

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, SUPERFÍCIE DE HIRSHFELD E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO COMPLEXO [AG(BPY)₂]NO₃

Ana B. N. Moreira¹; Jad L. F. Simplicio¹; Marinaldo V. de Souza Junior¹, Jailton R. Viana¹; Franklin M. dos Santos¹; Jayson C. dos Santos¹; Adenilson O. dos Santos¹.

¹Programa de Pós Graduação em Ciência dos Materiais – PPGCM, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Centro de Ciências de Imperatriz (CCIm), Imperatriz – MA, Brasil

nunes.ana@discente.ufma.br

Palavras-Chave: Composto de coordenação, prata, antibacteriana.

Introdução

Os compostos de coordenação são materiais formados quando um átomo ou íon metálico central estabelece ligações covalentes com ligantes orgânicos ou inorgânicos. Dessa forma, metais e ligantes podem originar arranjos cristalinos com potencial para interagir com biomoléculas e apresentar funções químicas e biológicas distintas em relação aos compostos isoladamente [1,2]. Entre as características que tornam os metais de transição atrativos, destaca-se a habilidade de formar cátions em solução, possibilitando interações com biomoléculas carregadas negativamente. Esses metais podem coordenar-se a ligantes por intermédio de átomos doadores, como oxigênio, enxofre ou nitrogênio, direcionando a atividade do complexo para alvos moleculares específicos [3,4].

A atividade desses complexos, em especial suas propriedades antimicrobianas, tem recebido destaque nos últimos anos, principalmente em virtude do aumento da resistência bacteriana [5]. Apesar do amplo desenvolvimento de antibióticos convencionais, o aparecimento de cepas multirresistentes continua sendo uma ameaça à saúde pública, ocasionando milhares de infecções e mortes anualmente [6,7]. Diante desse cenário, torna-se importante desenvolver novas estratégias terapêuticas capazes de superar as infecções resistentes aos tratamentos convencionais [8].

Os complexos tem a capacidade de demonstrar atividade antibacteriana por meio de diferentes mecanismos. Interagindo diretamente com o DNA bacteriano, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibindo enzimas essenciais ao metabolismo ou ainda comprometendo a homeostase iônica celular, ocasionando morte bacteriana [9,10]. Tais efeitos podem resultar em ação bactericida, quando ocorre eliminação das células, ou bacteriostática, quando há apenas inibição da proliferação. Nesses casos, parâmetros como a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) são comumente utilizados para avaliar a eficácia do material [11].

Entre os metais investigados, a prata ocupa posição de destaque, já que, embora não seja essencial para os processos fisiológicos humanos, a prata possui reconhecida

atividade antimicrobiana, especialmente em sua forma iônica (Ag^+), responsável por interações com microrganismos [12]. Compostos à base desse metal têm sido explorados, a exemplo a sulfadiazina de prata, amplamente utilizada em queimaduras e feridas [13]. A ampla difusão dos antibióticos reduziu temporariamente seu uso, mas o agravamento da resistência bacteriana reacendeu o interesse em complexos contendo prata, dada sua eficácia e baixa toxicidade em humanos [14].

Nesse contexto, a escolha do ligante é determinante para modular a liberação do íon ativo de prata afim de garantir a eficácia do complexo [15]. Entre os ligantes nitrogenados empregados, a 2,2'-bipiridina (bpy) destaca-se como uma molécula bidentada amplamente utilizada na síntese de complexos de coordenação, principalmente devido sua capacidade de estabilização e à relevância biológica associada [16,17]. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo a síntese, caracterização e aplicação biológica do complexo $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$. A confirmação estrutural foi realizada por difração de raios X pelo método de pó (XRPD), enquanto a análise de superfície de Hirshfeld permitiu identificar as interações intermolecular que contribuem para a estabilidade da rede cristalina. Por fim, a atividade antibacteriana foi avaliada utilizando cepas Gram-positivas e Gram-negativas, por meio da determinação dos valores de CIM e CBM.

Material e Métodos

Crescimento de cristais

Cristais do complexo $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$ foram sintetizados pela técnica de evaporação lenta de solvente. Os compostos de partida, 2,2'-bipiridina (Sigma-Aldrich > 99%) e nitrato de prata (Sigma-Aldrich > 99%), foram utilizados na razão molar de 1:1. O nitrato de prata (0,169 g) foi solubilizado em 5 mL de água deionizada. A 2,2'-bipiridina (0,156 g) foi dissolvida em 30 mL de metanol. Em seguida, a solução de nitrato de prata foi adicionada à solução de 2,2'-bipiridina. A mistura permaneceu sob agitação magnética (300 RPM) por 15 minutos, na ausência de luz. Logo depois, a solução foi levada a uma sala de crescimento de cristais e mantida à temperatura ambiente por 7 dias até a nucleação da fase sólida.

