

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Andrea Roxana Aguirre Manga

**COMPLEXOS DE In(III) COM LIGANTES POLIDENTADOS DERIVADOS DE
BASES DE SCHIFF: propriedades físico-químicas e avaliação de seu potencial
quimioterapêutico, radioquimioterapêutico e radiosensibilizador frente a células de
tumores mamários**

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEx/DQ. 1.567^a

T. 713^a

Andrea Roxana Aguirre Manga

**COMPLEXOS DE In(III) COM LIGANTES POLIDENTADOS DERIVADOS DE
BASES DE SCHIFF: propriedades físico-químicas e avaliação de seu potencial
quimioterapêutico, radioquimioterapêutico e radiosensibilizador frente a células de
tumores mamários**

Tese apresentada ao Departamento de Química
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências
- Química.

Orientadora: Prof^o Dra. Heloisa de Oliveira
Beraldo

Coorientadora: Prof^o Dra. Raquel Gouvêa dos
Santos

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

A284c
2023
T

Aguirre Manga, Andrea Roxana.
Complexos de In(III) com ligantes polidentados derivados de bases de Schiff [manuscrito] : propriedades físico-químicas e avaliação de seu potencial quimioterapêutico, radioquimioterapêutico e radiosensibilizador frente a células de tumores mamários / Andrea Roxana Aguirre Manga. 2023.
162 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.
Coorientadora: Raquel Gouvêa dos Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Inclui bibliografia e apêndices.

1. Química inorgânica – Teses. 2. Radioquímica – Teses. 3. Índio (Química) – Teses. 4. Complexos metálicos – Teses. 5. Schiff, Bases de – Teses. 6. Agentes antineoplásicos – Teses. 7. Mamas – Câncer – Teses. 8. Radioterapia – Teses. 9. Quimioterapia – Teses. I. Beraldo, Heloisa de Oliveira, Orientadora. II. Santos, Raquel Gouvêa dos, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Complexos de In(III) com Ligantes Polidentados Derivados de Bases de Schiff: Propriedades Físico-químicas e Avaliação de seu Potencial Quimioterapêutico, Radioquimioterapêutico e Radiossensibilizador Frente a Células de Tumores Mamários"

Andrea Roxana Aguirre Manga

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG

Dra. Raquel Gouvea dos Santos - Coorientadora
CDTN

Dr. Fabio Luiz Navarro Marques
USP

Prof. Júlio Santos Rebouças
UFPB

Profa. Cynthia Lopes Martins Pereira
UFMG

Profa. Heveline Silva
UFMG

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Heloisa de Oliveira Beraldo, Professora do Magistério Superior**, em 31/08/2023, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Luiz Navarro Marques, Usuário Externo**, em 31/08/2023, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cynthia Lopes Martins Pereira, Professora do Magistério Superior**, em 31/08/2023, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Julio Santos Rebouças, Usuário Externo**, em 31/08/2023, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heveline Silva, Servidor(a)**, em 31/08/2023, às 22:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Gouvea dos Santos, Usuária Externa**, em 04/09/2023, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2579850** e o código CRC **F7228513**.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Heloisa de Oliveira Beraldo, pela confiança, orientação e dedicação no desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho, e pelo carinho de sempre.

À minha coorientadora Dra. Raquel Gouvêa pelos ensinamentos e disposição em ajudar durante a realização desse trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Renata Diniz e Dr. Tiago Brandão pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus antigos e novos colegas do laboratório pela colaboração, ensino, incentivo, amizade e carinho demonstrado no dia a dia.

Aos meus amigos Guillermo, Victor, Eiji, Robinson, Giuliano, Rayane, Guilherme, Saddam, Fabricio, Alix, Bruna, Emmanuel, Nicolas, Gabriela e Carlos pelo carinho, indispensável ajuda e os bons momentos que passamos juntos.

A meu marido Naziel pelo apoio incondicional, a constante motivação e sobretudo pelo companheirismo e amor sempre presente.

Ao Departamento de Química da UFMG e ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear pela infraestrutura fornecida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Complexos de In(III) com ligantes polidentados derivados de bases de Schiff: propriedades físico-químicas e avaliação de seu potencial quimioterapêutico, radioquimioterapêutico e radiosensibilizador frente a células de tumores mamários

No presente trabalho foram sintetizados os complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**), $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) e $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**3**) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona) (H_2 -2,6AcPh) e seus derivados *bis*(*para*-cloro-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6AcpClPh) e *bis*(*para*-toluil-hidrazona) (H_2 -2,6AcpCH₃Ph), os complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**6**) com 2,6-difomilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona) (H_2 -2,6FoPh) e seus derivados *bis*(*para*-cloro-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6FopClPh) e *bis*(*para*-toluil-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6FopCH₃Ph) e os complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) (H_2 -2,6AcSc) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) (H_2 -2,6AcTsc).

