão de lise de Renilla luciferase (Promega®) 16 h pós-infecção (h.p.i.), e a replicação do vírus foi quantificada medindo a atividade da nanoluciferase usando o Sistema Renilla luciferase (Promega®). Os dados foram analisados quanto à distribuição. Em seguida, o teste One-way ANOVA ou Mann-Whitney foi usado para comparar o tratamento com cada composto frente ao DMSO, usando um $p < 0,05$.

3.6. Ensaios biofísicos

3.6.1. Estudos de interação com proteína sérica bovina

Amostras de albumina sérica bovina (BSA, 66.463 Da, absorvidade molar 43.824 M⁻¹cm⁻¹ a 279 nm) na concentração 2,6 μmol L⁻¹ foram preparadas em solução de tampão fosfato (HPO₄²⁻/ H₂PO₄⁻, 50 mmol L⁻¹, pH = 7,3) e tituladas a 25°C com soluções dos complexos e seus precursores em DMSO para garantir a solubilidade. Na titulação, 2,5 μL de cada solução de amostra foram adicionadas sucessivamente à solução de BSA para obter concentrações 5,0 – 50,0 μmol L⁻¹ de supressor. A emissão da fluorescência da proteína foi monitorada de 300 a 450 nm (excitação a λ = 280 nm) a 25 °C. Os resultados foram tratados de acordo com a equação de Stern-Volmer, equação 1, para uma análise quantitativa dos dados de supressão da fluorescência:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad \text{Equação 1}$$

Nesta equação, F₀ é a intensidade da fluorescência na ausência do supressor, F é a intensidade da fluorescência na presença do supressor, K_{sv} é a constante de Stern-Volmer [Q] é a concentração do supressor, K_q é a constante da taxa de supressão biomolecular e τ₀ é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor (aproximadamente 10⁻⁹ s para BSA) [70].

O valor de K_{sv} é equivalente ao coeficiente angular da equação da reta obtida pela regressão linear do gráfico F₀/F vs [Q]. Alterações na intensidade da fluorescência da proteína causada pela presença dos compostos são indícios de possíveis interações. O valor da constante de ligação (K_b) é determinado pela equação de Scatchard [71], conforme apresentado na equação 2:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log[K_b] + n \cdot \log[Q] \quad \text{Equação 2}$$

O valor de K_b e n correspondem ao coeficiente linear e angular, respectivamente, da equação da reta obtida pela regressão linear do gráfico log (F₀-F) / F vs log [Q].

3.6.2. Estudos de interação com o DNA

A interação dos complexos de Ag(I) e Pt(II) com DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular. As soluções estoques de DNA de timo de bezerro (CT-DNA) foram preparadas por diálise de amostras dissolvidas em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH = 7,4) por 24 h. As concentrações das soluções foram medidas considerando $\epsilon = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm. Nos estudos por eletroforese foi utilizado o DNA plasmidial pGEX-4T1, o qual foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri da Universidade de Araraquara-UNIARA.

3.6.2.1. Eletroforese em gel de agarose

Para o gel contendo os complexos de Ag(I): Os compostos Ag-atd, Ag-mtn, atdH, rtdH, mtnH, AgNO₃ e cisplatina foram previamente dissolvidos em DMSO e as concentrações iniciais ajustadas para 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (HPO₄²⁻/ H₂PO₄⁻, pH = 7,4). Quantidades diferentes de cada amostra foram adicionadas a 15 μL de solução plasmidial pGEX-4T1 para uma concentração final de 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos compostos em tampão fosfato e incubados a 37 °C por uma hora.

Para o gel contendo os complexos de Pt(II): Os compostos Pt-atd, Pt-rtd, Pt-mtn, atdH, rtdH, mtnH, [PtCl₂(DMSO)₂], K₂[PdCl₄] e cisplatina foram dissolvidos em DMSO e diluídos para 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato (pH = 7,4). As alíquotas de 2 μL de cada composto e 12 μL de solução de DNA plasmidial pGEX-4T1 foram preparadas até a concentração final de 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do composto em solução tampão fosfato e incubadas a 37 °C por duas horas.

Após o período de incubação, 5 μL do tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25% m/v, xileno cianol 0,25% m/v, glycerol 30% m/v e EDTA 30 mmol L⁻¹ em água destilada estéril) foram adicionados a cada amostra. A matriz de gel de agarose (0,8%) foi preparada em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5x a pH 8,3 e submetida a eletroforese a 100 V. O controle utilizado foi o plasmídeo pGEX-4T1 puro e o DNA Ladder 1Kb Plus (12000 pb) foi usado como marcador de peso. Após eletroforese, o gel foi corado com solução 1x SYBR Green e fotodocumentado utilizando-se o fotodocumentador UVDoc 400i Delpho instruments.

3.6.2.2. Interação dos complexos de Ag(I) com DNA por espectroscopia de fluorescência

Amostras de CT-DNA a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} e 1,5% DMSO) foram incubadas por 20 h a 37°C com atdH, mtnH, Ag-atd e Ag-mtn na proporção [composto]/[DNA] de 0,3 ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$). O SYBR Green I® (SG) foi utilizado como sonda fluorescente. O comprimento de onda de excitação foi definido como 485 nm e a janela de emissão de 505 a 600 nm. Para cada amostra, a fluorescência a 520 nm foi monitorada com a adição consecutiva de $4 \mu\text{L}$ de SG 5x. As medições foram realizadas em triplicata.

3.6.2.3. Interação dos complexos de Pt(II) com DNA por dicroísmo circular

As amostras de DNA a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH = 7,4) foram incubadas com os complexos de platina(II) e seus precursores previamente solubilizados em DMSO, em diferentes razões [compostos]/[DNA] (variando de 0 a 0,50; volume final de 5,0 mL), a 37°C e por 24 h. A amostra de CT-DNA a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH=7,4 e 1% de DMSO foi usada como controle. Os espectros foram registrados com velocidade de varredura de 50 nm min^{-1} com 8 acumulações e à temperatura ambiente.

3.7. Avaliação do potencial antiviral do cloridrato de memantina

A atividade antiviral de mtnH contra CHIKV foi determinada infectando células BHK–21 com CHIKV-*nanoluc*, nas mesmas condições descritas no procedimento 3.4.4. As células BHK–21 foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich®) suplementado com 100U/mL de penicilina (Hyclone Laboratories®), 100 mg/mL de estreptomicina (Hyclone Laboratories®), 1% de diluição de estoque de aminoácidos não essenciais (Hyclone Laboratories®) e 1% de soro fetal bovino (FBS, Hyclonen Laboratories®) em uma incubadora umidificada de 5% de CO_2 a 37°C . Após a construção do vetor viral, conforme item 3.4.4.2, as células BHK – 21 em densidade 1×10^5 foram semeadas em cada uma das placas de 24 poços 24 horas antes da infecção para determinação do título viral. Em seguida, as células foram infectadas com diluições em série de dez vezes de CHIKV- *nanoluc* por 1 h a 37°C . Os inóculos foram removidos, as células foram lavadas com tampão fosfato para remover o vírus não ligado e adicionado meio fresco suplementado com 1% de penicilina, 1% de estreptomicina, 2% de FBS e 1% de carboximetilcelulose (CMC). As células infectadas foram incubadas durante 2 dias em uma incubadora de 5% CO_2 a 37°C , seguido pela fixação com

formaldeído a 4% e coradas com 0,5% de violeta de cristal. Os focos virais foram contados para determinar o título viral que foi apresentado em unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). A viabilidade celular por ensaio MTT e os ensaios de infecção viral foram realizados conforme procedimento 3.4.4.3 e 3.4.4.4, respectivamente. A concentração de mtnH variou de 500 a 1,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A concentração eficaz de inibição de 50% (EC_{50}) e a concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) foram calculadas usando GraphPad Prism 8. Os valores de CC_{50} e EC_{50} foram usados para calcular o índice seletivo ($\text{SI} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{EC}_{50}}$).

4. Resultados e Discussões

4.1. Complexos de Ag(I) com amantadina e memantina

4.1.1. Caracterização

4.1.1.1. Estruturas cristalinas

O composto Ag-atd cristalizou em um sistema cristalino monoclinico, grupo espacial $C2/c$, enquanto o composto Ag-mtn cristalizou no sistema cristalino ortorrômbico, grupo espacial $Aea2$. As estruturas cristalinas, Figura 4, confirmam as composições $[Ag(C_{10}H_{17}N)_2]NO_3$ e $[Ag(C_{12}H_{21}N)_2]NO_3 \cdot H_2O$, nas quais duas moléculas do adamantano se coordenam à prata simultaneamente pelo átomo de nitrogênio do grupo amino, com o íon nitrato atuando como contra-íon.

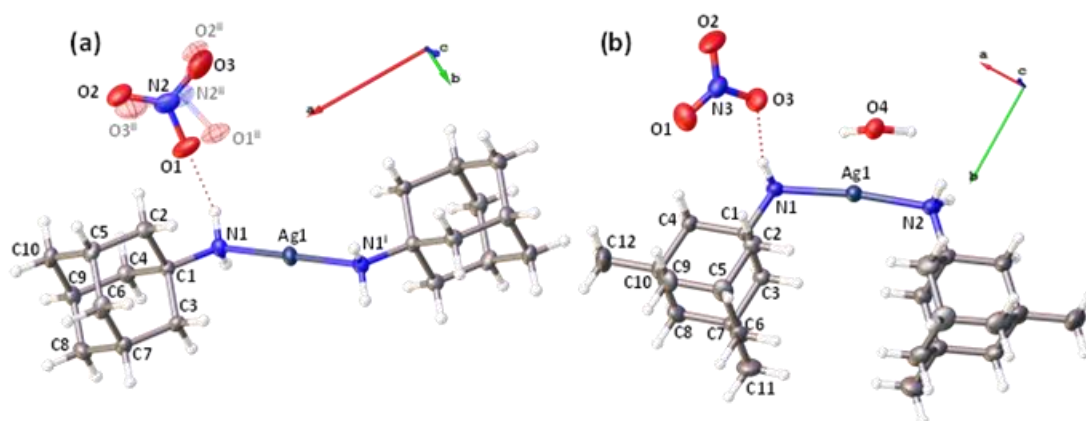


Figura 4: Representação dos compostos (a) Ag-atd e (b) Ag-mtn. Elipsóides de deslocamento são representadas no nível de probabilidade de 50%. A desordem do grupo nitrato do complexo Ag-atd é representada por elipsóides translúcidos. As moléculas de água desordenadas do complexo Ag-mtn não são mostradas. Apenas um dos ligantes mtn em Ag-mtn é marcado e os átomos de hidrogênio não foram marcados, para maior clareza. Códigos de simetria: (i) $-x + 1, -y + 2, -z + 1$; (ii) $-x + 1, y, -z + 1/2$.

O comprimento de ligação Ag1—N1 é 2,124(2) Å no complexo Ag-atd, enquanto o complexo Ag-mtn tem ligações Ag1—N1 e Ag1—N2 mais longas de 2,160(2) e 2,163(2), respectivamente. Estes valores são consistentes com a média de 2,14(7) para comprimentos de ligação Ag—N_{amina} em geometria linear (ângulos N—Ag—N variando de 170° a 180°) encontrados no Cambridge Structural Database (CSD) [42]. Enquanto o Ag-atd tem uma

geometria linear perfeita, o Ag-mtn tem ângulos de ligação de $173,4(1)^\circ$. As geometrias dos complexos Ag-atd e Ag-mtn podem ser comparadas com a do complexo catiônico $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, que apresenta ângulos e comprimentos de ligação N—Ag—N variados dependendo da estrutura do cristal [72,73].

As diferentes orientações dos ligantes em cada estrutura comprovam que a amantadina e a memantina são livres para girar em torno da ligação Ag—N em solução, levando a diferentes conformações como resultado dos efeitos de empacotamento no estado sólido quando os compostos cristalizam. Embora nenhuma outra estrutura cristalina de compostos de prata(I)-amantadina ou memantina tenha sido encontrada no banco de dados, foram relatados complexos com ligantes de iminoadamantano. Estes compostos têm o grupo amino condensado com um aldeído, formando uma imina. O complexo de prata(I) com duas moléculas de 2-(quinonil)iminoadamantano exibe uma geometria tetraédrica distorcida [74], enquanto o complexo com dois ligantes 2,6-(piridil)iminodiadamantano apresenta uma esfera de coordenação bipiramidal trigonal distorcida [75].

As principais interações intermoleculares presentes nas estruturas cristalinas de Ag-atd e Ag-mtn são as ligações de hidrogênio entre o ânion nitrato e os grupos amino dos ligantes aminoadamantano. Na estrutura cristalina do complexo Ag-mtn, a molécula de água também está envolvida na formação de ligações do hidrogênio.

4.1.1.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os espectros no infravermelho (IV) dos complexos e ligantes são mostrados na Figura 5a–d. As bandas entre 2914 e 2837 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{CH})$ e $\nu(\text{CH}_2)$ da gaiola do adamantano [21]. O alargamento das bandas dos ligantes nesta região (Figura 5b e 5d), pode ser devido à sobreposição com bandas relacionadas ao alongamento do grupo amino $\nu(\text{NH}_3^+)$ [76]. Uma banda em 2070 cm^{-1} no espectro de atdH e 2053 cm^{-1} no espectro de mtnH foi atribuída a uma combinação da vibração de deformação assimétrica e a oscilação torcional do grupo NH_3^+ [76]. A ausência desta banda no espectro no IV dos complexos Ag-atd e Ag-mtn (Figura 5a e 5c) indica a perda do átomo de hidrogênio do grupo R—NH_3^+ após a conversão de atdH e mtnH em formas neutras. Além disso, a presença de duas bandas bem resolvidas em 3257 cm^{-1} e em 3147 cm^{-1} no espectro do complexo Ag-atd, e em 3270 e 3154 cm^{-1} no espectro do complexo Ag-mtn, correspondem aos modos de estiramento assimétrico e simétrico (NH_2) do grupo amino coordenado [77], confirmando assim a coordenação de atd ou mtn ao Ag(I) pelo grupo NH_2 como já observado nas estruturas determinadas por dados de difração de raios

X de monocristal. De acordo com a literatura, o íon nitrato livre exibe uma forte banda de absorção de $\nu(\text{N—O})$ que se estende na faixa de $1389\text{--}1259\text{ cm}^{-1}$ [77,78]. Como observado nas Figuras 5a e 5c, a presença de uma banda de absorção forte em 1343 e em 1321 cm^{-1} , respectivamente, confirma a presença de NO_3^- não coordenado na composição dos complexos Ag-atd e Ag-mtn. A banda em 3562 cm^{-1} no espectro do complexo Ag-mtn confirma a presença de água na sua composição. Os modos de vibração encontrados para o complexo Ag-atd foram semelhantes aos obtidos por Jeremić *et al.* para um complexo semelhante e previamente reportado, o $[\text{Ag}(1\text{-AdNH}_2)_2]\text{NO}_3 \cdot 0,5\text{CH}_3\text{OH}$ [79].

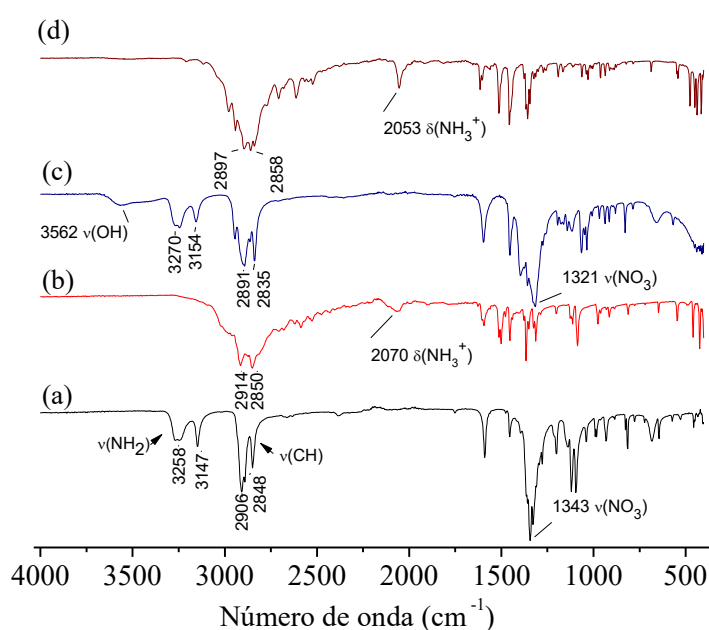


Figura 5: Espectros no infravermelho de (a) Ag-atd, (b) atdH, (c) Ag-mtn, (d) mtnH.

4.1.1.3. Simulação computacional

Para entender melhor a estrutura eletrônica do complexo metálico com amantadina e memantina, simulações no nível DFT foram realizadas para os complexos $[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$ e $[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$. Neste estudo, o contra-íon e a água de hidratação do sistema não foram simulados. A Figura 6a mostra as estruturas otimizadas com a proporção ligante:metal 2:1 e a Figura 6b as estruturas obtidas experimentalmente a partir das estruturas cristalinas. Os resultados da simulação são consistentes com as estruturas cristalinas ao considerar o ângulo N—Ag—N . Enquanto o ângulo de ligação N—Ag—N para o complexo $[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$ é $177,9^\circ$, os resultados encontrados para $[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$ mostram que o complexo tem um ângulo de $173,7^\circ$.

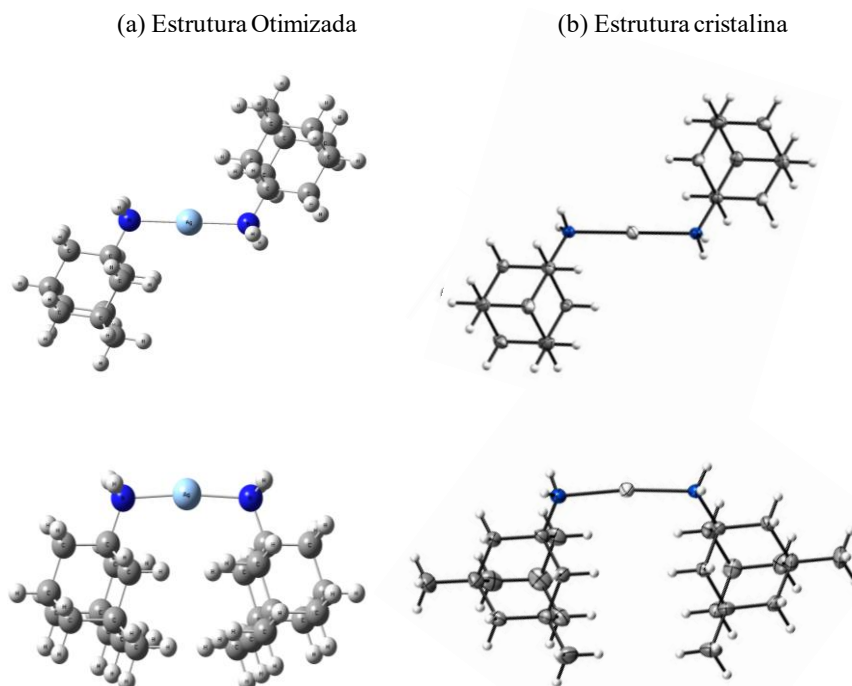


Figura 6: Estruturas dos complexos (a) $[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$ (topo) e $[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$ (baixo): (a) Otimizado no nível wB97XD/6-31+G(d, p)/LANL2DZ e (b) Estruturas cristalinas experimentais.

Os parâmetros estruturais, comprimento de ligação e frequências vibracionais para os complexos estão representados na Tabela 3. Apenas as frequências vibracionais dos átomos diretamente ligados ao metal foram consideradas para análise. O comprimento da ligação N—Ag encontrado teoricamente para $[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$ foi 2,187 Å e experimentalmente 2,124 Å. Para $[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$, o comprimento teórico da ligação foi de 2,191 Å e o experimental de 2,163 Å. Os resultados também mostram que os dados teóricos são semelhantes aos do cristal para outros comprimentos de ligação do complexo.

Tabela 3: Comprimentos de ligação experimentais e teóricos (em Å) e frequências vibracionais (em cm^{-1}) para os complexos $[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$ e $[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$.

Ligação	Complexos			
	$[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$		$[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$	
	Teórica	Experimental	Teórica	Experimental
	(Å)		(Å)	
C—N	1,494	1,481	1,495	1,485
N—Ag	2,187	2,124	2,191	2,161
Modos vibracionais	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental
	cm^{-1}		cm^{-1}	
$\nu_{\text{as}}(\text{N—H})$	3578	3258	3585	3270
$\nu_{\text{s}}(\text{N—H})$	3506	3147	3512	3154
$\delta(\text{H—N—H})$	1658	1589	1655	1596
$\nu(\text{Ag—N})$	510	-	521	-

Os orbitais moleculares de fronteira (OMF) foram também simulados, pois, com base em sua localização, é possível realizar análises qualitativas e quantitativas da possibilidade de ocorrer uma reação [80]. O HOMO, LUMO e o gap de energia também podem gerar informações sobre a estabilidade cinética e reatividade química. Diferentes aplicações de OMFs podem ser encontradas na literatura, como reações pericíclicas, complexos orgânicos e inorgânicos, comportamento de ácidos e bases, entre outros [80–86]. Os orbitais HOMO e LUMO e o gap de energia foram calculados e são apresentados nas Figuras 7 e 8. Os resultados mostram as mesmas tendências para as estruturas e indicam que o orbital HOMO para os ligantes está localizado principalmente no grupo NH_2 e o LUMO nos átomos de carbono. Para os complexos, o HOMO está localizado principalmente nos átomos de carbono do ligante e o LUMO está localizado na ligação Ag—N. O gap de energia encontrado para o atd livre e o complexo Ag-atd ($\Delta E = 10,20 \text{ eV}$ e $10,10 \text{ eV}$), Figura 7, são semelhantes aos resultados Ag-mtn ($\Delta E = 10,14 \text{ eV}$ e $9,82 \text{ eV}$), Figura 8. Quanto menor o gap de energia, mais reativa é a molécula. Comparando os complexos, é possível sugerir que o complexo Ag-mtn é ligeiramente mais reativo do que o complexo Ag-atd.

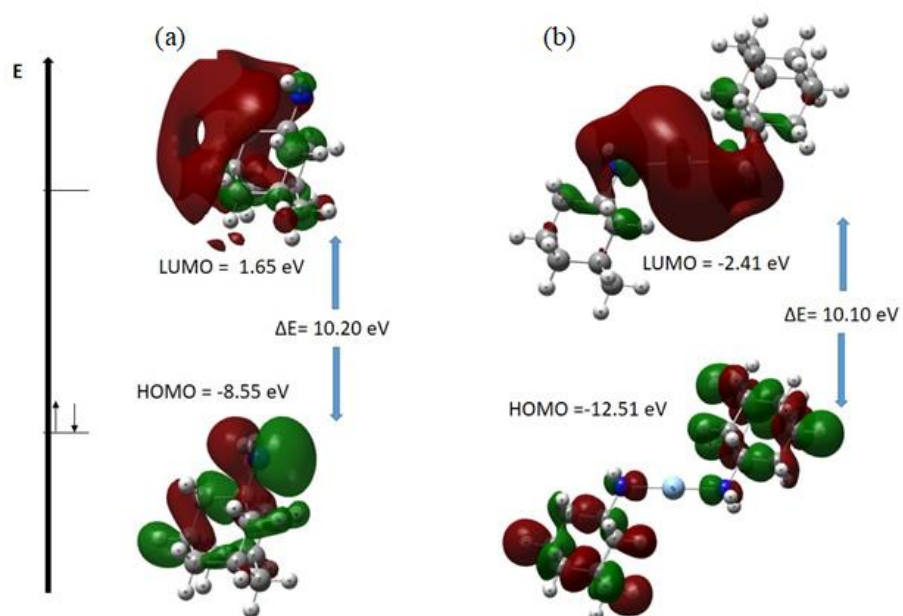


Figura 7: HOMO, LUMO e gap para: (a) atd e (b) $[\text{Ag}(\text{atd})_2]^+$.