Difração de raios X em pó

Para a análise de difração de raios X em pó (DRXP), foi utilizado um difratômetro PANanalytical (modelo Empyrean) operando a 40 kV/40 mA com radiação Cu- $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), geometria Bragg-Betano, utilizando um passo angular de $0,013^\circ$ por 1 s, em uma faixa angular de 5 a 50° , à temperatura ambiente. Os parâmetros de rede foram refinados pelo método de Rietveld, utilizando o software EXPGUI-GSAS II [18], com base em parâmetros estruturais relatados na literatura [19], de acordo com o arquivo de informações cristalográficas (CIF) nº 1899332, presente no banco de dados cristalográficos da *Cambridge Crystallographic Data Center* (CCDC).

Análise de superfícies de Hirshfeld

Para a análise das superfícies de Hirshfeld [20], utilizou o software Crystal Explorer [21], partido das informações contida estrutura CIF relatada por Aslam e colaboradores [19]. As superfícies foram mapeadas em função da propriedade d_{norm} (distância normalizada), definida com base nas distâncias entre um ponto específico na

superfície e o átomo externo mais próximo (d_e), distâncias entre um ponto específico na superfície e o átomo interno mais próximo (d_i) e o raio de van der Waals [22]. As imagens 3D também foram mapeadas em função de d_e , d_i , índice de forma, curvatura e trechos fragmentadas (*fragmente patch*). Gráficos de impressão digital 2D foram gerados para representar essas distâncias (d_e e d_i) em cada ponto da superfície. Esses cálculos incluíram as interações intermoleculares das estruturas, permitindo a quantificação de contatos específicos [23]. O volume vazio também foi estimado com base nas isosuperfícies de densidade eletrônica (0,002 u.a.) geradas dentro da célula unitária [24].

Ensaio Antibacteriano

A atividade antibacteriana foi avaliada contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). A amostra foi preparada em DMSO (20 mg/mL) e o inóculo foi ajustado para um padrão de McFarland de 0,5. A microdiluição foi realizada em placas de 96 poços com concentrações variando de 1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ [25]. Após incubação por 24 horas a 35 °C, a resazurina foi utilizada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada cultivando amostras sem crescimento bacteriano em ágar por mais 24 horas [26].

Resultados e Discussão

Análise de XRPD e refinamento Rietveld

O difratograma e refinamento pelo método Rietveld do complexo bis(2,2'-bipiridina)-nitrato de prata(I) – $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$, em condições ambientes, é apresentado na Figura 1a. O complexo cristaliza no sistema monoclinico, grupo espacial $C2/c$ (C_{2h}^6), contendo quatro fórmulas por célula unitária ($Z = 4$). Os parâmetros de rede refinados foram: $a = 24,372(9)$ Å, $b = 3,793(1)$ Å, $c = 24,423(5)$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 102,394^\circ$ e $V = 2205,293$ Å³, valores que estão em consonância com dados previamente descritos na literatura [19]. Os índices de qualidade do refinamento resultaram em $R_{wp} = 13,9\%$, $R_p = 9,2\%$ e fator de qualidade $S = 1,9$, resultando em um bom indicador de ajuste [27]. Além disso, o difratograma junto com refinamento sugerem uma boa cristalinidade do material sintetizado. A estrutura molecular do complexo de coordenação $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$ encontra-se representada na Figura 1b, onde se observa uma estrutura quadrada planar distorcida, com o cátion prata(I) ligado a quatro átomos de nitrogênio provenientes das moléculas de bipiridina. A célula unitária correspondente é mostrada na Figura 1c.