Nos complexos (**1 - 8**) o ligante se coordena ao metal na forma dianiônica por meio do sistema quelante O-N-Npy-N-O nas *bis*(benzoilhidrazonas) e *bis*(semicarbazona) e pelo sistema S-N-Npy-N-S na *bis*(tiossemicarbazona). As estruturas cristalográficas dos complexos (**1**) e (**2**) mostram para ambos uma geometria bipirâmide pentagonal, onde In(III) está coordenado ao ligante na forma pentadentada, a um íon cloreto e a uma molécula de água.

Pela coordenação há um aumento da conjugação e da rigidez no ligante, o que faz com que os complexos (**1 - 6**) apresentem fluorescência em DMSO na faixa 425-575 nm. Foram obtidos valores de rendimento quântico menores de 1,5%, usando-se hemissulfato de quinina como padrão. Os compostos mostraram significativa luminosidade de fluorescência em razão da forte absorção na região do UV próximo.

Amostras do precursor InCl_3 e dos complexos (**4**), (**6**), (**7**) e (**8**), foram submetidas a ativação neutrônica com a finalidade de serem produzidos seus análogos radioativos $^*\text{InCl}_3$, (***4**), (***6**), (***7**) e (***8**) contendo $^{114\text{m}}\text{In}$.

Nos estudos de citotoxicidade foram empregadas três linhagens celulares, a saber: MCF-7 (adenocarcinoma mamário estrógeno dependente), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário triplo negativo) e MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano). Os complexos de índio(III) apresentaram atividade citotóxica e se observou um efeito aditivo pela combinação do

tratamento das células tumorais com os complexos e radiações ionizantes (quimioterapia com complexos de In(III) combinada com radioterapia a partir de uma fonte de ^{60}Co).

O complexo (4) e seu análogo (*4) apresentaram atividade citotóxica na faixa micromolar contra as células MCF-7, sem atingir as células saudáveis MRC-5, e com citotoxicidade superior à da cisplatina. Na terapia combinada com radiação de uma fonte de ^{60}Co , o complexo (4) (na concentração de $1\ \mu\text{molL}^{-1}$) em combinação com 1 Gy fez aumentar a porcentagem de morte celular na seguinte ordem MDA-MB-231 > MCF-7 > MRC-5. Assim o complexo (4) poderia atuar como potencial radiosensibilizador, elevando a eficácia terapêutica da radiação.

Os complexos (6) e (7) não apresentaram atividade citotóxica frente às três linhagens celulares, mas seus análogos radioativos (*6) e (*7) mostraram-se ativos, na faixa micromolar, frente às células MCF-7. No entanto (*6) e (*7) e a cisplatina foram igualmente ativos contra as células saudáveis MRC-5. Na terapia combinada com radiação com fonte de ^{60}Co os complexos (6) ou (7) aumentaram a eficácia terapêutica da radiação de igual forma nas células tumorais e saudáveis, não podendo atuar como potenciais radiosensibilizadores.

O complexo (8), em concentrações da faixa micromolar, mostrou-se ativo unicamente frente às células MCF-7, enquanto o análogo (*8) apresentou atividade citotóxica frente às três linhagens celulares com índices de seletividade $IS^1 = 7,7$ ($IC_{50\ \text{MRC-5}} / IC_{50\ \text{MCF-7}}$) e $IS^2 = 1,4$ ($IC_{50\ \text{MRC-5}} / IC_{50\ \text{MDA-MB-231}}$). A radioquimioterapia com o complexo (*8) resultou em uma diminuição de 11,14 vezes no IC_{50} , frente à linhagem MCF-7, em comparação com a quimioterapia com o complexo (8). Desse modo, o complexo (*8) teria potenciais aplicações na radioquimioterapia de tumores de mama MCF-7 e também MDA-MB-231.

Os complexos (4) e (6) agiram como intercaladores frente ao DNA, enquanto o complexo (8) não mostrou capacidade de intercalação.

O presente trabalho constitui importante contribuição ao estudo de compostos com ação antineoplásica e de estratégias de ação terapêutica contra câncer de mama estrógeno-dependente e triplo negativo.

Palavras-chave: *bis*(benzoilhidrazonas); *bis*(semicarbazona); *bis*(tiossemicarbazona); complexos de In(III); complexos de $^{114\text{m}}\text{In}$ (III); atividade citotóxica; efeito radiosensibilizador.

ABSTRACT

Indium(III) complexes with Schiff base-derived polydentate ligands: physicochemical properties and evaluation of their chemotherapeutic, radiochemotherapeutic, and radiosensitizer potentials against breast tumors

In the present work complexes [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**1**), [In(2,6AcpClPh)Cl(H₂O)] (**2**) and [In(2,6AcpCH₃Ph)Cl(H₂O)] (**3**) with 2,6-diacetylpyridina-*bis*(benzoylhydrazone) (H₂-2,6AcPh) and its *bis*(*para*-chloro-benzoylhydrazone) (H₂-2,6AcpClPh) and *bis*(*para*-toluylhydrazone) (H₂-2,6AcpCH₃Ph) were obtained, as well as complexes [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (**4**), [In(2,6FopClPh)Cl(H₂O)]·3H₂O (**5**) and [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (**6**) with 2,6-difomylpyridine-*bis*(benzoylhydrazone) (H₂-2,6FoPh) and its *bis*(*para*-chloro-benzoylhydrazone) (H₂-2,6FopClPh) and *bis*(*para*-toluyl-benzoyllhydrazone) (H₂-2,6FopCH₃Ph) derivatives, and complexes [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (**7**) and [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (**8**) with 2,6-diacetylpyridine-*bis*(semicarbazone) (H₂-2,6AcSc) and 2,6-diacetylpyridine-*bis*(thiosemicarbazone) (H₂-2,6AcTsc).