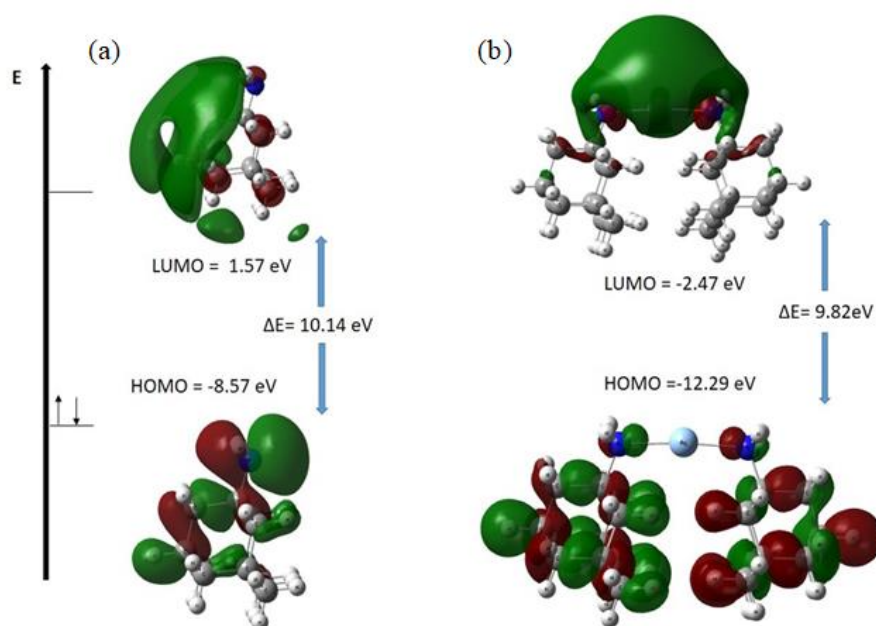


Figura 8: HOMO, LUMO e gap para: (a) mtn e (b) $[\text{Ag}(\text{mtn})_2]^+$.

4.1.1.4. Análise termogravimétrica

As curvas DTA e TG para os complexos de prata são apresentadas na Figura 9. De acordo com os dados experimentais, o composto Ag-atd começa a se decompor a 100 °C. Para Ag-mtn há uma perda de massa de 4,2% acima de 100 °C, que é atribuída à perda de uma molécula de água. Existem variações de peso de 62,4% e 67,3% de 100 – 260 °C para Ag-atd e Ag-mtn, respectivamente, que correspondem à perda de dois ligantes atd ou mtn. De 260 °C a 700 °C houve perdas de massa de 14,8% e 9,0% para Ag-atd e Ag-mtn, atribuídas à perda do íon nitrato.

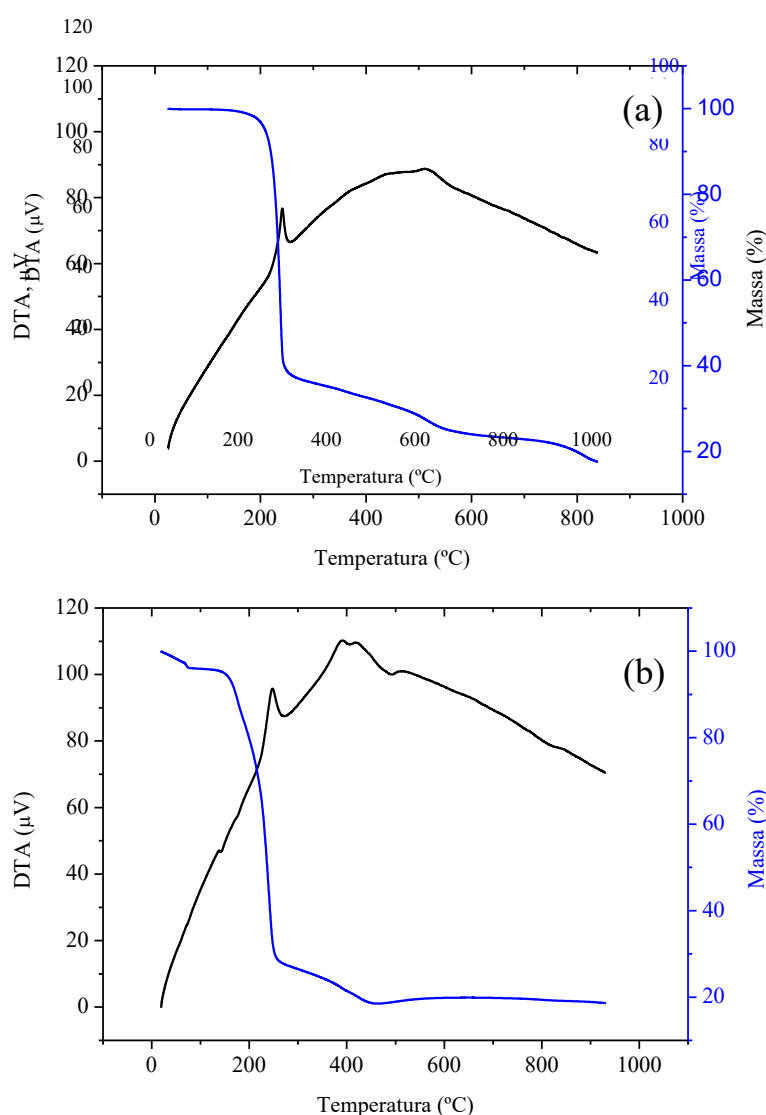


Figura 9: As curvas de TG e DTA de (a) Ag-atd e (b) Ag-mtn.

A curva DTA para o complexo Ag-atd exibe um pico exotérmico definido centrado em 241 °C e outro exotérmico amplo com um máximo em 513 °C, que são consistentes com a

perda das moléculas do ligante e do íon nitrato. Para o complexo Ag-mtn, a curva DTA mostra um pico exotérmico definido centrado em 247 °C e outro exotérmico amplo centrado em 388 °C, que também pode ser atribuído à perda das moléculas de ligante e do íon nitrato conforme observado para o complexo Ag-atd. Um pico endotérmico com máximo a 140 °C também é observado para o complexo Ag-mtn. Esse pico pode ser atribuído à perda da molécula de água presente na composição desse complexo. A 700 °C, os resíduos finais correspondentes a 22,8% para Ag-atd e 19,5% para Ag-mtn em massa (calculado 22,8% e 19,7%, respectivamente) são consistentes com a formação de prata metálica. Os dados termogravimétricos experimentais reforçam a composição 1:2 metal/ligante dos compostos e a presença de uma molécula de água em Ag-mtn, conforme verificado por análises elementares e espectroscopia no infravermelho.

4.1.1.5. Espectrometria de massas

Os complexos de prata foram analisados por ESI(+)-QTOF-MS e os espectros são apresentados na Figura 10, enquanto os padrões isotópicos (experimentais e calculados) para os íons correspondentes às composições $[\text{AgL}_2]^+$ esperadas são apresentados na Figura 11. Para Ag-atd, o sinal observado em m/z 152,1512 foi atribuído ao íon $[(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}) + \text{H}^+]$, correspondente ao ligante protonado e o sinal em m/z 409,1615 foi atribuído ao $[\text{Ag}(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})_2]^+$ íon, confirmando a composição 1:2 metal/ligante. Curiosamente, o espectro de massa de Ag-mtn tem apenas um conjunto de picos intensos em m/z 465,2338, correspondendo ao íon $[\text{Ag}(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N})_2]^+$. Apenas para Ag-atd, picos correspondentes a aglomerados de atd com ácido nítrico foram observados em m/z 366,2743, m/z 580,3838 e m/z 794,5087. Estes picos correspondem a $[(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})_2(\text{HNO}_3) + \text{H}^+]^+$, $[(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})_3(\text{HNO}_3)_2 + \text{H}^+]^+$ e $[(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})_4(\text{HNO}_3)_3 + \text{H}^+]^+$ aglomerados de amina-ácido nítrico, como relatado recentemente [87], sendo consistentes com as condições ácidas usadas para os experimentos.

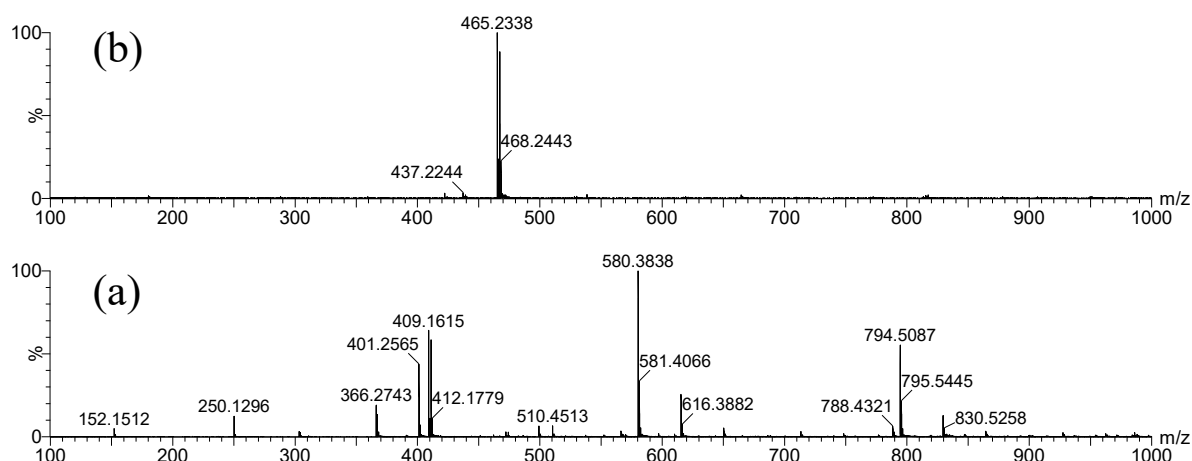


Figura 10: Espectro de massas para (a) Ag-atd e (b) Ag-mtn.

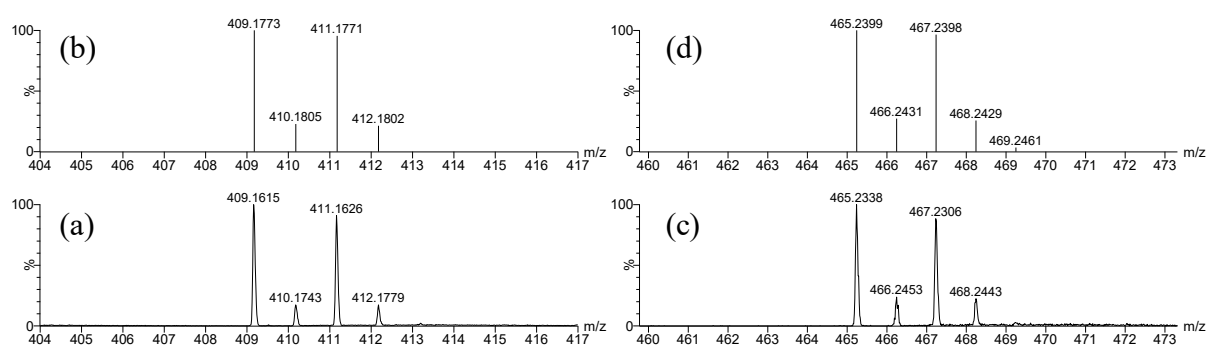


Figura 11: Padrões isotópicos para os íons $[\text{Ag}(\text{L})_2]^+$: (a) experimental e (b) calculado para Ag-atd - $[\text{Ag}(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})_2]^+$, enquanto (c) e (d) correspondem à Ag-mtn - $[\text{Ag}(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N})_2]^+$.

4.1.1.6. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H em solução dos complexos de prata e dos ligantes correspondentes (Figura 12 e Figura 13) foram obtidos em $\text{DMSO}-d_6$ deuterado. Os espectros dos complexos foram analisados por comparação com os espectros dos ligantes correspondentes a fim de verificar se a coordenação de atd e mtn à $\text{Ag}(\text{I})$ é mantida neste solvente. Os esquemas de numeração de átomos são apresentados nos espectros, enquanto as atribuições de sinal são apresentadas na Tabela 4.

Os espectros de RMN de ^1H para atdH e Ag-atd apresentam diferenças nos deslocamentos químicos, que podem ser atribuídos à coordenação. O deslocamento mais notável corresponde ao sinal dos átomos de hidrogênio do grupo $-\text{NH}_3^+$ de atdH, visto a 8,18 ppm, que são observados a 4,00 ppm no espectro Ag-atd quando coordenado com prata como $-\text{NH}_2$.

A presença de dois grupos metil adicionais na estrutura de mtnH quando comparada a atdH leva a espectros distintos de RMN de ^1H . No entanto, as mesmas mudanças químicas ocorrem quando se compara mtnH e Ag-mtn, sugerindo também que a coordenação do ligante para Ag(I) é mantida em solução. Os experimentos de HMBC de RMN de $\{^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ foram realizados para ver mudanças diretas na densidade eletrônica do átomo de nitrogênio após coordenação com prata. Os mapas de correlação 2D são apresentados na Figura 14.

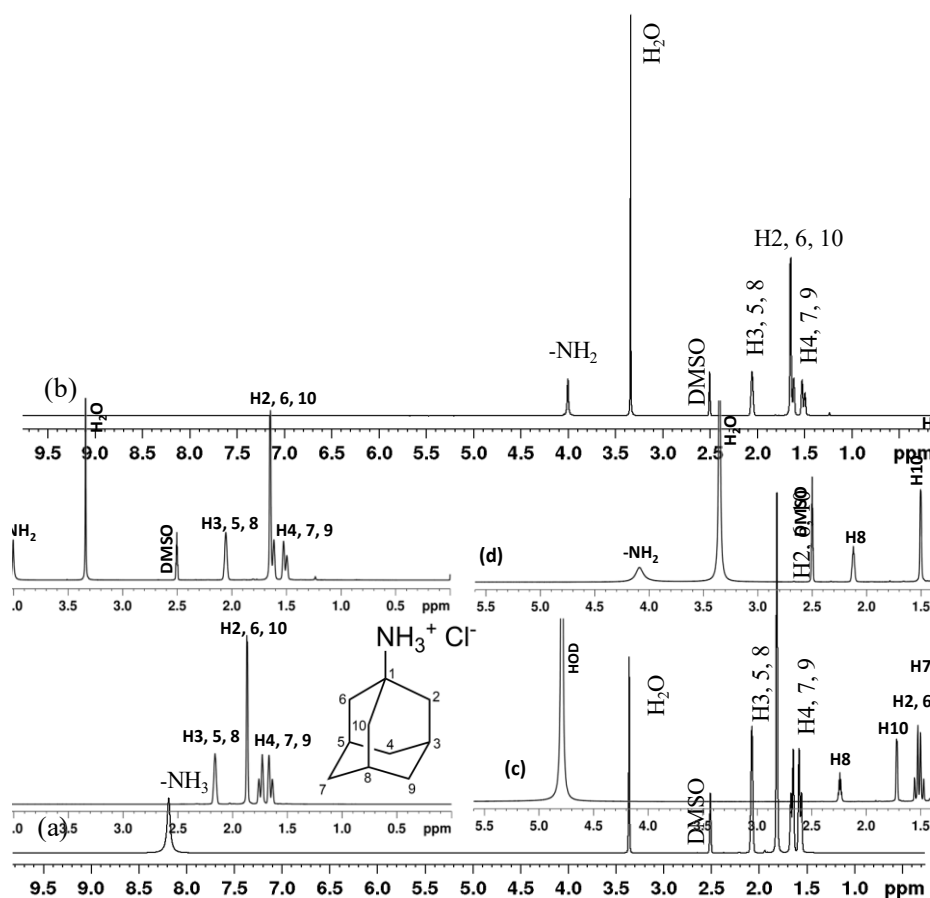


Figura 12: Espectros de RMN ^1H para (a) atdH, (b) Ag-atd. Os espectros dos ligantes protonados e dos complexos de prata foram registrados em $\text{DMSO}-d_6$.

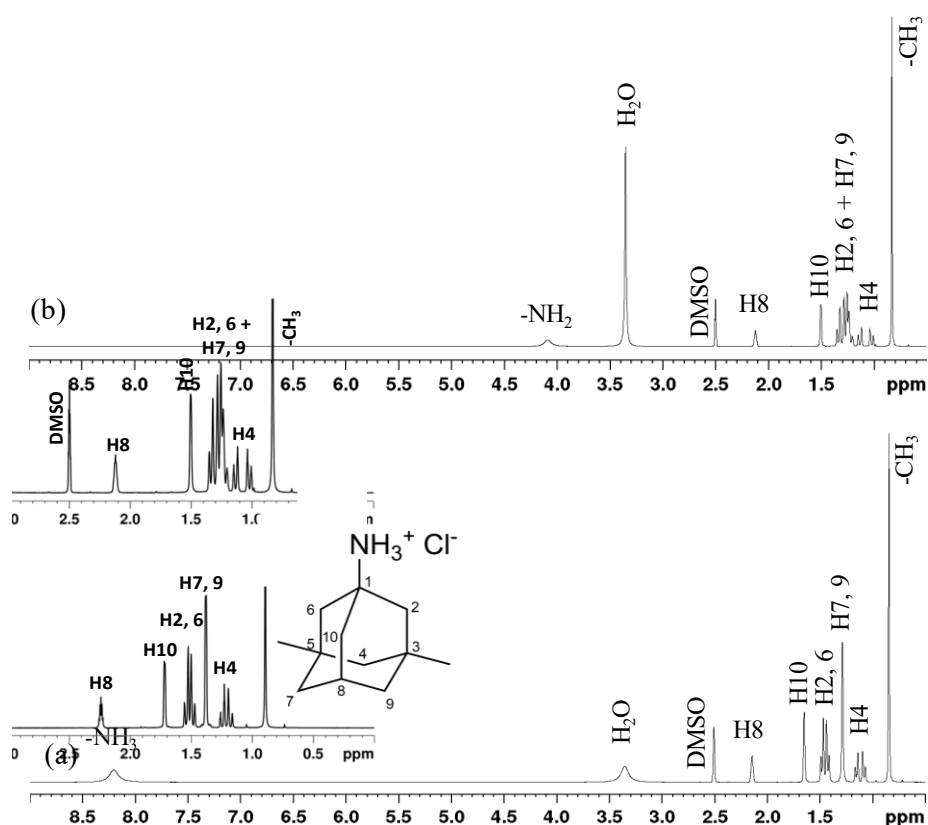


Figura 13: Espectros de RMN ^1H para (a) mtnH, (b) Ag-mtn. Os espectros dos ligantes protonados e dos complexos de prata foram registrados em $\text{DMSO}-d_6$.

Tabela 4: Atribuições de RMN de ^1H e desvios químicos (ppm) para atdH, Ag-atd, mtnH e Ag-mtn. Para a numeração dos átomos de hidrogênio, consulte a Figura 12 e 13.

Atribuição	Integral	atdH	Ag-atd	Atribuição	Integral	mtnH	Ag-mtn
$-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$	3	8,18	4,00	$-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$	3	8,20	4,09
H4, H7, H9	6	1,60	1,57	H2, H6	4	1,45	1,32
H2, H6, H10	6	1,80	1,65	H4	2	1,12	1,07
H3, H5, H8	3	2,06	2,05	H7, H9	4	1,29	1,23
				H8	1	2,15	2,12
				H10	2	1,65	1,5
				$-\text{CH}_3$	6	0,85	0,84

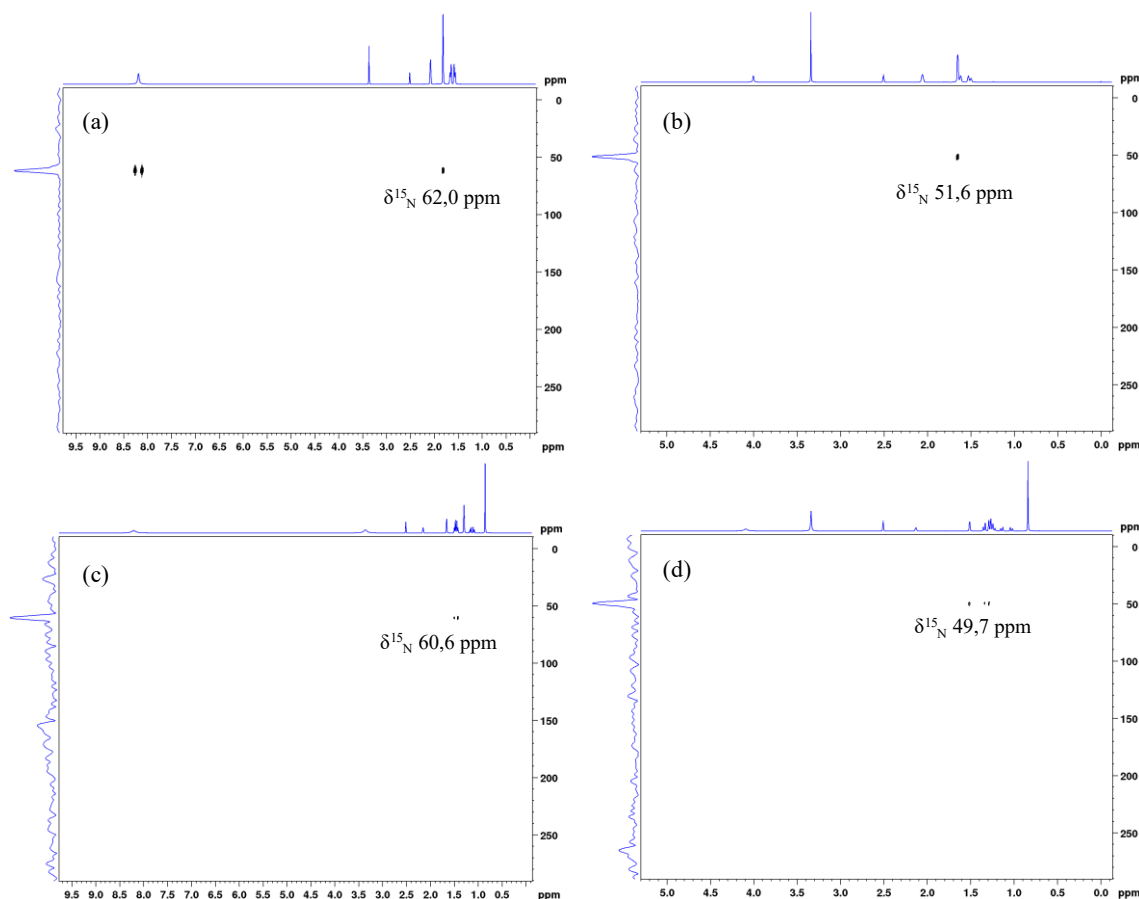


Figura 14: Mapas de correlção de HMBC $\{^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ para (a) atdH, (b) Ag-atd, (c) mtnH e (d) Ag-mtn em $\text{DMSO}-d_6$.

Os átomos de nitrogênio dos grupos $\text{R}-\text{NH}_3^+$ de atdH e mtnH são observados em 62,0 e 60,6 ppm, respectivamente, enquanto para seus complexos correspondentes os sinais foram encontrados em 51,6 ppm e 49,7 ppm. A variação $\Delta\delta$ (complexo δ - ligante δ) de -10,4 e -10,9, respectivamente, atesta o fato de que a coordenação de atd e mtn para prata (I) pelo átomo N do grupo NH_2 é mantida na solução. Finalmente, para verificar se os complexos sofrem alguma substituição significativa do ligante pelo solvente ($\text{DMSO}-d_6$), os espectros de RMN de ^1H dos compostos foram registrados com o tempo, por um período de 24 h. Os conjuntos de espectros para Ag-atd e Ag-mtn são apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Nenhuma substituição de ligante aparente em $\text{DMSO}-d_6$ é observada durante o período de tempo avaliado. Evidenciando que esses compostos são bem estáveis em solução.