Análise de superfícies de Hirshfeld

As superfícies de Hirshfeld foram obtidas, permitindo a análise das interações intermoleculares presentes no complexo $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$. A Figura 2a apresenta a unidade assimétrica do complexo. A Figura 2(b-d) mostra a superfície normalizada (d_{norm}) e os mapas de distâncias internas e externas (d_i e d_e). Na superfície d_{norm} , as interações mais fortes são mostradas por meio de pontos vermelhos, que indicam regiões de contato próximo, como ligações de hidrogênio. Regiões brancas e azul-claras indicam interações de van der Waals, que são mais fracas, mas são relevantes para a estabilização da rede cristalina (Figura 2b). A análise da superfície d_{norm} mostra essas interações como pontos vermelhos, evidenciando contatos intensos como ligações de hidrogênio, o átomo de

nitrato, apesar de não coordenado, contribui significativamente para a estabilização do composto. Interações π - π também ocorrem entre anéis aromáticos de 2,2-bipiridina, que mantêm as moléculas próximas umas das outras. Além disso, as interações de van der Waals, embora mais fracas, contribuem para a estabilidade geral da rede cristalina [28].

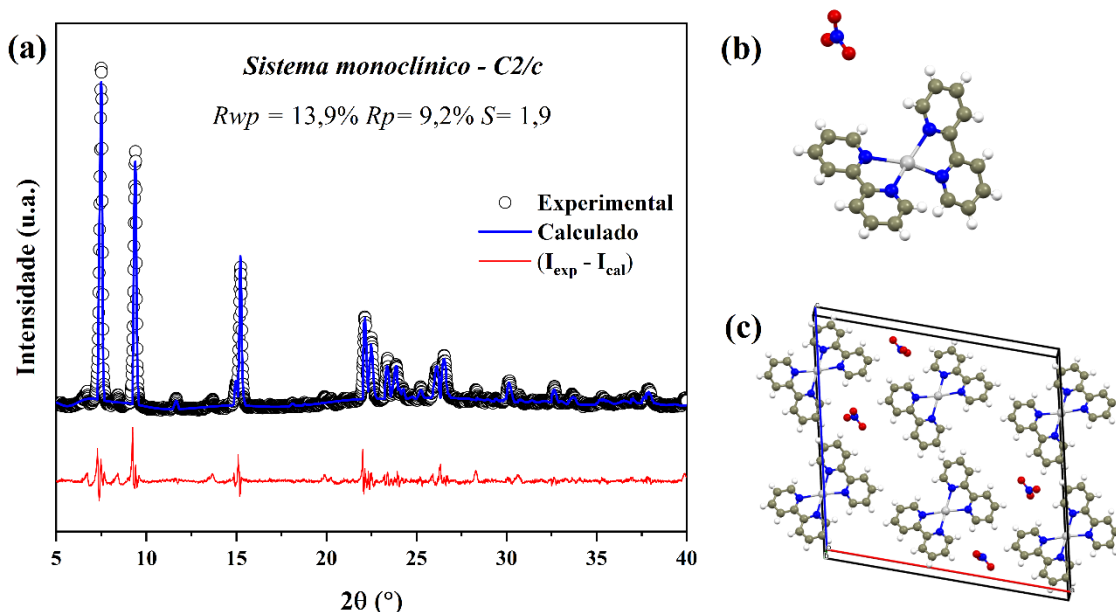


Figura 1 – (a) Refinamento Rietveld para o complexo $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$, (b) estrutura molecular do complexo e (c) sistema monoclinico no plano *abc* da célula unitária.

A Figura 2e apresenta o índice de forma, que permite avaliar a geometria da molécula e suas interações com moléculas vizinhas. Triângulos menores e definidos indicam áreas de forte interação, enquanto triângulos maiores e suaves sugerem regiões com menor contato molecular. A Figura 2f mostra a curvatura da superfície molecular, indicando como as moléculas estão organizadas no cristal e onde ocorrem as interações intermoleculares. Regiões de curvatura acentuada revelam contatos fortes, enquanto áreas planas ou côncavas sugerem interações mais fracas. A análise destas superfícies mostra que as interações π - π que ocorrem entre anéis aromáticos de 2,2-bipiridina, indicado pelo encontro entre os triângulos vermelho e azul, mostrados no índice de forma, contribuindo significativamente para a estabilização da rede cristalina.

A Figura 2g mostra os fragmentos moleculares, destacando o arranjo atômico e usando cores para identificar os tipos e intensidades das interações na superfície. Finalmente, a Figura 2h destaca as principais interações intermoleculares no cristal, incluindo ligações de hidrogênio, destacadas na figura por linhas tracejadas vermelhas. A molécula de nitrato, embora descoordenada, contribui significativamente, ligando-se aos hidrogênios das moléculas de bipiridina e estabilizando a estrutura.