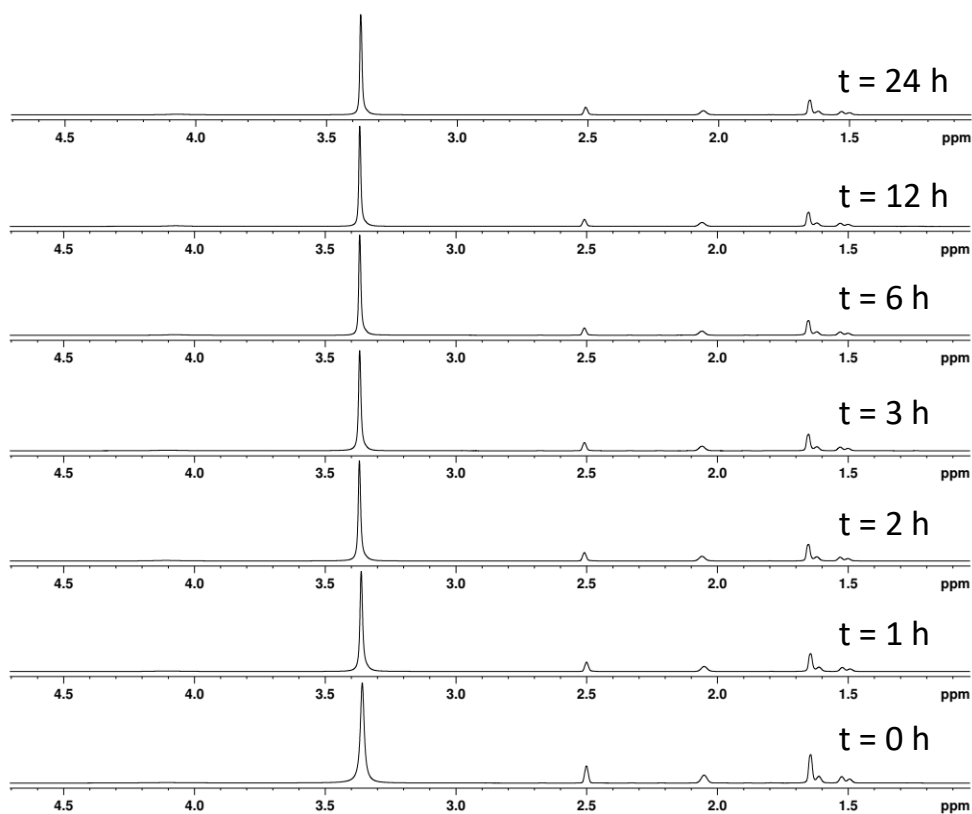


Figura 15: Espectros de RMN de ^1H para Ag-atd registrados por 24 h em $\text{DMSO-}d_6$ à 25°C .

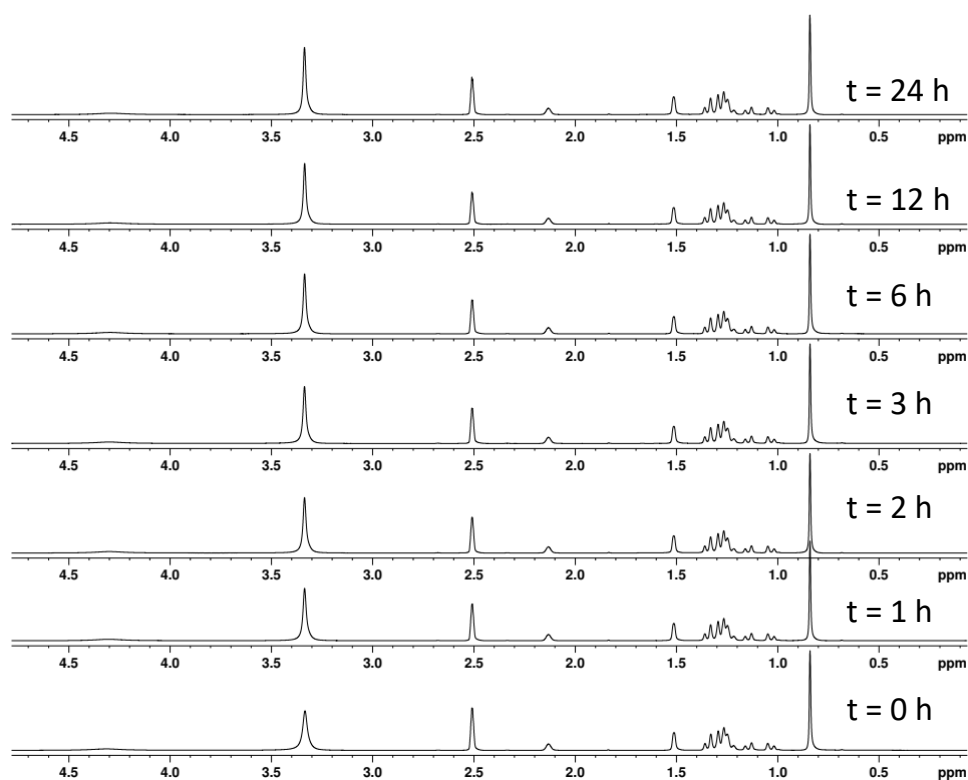


Figura 16: Espectros de RMN de ^1H para Ag-mtn registrados por 24 h em $\text{DMSO-}d_6$ à 25°C .

4.1.2. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos complexos Ag-atd e Ag-mtn e de seus precursores contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos foi avaliada por ensaio de concentração mínima inibitória (CIM). A ampicilina foi usada como um fármaco controle antibacteriano para este experimento. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Comparação entre os valores de concentração inibitória mínima de Ag-atd, Ag-mtn, atdH, mtnH e AgNO₃ contra as quatro cepas bacterianas testadas.

Compostos	CIM (mmol L ⁻¹)			
	<i>S. aureus</i> ATCC – 25923	<i>B. cereus</i> ATCC – 14579	<i>E. coli</i> ATCC – 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC – 27853
atdH	R	R	R	R
mtnH	9,27	R	R	9,27
Ag-atd	16,5 x 10 ⁻³	16,5 x 10 ⁻³	16,5 x 10 ⁻³	16,5 x 10 ⁻³
Ag-mtn	114,0 x 10 ⁻³	57,2 x 10 ⁻³	57,2 x 10 ⁻³	57,2 x 10 ⁻³
AgNO ₃	46,0 x 10 ⁻³	46,0 x 10 ⁻³	23,0 x 10 ⁻³	23,0 x 10 ⁻³
Ampicilina	28,6 x 10 ⁻³	28,6 x 10 ⁻³	1,8 x 10 ⁻³	7.1 x 10 ⁻³

R = Resistente

As cepas bacterianas foram resistentes ao ligante atdH nas condições experimentais consideradas, enquanto mtnH apresentou atividade contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Embora o mtnH fosse ativo apenas em alta concentração, essa atividade antibacteriana nunca havia sido relatada para essa molécula. Os valores de CIM de Ag-atd, Ag-mtn e AgNO₃ contra as cepas bacterianas testadas revelaram atividade na faixa de micromolar. O complexo Ag-atd foi mais ativo do que Ag-mtn em todas as cepas bacterianas testadas. O Ag-atd também foi mais ativo que o AgNO₃, principalmente contra cepas de bactérias Gram-positivas, o que indica que esse composto pode ter um mecanismo de ação que não está relacionado exclusivamente ao íon prata. O fato de o AgNO₃ ter uma atividade antibacteriana pronunciada por si só é bem relatado na literatura. No entanto, sabe-se também que esse sal de prata é tóxico para os tecidos humanos devido a sua rápida absorção na pele [88]. Dados os baixos valores de CIM de Ag-atd e Ag-mtn contra as cepas bacterianas testadas, outros ensaios devem ser realizados para avaliar a extensão de suas propriedades antibacterianas, bem como para determinar a toxicidade desses

complexos para células humanas. Os resultados também são consistentes com os dados anteriormente relatados sobre a atividade antibacteriana do complexo $[\text{Ag}(\text{l-AdNH}_2)_2]\text{NO}_3 \cdot 0,5\text{CH}_3\text{OH}$ contra *S. aureus* e *E. coli* [79].

4.1.3. Atividade antimicobacteriana

Os estudos biológicos relativos às atividades anti-*M. tuberculosis* para determinação da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) dos compostos testados são mostrados na Tabela 6. Antibióticos como moxifloxacina (MOX), rifampicina (RIF) e isoniazida (INZ) foram utilizados como controle positivo.

Tabela 6: Atividade antimicobacteriana dos complexos Ag(I) e dos compostos de partida. Os valores são apresentados em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Composto	CIM ₉₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
atdH	25,000
mtnH	25,000
Ag-atd	0,574
Ag-mtn	0,674
AgNO ₃	3,128
MOX	< 0,098
RIF	< 0,098
INZ	0,186

Os complexos Ag(I) mostraram-se mais ativos sobre *M. tuberculosis* do que seus precursores (nitrato de prata e ligantes). Embora os complexos fossem menos ativos que os antibióticos padrões testados no experimento, os compostos com valores de $\text{CIM}_{90} \leq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados promissores, podendo esses novos compostos serem usados em combinação com os antibióticos já consolidados na clínica para superar as cepas resistentes do *M. tuberculosis*.

4.1.4. Atividade antiviral

Os compostos foram avaliados quanto à sua atividade antiviral, utilizando um CHIKV recombinante desenvolvido para expressão do repórter de nanoluciferase (CHIKV-

nanoluciferase). Esta construção foi usada para avaliar a atividade anti-CHIKV desses compostos e possui taxas de replicação semelhantes às do vírus do tipo selvagem [67,68]. Primeiramente, as células BHK-21 foram tratadas com compostos a 50 μM , 10 μM e 2 μM e a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que as células toleraram diferentes concentrações de cada composto. A concentração não citotóxica mais elevada (10 ou 50 μM , dependendo do composto) foi selecionada para avaliar a atividade anti-CHIKV dos compostos. As células foram infectadas com CHIKV-*nanoluciferase* a um MOI de 0,1 na presença ou ausência de cada composto, e os níveis de atividade da nanoluciferase, que é proporcional à replicação viral, foram avaliados 16 horas após a infecção (Tabela 7). O ensaio de viabilidade foi realizado em paralelo. Nestes casos, DMSO foi usado como controle não tratado.

Tabela 7: Infecção por CHIKV e viabilidade de BHK-21 para os compostos de Ag(I) e seus precursores a 10 μM e 50 μM .

10 μM			50 μM		
Compostos	Viabilidade celular (%)	Inibição CHIKV (%)	Compostos	Viabilidade celular (%)	Inibição CHIKV (%)
atdH	107,8	4,2	mtnH	85,9	72,7
Ag-atd	103,0	46,0	AgNO ₃	88,3	61,3
Ag-mtn	94,4	48,8			

As porcentagens de inibição da infecção viral foram obtidas através de uma triagem realizada em concentrações isoladas, contudo os compostos de Ag(I) apresentaram bons valores de inibição. O grande destaque deste estudo foi para o potencial anti-CHIKV do ligante cloridrato de memantina, conforme será descrito no item 4.3.

4.1.5. Estudo de interação com BSA por espectroscopia de fluorescência

Uma avaliação detalhada do potencial de interação dos compostos com a proteína BSA foi realizada por estudos espectroscópicos de fluorescência. A proteína albumina sérica bovina (BSA) é amplamente utilizada como modelo em estudos de interação devido às suas semelhanças com a albumina sérica humana (HSA) [89]. As albuminas séricas atuam no organismo como transportadoras de substâncias exógenas e endógenas e estão presentes em

altas concentrações no plasma sanguíneo [71]. Os resíduos de aminoácidos responsáveis pela fluorescência da proteína BSA são triptofano, tirosina e fenilalanina [90] e a supressão da fluorescência desses fluoróforos ocorre quando há interações moleculares através de processos como rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexos e supressão por colisões [90]. Os efeitos dos compostos Ag-atd, Ag-mtn e AgNO_3 , na intensidade de fluorescência da BSA são mostrados na Figura 17.

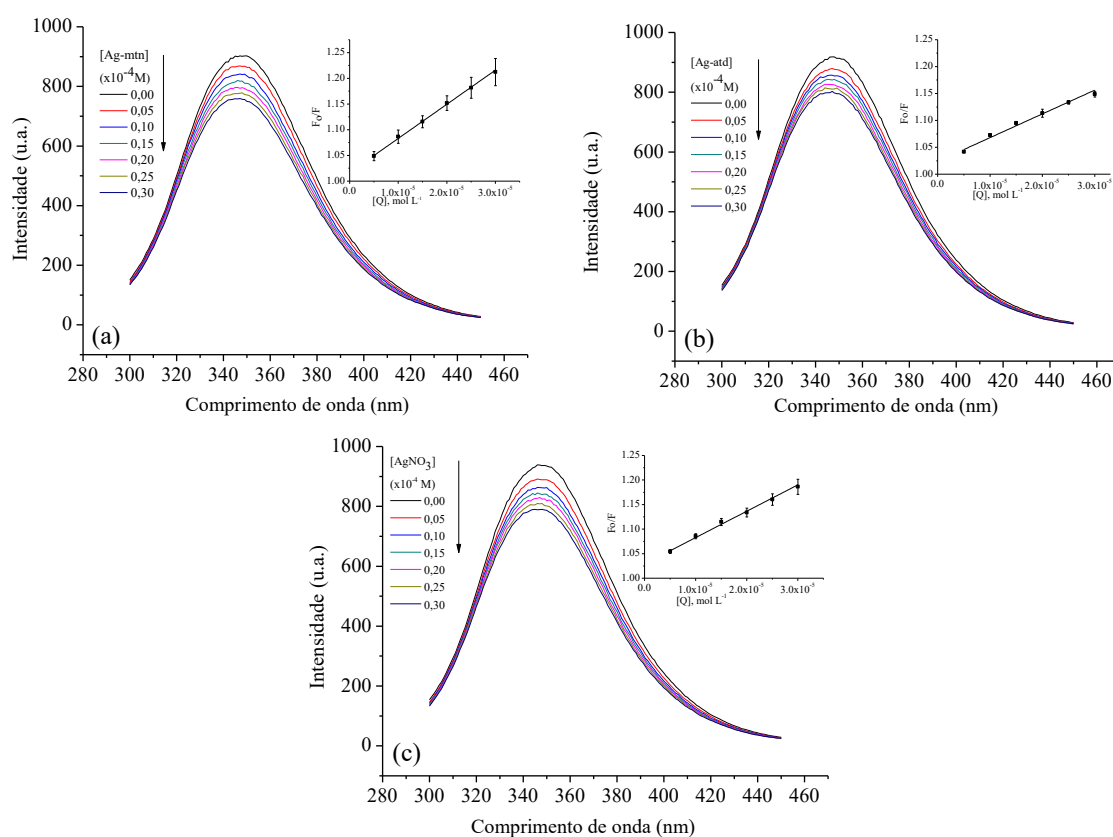


Figura 17: Espectros de supressão da fluorescência de BSA por (a)Ag-mtn (b)Ag-atd e (c) AgNO_3 .

Os espectros obtidos por titulação de Ag-atd e Ag-mtn em solução de BSA mostraram 13% e 17%, respectivamente, de supressão de fluorescência de BSA na maior concentração testada ($[\text{complexo}] = 30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), semelhante ao valor de supressão da fluorescência obtida com AgNO_3 (15%) na mesma concentração. Uma comparação entre os valores de K_{SV} e K_{b} dos complexos de Ag(I) e AgNO_3 , bem como a porcentagem de diminuição da intensidade de fluorescência inicial da BSA é mostrada na Tabela 8.

Tabela 8: Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b) e porcentagem de redução na intensidade de fluorescência para a interação de Ag-atd, Ag-mtn e $AgNO_3$ com BSA.

Compostos	K_{sv} (L mol ⁻¹)	K_b (L mol ⁻¹)	Redução (%)
Ag-atd	$4,4 \times 10^3$	$2,04 \times 10^2$	13,0%
Ag-mtn	$6,6 \times 10^3$	$1,17 \times 10^3$	17,5%
$AgNO_3$	$5,4 \times 10^3$	$2,07 \times 10^2$	15,7%

Os valores constantes de ligação, K_b para os compostos de Ag(I), não são tão altos quanto os descritos na literatura para outros complexos de prata(I) [91,92], indicando que a interação de Ag-atd e Ag-mtn com BSA é mais fraca do que as relatadas anteriormente. A semelhança dos resultados obtidos para os complexos e para o $AgNO_3$ sugere influência da concentração de íons Ag^+ na supressão da fluorescência da BSA [93].

4.1.6. Estudo de interação com DNA por eletroforese em gel de agarose

Estudos sobre a interação dos compostos com biomoléculas geralmente são realizados para investigar seus possíveis alvos moleculares. Neste caso, a capacidade dos ligantes amino adamantanos e seus correspondentes complexos de prata para alterar a conformação do DNA plasmidial foi monitorada por ensaio de eletroforese em gel de agarose. A cisplatina em diferentes concentrações foi utilizada como controle positivo. Os resultados são apresentados na Figura 18.

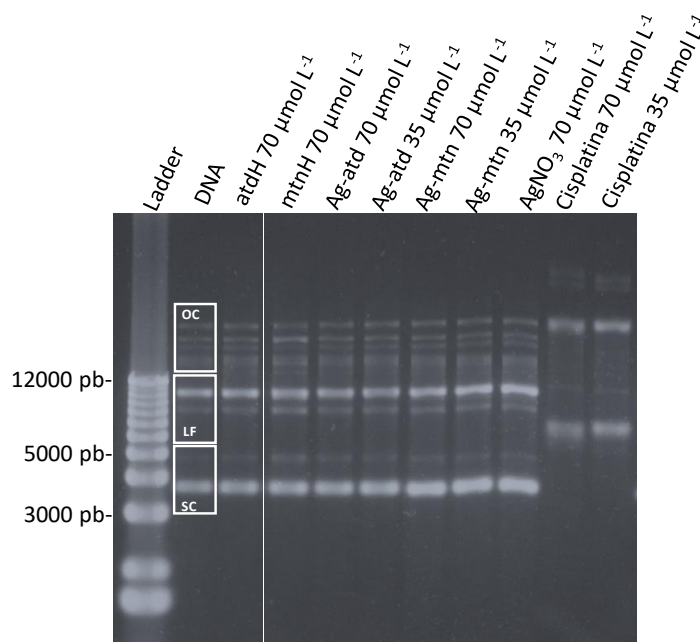


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose do DNA circular na presença de atdH, mtmH, Ag-atd, Ag-mtn, AgNO₃ e cisplatina em diferentes concentrações. OC = circular aberta, LF = forma linear e SC = formas superenoveladas do plasmídeo pGEX-4T1.

O DNA plasmidial é separado por eletroforese em diferentes bandas que são divididas devido a três conformações principais, conforme mostrado na Figura 18: forma circular aberta (OC = Open-circular), forma linear (LF = linear form) e forma superenovelada (SC = super coiled form) [94,95]. Essas conformações do plasmídeo são separadas de uma maneira que as formas mais condensadas podem migrar ainda mais no gel, enquanto as formas abertas migram menos. Quando o perfil de migração das bandas de DNA é alterado, há evidências de interação com os compostos testados. A Figura 18 mostrou que a cisplatina, que é conhecida por sua capacidade de formar adutos covalentes com o DNA [96], apresenta considerável alteração nas bandas de DNA nas duas concentrações avaliadas, enquanto o AgNO₃, os ligantes amino adamantanos e seus complexos de prata não interagem covalentemente com DNA nas condições experimentais consideradas.

4.1.7. Estudo de interação com DNA por espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi usada para melhor avaliar a interação entre os compostos e o DNA por ligação competitiva com o fluoróforo SYBr Green, Figura 19. Quando este corante interage com o DNA (razão corante/pares de base acima de 0,15) [97], um sinal de

fluorescência aumenta devido à vinculação ao sulco menor. Nesse caso, se os compostos de interesse podem interromper a interação DNA-SG, ocorre uma supressão da fluorescência.

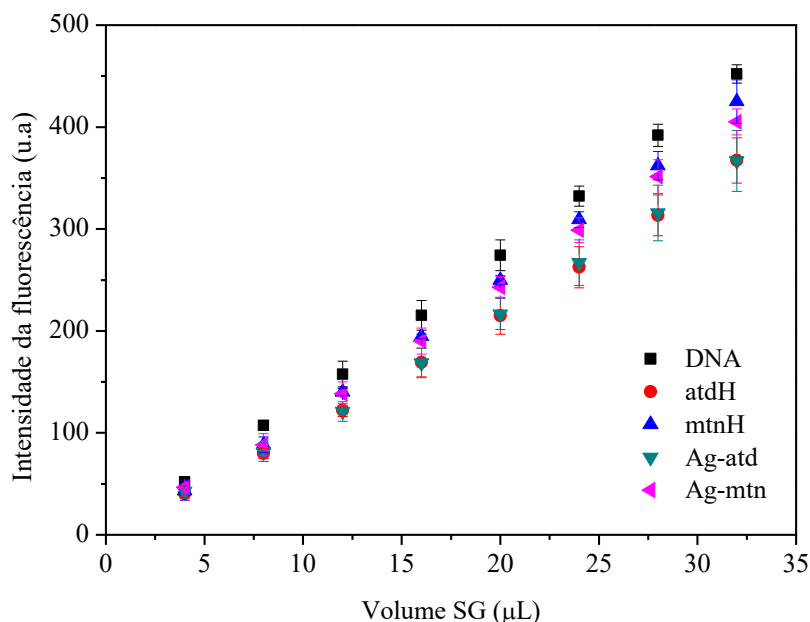


Figura 19: Intensidades de fluorescência de SG na presença de DNA livre e DNA incubado com atdH, mtnH, Ag-atd e Ag-mtn na proporção (composto/DNA) 0,3.

De acordo com os resultados obtidos na Figura 19, há apenas uma pequena interação dos compostos obtidos com CT-DNA, com a maior supressão de fluorescência resultante de atdH e Ag-atd. A presença de grupos metil em mtnH parece ter diminuído a afinidade desse ligante e seu complexo de prata correspondente com o DNA. A pequena supressão da fluorescência indica um modo não covalente de interação com o DNA. Além disso, a carga positiva nos ligantes e complexos e sua capacidade de formar ligações de hidrogênio pelo grupo NH_2 determinada que a interação é de natureza eletrostática ou por ligação ao sulco [98].

4.2. Complexos de Pt(II) com amantadina, rimantadina e memantina

4.2.1. Caracterização

4.2.1.1. Estruturas cristalinas

Os compostos Pt-atd e Pt-rtd cristalizaram no grupo espacial monoclinico $P2_1/c$, enquanto Pt-mtn cristalizou no grupo espacial ortorrômbico $Pbca$. A estrutura cristalina de Pt-

atd tem quatro moléculas independentes na unidade assimétrica, enquanto Pt-rtd e Pt-mtn tem uma. As três estruturas cristalinas confirmaram a composição esperada pelos dados de análise elementar, $[\text{PtCl}_2(\text{ligante})(\text{DMSO})]$, em que apenas uma molécula de cada derivado aminoadamantano (ligante) é coordenado aos íons platina(II), com 2 ligantes cloreto e uma molécula de dmso completando a geometria quadrada dos complexos, conforme Figura 20.