A Figura 3(a) mostra o gráfico de impressão digital 2D do complexo $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$, revelando quantitativamente as interações intermoleculares na rede cristalina. A Figura 3(b-f) exhibe as contribuições mais significativas das interações, sendo $\text{H}\cdots\text{O}/\text{O}\cdots\text{H} = 27,5\%$, $\text{H}\cdots\text{H} = 27,2\%$, $\text{C}\cdots\text{C} = 11,9\%$, $\text{H}\cdots\text{C}/\text{C}\cdots\text{H} = 10,1\%$, $\text{O}\cdots\text{O} = 8,3\%$. Existem outras interações de menor contribuições, como $\text{N}\cdots\text{C}/\text{C}\cdots\text{N} = 4,9\%$, $\text{H}\cdots\text{N}/\text{N}\cdots\text{H} = 4,4\%$, $\text{Ag}\cdots\text{N}/\text{N}\cdots\text{Ag} = 1,5\%$ e $\text{Ag}\cdots\text{Ag} = 1,1\%$, totalizando quase 100% de todas as interações.

O volume vazio da célula unitária do complexo também foi calculado e apresentado na Figura 4. O volume vazio é definido por uma issosuperfície de densidade eletrônica do pró-cristal em toda célula unitária. O volume vazio calculado foi de 86,71 Å³, o que representa apenas 4% do volume total da célula unitária. Isso indica que não há cavidade significativas na rede cristalina do complexo, sugerindo a boa estabilidade mecânica, pois as moléculas se mostraram bem compactadas devido pouco espaço vazio. Além disso, é interessante levar esse resultado em consideração para futuras dopagem do complexo para modular outras propriedades desejadas [29,30].