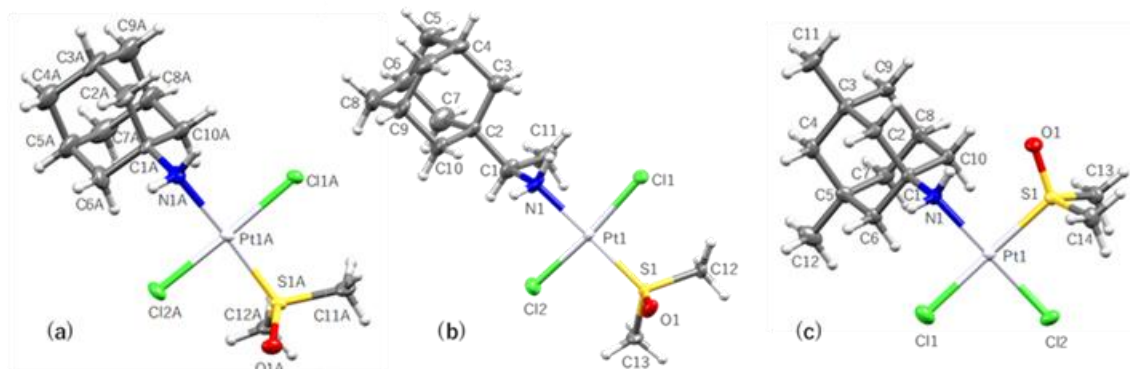


Figura 20: Representação molecular dos compostos (a) Pt-atd*, (b) Pt-rtd e (c) Pt-mtn. Elipsóides representadas com 50% de probabilidade. Os átomos de hidrogênio não foram rotulados, para maior clareza. *Apenas uma das quatro unidades assimétricas da estrutura do cristal do complexo Pt-atd é mostrada.

Uma característica estrutural importante é observada nessas estruturas cristalinas, em que os complexos Pt-atd e Pt-rtd exibem uma configuração *trans* para os átomos de cloro, enquanto o isômero *cis* é observado para Pt-mtn. Os principais comprimentos e ângulos de ligação para as três estruturas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) para as estruturas cristalinas Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn.

Ligação ou ângulo	Pt-atd*	Pt-rtd	Pt-mtn
Pt1—Cl1	2,304 (4)	2,307 (1)	2,298 (1)
Pt1—Cl2	2,302 (4)	2,294 (1)	2,301 (1)
Pt1—N1	2,070 (12)	2,079 (4)	2,067 (2)
Pt1—S1	2,217 (4)	2,221 (4)	2,192 (1)
Cl1—Pt1—Cl2	176,80 (14)	174,73 (4)	89,70 (3)
N1—Pt1—S1	175,5 (4)	172,5 (1)	90,16 (6)
N1—Pt1—Cl1	88,8 (4)	86,9 (1)	90,28 (7)
Cl1—Pt1—S1	94,97 (12)	92,02 (4)	172,88 (3)
S1—Pt1—Cl2	87,48 (13)	93,16 (4)	90,08 (3)
Cl2—Pt1—N1	88,9 (4)	88,1 (1)	178,23 (7)

*Os valores apresentados são uma média dos comprimentos e ângulos de ligação observados nas quatro moléculas de Pt-atd.

A ligação Pt—Cl e Pt—N dos três compostos tem, estatisticamente, o mesmo valor. A única diferença significativa surge da ligação Pt—S em Pt-mtn, o único composto *cis*, o qual difere dos valores observados em Pt-atd e Pt-rtd. Os comprimentos de ligação Pt—Cl, Pt—N e Pt—S (esta última do DMSO) também estão de acordo com os valores observados em uma pesquisa no Cambridge Structural Database [99], que retornou os seguintes valores médios: 2,32(4), 2,04(3) e 2,22(4)Å, respectivamente. Os ângulos de ligação observados são consistentes com a geometria quadrada, com apenas pequenas diferenças dos valores ideais e as principais interações intermoleculares presentes nas estruturas cristalinas são ligações de hidrogênio N—H···O.

4.2.1.2. Espectroscopia de absorção da região do infravermelho

Os espectros no infravermelho dos complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn e seus precursores são apresentados nas Figuras 21 e 22, respectivamente. As bandas na região de 2903-2841 cm⁻¹ podem ser atribuídas aos modos de estiramento $\nu(\text{CH})$ e $\nu(\text{CH}_2)$ dos carbonos do adamantano [21] dos ligantes. Bandas na região de 3273-3104 cm⁻¹ nos espectros dos complexos correspondem aos modos de estiramento assimétrico e simétrico do grupo amino coordenado

(NH₂) [100]. Essas mesmas bandas não são evidentes nos espectros dos ligantes porque, neste caso, eles estão na forma de cloridrato e, portanto, os modos de estiramento do grupo amino $\nu(\text{NH}_3^+)$ estão sobrepostos. As bandas na região entre 1582-1565 cm⁻¹ foram atribuídas às vibrações $\delta(\text{H-N-H})$ [79]. Bandas de absorção na região 1131-1110 cm⁻¹ e 1034-1017 cm⁻¹ foram atribuídas às vibrações $\nu\text{S=O}$ e $\nu\text{C-S}$, respectivamente, o que confirma a coordenação do enxofre da molécula de DMSO à Pt(II) [101]. Finalmente, as bandas na região 445-438 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao modo de vibração $\nu\text{Pt-S}$ característico dos complexos de platina com sulfóxidos coordenados por enxofre [102].

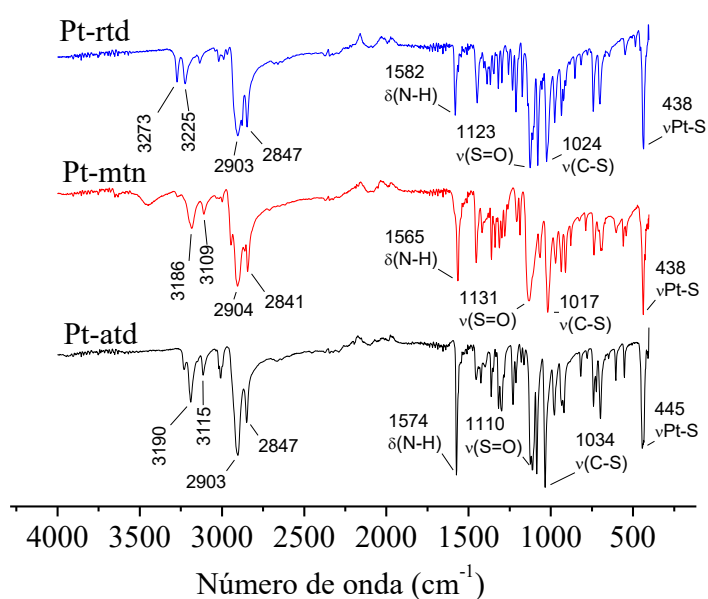


Figura 21: Espectros no infravermelho dos complexos de platina.

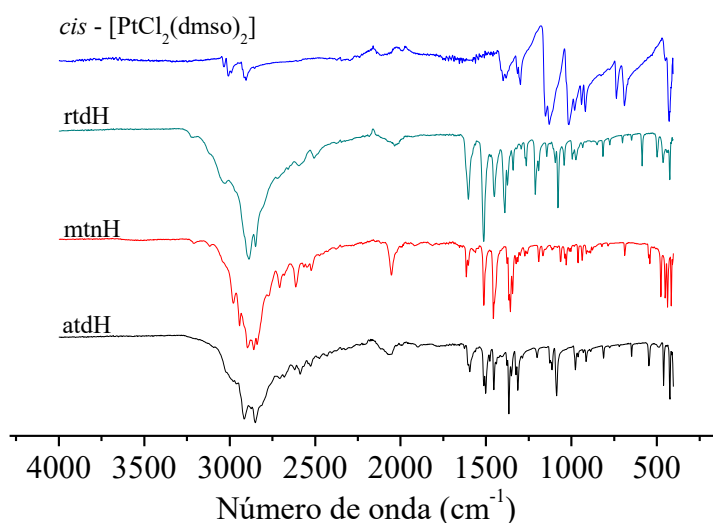


Figura 22: Espectros no infravermelho dos ligantes e do precursor metálico.

4.2.1.3. Propriedades eletrônicas e estruturais teóricas dos complexos de platina

As estruturas dos complexos $[\text{PtCl}_2(\text{atd})(\text{DMSO})]$, $[\text{PtCl}_2(\text{mtn})(\text{DMSO})]$ e $[\text{PtCl}_2(\text{rtd})(\text{DMSO})]$ foram otimizadas nas configurações *cis* e *trans* e a diferença de energia entre elas ($\Delta E_{\text{cis} - \text{trans}}$) são apresentados na Tabela 10. Os $\Delta E_{\text{cis} - \text{trans}}$ calculados para os três complexos foram menores que $\pm 2,0 \text{ kcal mol}^{-1}$, o que sugere que, em teoria, podem existir isômeros *cis* ou *trans*. O cálculo teórico também suporta os resultados experimentais por difração de raios X que mostra uma configuração *cis* para Pt-mtn e configurações *trans* para Pt-atd e Pt-rtd.

Tabela 10: Energias calculadas para os complexos $[\text{PtCl}_2(\text{atd})(\text{DMSO})]$, $[\text{PtCl}_2(\text{mtn})(\text{DMSO})]$ e $[\text{PtCl}_2(\text{rtd})(\text{DMSO})]$ em Hartree e a diferença de energia entre as conformações *cis* e *trans* ($\Delta E_{\text{cis} - \text{trans}}$, em kcal mol^{-1}). Os valores foram obtidos com a função de base 6-31+G(d, p)/LANL2DZ.

Estruturas	Métodos	
	B3LYP	MP2
$[\text{PtCl}_2(\text{atd})(\text{DMSO})]$		
<i>Cis</i> (Hartree)	-2038,982800	-2034,603288
<i>Trans</i> (Hartree)	-2038,985824	-2034,602198
$\Delta E_{\text{cis-trans}}$ (kcal mol^{-1})	1,90	-0,68
$[\text{PtCl}_2(\text{mtn})(\text{DMSO})]$		
<i>Cis</i> (Hartree)	-2117,620948	-2112,986220
<i>Trans</i> (Hartree)	-2117,623698	-2112,984698
$\Delta E_{\text{cis-trans}}$ (kcal mol^{-1})	1,73	-0,96
$[\text{PtCl}_2(\text{rtd})(\text{DMSO})]$		
<i>Cis</i> (Hartree)	-2117,611550	-2112,967294
<i>Trans</i> (Hartree)	-2117,614200	-2112,966852
$\Delta E_{\text{cis-trans}}$ (kcal mol^{-1})	1,66	-0,28

As energias dos orbitais HOMO e LUMO foram calculadas e são apresentadas na Figura 23. Os resultados mostram que o gap de energia entre HOMO e LUMO para os ligantes atd ($\Delta E = 6,27 \text{ eV}$), mtn ($\Delta E = 6,28 \text{ eV}$) e rtd ($\Delta E = 6,10 \text{ eV}$) são maiores que os seus respectivos complexos de Pt(II), independentemente da configuração.

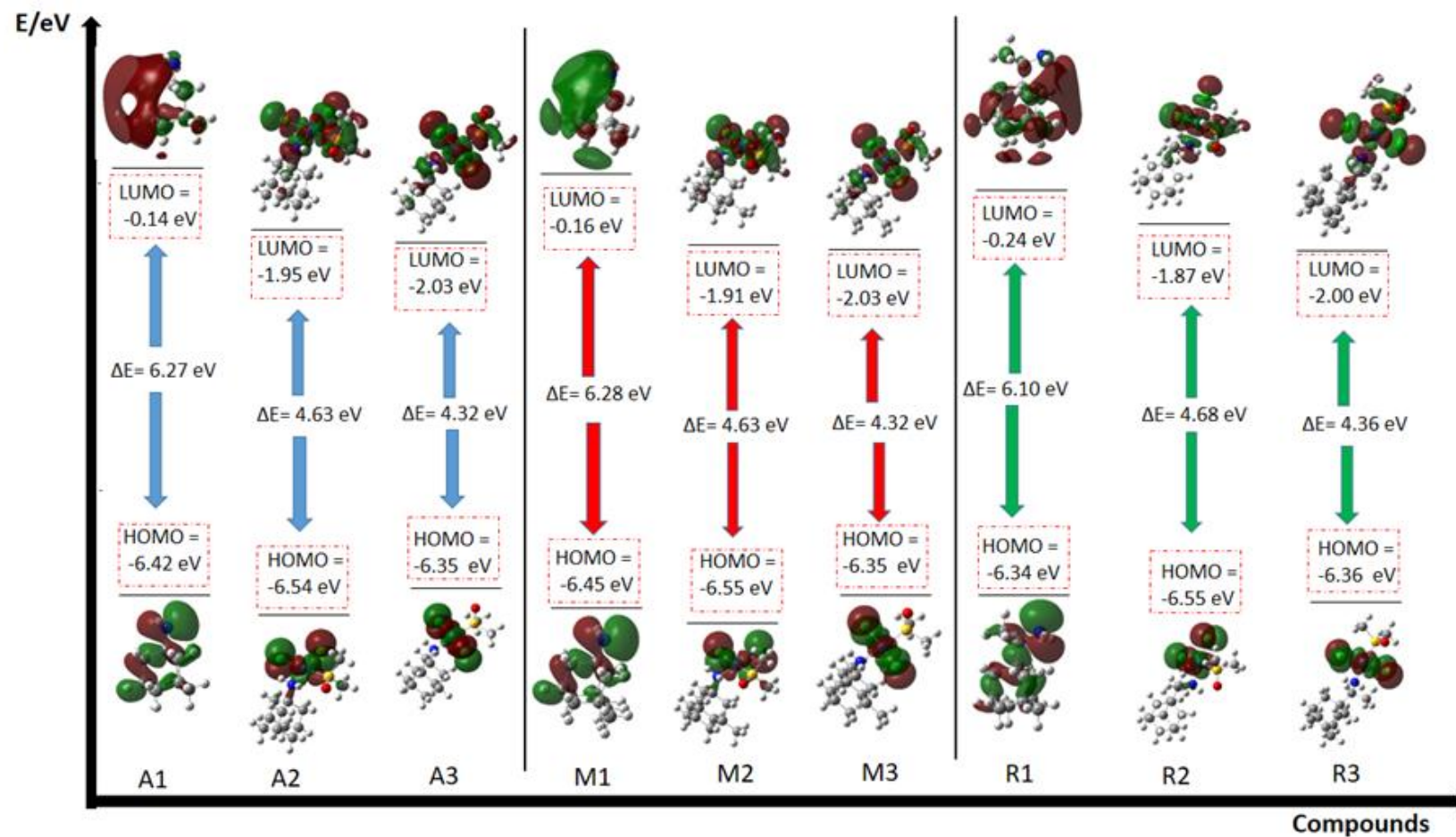


Figura 23: HOMO, LUMO e gap para: A1) atd, A2) *cis*-[PtCl₂(atd)(DMSO)], A3) *trans*-[PtCl₂(atd)(DMSO)], M1) mtn, M2) *cis*-[PtCl₂(mtn)(DMSO)], M3) *trans*-[PtCl₂(mtn)(DMSO)], R1) rtd, R2) *cis*-[PtCl₂(rtd)(DMSO)], R3) *trans*-[PtCl₂(rtd)(DMSO)]. Dados obtidos no nível teórico B3LYP/6-31+G(d, p)/LANL2DZ.

4.2.1.4. Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas para os complexos de platina são mostradas na Figura 24. De acordo com os dados experimentais, o composto Pt-atd começa a se decompor a 160 °C com perda de massa de 56,4% até 400 °C. A perda de massa pode ser atribuída à fração orgânica da molécula (calc. 57,4%). O resíduo final correspondente a 42,6% é consistente com a formação de óxido de platina, PtO (calc. 43,6%).

Para o composto Pt-rtd, a decomposição térmica começa a 160 °C com uma perda de massa de 44,10% de 160–257 °C, que é equivalente à perda das moléculas rtd e dmso (calc. 46,5%). Há uma perda de peso subsequente de 14,1% de 257–360 °C, que é consistente com a perda de dois átomos de Cl (calc. 13,6%) com a formação de um resíduo final de 41,4%, que é consistente com óxido de platina, PtO (calc. 40,3%).

Para Pt-mtn, há uma primeira etapa de perda de massa de 2% de 25 a 120 °C, que foi atribuída à perda de água ou solvente residual. De 120 °C a 696 °C foi observada uma perda de massa de 54,8%, que corresponde à perda da memantina e uma molécula de DMSO $[(CH_3)_2SO]$, além de dois átomos de Cl (calc. 59,7%). Em 696 °C existe um resíduo de 41,4% que é consistente com a formação de PtO (calc. 40,3%). De 696 °C para 900 °C há uma perda de massa que, provavelmente, corresponde à redução de PtO para Pt⁰.

Os dados de decomposição térmica estão resumidos na Tabela 11. Os dados termogravimétricos experimentais reforçam a composição dos complexos conforme verificado pelas análises anteriores.

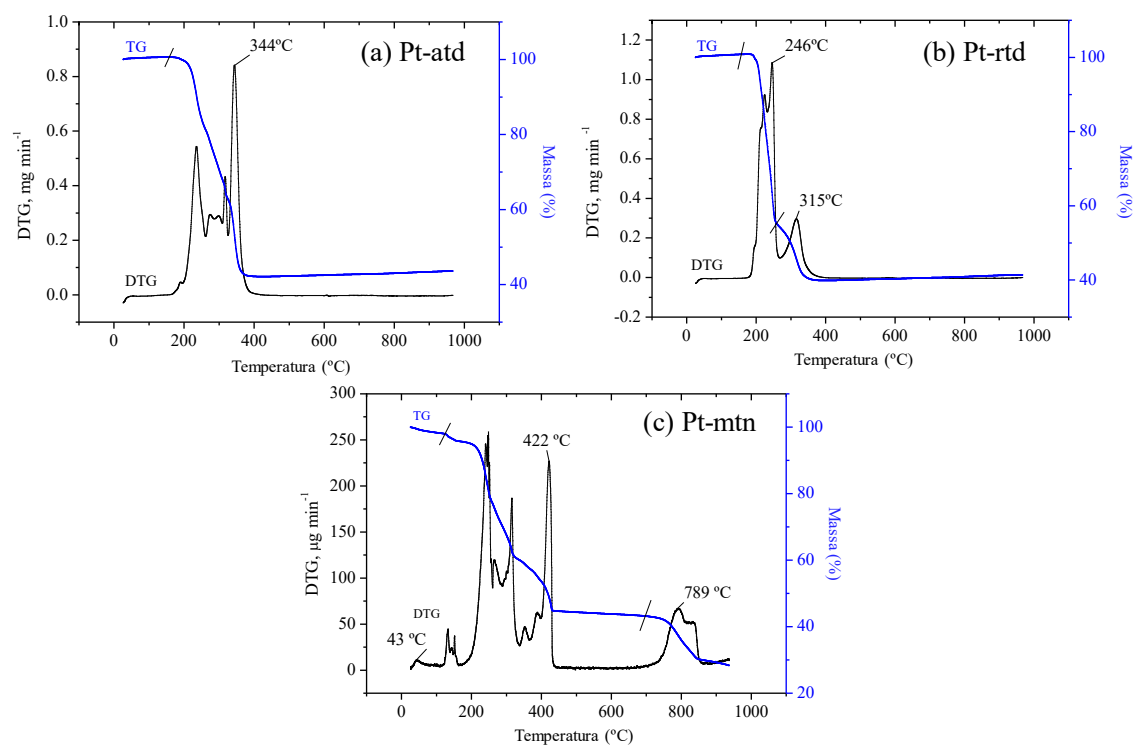


Figura 24: Curvas TG (azul) e DTG (preto) de (a) Pt-atd, (b) Pt-rtd e (c) Pt-mtn.

Tabela 11: Dados de comportamento térmico dos complexos.

Complexo	etapa	Temperatura (°C)	DTG pico	TG perda de massa (%)		Atribuição
				Calc.	Exp.	
Pt-atd	1 ^a	160 – 400	344 °C	57,4	56,4	Ligante + (CH ₃) ₂ SO + 2Cl
	Resíduo			42,6	43,6	PtO
Pt-rtd	1 ^a	160 – 257	246 °C	46,1	44,5	Ligante + (CH ₃) ₂ SO
	2 ^a	257 – 360	315 °C	13,6	14,1	2Cl
	Resíduo			40,3	41,4	PtO
Pt-mtn	1 ^a	26 – 120	43 °C		2,00	Solvente residual
	2 ^a	120 – 696	422 °C	59,7	54,8	Ligante + (CH ₃) ₂ SO + 2Cl
	Resíduo			40,3	43,2	PtO
	3 ^a	696 – 900	789 °C			Pt ⁰

4.2.1.5. Espectrometria de massas

Os complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn foram analisados por ESI(+)-QTOF-MS e os padrões isotópicos do íon molecular para os complexos são apresentados na Figura 25, enquanto os espectros completos são mostrados na Figura 26. Para Pt-atd, o pico observado em m/z 460,0752 foi atribuído ao íon $[\text{Pt}(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})(\text{DMSO})\text{Cl}]^+$ e um pico em m/z 496,0482 foi atribuído ao $[\text{Pt}(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})(\text{DMSO})\text{Cl}_2 + \text{H}]^+$ íon, em que dmso se refere à composição $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Para Pt-rtd, uma espécie contendo dois ligantes dmso $[\text{Pt}(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N})(\text{DMSO})_2\text{Cl}]^+$ foi observada em m/z 566,1272 e é provavelmente uma consequência da recombinação do ligante que ocorre durante a análise. O espectro Pt-mtn apresentou um sinal correspondente à composição proposta do complexo $[\text{Pt}(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N})(\text{DMSO})\text{Cl}_2 + \text{H}]^+$ em m/z 524,0769.

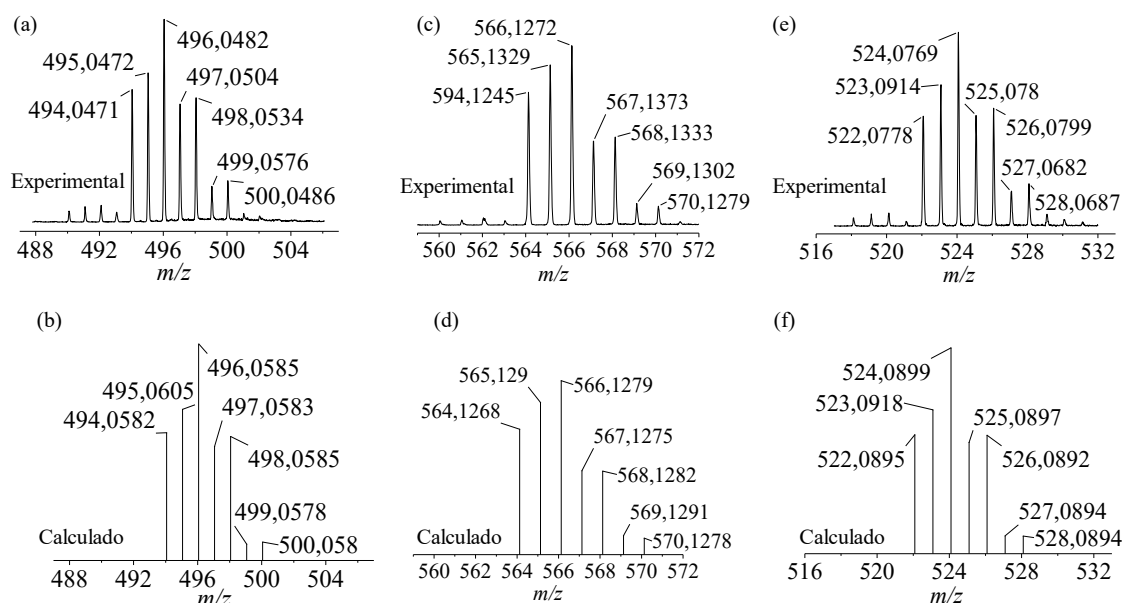


Figura 25: Padrões isotópicos do pico do íon molecular (a) experimental e (b) calculado para Pt-atd, enquanto (c) e (d) correspondem a Pt-rtd e (e) e (f) correspondem a Pt-mtn.

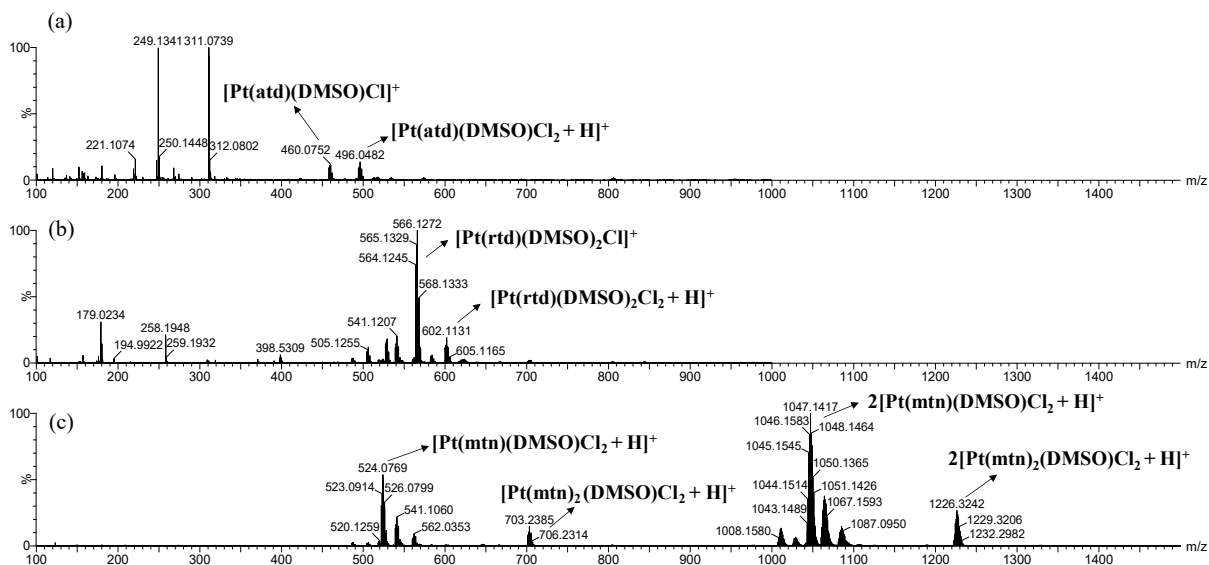


Figura 26: Espectros de massas de (a) Pt-atd, (b) Pt-rtd e (c) Pt-mtn.

4.2.1.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H em solução dos complexos de Pt(II) e dos ligantes correspondentes são fornecidos na Figura 27. Os espectros dos complexos foram registrados em CD_2Cl_2 e analisados por comparação com os espectros dos ligantes correspondentes. As atribuições são apresentadas na Tabela 12. Sinais em 3,3 ppm nos espectros dos complexos são característicos da presença de moléculas de DMSO coordenadas aos átomos de platina em todos os casos [103]. Diferenças entre os deslocamentos químicos nos espectros dos ligantes e complexos são observadas para átomos de hidrogênio próximos aos locais de coordenação. Para atdH e mtnH, os átomos de hidrogênio H2, H6 e H10 sofrem desblindagem de aproximadamente 0,15 ppm após coordenação com o íon Pt(II). Para rtdH, os átomos de hidrogênio do grupo metil vizinho ao grupo $-\text{NH}_2$ sofrem desblindagem de 0,24 ppm.

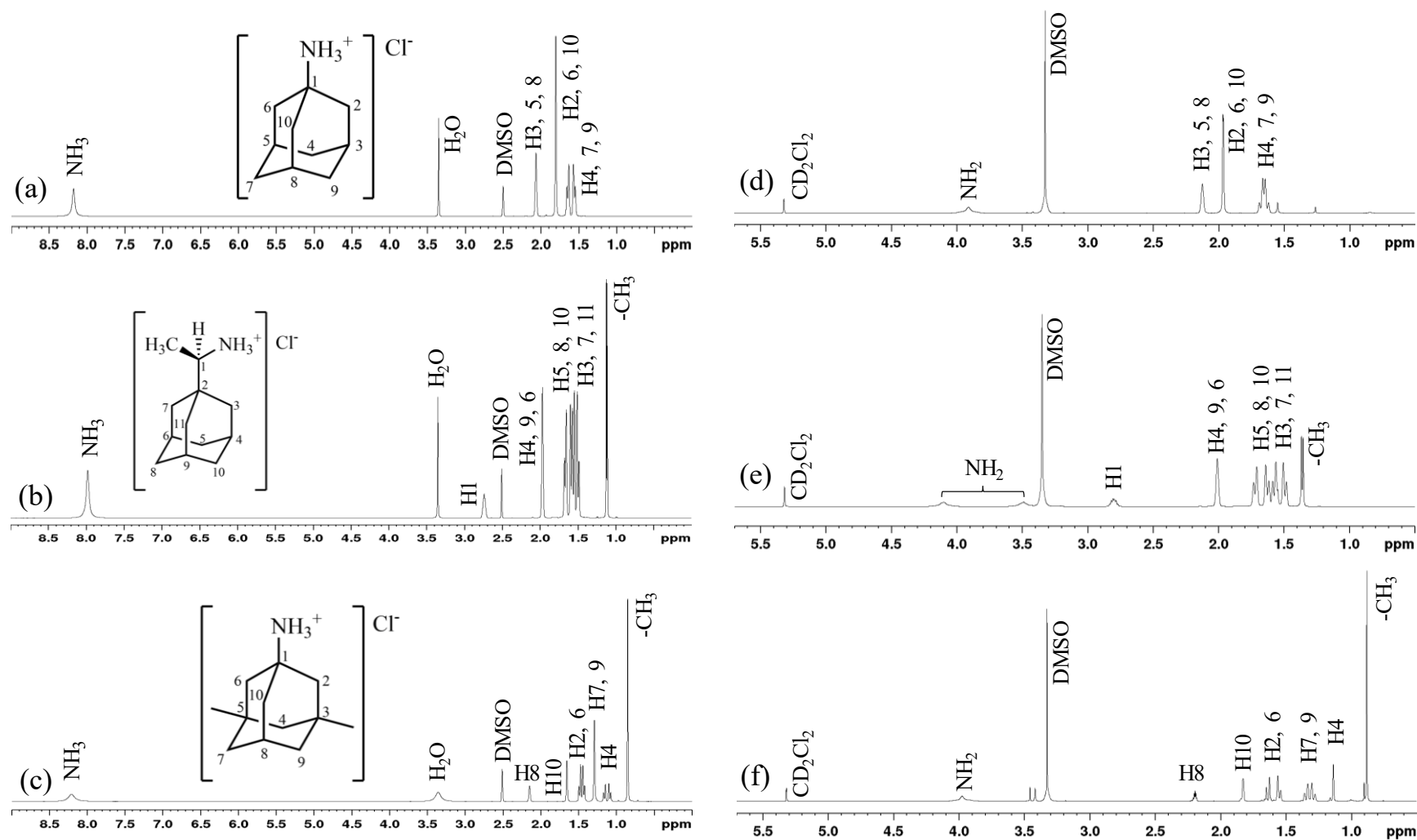


Figura 27: Espectros de RMN ^1H de (a) atdH, (b) rtdH e (c) mtnH em $\text{DMSO}-d_6$ e de (d) Pt-atd, (e) Pt-rtd e (f) Pt-mtn em CD_2Cl_2 .

Tabela 12: Atribuições de RMN de ^1H e desvios químicos (ppm) para atdH, rtdH e mtnH em $\text{DMSO}-d_6$ e Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn em CD_2Cl_2 . Para o esquema de numeração do átomo de hidrogênio consultar Figura 27.

Atribuição	$-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$	H4, H7, H9	H2, H6, H10	H3, H5, H8	DMSO
Integral		6	6	3	6
atdH	8,18	1,60	1,80	2,06	--
Pt-atd	3,91	1,65	1,96	2,12	3,32

Atribuição	$-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$	H3, H7, H11	H5, H8, H10	H4, H9, H6	H1	$-\text{CH}_3$	DMSO
Integral		6	6	3	1	3	6
rtdH	7,98	1,53	1,63	1,97	2,74	1,12	--
Pt-rtd	4,10/3,49	1,53	1,68	2,01	2,80	1,36	3,35

Atribuição	$-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$	H2, H6	H4	H7, H9	H8	H10	$-\text{CH}_3$	DMSO
Integral		4	2	4	1	2	6	6
mtnH	8,20	1,45	1,12	1,29	2,15	1,65	0,85	--
Pt-mtn	3,97	1,60	1,14	1,32	2,19	1,83	0,88	3,33

Os experimentos de HMBC $\{^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ foram realizados para ver mudanças diretas na densidade eletrônica do átomo de nitrogênio dos aminoadamantanos após a coordenação com a platina. Os mapas de correlação 2D são mostrados na Figura 28. Os átomos de nitrogênio dos grupos $\text{R}-\text{NH}_3^+$ de atdH e mtnH são observados a 62,0 e 60,6 ppm, respectivamente, enquanto o átomo de nitrogênio do grupo $\text{R}-\text{NH}_3^+$ de rtdH é observado a 42,6 ppm. Para seus complexos correspondentes, os sinais foram encontrados em 36,2 ppm, 34,8 ppm e 10,0 ppm, respectivamente. A variação $\Delta\delta$ (complexo δ - ligante δ) de $-25,8$, $-25,8$ e $-32,6$, respectivamente, reforça a coordenação dos ligantes a Pt(II) pelo átomo N do grupo NH_2 .

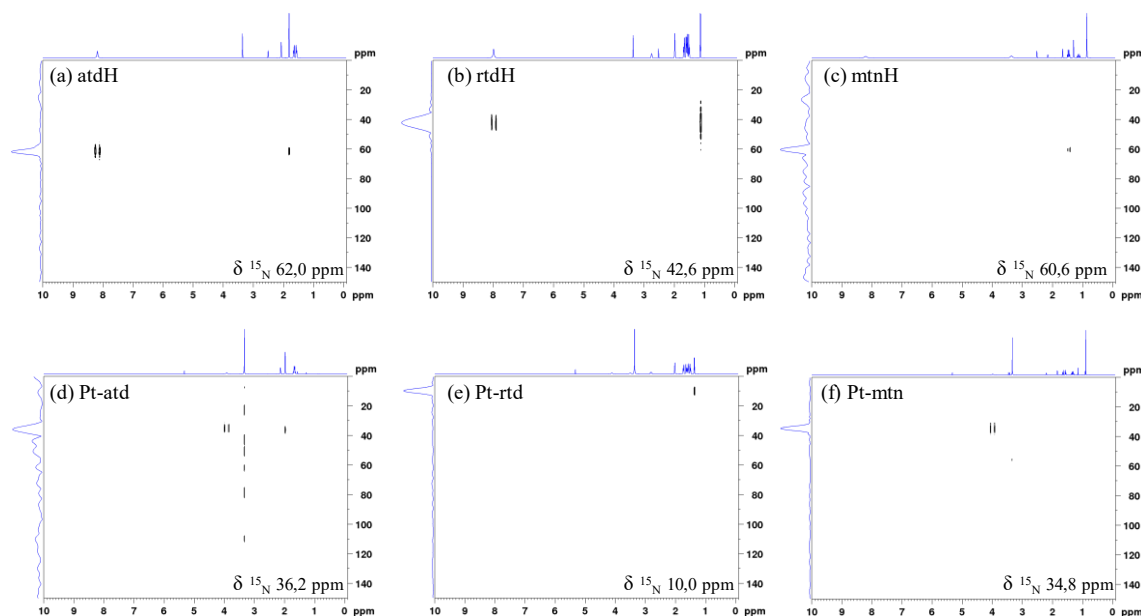


Figura 28: Mapa de correlação $\{^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ HMBC de (a) atdH, (b) rtdH, (c) mtnH em $\text{DMSO}-d_6$ e de (d) Pt-atd, (e) Pt-rtd e (f) Pt-mtn em CD_2Cl_2 .

Os espectros de RMN ^{195}Pt , apresentados na Figura 29, foram obtidos usando $\text{K}_2[\text{PtCl}_6]$ como uma referência interna. O composto $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ foi usado como padrão externo com sinal em -1609,41 ppm. Os sinais observados em -3049,49, -3090,20 e -3085,69 ppm correspondem a ^{195}Pt nos complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn, respectivamente. O sinal do complexo de platina parental $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ foi observado em -3445,96 ppm.

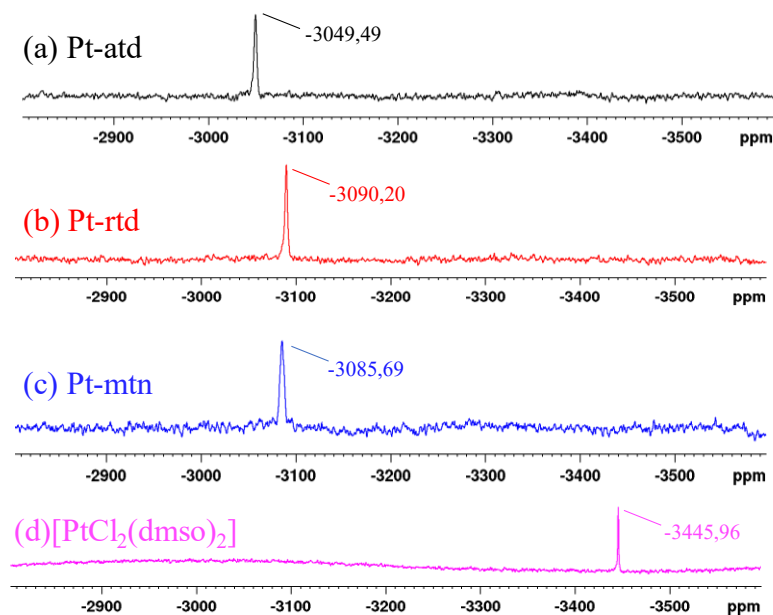
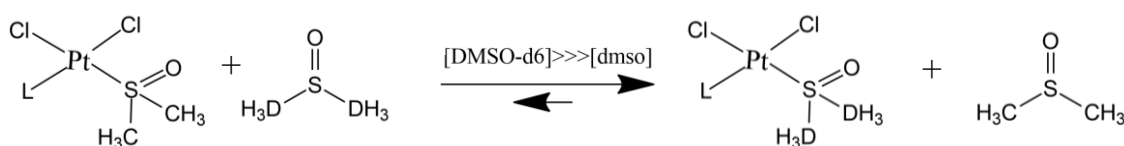


Figura 29: RMN de ^{195}Pt e deslocamentos químicos (ppm) dos complexos metálicos.

A pequena diferença de deslocamento químico entre Pt-atd e Pt-rtd (ambos os complexos *trans*) é provavelmente devido às diferentes naturezas dos grupos doadores de amino entre esses dois ligantes. Para Pt-atd e Pt-mtn, com ambiente químico igual do grupo amino, a diferença de mudanças químicas provavelmente aumenta a partir de configurações distintas (*trans* vs *cis*, respectivamente). Na verdade, a configuração *cis* ou *trans* dos complexos de Pt(II) pode não alterar drasticamente os desvios de RMN de ^{195}Pt , como exemplificado pela diferença de apenas 4 ppm entre os sinais de RMN de ^{195}Pt de cisplatina (-2149 ppm) e transplatina (-2145 ppm) [104].

A fim de avaliar a labilidade dos complexos na solução de DMSO- d_6 em função do tempo, os espectros de RMN de ^1H foram registrados para cada composto por 24 h à temperatura ambiente. Neste estudo foi possível diferenciar o sinal do ligante DMSO (que não é deuterado) do DMSO- d_6 (solvente), e também foi possível identificar a troca de DMSO na esfera de coordenação com o solvente, conforme mostrado no Esquema 1.



Esquema 1. Esquema de reação de troca de ligante entre o dmso coordenado e o DMSO- d_6 .

Os sinais de DMSO- d_6 não são observados por RMN de ^1H , além do sinal característico de RMN de ^1H do DMSO- d_5 que é observado a 2,54 ppm (quinteto, $J_{\text{H,D}} = 1,9$ Hz) [105]. No entanto, moléculas de DMSO coordenadas e não coordenadas são observadas como dois sinais distintos em 3,27 e 2,55 ppm, respectivamente, no espectro de Pt-atd, conforme observado na Figura 30.

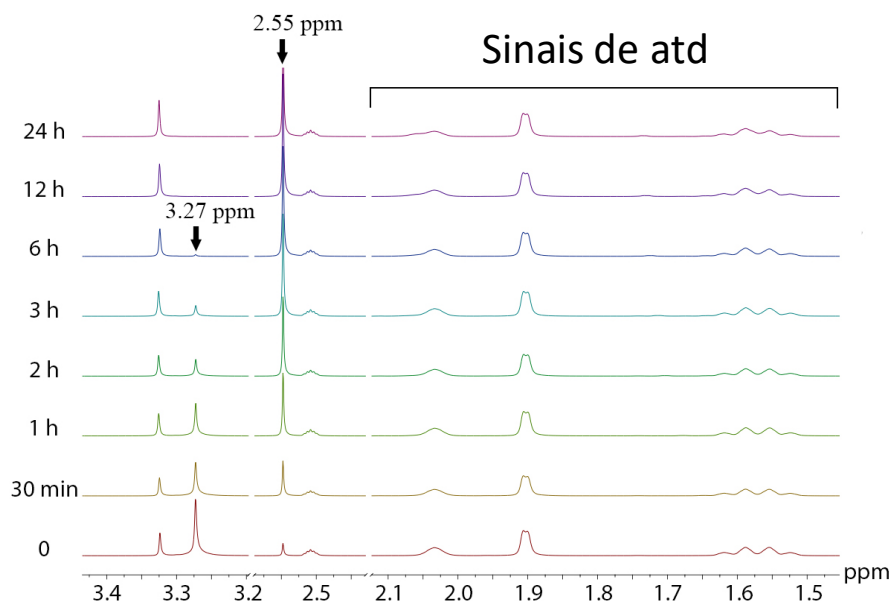


Figura 30: Estudos cinéticos de Pt-atd por 24 horas à 25 °C por RMN ^1H . Os sinais de DMSO coordenado (3,27 ppm) e DMSO não coordenado (2,55 ppm) são indicados pelas setas.

O sinal do DMSO coordenado diminui em intensidade (área de integração) com o tempo, enquanto o sinal do DMSO livre aumenta, o que é uma indicação de que a reação sugerida no Esquema 1 ocorre em solução. Como a concentração de DMSO- d_6 (solvente) é muito maior do que a concentração de DMSO do complexo, é razoável supor que a reação de troca de ligante alcançaria o equilíbrio onde todas as moléculas de DMSO são substituídas por DMSO- d_6 na esfera de coordenação. Os estudos cinéticos do Pt-atd mostram que após 12 horas o dmsco coordenado é completamente substituído pelo DMSO- d_6 , mas nenhuma alteração é observada nos sinais do ligante atd (1,50 - 2,10 ppm).

Isso está em contraste com o que foi observado para Pt-mtn e Pt-rtd, porque o DMSO é completamente substituído após apenas 2 horas e pequenas alterações nos sinais dos ligantes também são observadas para ambos rtd e mtn, conforme mostrado nas Figuras 31 e 32, respectivamente.

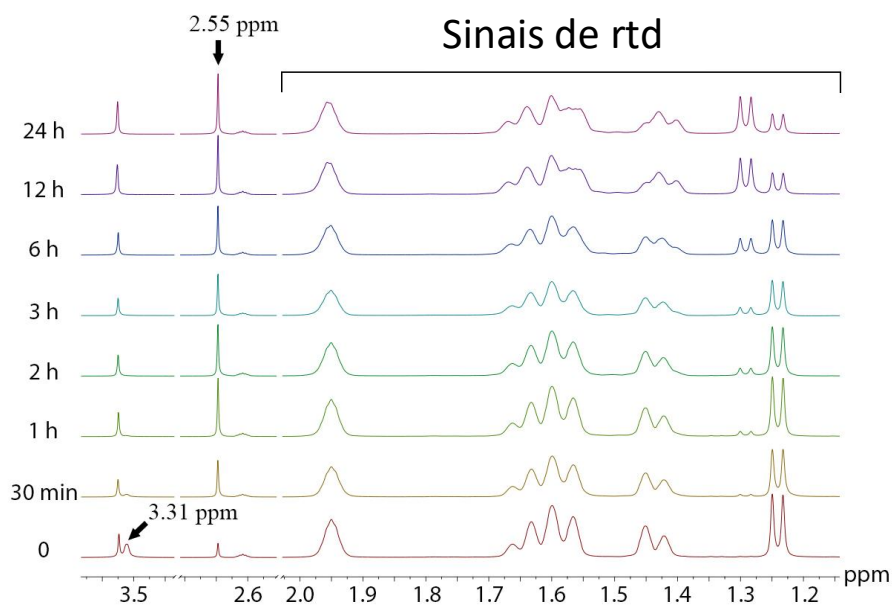


Figura 31: Estudos cinéticos de Pt-rtd durante 24 horas à 25 °C por RMN ^1H . Os sinais de DMSO coordenado (3,31 ppm) e DMSO não coordenado (2,55 ppm) são indicados pelas setas. A intensidade dos sinais entre 1,20 e 2,00 ppm foi aumentada para melhor visualização.

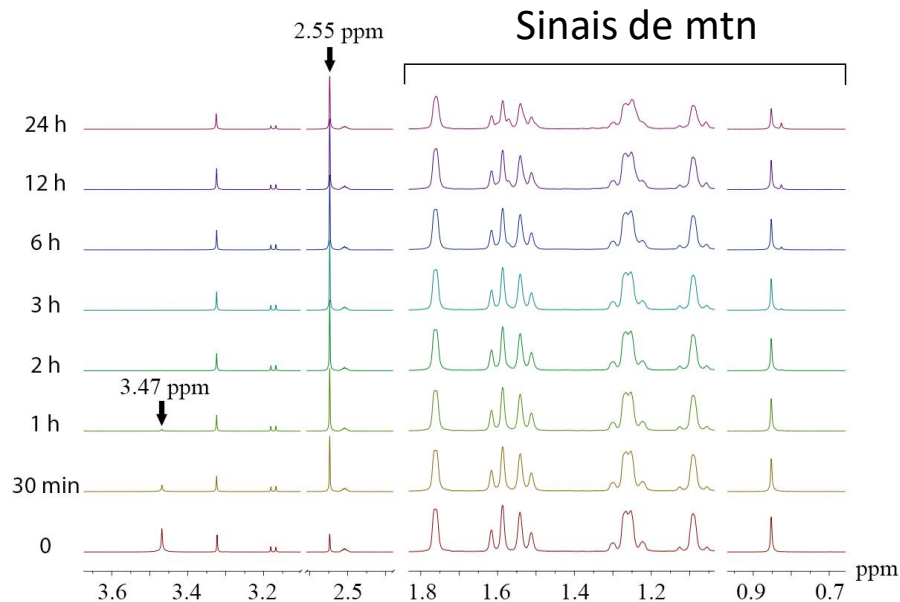


Figura 32: Estudos cinéticos de Pt-mtn durante 24 horas à 25 °C por RMN ^1H . Os sinais de DMSO coordenado (3,47 ppm) e DMSO não coordenado (2,55 ppm) são indicados pelas setas. A intensidade dos sinais entre 1,00 e 1,80 ppm foi aumentada para melhor visualização.

Para quantificar a taxa de troca de DMSO, a integração dos picos nos espectros de RMN de ^1H dos complexos foram correlacionados com a concentração conhecida do complexo em

solução para traçar curvas cinéticas. Os resultados foram ajustados à equação 3, equação exponencial que descreve uma reação de taxa de primeira ordem:

$$[A] = [A_0]e^{-kt} \quad \text{Equação 3}$$

Onde $[A]$ é a concentração de DMSO (coordenado ou livre) em $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $[A_0]$ é a concentração inicial de DMSO (coordenado ou livre), também em $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, k é a constante de velocidade e t é o tempo em segundos. Os gráficos das equações de taxas calculadas para a troca de DMSO nos três complexos são apresentados na Figura 33.