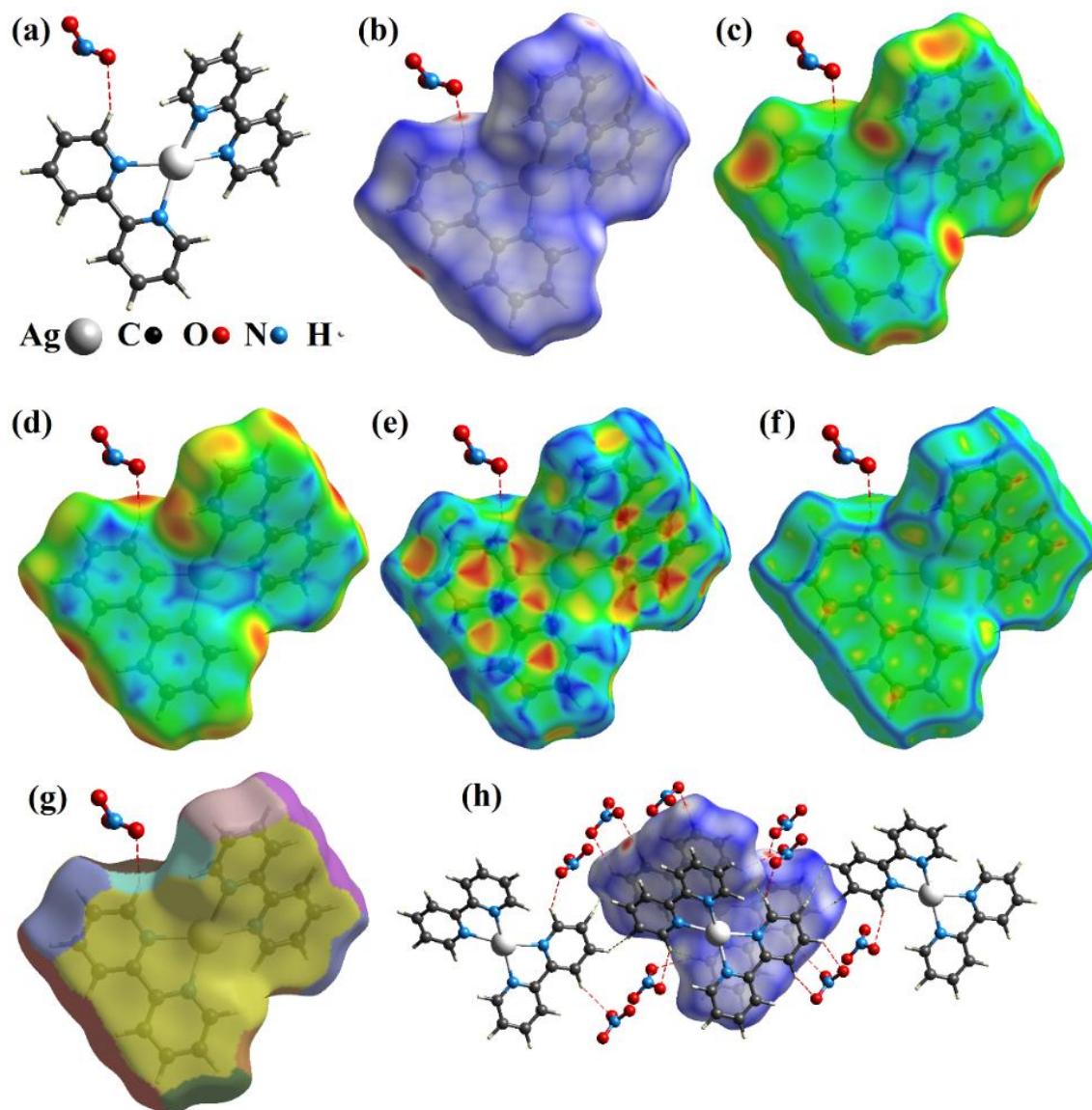


Figura 2 – (a) unidade assimétrica, (b) d_{norm} , (c) d_i , (d) d_e , (e) índice de forma, (f) curvatura, (g) fragmentos, (h) principais interações intermoleculares do $[Ag(bpy)_2]NO_3$.

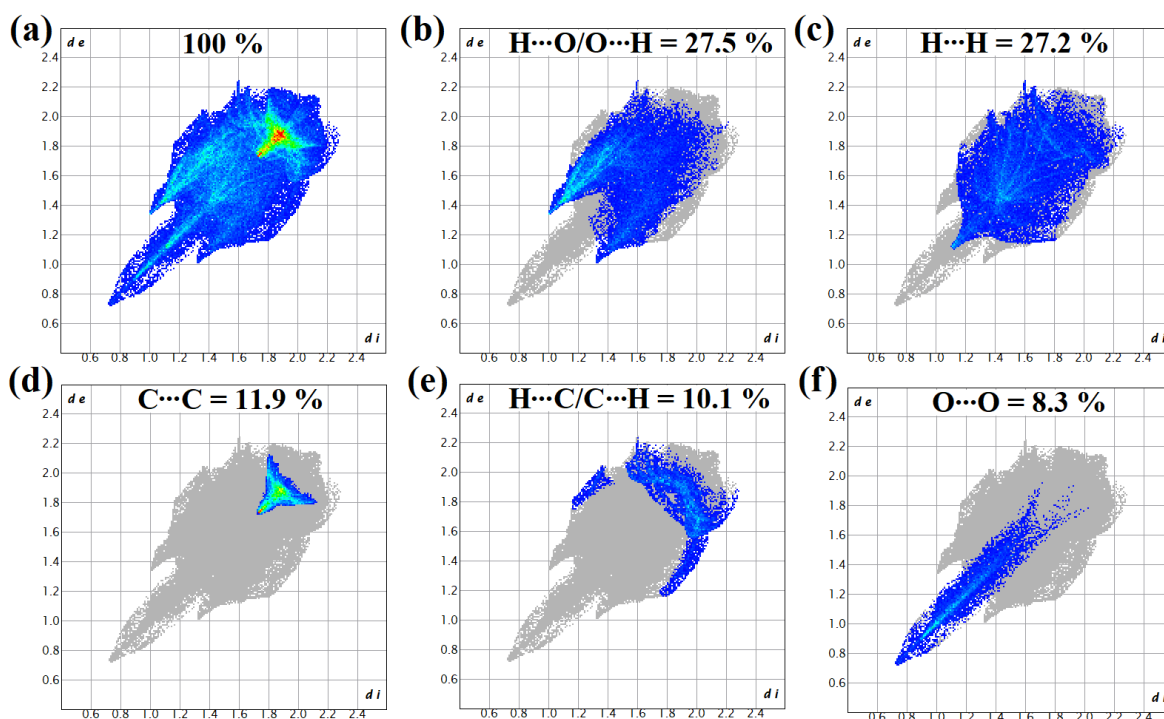


Figura 3 - (a) Gráfico de impressão digital 2D completo para o complexo $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$ e gráficos de impressão digital de interações específicas: (b) $\text{H}\cdots\text{O}/\text{O}\cdots\text{H}$, (c) $\text{H}\cdots\text{H}$, (d) $\text{C}\cdots\text{C}$, (e) $\text{H}\cdots\text{C}/\text{C}\cdots\text{H}$, (f) $\text{O}\cdots\text{O}$.

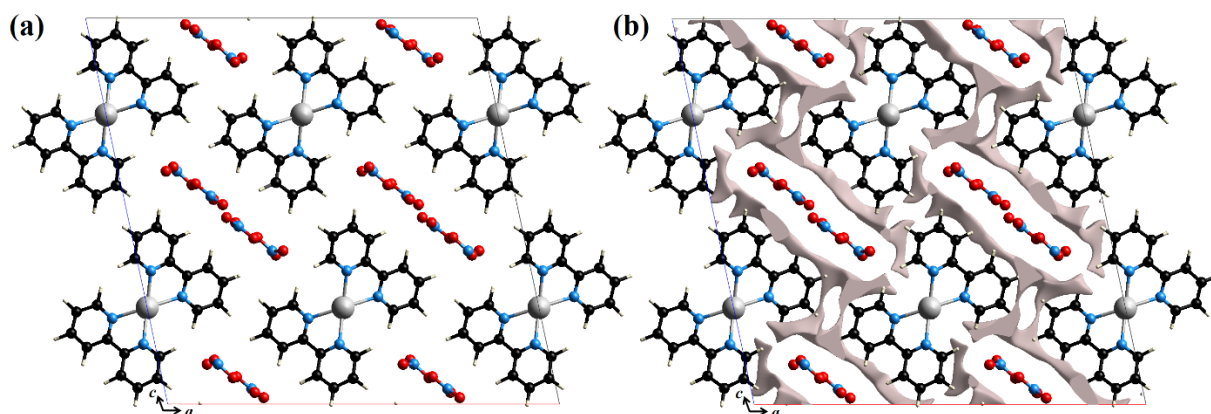


Figura 4 - (a) Estrutura da célula unitária no eixo ac e (b) volume vazio calculado na célula unitária do complexo $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$

Avaliação da atividade antibacteriana

Os resultados de CIM e CBM obtidos para o cristal $[\text{Ag}(\text{bpy})_2]\text{NO}_3$ são apresentados na Tabela 1. O complexo obteve valores de CIM de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, entretanto, contra *Escherichia coli* ATCC 25922 o valor foi de 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando atividade inibitória relevante. Em relação aos valores de CBM, para *E. coli* foi de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e para as demais, de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabela 1 - Ensaio bactericida do complexo $[Ag(bpy)_2]NO_3$ e droga padrão (Gentamicina) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ($\mu g/mL$).

	$[Ag(Bpy)_2]NO_3$			Gentamicina		
	MIC ($\mu g/mL$)	MBC ($\mu g/mL$)	Ação	MIC ($\mu g/mL$)	MBC ($\mu g/mL$)	Ação
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	125	125	Bactericida	1.25	2.5	Bactericida
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25923	125	125	Bactericida	0.078	0.31	Bactericida
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7.81	62.5	Bactericida	0.31	0.31	Bactericida
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	125	125	Bactericida	0.156	0.62	Bactericida

^aInterpretação da atividade inibitória do complexo testado: CIM < 100 $\mu g/mL$ (alta atividade); CIM 100–500 $\mu g/mL$ (atividade inibitória moderada); CIM 500–1000 $\mu g/mL$ (atividade inibitória fraca); > 1000 $\mu g/mL$ (inativo). A relação CBM/CIM foi calculada para avaliar o efeito bactericida para CBM/CIM ≤ 4 ou bacteriostático para CBM/CIM > 4.

A partir das análises de CIM e CBM, foi possível classificar o material como bactericida ou bacteriostático. Verificou-se atividade bactericida frente a todas as cepas avaliadas, exceto contra *E. coli* (Tabela 1). Além disso, os achados deste trabalho indicam que o material exibe atividade inibitória semelhante à descrita para outros complexos já reportados na literatura [31].

Entretanto, em comparação à gentamicina (Tabela 1), observou-se que o material apresentou menor atividade. Apesar disso, pesquisas já relatam o efeito sinérgico entre esses novos complexos e antibióticos convencionais, o que pode intensificar sua ação e representar uma alternativa promissora no tratamento de cepas resistentes [32]. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que o complexo $[Ag(bpy)_2]NO_3$ possui potencial para ser explorado como candidato no desenvolvimento de agentes antibacterianos mais eficazes.