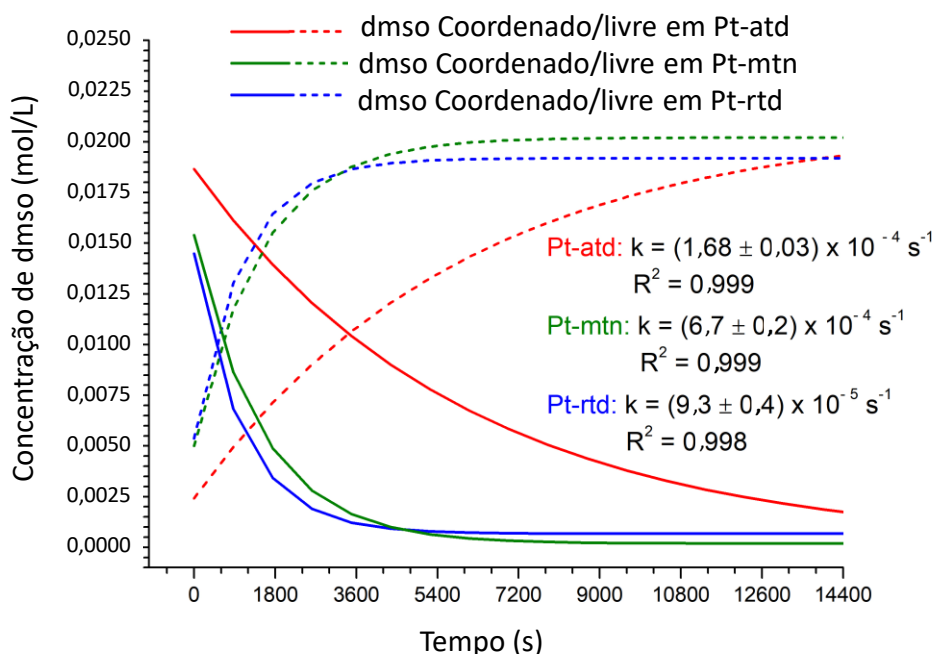


Figura 33: Cinética de troca de DMSO nos três complexos de platina.

As linhas tracejadas descrevem a concentração de dmsO livre em função do tempo. Percebe-se que as concentrações iniciais de DMSO livre não são zero, pois há picos correspondentes ao DMSO livre em todos os espectros de RMN (Figura 30-32). No entanto, essas concentrações iniciais são muito baixas e aumentam com o tempo, ao contrário das concentrações iniciais de dmsO coordenado, que se aproximam da concentração real dos complexos e diminuem com o tempo. As constantes de taxa calculadas mostram que os ligantes dmsO de Pt-mtn e Pt-rtd são mais lábeis ($k = 6,7 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ e $9,3 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$, respectivamente) do que o dmsO de Pt-atd ($k = 1,68 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$). Para Pt-mtn e Pt-rtd, não só o DMSO está sendo substituído pelo DMSO- d_6 , mas também os ligantes. Os sinais de mtn livre começam a ser

visíveis após 6 horas (0,83 ppm) e os sinais de rtd livre são mais evidentes (logo após 30 minutos, 1,29 ppm). Portanto, os experimentos cinéticos sugerem uma ordem de labilidade de $\text{Pt-rtd} > \text{Pt-mtn} \gg \text{Pt-atd}$ em condições de alto excesso de $\text{DMSO-}d_6$. A labilização do ligante atd não foi observada durante o período de 24 horas.

Essa ordem de labilidade pode ser devida a dois efeitos principais. Ao comparar Pt-atd e Pt-rtd (ambos complexos *trans*), a diferença provavelmente ocorre devido à natureza do sítio doador do ligante, uma vez que atd e rtd têm valores de pKa ligeiramente diferentes (10,71 vs 10,14, de acordo com o banco de dados DrugBank) [106]. Agora comparando Pt-atd e Pt-mtn, que têm o mesmo ambiente químico no local doador do ligante, a diferença provavelmente surge das configurações *trans* e *cis*, respectivamente. A terceira comparação, Pt-rtd e Pt-mtn, não é tão direta, uma vez que a natureza do ligante e a configuração geométrica mudam, resultando em uma cinética geral de substituição de ligante semelhante. Essas observações são consistentes com a ordem dos deslocamentos químicos ^{195}Pt dos complexos.

4.2.2. Atividade antibacteriana

As atividades antibacterianas *in vitro* dos ligantes e complexos de Pt(II) foram avaliadas contra cepas bacterianas Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) por meio da determinação da sua concentração inibitória mínima (CIM) e os resultados podem ser encontrados na Tabela 13. O ligante atdH não mostrou atividade mesmo na concentração mais alta testada neste experimento, enquanto os ligantes rtdH e mtnH foram inativos contra *B. cereus*. Os complexos de Pt(II) foram particularmente ativos contra as bactérias Gram-positivas. O complexo Pt-mtn apresentou a maior atividade geral contra *S. aureus* ($\text{CIM} = 0,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) e *B. cereus* ($\text{CIM} \leq 0,14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) e foi o único complexo capaz de inibir bactérias Gram-negativas neste experimento (*E. coli*, $\text{CIM} \leq 0,14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Tabela 13: Comparação entre os valores de concentração inibitória mínima de Pt–atd, Pt–rtd, Pt–mtn, atdH, rtdH, mtnH e $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ contra as quatro cepas bacterianas testadas.

Compostos	CIM (mmol L^{-1})			
	<i>S. aureus</i> (ATCC - 25923)	<i>B. cereus</i> (ATCC - 14579)	<i>E. coli</i> (ATCC - 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC – 27853)
atdH	R	R	R	R
rtdH	11,0	R	11,0	11,0
mtnH	11,0	R	11,0	11,0
Pt-atd	0,30	0,63	R	R
Pt-rtd	4,77	4,77	R	R
Pt-mtn	0,30	$\leq 0,14$	$\leq 0,14$	R
$[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$	R	R	R	R
Ampicilina	0,0286	0,0286	0,0018	0,0071

R= Resistente

Esses resultados indicaram não apenas um potencial antibacteriano melhorado dos complexos de Pt(II) em comparação com os ligantes, mas também a presença de alguma seletividade para bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-negativas também se mostraram mais resistentes a outros complexos de platina(II) relatados na literatura [107]. É interessante notar que o precursor $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ não foi capaz de inibir nenhuma das cepas bacterianas testadas neste experimento, sugerindo que a atividade antibacteriana observada para os complexos não pode ser atribuída apenas à presença do íon Pt(II), mas sim à formação dos compostos de coordenação com os ligantes bioativos.

4.2.3. Atividade antimicobacteriana

O potencial antimicobacteriano dos compostos foi avaliado *in vitro* por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM_{90}) para a cepa laboratorial *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294). Os valores encontrados para os complexos de platina e seus precursores são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14: Atividade antimicobacteriana dos complexos de Pt(II) e dos materiais de partida.

Composto	CIM ₉₀ (µg mL ⁻¹)
atdH	> 25
rtdH	> 25
mtnH	> 25
atdH	> 25
Pt-atd	> 25
Pt-rtd	> 25
Pt-mtn	> 25
[PtCl ₂ (dmsO) ₂]	> 25
Isoniazida	0,56 ± 0,15

O antibiótico isoniazida foi utilizado como controle positivo. Os compostos de platina foram avaliados quanto à sua atividade antimicobacteriana e não apresentaram inibição no crescimento de *M. tuberculosis* mesmo na maior concentração testada.

4.2.4. Atividade antiviral

O potencial antiviral dos complexos de platina foi avaliado utilizando a mesma metodologia aplicada aos complexos de Ag(I). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Infecção por CHIKV e viabilidade de BHK-21 para os compostos de Pt(II) e seus precursores a 10 µM e 50 µM.

10 µmol L ⁻¹			50 µmol L ⁻¹		
Compostos	Viabilidade celular (%)	Inibição CHIKV (%)	Compostos	Viabilidade celular (%)	Inibição CHIKV (%)
atdH	107,8	4,2	mtnH	85,9	27,3
rtdH	96,9	45,9	[PtCl ₂ (DMSO) ₂]	95,2	20,3
Pt-rtd	51,5	100,0			
Pt-mtn	46,4	100,0			

O complexo Pt-atd não foi avaliado quanto seu potencial antiviral, pois nos estudos preliminares apresentou elevada toxicidade frente as células BHK-21 mesmo na menor concentração testada ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$). Já os complexos Pt-rtd e Pt-mtn inibiram completamente a infecção viral, porém apresentaram uma redução na viabilidade das células BHK-21.

4.2.5. *Ensaio de mutagenicidade*

Os resultados do ensaio de mutagenicidade dos complexos de Pt(II) podem ser encontrados na Tabela 16. Os dados revelam o número médio de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice mutagênico (IM) após os tratamentos com complexos de platina, observados nas cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a, na presença (+ S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica. Os ensaios de mutagenicidade mostraram que nenhuma das cepas de *S. typhimurium*, expostas a diferentes concentrações de Pt-rtd induziu um aumento duas vezes ou maior no número médio de revertentes em comparação ao grupo controle negativo, indicando a ausência de atividade mutagênica, nas condições utilizadas neste estudo. Por outro lado, na ausência e presença do sistema metabolizador externo, os complexos de Pt-mtn e Pt-atd se mostraram mutagênicos, com um índice mutagênico superior a 2,0 em todas as concentrações testadas nas cepas TA98 e TA97a. Na cepa TA100, o complexo Pt-mtn também induziu um aumento no número de colônias revertentes em relação ao controle negativo na presença de ativação metabólica, com um índice mutagênico de 2,0 na concentração de $50 \mu\text{g/placa}$, indicando também a atividade mutagênica indireta por substituição de pares de bases. Na cepa TA102, nenhuma mutagenicidade foi detectada na ausência ou presença de ativação metabólica. Nenhum dos ligantes assim como o complexo de platina precursor foram mutagênicos nas condições utilizadas neste estudo.

Tabela 16: Revertentes/placa, desvio padrão e índice mutagênico (entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* após tratamento com várias doses de Pt-rtd, Pt-mtn e Pt-atd com (+ S9) e sem (- S9) ativação metabólica.

Número de revertentes (M ± DP)/placa e IM								
	TA98		TA100		TA102		TA97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
DMSO	20 ± 4	21 ± 5	93 ± 3	106 ± 5	274 ± 36	270 ± 47	96 ± 13	112 ± 18
C+	654 ± 91 ^a	1221 ± 73 ^d	1458 ± 85 ^b	1132 ± 68 ^d	1982 ± 249 ^c	2359 ± 114 ^c	1518 ± 123 ^a	1442 ± 152 ^d
Pt-rtd (µg/placa)								
12,5	22 ± 6 (1.13)	22 ± 3 (1.05)	112 ± 11 (1.20)	121 ± 16 (1.15)	270 ± 29 (0.98)	267 ± 30 (0.99)	125 ± 4 (1.31)	128 ± 6 (1.14)
25	20 ± 0 (1.03)	26 ± 0 (1.27)	106 ± 6 (1.13)	107 ± 5 (1.01)	289 ± 32 (1.05)	222 ± 22 (0.82)	117 ± 18 (1.23)	116 ± 15 (1.04)
50	22 ± 3 (1.13)	26 ± 1 (1.24)	102 ± 18 (1.09)	110 ± 11 (1.04)	251 ± 18 (0.91)	232 ± 16 (0.86)	98 ± 5 (1.03)	123 ± 8 (1.09)
75	21 ± 3 (1.08)	24 ± 7 (1.17)	84 ± 4 (0.90)	124 ± 6 (1.17)	267 ± 47 (0.97)	235 ± 15 (0.87)	93 ± 1 (0.97)	143 ± 12 (1.28)
100	22 ± 1 (1.13)	24 ± 2 (1.15)	74 ± 8 (0.80)	96 ± 4 (0.91)	268 ± 20 (0.98)	228 ± 15 (0.84)	88 ± 6 (0.92)	119 ± 10 (1.06)
Pt-mtn (µg/placa)								
3,12	83 ± 13** (4.23)	64 ± 10** (3.12)	128 ± 21 (1.38)	144 ± 15 (1.36)	253 ± 36 (0.92)	264 ± 49 (0.98)	376 ± 28** (3.93)	303 ± 36** (2.71)
6,25	60 ± 8** (3.08)	75 ± 30** (3.66)	116 ± 16 (1.24)	159 ± 22* (1.50)	312 ± 41 (1.14)	232 ± 26 (0.86)	340 ± 13** (3.56)	273 ± 20** (2.43)
12,5	70 ± 4** (3.59)	63 ± 21** (3.07)	127 ± 11 (1.37)	147 ± 8 (1.39)	322 ± 26 (1.17)	259 ± 40 (0.96)	367 ± 24** (3.84)	327 ± 33** (2.92)
25	77 ± 9** (3.92)	111 ± 17** (5.41)	138 ± 28 (1.48)	185 ± 16* (1.75)	356 ± 31 (1.30)	230 ± 33 (0.85)	235 ± 18** (2.46)	259 ± 15** (2.31)
50	99 ± 5** (5.05)	132 ± 22** (6.44)	124 ± 14 (1.33)	211 ± 24** (2.00)	338 ± 49 (1.23)	212 ± 25 (0.79)	198 ± 25** (2.07)	234 ± 17** (2.09)
Pt-atd (µg/placa)								
3,12	43 ± 3** (2.21)	49 ± 4** (2.39)	79 ± 2 (0.85)	124 ± 18 (1.18)	253 ± 36 (0.92)	280 ± 19 (1.04)	216 ± 31** (2.26)	280 ± 14** (2.50)
6,25	76 ± 18** (3.87)	46 ± 14** (2.24)	84 ± 14 (0.90)	118 ± 15 (1.11)	312 ± 41 (1.14)	245 ± 22 (0.91)	233 ± 42** (2.43)	294 ± 27** (2.63)
12,5	73 ± 9** (3.74)	52 ± 6** (2.54)	108 ± 9 (1.16)	157 ± 9 (1.48)	322 ± 26 (1.17)	283 ± 21 (1.05)	206 ± 26** (2.16)	247 ± 13** (2.21)
25	82 ± 4** (4.18)	46 ± 6** (2.22)	92 ± 5 (0.99)	154 ± 11 (1.45)	356 ± 31 (1.30)	261 ± 31 (0.97)	260 ± 13** (2.72)	327 ± 18** (2.92)
50	95 ± 15** (4.87)	68 ± 12** (3.32)	78 ± 12 (0.84)	125 ± 4 (1.18)	338 ± 49 (1.23)	279 ± 28 (1.03)	253 ± 29** (2.65)	237 ± 20** (2.12)

* $p < 0,05$ (ANOVA); ** $p < 0,01$ (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão ; IM = índice mutagênico; Controle negativo/Solvente: dimetilsulfóxido (DMSO - 100 µL/placa); C+ = Controle positivo: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (TA98 e TA97a, 10,0 µg/placa); ^bazida de sódio (TA100, 1,25 µg/placa); ^cmitomicina (TA102, 0,5 µg/placa), na ausência de S9 and ^d2-antramina (TA98, TA100, TA 97a, 1,25 µg/placa), ^e2-aminofluoreno (TA102, 10,0 µg/placa), na presença de S9. Valores entre parênteses (IM) ≥2 indicam mutagenicidade.

4.2.6. Estudos de interação com BSA por espectroscopia de fluorescência

Os espectros de supressão da fluorescência da proteína BSA com concentrações crescentes dos complexos de Pt(II) são mostrados na Figura 34. De acordo com os resultados, a supressão da fluorescência de BSA na concentração mais alta avaliada dos complexos Pt-atd, Pt-rtd e Pt-mtn ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) corresponde a 21%, 53% e 28% do máximo intensidade de emissão de fluorescência, respectivamente, enquanto o *cis*-[PtCl₂(DMSO)₂] apresentou supressão da fluorescência de 14%. Os ligantes atdH, rtdH, mtnH e o solvente DMSO não apresentaram supressão significativa na fluorescência. Uma comparação entre os valores de K_{sv} e K_b dos complexos de Pt(II), bem como a porcentagem de supressão na intensidade de fluorescência inicial da BSA é mostrada na Tabela 17.

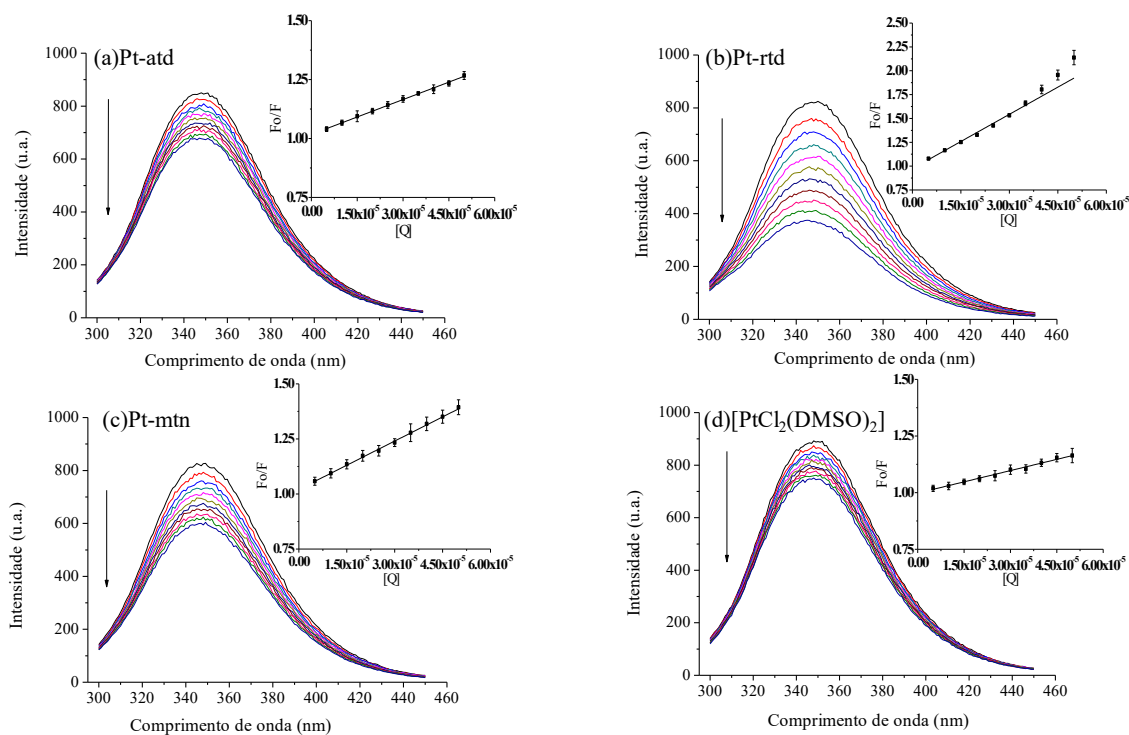


Figura 34: Espectros da supressão de fluorescência de BSA por (a) Pt-atd, (b)Pt-rtd, (c)Pt-mtn e (d) *cis*-[PtCl₂(DMSO)₂].

Tabela 17: Constante Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b) e porcentagem de redução na intensidade de fluorescência para a interação dos compostos com BSA.

Complexos	K_{sv} ($L \cdot mol^{-1}$)	K_b ($L \cdot mol^{-1}$)	Supressão (%)
Pt-atd	$(4.93 \pm 0.07) \times 10^3$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^3$	21
Pt-rtd	$(1.89 \pm 0.07) \times 10^4$	$(7.3 \pm 3.4) \times 10^4$	53
Pt-mtn	$(7.3 \pm 0.1) \times 10^3$	$(2.5 \pm 0.8) \times 10^3$	28
$[PtCl_2(DMSO)_2]$	$(3.3 \pm 0.1) \times 10^3$	$(8.6 \pm 4.7) \times 10^3$	14

Fortes interações fármaco-albumina frequentemente mostram constantes de ligação variando de 10^5 a 10^6 $L \cdot mol^{-1}$ [108,109], o que significa que os complexos de Pt(II) não interagem muito fortemente com BSA, mas podem ter uma constante de ligação mais alta do que a cisplatina. A constante de ligação geral para cisplatina-HSA (albumina de soro humano) é estimada em $8,52 \times 10^2$ $L \cdot mol^{-1}$ [110], embora HSA seja diferente de BSA. Além disso, o complexo Pt-rtd mostrou um valor de K_b na mesma ordem de magnitude que o encontrado para outro agente antineoplásico (cloridrato de gencitabina - GEM) com BSA [111].

4.2.7. Estudo de interação com DNA por eletroforese em gel de agarose

Os complexos de Pt(II) são conhecidos por se ligarem ao DNA. A avaliação da interação de DNA dos complexos de Pt(II) e ligantes foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose usando o plasmídeo pGEX-4T1 como DNA modelo (Figura 35).

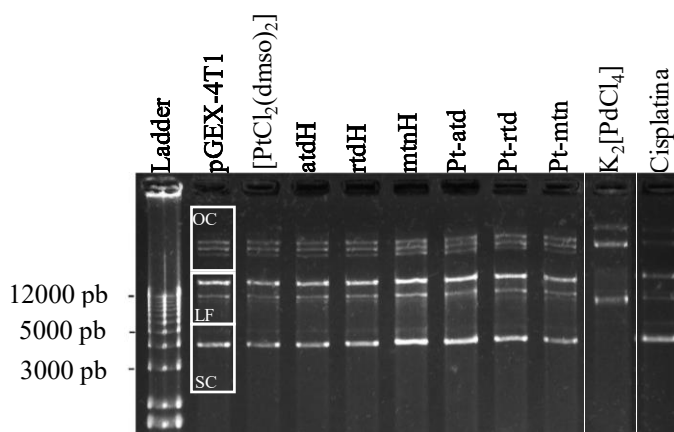


Figura 35: Eletroforese em gel de agarose para DNA plasmidial pGEX-4T1 na presença dos compostos na concentração de $80 \mu mol \cdot L^{-1}$.

Conforme já apresentado quando da análise dos complexos de prata, o perfil eletroforético do plasmídeo exibe as três seguintes formas: forma circular aberta (OC = Open-circular), forma linear (LF = linear form) e forma superenovelada (SC = super coiled form) [94,95,112,113]. O $[K_2PdCl_4]$ e a cisplatina foram usados como controles positivos por serem capazes de causar alteração na mobilidade eletroforética das bandas de DNA do plasmídeo. Nas condições experimentais, os compostos testados não apresentaram evidências de interação com o DNA.

4.2.8. *Estudo de interação com DNA por dicroísmo circular*

Para melhor avaliar o potencial de interação dos complexos ao DNA, a espectroscopia de dicroísmo circular (DC) foi usada para identificar modificações estruturais na estrutura tridimensional de um CT-DNA de dupla hélice. O espectro de CD do CT-DNA (Figura 36) apresenta duas bandas: uma banda negativa próxima a 247 nm que está relacionada à helicidade do DNA e uma banda positiva a 275 nm atribuída às características de empilhamento de bases da forma B-DNA [114,115]. Os espectros de DC de CT-DNA na presença dos ligantes nas relações ligante/DNA (r) 0,1, 0,3 e 0,5 não revelaram alterações significativas na estrutura do DNA (Figura 36) [114,116]. No entanto, resultados diferentes são observados em a presença dos complexos (Figura 37), mostrando evidências de interação semelhantes aos efeitos da cisplatina na forma B-DNA [117]. Os efeitos da ligação da cisplatina são caracterizados por um deslocamento batocrômico das duas bandas, uma diminuição na banda negativa em 245 nm e um aumento na intensidade da banda positiva em 275 nm para razões molares inferiores (r), seguido por uma diminuição da mesma banda em valores de r maiores. Os efeitos são mais evidentes nos espectros de DC de DNA com Pt-atd e Pt-rtd (Figura 37(a) e (b)), sugerindo algum grau de interação covalente dos complexos com DNA. Os desvios batocrômicos das bandas em 275 nm foram da ordem de 4 a 6 nm para todo o complexo, enquanto os desvios na banda negativa (247 nm) foram de no máximo 2 nm. Para a amostra com *cis*- $[PtCl_2(DMSO)_2]$, a diminuição da intensidade da banda negativa é muito pronunciada, sugerindo uma alteração de helicidade mais forte em comparação aos outros três complexos [13,115,118–121].

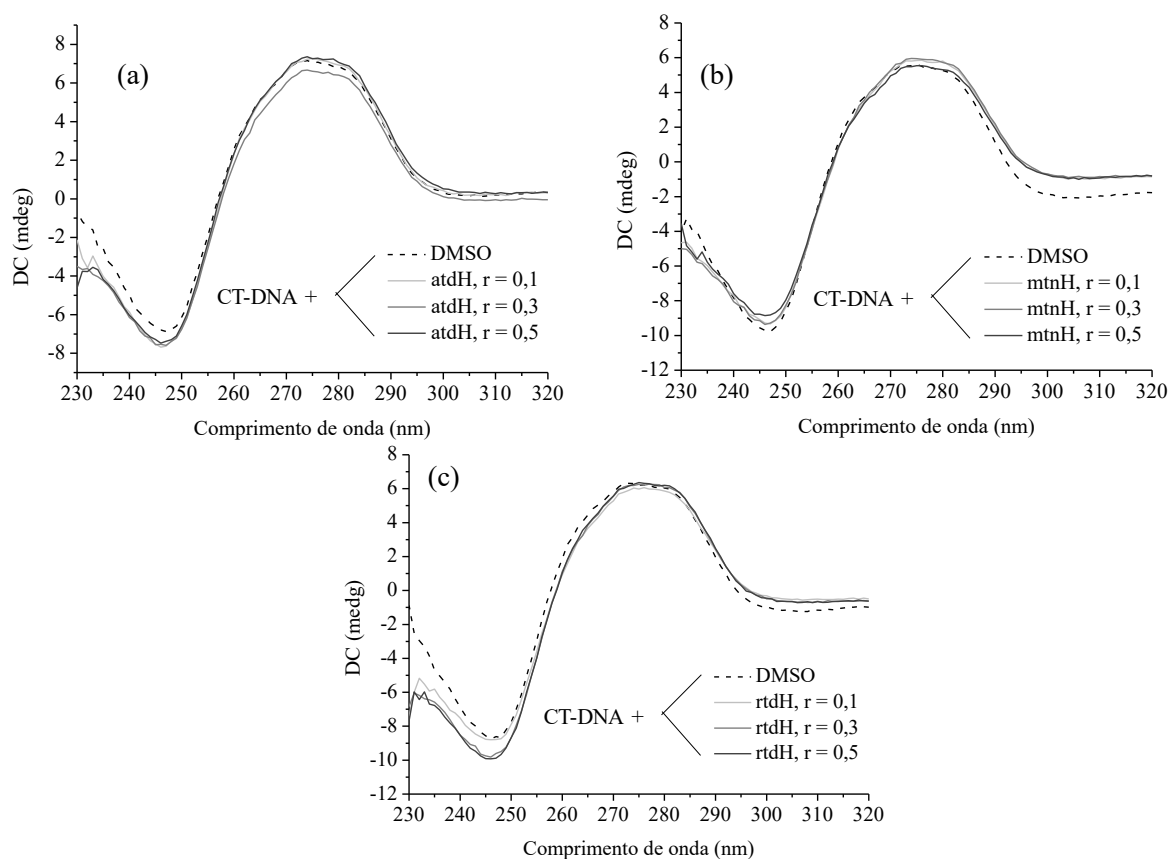


Figura 36: Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão fosfato e 1% de DMSO, linhas tracejadas) na presença de (a) atdH, (b) mtnH e (c) rtdH nas razões molares $r = 0,1, 0,3$ e $0,5$ (cinza claro, cinza e cinza escuro, respectivamente).

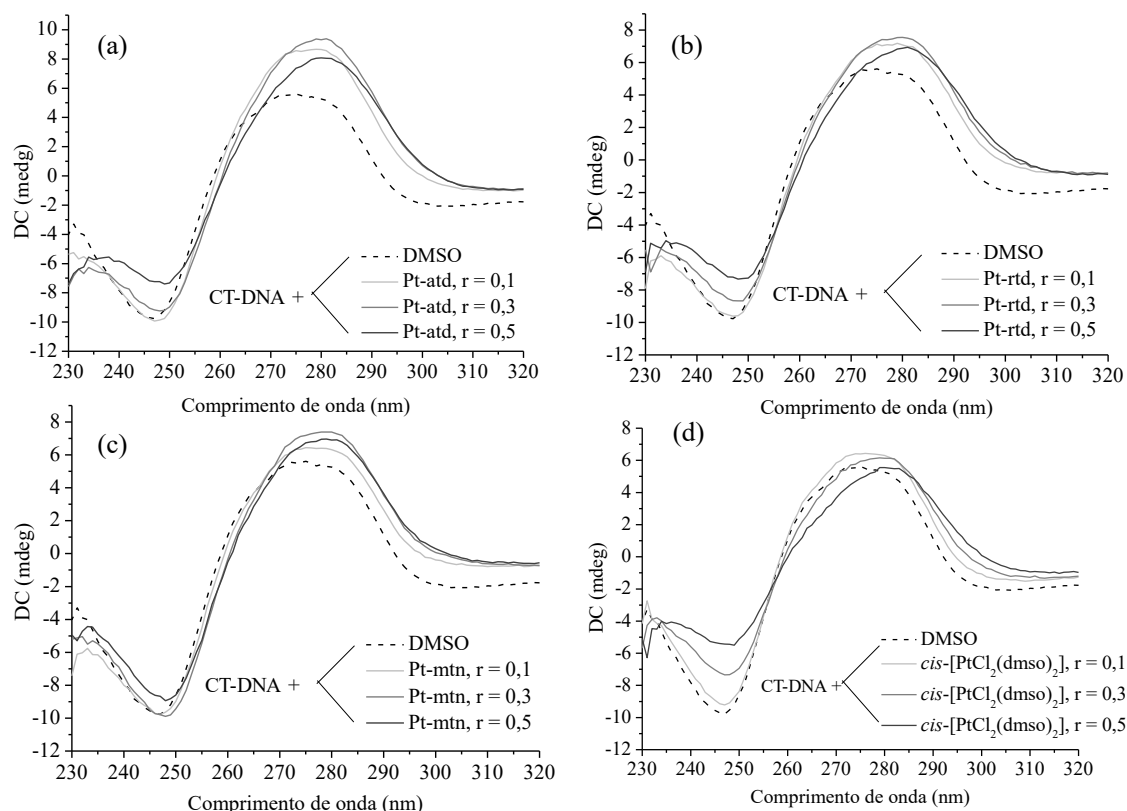


Figura 37: Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão fosfato e 1% de DMSO, linhas tracejadas) na presença de (a) Pt-atd, (b) Pt-rtd, (c) Pt-mtn e (d) $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ nas razões molares $r = 0,1, 0,3$ e $0,5$ (cinza claro, cinza e cinza escuro, respectivamente).

4.3. Cloridrato de memantina: Reposicionamento de fármaco

O cloridrato de memantina, utilizado clinicamente por ser um agente antineurodegenerativo, foi avaliado quanto ao seu potencial anti-CHIKV. Foi realizado um ensaio de dose-resposta para determinar a concentração de citotoxicidade de 50% (CC_{50}) e a concentração antiviral eficaz de 50% (EC_{50}). Para isso, as células BHK-21 foram infectadas com CHIKV-*nanoluc* e simultaneamente tratadas com mtnH em concentrações que variam de 500 a $1,45 \mu\text{mol L}^{-1}$, e a replicação viral foi avaliada 16h pós-infecção (hpi). Paralelamente, a viabilidade celular foi avaliada por um ensaio MTT. Os resultados obtidos estão representados na Figura 38.

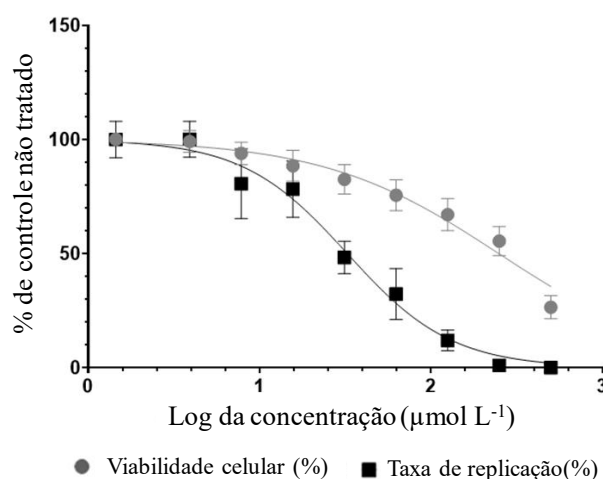


Figura 38: Porcentagem de replicação de CHIKV (quadrado fechado) e a viabilidade celular (círculo fechado) de células BHK-21 infectadas com CHIKV-*nanoluc* na presença ou ausência de mtnH* com concentrações variando de 500 a 1,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$. *Os resultados são apresentados como uma análise de regressão não linear, indicando as porcentagens de viabilidade celular ou replicação viral por mtnH. São apresentados os valores médios $\pm$ DP de três experiências independentes, cada uma medida em triplicata. A comparação de cada curva foi realizada por meio do teste F (nível de confiança de 95%), resultando em $p < 0,0001$, e $F_{2,116} = 260,5$.

A partir desta faixa de concentrações, foi determinado que mtnH tem CC_{50} de $248,4 \pm 31,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ e EC_{50} de $32,4 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($p < 0,0001$, $F_{2,116} = 260,5$). O índice de seletividade (IS) calculado é 7,67. Esses resultados sugerem mtnH como uma alternativa potencial para o futuro tratamento da infecção por CHIKV. Apesar do valor de IS relativamente modesto em comparação com outros fármacos, o mtnH tem um esquema de dosagem de 20 mg por dia para o tratamento de Doença de Alzheimer leve a severa [122], sem efeitos adversos graves. Pode-se sugerir que a ausência de efeitos adversos *in vivo* pode, portanto, superar o modesto IS *in vitro* em termos de significado terapêutico. Porém, é importante ressaltar que a concentração efetiva para o tratamento de animais e/ou indivíduos infectados deve ser melhor avaliada. Além disso, valores de IS maiores que 1,0 sugerem um benefício positivo para o potencial medicamento antiviral [123]. Por ser um medicamento aprovado mundialmente e de custo relativamente baixo, com um perfil terapêutico bem estabelecido tanto em termos de seus resultados biológicos (atividade dose-resposta e potenciais efeitos adversos), bem como seus aspectos físico-químicos e propriedades farmacocinéticas [124], é possível hipotetizar que mtnH pode resultar em um custo e caminho reduzidos nos ensaios clínicos, com um potencial considerável para ser capitalizado como um medicamento antiviral sobre o CHIKV.

5. Considerações finais

Complexos de prata(I) com amantadina, memantina de fórmula de coordenação $[\text{Ag}(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N})_2]\text{NO}_3$ $[\text{Ag}(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e complexos de platina(II) com amantadina, rimantadina e memantina de fórmula $[\text{PtCl}_2(\text{Ligante})(\text{DMSO})]$ foram obtidos e suas composições foram determinadas por análises químicas e espectroscópicas. As estruturas dos complexos foram resolvidas por difração de raios X de monocristais, em que cada molécula do ligante se coordena ao íon metálico pelo átomo de nitrogênio do grupo NH_2 .

Para os compostos de Ag(I): Estudos cinéticos por RMN de ^1H mostraram estabilidade dos compostos em DMSO por até 24 h. Os complexos exibiram atividade antibacteriana sobre cepas Gram-positivas e Gram-negativas com valores de CIM na ordem de micromolar e apresentaram atividade anti-*M.tuberculosis* promissora e potencial anti-CHIKV satisfatório. Estudos de espectroscopia de fluorescência revelaram fraca interação dos compostos com BSA com supressão de 13% e 15% na fluorescência da proteína. O ensaio de eletroforese em gel de agarose mostrou que os complexos não interagem covalentemente com o DNA, mas experimentos de ligação competitiva mostraram que interações eletrostáticas e com os sulcos do DNA podem ocorrer.

Para os complexos de Pt(II): Estudos cinéticos por RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ mostraram que o dmsco coordenado ao íon metálico com o tempo é completamente substituído por $\text{DMSO-}d_6$ com ordem de labilidade de $\text{Pt-rtd} > \text{Pt-mtn} \gg \text{Pt-atd}$. Os complexos de Pt(II) apresentaram uma certa seletividade por cepas bacterianas Gram-positivas, sendo o complexo Pt-mtn o mais promissor nesse estudo com valores de $\text{CIM} = 0,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ para *S. aureus* e $\text{CIM} = \leq 0,14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ para *B. cereus* e *E. coli*. Os complexos de Pt(II) não apresentaram atividade anti-*M.tuberculosis* e apenas o complexo Pt-rtd não apresentou potencial mutagênico. Os compostos também reduziram a viabilidade celular nos ensaios anti-CHIKV. Ensaio de espectroscopia de dicroísmo circular revelaram interações dos complexos de Pt(II) com DNA, enquanto estudos de fluorescência de interação com albumina de soro bovino revelaram supressão da fluorescência das proteínas por interação com os complexos de Pt(II), especialmente para o complexo de Pt-rtd.

Por fim, o ligante mtnH mostrou um excelente percentual de inibição da infecção por CHIKV, sendo possível considerá-lo um candidato viável a ser reposicionado como um fármaco anti-CHIKV.

Referências

- [1] H.M.T. Barros, 1968 a 2008: 40 anos de história recente dos medicamentos, in: Páginas Da História Da Med., 2010: p. 54.
- [2] World Health Organization - Global Tuberculosis Report 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>>.
- [3] M.V.N. De Souza, T.R.A. Vasconcelos, Fármacos no combate à tuberculose: Passado, presente e futuro, *Quim. Nova.* 28 (2005) 678–682. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400022>.
- [4] A.D. Khosravi, N. Etemad, M. Hashemzadeh, S. Khandan Dezfuli, H. Goodarzi, Frequency of rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iranian patients, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 9 (2017) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.005>.
- [5] K. Ramsauer, F. Tangy, Chikungunya Virus Vaccines: Viral Vector–Based Approaches: Table 1., *J. Infect. Dis.* 214 (2016) S500–S505. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw369>.
- [6] M.R.T. Nunes, N.R. Faria, J.M. de Vasconcelos, N. Golding, M.U. Kraemer, L.F. de Oliveira, R. do S. da S. Azevedo, D.E.A. da Silva, E.V.P. da Silva, S.P. da Silva, V.L. Carvalho, G.E. Coelho, A.C.R. Cruz, S.G. Rodrigues, J.L. da Silva Gonçalves Vianez, B.T.D. Nunes, J.F. Cardoso, R.B. Tesh, S.I. Hay, O.G. Pybus, P.F. da Costa Vasconcelos, Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil, *BMC Med.* 13 (2015) 102. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>.
- [7] E.F. da Silva-Júnior, G.O. Leoncini, É.E.S. Rodrigues, T.M. Aquino, J.X. Araújo-Júnior, The medicinal chemistry of Chikungunya virus, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 4219–4244. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.049>.
- [8] N. Farrell, Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00100-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00100-5).
- [9] B.Đ. Glišić, M.I. Djuran, Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure., *Dalton Trans.* 43 (2014) 5950–69. <https://doi.org/10.1039/c4dt00022f>.
- [10] G. Duarte de Souza, M. Aparecida Rodrigues, P. Pereira Silva Wendell Guerra, Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações / Silver: Brief history, properties and

- applications, *Educ. Quím.* 24 (2013) 14–16. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)73189-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)73189-6).
- [11] M.I. Azócar, G. Gómez, P. Levín, M. Paez, H. Muñoz, N. Dinamarca, Review: Antibacterial behavior of carboxylate silver(I) complexes, *J. Coord. Chem.* 67 (2014) 3840–3853. <https://doi.org/10.1080/00958972.2014.974582>.
- [12] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- [13] C.M. Manzano, F.R.G. Bergamini, W.R. Lustri, A.L.T.G. Ruiz, E.C.S. de Oliveira, M.A. Ribeiro, A.L.B. Formiga, P.P. Corbi, Pt(II) and Pd(II) complexes with ibuprofen hydrazide: Characterization, theoretical calculations, antibacterial and antitumor assays and studies of interaction with CT-DNA, *J. Mol. Struct.* 1154 (2018) 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.10.072>.
- [14] S. Rubino, R. Busà, A. Attanzio, R. Alduina, V. Di Stefano, M.A. Girasolo, S. Orecchio, L. Tesoriere, Synthesis, properties, antitumor and antibacterial activity of new Pt(II) and Pd(II) complexes with 2,2'-dithiobis(benzothiazole) ligand, *Bioorganic Med. Chem.* 25 (2017) 2378–2386. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.067>.
- [15] N. Shahabadi, S. Hashempour, A. (Arman) Taherpour, F. Mohsenzadeh, Synthesis, characterization, HSA interaction, and antibacterial activity of a new water-soluble Pt(II) complex containing the drug cephalixin, *J. Coord. Chem.* 71 (2018) 3708–3730. <https://doi.org/10.1080/00958972.2018.1525488>.
- [16] M.T. Ghaneian, M. Tabatabaee, M.H. Ehrampoush, A. Jebali, S. Hekmatimoghaddam, H. Fallahzadeh, R.A. Fallahzadeh, Synthesis of Ag(I) and Cu(I) Complexes with 4-Amino-5-Methyl-2h-1,2,4-Triazole-3(4h)-Thione Ligand as Thiocarbohydrazide Derivatives and their Antimicrobial Activity, *Pharm. Chem. J.* 49 (2015) 210–212. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1258-0>.
- [17] T.S. Macedo, W. Villarreal, C.C. Couto, D.R.M. Moreira, M. Navarro, M. Machado, M. Prudêncio, A.A. Batista, M.B.P. Soares, Platinum(ii)–chloroquine complexes are antimalarial agents against blood and liver stages by impairing mitochondrial function, *Metallomics*. 9 (2017) 1548–1561. <https://doi.org/10.1039/C7MT00196G>.
- [18] N. Margiotta, A. Bergamo, G. Sava, G. Padovano, E. de Clercq, G. Natile, Antiviral properties and cytotoxic activity of platinum(II) complexes with 1,10-phenanthrolines

- and acyclovir or penciclovir, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1385–1390. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.04.018>.
- [19] N.D. Savić, S. Vojnovic, B.Đ. Glišić, A. Crochet, A. Pavic, G. V. Janjić, M. Pekmezović, I.M. Opsenica, K.M. Fromm, J. Nikodinovic-Runic, M.I. Djuran, Mononuclear silver(I) complexes with 1,7-phenanthroline as potent inhibitors of *Candida* growth, *Eur. J. Med. Chem.* 156 (2018) 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.049>.
- [20] A. Spinello, R. Bonsignore, G. Barone, B. K. Keppler, A. Terenzi, Metal Ions and Metal Complexes in Alzheimer's Disease, *Curr. Pharm. Des.* 22 (2016) 3996–4010. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160520115248>.
- [21] J.C. Garcia, J.F. Justo, W.V.M. Machado, L.V.C. Assali, Structural, Electronic, and Vibrational Properties of Amino-adamantane and Rimantadine Isomers, *J. Phys. Chem. A.* 114 (2010) 11977–11983. <https://doi.org/10.1021/jp107496b>.
- [22] B.J. Mair, M. Shamaingar, N.C. Krouskop, F.D. Rossini, Isolation of Adamantane from Petroleum, *Anal. Chem.* 31 (1959) 2082–2083. <https://doi.org/10.1021/ac60156a063>.
- [23] R.A. Bright, D.K. Shay, B. Shu, N.J. Cox, A.I. Klimov, Adamantane Resistance Among Influenza A Viruses Isolated Early During the 2005-2006 Influenza Season in the United States, *JAMA.* 295 (2006) 891. <https://doi.org/10.1001/jama.295.8.joc60020>.
- [24] C. Scholtissek, G. Quack, H.D. Klenk, R.G. Webster, How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives., *Antiviral Res.* 37 (1998) 83–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588841>.
- [25] J. Folch, O. Busquets, M. Ettcheto, E. Sánchez-López, R.D. Castro-Torres, E. Verdaguer, M.L. Garcia, J. Olloquequi, G. Casadesús, C. Beas-Zarate, C. Pelegri, J. Vilaplana, C. Auladell, A. Camins, Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications, *J. Alzheimer's Dis.* 62 (2018) 1223–1240. <https://doi.org/10.3233/JAD-170672>.
- [26] K. Spilovska, F. Zemek, J. Korabecny, E. Nepovimova, O. Soukup, M. Windisch, K. Kuca, Adamantane – A Lead Structure for Drugs in Clinical Practice, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 3245–3266. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160525114026>.
- [27] J.-P. Jourdan, R. Bureau, C. Rochais, P. Dallemagne, Drug repositioning: a brief overview, *J. Pharm. Pharmacol.* 72 (2020) 1145–1151. <https://doi.org/10.1111/jphp.13273>.

- [28] J.A. DiMasi, H.G. Grabowski, R.W. Hansen, Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs, *J. Health Econ.* 47 (2016) 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>.
- [29] G.F. Wilkinson, K. Pritchard, In Vitro Screening for Drug Repositioning, *J. Biomol. Screen.* 20 (2015) 167–179. <https://doi.org/10.1177/1087057114563024>.
- [30] D. Parisi, M.F. Adasme, A. Sveshnikova, S.N. Bolz, Y. Moreau, M. Schroeder, Drug repositioning or target repositioning: A structural perspective of drug-target-indication relationship for available repurposed drugs, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18 (2020) 1043–1055. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.04.004>.
- [31] B. Padhy, Y. Gupta, Drug repositioning: Re-investigating existing drugs for new therapeutic indications, *J. Postgrad. Med.* 57 (2011) 153. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.81870>.
- [32] N. Cimolai, Potentially repurposing adamantanes for COVID-19, *J. Med. Virol.* 92 (2020) 531–532. <https://doi.org/10.1002/jmv.25752>.
- [33] G. Albayrak, F.D. Korkmaz, Alzheimer’s drug Memantine inhibits metastasis and p-Erk protein expression on 4T1 breast cancer cells, *Bratislava Med. J.* 121 (2020) 499–503. https://doi.org/10.4149/BLL_2020_082.
- [34] G. Albayrak, E. Konac, A. Dikmen, C. Bilen, Memantine induces apoptosis and inhibits cell cycle progression in LNCaP prostate cancer cells, *Hum. Exp. Toxicol.* 37 (2018) 953–958. <https://doi.org/10.1177/0960327117747025>.
- [35] J.-Y. Yu, B. Zhang, L. Peng, C.-H. Wu, H. Cao, J.F. Zhong, J. Hoffman, S.-H. Huang, Repositioning of Memantine as a Potential Novel Therapeutic Agent against Meningitic *E. coli*–Induced Pathogenicities through Disease-Associated Alpha7 Cholinergic Pathway and RNA Sequencing-Based Transcriptome Analysis of Host Inflammatory Responses, *PLoS One.* 10 (2015) e0121911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121911>.
- [36] F.S. Damasceno, M.J. Barisón, E.M.F. Pral, L.S. Paes, A.M. Silber, Memantine, an Antagonist of the NMDA Glutamate Receptor, Affects Cell Proliferation, Differentiation and the Intracellular Cycle and Induces Apoptosis in *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) e2717. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002717>.
- [37] H.F. Santos Souza, S.C. Rocha, F.S. Damasceno, L.N. Rapado, E.M.F. Pral, C.R.F. Marinho, A.M. Silber, The effect of memantine, an antagonist of the NMDA glutamate

- receptor, in in vitro and in vivo infections by *Trypanosoma cruzi*, PLoS Negl. Trop. Dis. 13 (2019) e0007226. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007226>.
- [38] G.M. Sheldrick, SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination, *Acta Crystallogr. A* 71 (2015) 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
- [39] G.M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- [40] O. V. Dolomanov, L.J. Bourhis, R.J. Gildea, J.A.K. Howard, H. Puschmann, *OLEX2* : a complete structure solution, refinement and analysis program, *J. Appl. Crystallogr.* 42 (2009) 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- [41] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P.A. Wood, Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures , *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 466–470. <https://doi.org/10.1107/s0021889807067908>.
- [42] C.R. Groom, I.J. Bruno, M.P. Lightfoot, S.C. Ward, The Cambridge Structural Database, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* 72 (2016) 171–179. <https://doi.org/10.1107/S2052520616003954>.
- [43] I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, IUCr, New software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* 58 (2002) 389–397. <https://doi.org/10.1107/S0108768102003324>.
- [44] Bruker SAINT; Bruker AXS, Bruker SAINT; Bruker AXS, (2010).
- [45] U. Bruker SADABS; Bruker AXS Inc.: Madison, Wisconsin, [, (2010).
- [46] G.M. Sheldrick, SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* 71 (2015) 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
- [47] J. Chai, M. Head-gordon, Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom – atom dispersion corrections, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 6615–6620. <https://doi.org/10.1039/b810189b>.
- [48] R. Ditchfield, W.J. Hehre, J.A. Pople, Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules, *J. Chem. Phys.* 54 (1971) 724–728. <https://doi.org/10.1063/1.1674902>.