Conclusões

O composto de coordenação $[Ag(bpy)_2]NO_3$, foi obtido empregando a técnica de evaporação lenta de solvente. A caracterização estrutural realizada por DRXP, em conjunto com o refinamento Rietveld, confirmou a obtenção dos cristais na fase monoclinica com grupo espacial C2/c, em concordância com dados cristalográficos disponíveis na literatura. A análise de superfícies de Hirshfeld demonstrou a presença de diferentes tipos de interações intermoleculares, incluindo ligações de hidrogênio, interações $\pi-\pi$ e forças de van der Waals, que contribuem significativamente para a estabilização da rede cristalina. Destaca-se ainda o papel do íon nitrato não coordenado diretamente ao centro metálico, mas relevante na estabilização do material ao estabelecer contatos fortes com os ligantes bipyridina.

Com relação à atividade biológica, o complexo demonstrou efeito antibacteriano relevante contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. O material destacou-se pela baixa CIM contra a *E. coli* (7,81 $\mu g/mL$), evidenciando uma forte atividade inibitória. Os resultados de CBM indicaram que o material atua majoritariamente como agente

bactericida, reforçando seu potencial no desenvolvimento de novos antimicrobianos. Embora tenha apresentado menor atividade em comparação com a gentamicina, o desempenho obtido para o complexo de prata é significativo, sobretudo considerando a possibilidade de aplicação em terapias combinadas, nas quais o efeito sinérgico com antibióticos convencionais pode ampliar sua eficácia e contornar a resistência bacteriana.

Portanto, os resultados obtidos reforçam a importância da combinação entre íons metálicos bioativos e ligantes nitrogenados na síntese de complexos com propriedades funcionais promissoras. O $[Ag(bpy)_2]NO_3$ mostrou-se um candidato viável para futuros estudos farmacológicos, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de materiais com aplicação na área biomédica, em especial no combate a infecções causadas por microrganismos resistentes.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, a FAPEMA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

Referências

- [1] NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. **Drug Des. Devel. Ther.**, 11, 599-616, 2017.
- [2] BASOLO, F.; JOHNSON, R.; BUSCH, R. H. **Química compuestos de coordinación**. Reverté, 1980.
- [3] HOSSAIN, Md S.; ROY P. K.; ALI, R.; *et al.* Selected Pharmacological Applications of 1 st Row Transition Metal Complexes: A review. **Clin. Med. Res.**, 6(6), 177-191, 2017.
- [4] GAMBERI, T.; HANIF, M. Metal-based complexes in cancer treatment. **Biomedicines**, 10(10), 2573, 2022.
- [5] MARZANO, C.; PELLEI, M.; TISATO, F. SANTINI, C. Copper complexes as anticancer agents. **AntiCancer Agents Med. Chem.**, 9(2), 185-211, 2009.
- [6] LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat. Rev. Microbiol.**, 11(6), 371-384, 2013.
- [7] BROWNE, A. J.; CHIPETA, M. G.; HAINES-WOODHOUSE, G.; *et al.* Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. **Lancet Planet. Health**, 5(12), 893-904, 2021.
- [8] FRANZ, K. J.; METZLER-NOLTE, N. Introduction: metals in medicine. **Chem. Rev.**, 119(2), 727-729, 2019.
- [9] RAJU, S. K.; KARUNAKARAN, A.; KUMAR, S.; *et al.* Silver complexes as anticancer agents: A perspective review. **German J. Pharm. Biomat.**, 1(1), 6-28, 2022.
- [10] YUAN, Y.; HAN, H. L.; LIN, S.; *et al.* Synthesis, structural characterization, stability, antibacterial activity and spectroscopic properties (THz) of five new polynuclear silver (I) complexes with 1, 10-phenanthroline derivative and 1, 3-bis (diphenylphosphino) propane (dppp). **Polyhedron**, 119(24), 184-193, 2016.
- [11] PATIL, S. M.; PATEL, P. Bactericidal and Bacteriostatic Antibiotics. **Infections and sepsis development**, 2021.
- [12] MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M.; ZORODDU, M. A. Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence. **J. Med. Chem.**, 62(13), 5923-5943, 2019.
- [13] LIANG, X.; LUAN, S.; YIN, Z.; HE, M. *et al.* Recent advances in the medical use of silver complex. **Eur. J. Med. Chem.**, 157, 62-80, 2018.
- [14] MEDICI, S.; PEANA, M.; CRISPONI, G.; NURCHI, V. M. *et al.* Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. **Coord. Chem. Rev.**, 327, 349-359, 2016.
- [15] SALVADOR, J.; GARCÉS, J. L.; COMPANYS, E.; *et al.* Ligand mixture effects in metal complex lability. **J. Phys. Chem. A**, 111(20), 4304-4311, 2007.
- [16] KAES, C.; KATZ, A.; HOSSEINI, M. W.. Bipyridine: the most widely used ligand. A review of molecules comprising at least two 2, 2'-bipyridine units. **Chem. Rev.**, 100(10), 3553-3590, 2000.