- [49] W.J. Hehre, R. Ditchfield, J.A. Pople, Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules, *J. Chem. Phys.* 56 (1972) 2257–2261. <https://doi.org/10.1063/1.1677527>.
- [50] P.C. Hariharan, J.A. Pople, The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies, *Theor. Chim. Acta.* 28 (1973) 213–222. <https://doi.org/10.1007/BF00533485>.
- [51] P.J. Hay, W.R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 270–283. <https://doi.org/10.1063/1.448799>.
- [52] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, B.E.K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.J. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, D. 0109, Revision D. 01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
- [53] M.J. Frisch, M. Head-Gordon, J.A. Pople, A direct MP2 gradient method, *Chem. Phys. Lett.* 166 (1990) 275–280. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(90\)80029-D](https://doi.org/10.1016/0009-2614(90)80029-D).
- [54] M.J. Frisch, M. Head-Gordon, J.A. Pople, Semi-direct algorithms for the MP2 energy and gradient, *Chem. Phys. Lett.* 166 (1990) 281–289. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(90\)80030-H](https://doi.org/10.1016/0009-2614(90)80030-H).
- [55] M. Head-Gordon, J.A. Pople, M.J. Frisch, MP2 energy evaluation by direct methods, *Chem. Phys. Lett.* 153 (1988) 503–506. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(88\)85250-3](https://doi.org/10.1016/0009-2614(88)85250-3).
- [56] M. Head-Gordon, T. Head-Gordon, Analytic MP2 frequencies without fifth-order storage. Theory and application to bifurcated hydrogen bonds in the water hexamer, *Chem. Phys. Lett.* 220 (1994) 122–128. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(94\)00116-2](https://doi.org/10.1016/0009-2614(94)00116-2).

- [57] S. Sæbø, J. Almlöf, Avoiding the integral storage bottleneck in LCAO calculations of electron correlation, *Chem. Phys. Lett.* 154 (1989) 83–89. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(89\)87442-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(89)87442-1).
- [58] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
- [59] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B.* 37 (1988) 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- [60] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200–1211. <https://doi.org/10.1139/p80-159>.
- [61] Dennington, R., Keith, T. and Millam, J. Gauss View, Version 5. Semichem Inc., Shawnee Mission.
- [62] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th ed, Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.
- [63] J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2720–2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>.
- [64] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 113 (1983) 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- [65] L. Bernstein, J. Kaldor, J. McCann, M.C. Pike, An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 97 (1982) 267–281. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(82\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(82)90026-7).
- [66] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 455 (2000) 29–60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6).
- [67] R. Matkovic, E. Bernard, S. Fontanel, P. Eldin, N. Chazal, D. Hassan Hersi, A. Merits, J.-M. Péloponèse, L. Briant, The Host DHX9 DExH-Box Helicase Is Recruited to

- Chikungunya Virus Replication Complexes for Optimal Genomic RNA Translation, *J. Virol.* 93 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.01764-18>.
- [68] L. Pohjala, A. Utt, M. Varjak, A. Lulla, A. Merits, T. Ahola, P. Tammela, Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays., *PLoS One.* 6 (2011) e28923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028923>.
- [69] D.L. Burleson, F. G., Chambers, T. M., Wiedbrauk, Plaque assays, in: Elsevier (Ed.), *Virol. a Lab. Man.*, San Diego, 1992: pp. 74–84.
- [70] V. Kondaparthi, A. Shaik, K.B. Reddy, D. Das Manwal, Studies on interaction of vanadium metal complexes with bovine serum albumin - Fluoremetric and UV–visible spectrophotometric studies, *Chem. Data Collect.* 20 (2019) 100203. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2019.100203>.
- [71] X. Jin, Y. Yang, Y. Jiang, X. Han, X. Wan, D. Liu, X. Song, X. Chang, Synthesis, characterization and interaction with bovine serum albumin of cyclometallated Pd(II) complexes containing arylimine and salicylalimine co-ligands, *J. Organomet. Chem.* 791 (2015) 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.04.050>.
- [72] D. Sun, F.-J. Liu, R.-B. Huang, L.-S. Zheng, Structural diversity of Ag/3-nitrophthalate coordination polymers controlled by solvent and induction agent, *CrystEngComm.* 15 (2013) 1185–1193. <https://doi.org/10.1039/C2CE26659H>.
- [73] Z.P. Deng, L.H. Huo, M.S. Li, L.W. Zhang, Z.B. Zhu, H. Zhao, S. Gao, Syntheses, structures, and luminescent properties of silver(I) complexes constructed from ortho - hydroxyl arenesulfonic acids, *Cryst. Growth Des.* 11 (2011) 3090–3100. <https://doi.org/10.1021/cg200360e>.
- [74] J. Jimenez, I. Chakraborty, M. Rojas-Andrade, P.K. Mascharak, Silver complexes of ligands derived from adamantylamines: Water-soluble silver-donating compounds with antibacterial properties, *J. Inorg. Biochem.* 168 (2017) 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.12.009>.
- [75] J. Jimenez, I. Chakraborty, A.M. Del Cid, P.K. Mascharak, Five- and Six-Coordinated Silver(I) Complexes Derived from 2,6-(Pyridyl)iminodiadamantanes: Sustained Release of Bioactive Silver toward Bacterial Eradication, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 4784–4787. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00621>.

- [76] S.F. Sucena, R.E.F. Paiva, C. Abbehausen, I.B. Mattos, M. Lancellotti, A.L.B. Formiga, P.P. Corbi, Chemical, spectroscopic characterization, DFT studies and antibacterial activities in vitro of a new gold(I) complex with rimantadine, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 89 (2012) 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.12.043>.
- [77] S.O. Podunavac-kuzmanovi, D.M. Cvetkovi, L.S. Vojinovi, Synthesis, physico-chemical characterization and biological activity of 2-aminobenzimidazole complexes with different metal ions, 280 (2004) 239–246.
- [78] Y.S. Mary, H.T. Varghese, C.Y. Panicker, T. Ertan, I. Yildiz, O. Temiz-Arpaci, Vibrational spectroscopic studies and ab initio calculations of 5-nitro-2-(p-fluorophenyl)benzoxazole, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 71 (2008) 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.12.041>.
- [79] D. Jeremic, M. Djordjevic, S. Miletic, L. Andjelkovic, D. Sladic, I. Brceski, Novel silver(I) compounds with 1-adamantanamine, *J. Serbian Chem. Soc.* 83 (2018) 699–705. <https://doi.org/10.2298/JSC171114041J>.
- [80] M. Sheikhi, S. Shahab, M. Khaleghian, F.H. Hajikolaee, I. Balakhanava, R. Alnajjar, Adsorption properties of the molecule resveratrol on CNT(8,0-10) nanotube: Geometry optimization, molecular structure, spectroscopic (NMR, UV/Vis, excited state), FMO, MEP and HOMO-LUMO investigations, *J. Mol. Struct.* 1160 (2018) 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.01.005>.
- [81] M. Sheikhi, S. Shahab, M. Khaleghian, R. Kumar, Interaction Between New Anti-cancer Drug Syndros and CNT(6,6-6) Nanotube for Medical Applications: Geometry Optimization, Molecular Structure, Spectroscopic (NMR, UV/Vis, Excited state), FMO, MEP and HOMO-LUMO Investigation, *Appl. Surf. Sci.* 434 (2018) 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.10.154>.
- [82] D.H. Pereira, F.A. La Porta, R.T. Santiago, D.R. Garcia, T.C. Ramalho, New Perspectives on the Role of Frontier Molecular Orbitals in the Study of Chemical Reactivity: A Review, *Rev. Virtual Química.* 8 (2016) 425–453. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160032>.
- [83] H. Fujimoto, Y. Mizutani, K. Iwase, An aspect of substituents and peripheral structures in chemical reactivities of molecules, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 2768–2772. <https://doi.org/10.1021/j100403a042>.

- [84] H. Hirao, T. Ohwada, Theoretical Study of Reactivities in Electrophilic Aromatic Substitution Reactions: Reactive Hybrid Orbital Analysis, *J. Phys. Chem. A.* 107 (2003) 2875–2881. <https://doi.org/10.1021/jp027330l>.
- [85] R. Vianello, Z.B. Maksić, Triadic analysis of substituent effects—gas-phase acidity of para-substituted phenols, *Tetrahedron.* 62 (2006) 3402–3411. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.01.049>.
- [86] R.R. da Silva, J.M. Santos, T.C. Ramalho, J.D. Figueroa-Villar, Concerning the FERMO concept and Pearson's Hard and Soft acid-base principle, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 223–226. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000200002>.
- [87] M. Kumar, H. Li, X. Zhang, X.C. Zeng, J.S. Francisco, Nitric Acid–Amine Chemistry in the Gas Phase and at the Air–Water Interface, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 6456–6466. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b03300>.
- [88] B.S. Atiyeh, M. Costagliola, S.N. Hayek, S.A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, 33 (2007) 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.06.010>.
- [89] P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, R.R. Butorac, A.H. Cowley, N. Dharmaraj, Synthesis of novel heterobimetallic copper(i) hydrazone Schiff base complexes: A comparative study on the effect of heterocyclic hydrazides towards interaction with DNA/protein, free radical scavenging and cytotoxicity, *Metallomics.* 4 (2012) 498. <https://doi.org/10.1039/c2mt00004k>.
- [90] N. Biswas, S. Khanra, A. Sarkar, S. Bhattacharjee, D. Prasad Mandal, A. Chaudhuri, S. Chakraborty, C. Roy Choudhury, One new azido bridged dinuclear copper(II) thiosemicarbazide complex: synthesis, DNA/protein binding, molecular docking study and cytotoxicity activity, *New J. Chem.* 41 (2017) 12996–13011. <https://doi.org/10.1039/C7NJ01998J>.
- [91] N. Shahabadi, M. Maghsudi, Z. Ahmadipour, Study on the interaction of silver(I) complex with bovine serum albumin by spectroscopic techniques, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 92 (2012) 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.02.071>.
- [92] S. Parveen, S. Govindarajan, H. Puschmann, R. Revathi, Synthesis, crystal structure and biological studies of new hydrazone ligand, 2-(Methoxycarbonyl-hydrazono)-

- pentanedioic acid and its silver(I) complex, *Inorganica Chim. Acta.* 477 (2018) 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.02.022>.
- [93] X. Zhao, R. Liu, Y. Teng, X. Liu, The interaction between Ag⁺ and bovine serum albumin: A spectroscopic investigation, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 892–897. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.004>.
- [94] M.J. Molloy, Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) e129–e129. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh124>.
- [95] M.S. Levy, Quantitation of supercoiled circular content in plasmid DNA solutions using a fluorescence-based method, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 57e – 57. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e57>.
- [96] A.C. Komor, J.K. Barton, The path for metal complexes to a DNA target, *Chem. Commun.* 49 (2013) 3617. <https://doi.org/10.1039/c3cc00177f>.
- [97] M.E. Bravo-Gómez, C. Campero-Peredo, D. García-Conde, M.J. Mosqueira-Santillán, J. Serment-Guerrero, L. Ruiz-Azuara, DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas®) and analysis of its biological meaning, *Polyhedron.* 102 (2015) 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.10.034>.
- [98] V. Censi, A.B. Caballero, M. Pérez-Hernández, V. Soto-Cerrato, L. Korrodi-Gregório, R. Pérez-Tomás, M.M. Dell’Anna, P. Mastorilli, P. Gamez, DNA-binding and in vitro cytotoxic activity of platinum(II) complexes of curcumin and caffeine, *J. Inorg. Biochem.* 198 (2019) 110749. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110749>.
- [99] C.R. Groom, I.J. Bruno, M.P. Lightfoot, S.C. Ward, The Cambridge Structural Database, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* 72 (2016) 171–179. <https://doi.org/10.1107/S2052520616003954>.
- [100] S. Podunavac-Kuzmanovic, D. Cvetkovic, L. Vojinovic, Synthesis, physico-chemical characterization and biological activity of 2-aminobenzimidazole complexes with different metal ions, *Acta Period. Technol.* 35 (2004) 239–246. <https://doi.org/10.2298/APT0435239P>.
- [101] P. Van Thong, D.T. Thom, N. Thi, T. Chi, Synthesis and structure of two platinum (II) complexes bearing N -heterocyclic carbene and dimethyl sulfoxide, 56 (2018) 146–151. <https://doi.org/10.1002/vjch.201800003>.

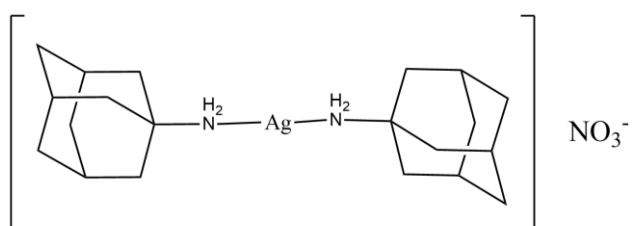
- [102] V.Y. Kukushkin, V.K. Belsky, V.E. Konovalov, G.A. Kirakosyan, L. V. Konovalov, A.I. Moiseev, V.M. Tkacbuk, cis-Influence determination of ethylene and benzyl cyanide ligands in the complexes cis-[Pt(Me₂SO)(C₂H₄)Cl₂] and cis-[Pt(Me₂SO)-(PhCH₂CN)Cl₂] on the basis of X-ray structure data. IR and ¹H, ¹³C and ¹⁹⁵Pt NMR characterization of the cis-, *Inorganica Chim. Acta.* 185 (1991) 143–154. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)85437-7](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)85437-7).
- [103] M. Jakubowski, I. Łakomska, J. Sitkowski, J. Wiśniewska, Dicarboxylato platinum(ii) complexes containing dimethyl sulfoxide and triazolopyrimidine as potential anticancer agents: Synthesis, structural and biological studies in solution, *New J. Chem.* 42 (2018) 8113–8122. <https://doi.org/10.1039/c8nj01199k>.
- [104] D.P. Bancroft, C.A. Lepre, S.J. Lippard, Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 6860–6871. <https://doi.org/10.1021/ja00175a020>.
- [105] H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *J. Org. Chem.* 62 (1997) 7512–7515. <https://doi.org/10.1021/jo971176v>.
- [106] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A.C. Guo, E.J. Lo, A. Marcu, J.R. Grant, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, Z. Sayeeda, N. Assempour, I. Iynkkaran, Y. Liu, A. Maciejewski, N. Gale, A. Wilson, L. Chin, R. Cummings, Di. Le, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>.
- [107] D.L. Stojković, V. V. Jevtić, G.P. Radić, M.B. Đukić, R.M. Jelić, M.M. Zarić, M. V. Anđelković, M.S. Mišić, D.D. Baskić, S.R. Trifunović, Stereospecific ligands and their complexes. XXIV. Synthesis, characterization and some biological properties of Pd(ii) and Pt(ii) complexes with R² - S,S-eddtyr, *New J. Chem.* 42 (2018) 3924–3935. <https://doi.org/10.1039/C7NJ04437B>.
- [108] A.M. Krause-Heuer, W.S. Price, J.R. Aldrich-Wright, Spectroscopic investigations on the interactions of potent platinum(II) anticancer agents with bovine serum albumin, *J. Chem. Biol.* 5 (2012) 105–113. <https://doi.org/10.1007/s12154-012-0074-1>.
- [109] U. Kragh-Hansen, Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albimun, *Pharmacol. Rev.* 33 (1981) 17–53.

- [110] J.. Neault, H.. Tajmir-Riahi, Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1384 (1998) 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00011-9).
- [111] P.B. Kandagal, S. Ashoka, J. Seetharamappa, S.M.T. Shaikh, Y. Jadegoud, O.B. Ijare, Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.11.037>.
- [112] A. Tarushi, J. Kljun, I. Turel, A.A. Pantazaki, G. Psomas, D.P. Kessissoglou, Zinc(II) complexes with the quinolone antibacterial drug flumequine: structure, DNA- and albumin-binding, *New J. Chem.* 37 (2013) 342–355. <https://doi.org/10.1039/C2NJ40798A>.
- [113] F. Li, J. Xie, F. Feng, Copper and zinc complexes of a diaza-crown ether as artificial nucleases for the efficient hydrolytic cleavage of DNA, *New J. Chem.* 39 (2015) 5654–5660. <https://doi.org/10.1039/C4NJ02193B>.
- [114] Y. Manojkumar, S. Ambika, R. Arulkumar, B. Gowdhami, P. Balaji, G. Vignesh, S. Arunachalam, P. Venuvanalingam, R. Thirumurugan, M.A. Akbarsha, Synthesis, DNA and BSA binding, in vitro anti-proliferative and in vivo anti-angiogenic properties of some cobalt(iii) Schiff base complexes, *New J. Chem.* 43 (2019) 11391–11407. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01269A>.
- [115] S. Kathiresan, S. Mugesh, J. Annaraj, M. Murugan, Mixed-ligand copper(ii) Schiff base complexes: the vital role of co-ligands in DNA/protein interactions and cytotoxicity, *New J. Chem.* 41 (2017) 1267–1283. <https://doi.org/10.1039/C6NJ03501A>.
- [116] K. Karami, Z.M. Lighvan, S.A. Barzani, A.Y. Faal, M. Poshteh-Shirani, T. Khayamian, V. Eigner, M. Dušek, Design and synthesis of a novel trinuclear palladium(ii) complex containing an oxime chelate ligand: determining the interaction mechanism with the DNA groove and BSA site I by spectroscopic and molecular dynamics simulation approaches, *New J. Chem.* 39 (2015) 8708–8719. <https://doi.org/10.1039/C5NJ01280E>.
- [117] J.-P. MACQUET, J.-L. BUTOUR, A Circular Dichroism Study of DNA . Platinum Complexes. Differentiation between Monofunctional. cis-Bidentate and trans-Bidentate Platinum Fixation on a Series of DNAs, *Eur. J. Biochem.* 83 (1978) 375–387. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12103.x>.

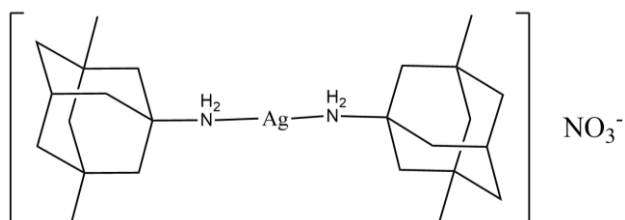
- [118] M. Sadeghizadeh, B. Ranjbar, M. Damaghi, L. Khaki, M.N. Sarbolouki, F. Najafi, S. Parsaee, A. Ziaee, M. Massumi, W. Lubitz, P. Kudela, S. Paukner, A. Karami, Dendrosomes as novel gene porters-III, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 912–920. <https://doi.org/10.1002/jctb.1891>.
- [119] M. Tao, G. Zhang, C. Xiong, J. Pan, Characterization of the interaction between resmethrin and calf thymus DNA in vitro, *New J. Chem.* 39 (2015) 3665–3674. <https://doi.org/10.1039/C4NJ02321H>.
- [120] V. Uma, M. Kanthimathi, T. Weyhermuller, B.U. Nair, Oxidative DNA cleavage mediated by a new copper (II) terpyridine complex: Crystal structure and DNA binding studies, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 2299–2307. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.08.011>.
- [121] D.H. Nakahata, R.E.F. de Paiva, W.R. Lustri, C.M. Ribeiro, F.R. Pavan, G.G. da Silva, A.L.T.G. Ruiz, J.E. de Carvalho, P.P. Corbi, Sulfonamide-containing copper(II) metallonucleases: Correlations with in vitro antimycobacterial and antiproliferative activities, *J. Inorg. Biochem.* 187 (2018) 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.07.011>.
- [122] R.R. Tampi, C.H. van Dyck, Memantine: efficacy and safety in mild-to-severe Alzheimer's disease, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3 (2007) 245–258. <https://doi.org/10.2147/ndt.2007.3.2.245>.
- [123] B. Subudhi, S. Chattopadhyay, P. Mishra, A. Kumar, Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection, *Viruses*. 10 (2018) 235. <https://doi.org/10.3390/v10050235>.
- [124] S.K. Sonkusare, C.L. Kaul, P. Ramarao, Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope, *Pharmacol. Res.* 51 (2005) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.05.005>.

Anexo

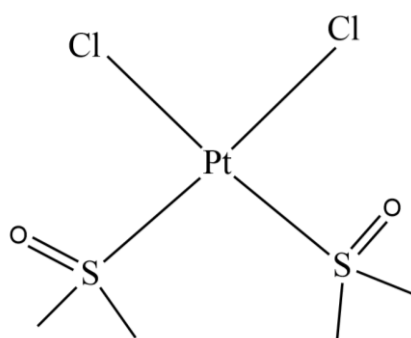
Estruturas



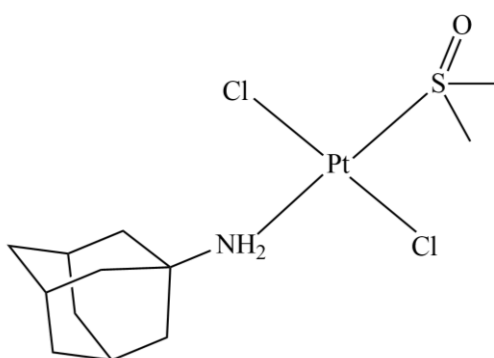
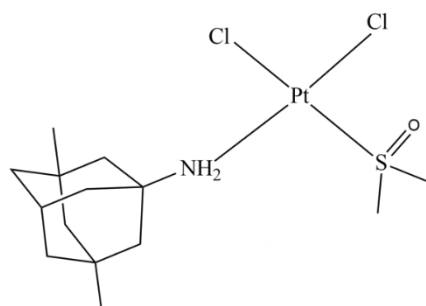
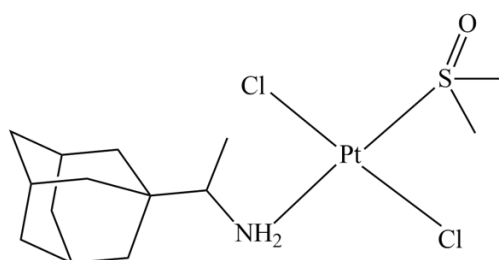
Ag-atd



Ag-mtn



***cis*-[PtCl₂(dmsO)₂]**

**Pt-atd****Pt-mtn****Pt-rtd**