- [17] RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coord. Chem. Rev.**, 251(13-14), 1633-1648, 2007.
- [18] TOBY, B. EXPGUI, a graphical user interface for GSAS. **J. App. Crystallogr.**, 34(2), 210-213, 2001.
- [19] ASLAM, S.; ISAB, A. A.; ALOTAIBI, M. A.; SALEEM, M. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization, DFT calculations and antimicrobial properties of silver (I) complexes of 2, 2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. **Polyhedron**, 115, 212-218, 2016.
- [20] HIRSHFELD, F. L. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. **Theor. Chim. Acta**, 44(2), 129-138, 1977.
- [21] SPACKMAN, P. R.; TURNER, M. J.; MCKINNON, J. J.; WOLFF, S. K. *et al.* CrystalExplorer: a program for Hirshfeld surface analysis, visualization and quantitative analysis of molecular crystals. **J. Appl. Crystallogr.**, 54(3), 1006-1011, 2021.
- [22] MCKINNON, J. J.; JAYATILAKA, D.; SPACKMAN, M. A. Towards quantitative analysis of intermolecular interactions with Hirshfeld surfaces, **Communication**, 37, 3814-3816, 2007.
- [23] PSYCHARIS, V.; DERMITZAKI, D.; RAPTOPOULOU, C. P. The use of Hirshfeld surface analysis tools to study the intermolecular interactions in single molecule magnets, **Crystals**, 11(10), 1246, 2021.
- [24] TURNER, M. J.; MCKINNON, J. J.; JAYATILAKA, D.; SPACKMAN, M. A. Visualisation and characterisation of voids in crystalline materials, **CrystEngComm**, 13(6), 1804-1813, 2011.
- [25] WAYNE, P. A. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-8th ed, **CLSI document M07-A8**, USA, 2009.
- [26] ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P. *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnol. Lett.**, 38(6), 1015-1019, 2016.
- [27] TOBY B. H. *R* factors in Rietveld analysis: How good is good enough? **Powder Diffr.** 21, 67-70, 2006.
- [28] MCKINNON, J. J.; SPACKMAN, M. A.; MITCHELL, A. S. Novel tools for visualizing and exploring intermolecular interactions in molecular crystals. **Acta Crystallogr. B**, 60(6), 627-668, 2004.
- [29] TOPKAYA, C.; HÖKELEK, T.; ASLAN, S.; *et al.* Crystal structure, Hirshfeld surface analysis, crystal voids, interaction energy calculations, energy frameworks and supercapacitor applications of isatin hydrazone ligand, **J. Mol. Struc.**, 1316, 139014, 2024.
- [30] OLIVEIRA NETO, J. G.; VIANA, J. R.; LIMA, A. D. S. G.; *et al.* Assessing the novel mixed tutton salts $K_2Mn_{0.03}Ni_{0.97}(SO_4)_2(H_2O)_6$ and $K_2Mn_{0.18}Cu_{0.82}(SO_4)_2(H_2O)_6$ for thermochemical heat storage applications: An experimental-theoretical study, **Molecules**, 28, 8058, 2023.
- [31] SOUZA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA NETO, J. G.; VIANA, J. R.; *et al.* Structural and spectroscopic properties, solvation effects, intermolecular interactions, and biological assays of a Mn (II)-complex with 1, 10-phenanthroline and chloro ligands. **Vib. Spectrosc.**, 133, 103710, 2024.
- [32] RODRIGUES, J. A. O.; TORRES, A. U.; SOUSA, N. A. B.; *et al.* Synthesis, characterization, DFT study, and antibacterial activity of a coordination complex of Cu(II) with 1, 10-phenanthroline and L-methionine ligands. **J. Mol. Struc.**, 1293, 136197, 2023.