In complexes (**1 - 8**) a dianionic ligand is attached to the metal center through the O-N-Npy-N-O chelating system in the *bis*(benzoylhydrazones) and *bis*(semicarbazone) and through the S-N-Npy-N-S chelating system in the *bis*(thiosemicarbazone). The crystal structures of (**1**) and (**2**) reveal a pentagonal bipyramidal arrangement, in which the In(III) center is bonded to a pentadentate ligand together with a chloride ion and a coordination water molecule.

The increased conjugation and rigidity of the ligands in the complexes gives rise to fluorescence of (**1-6**) in DMSO in the 425-575 nm range. The quantum yields were lower than 1.5% taking quinine hemisulphate as standard. The compounds exhibited significant luminosities due to absorption in the near UV.

Samples of the InCl₃ precursor and of complexes (**4**), (**6**), (**7**) and (**8**) were submitted to neutron activation aiming to obtain the ^{114m}In analogs *InCl₃, (***4**), (***6**), (***7**) and (***8**).

The cytotoxic effects of the compounds were evaluated against MCF-7 (estrogen-dependent mammary adenocarcinoma), MDA-MB-231 (triple negative mammary adenocarcinoma), and MRC-5 (non-malignant human lung fibroblast) cells. The indium(III) complexes showed cytotoxic activity against breast tumor cells and an additive effect was observed by the combined treatment of the cells with the complexes and ionization radiation (chemotherapy with the In(III) complexes and radiotherapy with a ⁶⁰Co source).

Complex (4) and its analog (*4) exhibited higher cytotoxic activity than cisplatin against MCF-7 breast tumor cells at micromolar concentrations with feeble effects on MRC-5 non-malignant cells. The combined therapy using complex (4) at 1 μmolL^{-1} and radiation from a ^{60}Co source and 1 Gy resulted in an increased percentage of cell death in the MDA-MB-231 > MCF-7 > MRC-5 order. Hence, complex (4) could act as a potential radiosensitizer, by increasing the therapeutic efficacy of radiation.

Complexes (6) and (7) did not show cytotoxic activity against the three studied cell lineages whereas their radioactive analogs (*6) and (*7) were active at micromolar concentrations against MCF-7 cells. However, (*6), (*7) and cisplatin proved to be equally active against MRC-5 healthy cells. The combined therapy using radiation from a ^{60}Co source and complexes (6) or (7) resulted in increased efficacy against the tumor as well as against the non-malignant cells, suggesting that the compounds are not able to act as potential radiosensitizers.

Complex (8) at micromolar concentrations showed cytotoxic effects only against MCF-7 cells while its radioactive (*8) was active against both tumor cell lineages with therapeutic indexes $\text{TI}^1 = 7.7$ ($\text{IC}_{50} \text{MRC-5} / \text{IC}_{50} \text{MCF-7}$) e $\text{TI}^2 = 1.4$ ($\text{IC}_{50} \text{MRC-5} / \text{IC}_{50} \text{MDA-MB-231}$). Radiochemotherapy with (*8) resulted in an 11.14-fold decrease in IC_{50} against MCF-7 cells compared to the chemotherapy treatment with (8). Hence, complex (*8) could have potential applications in the radiochemotherapy of MCF-7 and MDA-MB-231 breast tumor cells.

Complexes (4) and (6) were able to function as DNA intercalating agents while (8) did not show intercalating capacity.

The present work constitutes an important contribution to the study of compounds with antineoplastic activity and to the development of therapeutic strategies to treat estrogen-positive and triple-negative breast tumors.

Keywords: *bis*(benzoylhydrazones); *bis*(semicarbazone); *bis*(thiosemicarbazone); In(III) complexes; $^{114\text{m}}\text{In}$ (III) complexes; cytotoxic activity; radio-sensitizing effects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Representação estrutural dos compostos a) subsalicilato de bismuto b) auranofina, c) nitroprussiato de sódio d) antimoniato de meglumina.....	25
Figura 1.2 Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	25
Figura 1.3. Radiofármaco ^{99m}Tc -MDP no processo de obtenção de imagem.....	28
Figura 1.4. Radiofármacos [^{18}F]FDG no processo de obtenção de imagem.....	28
Figura 1.5. Representação estrutural: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina.....	29
Figura 1.6. Representação estrutural: nedaplatina, heptaplatina, lobaplatina.....	29
Figura 1.7. Representação estrutural dos complexos KP46 e Maltolato de gálio.....	30
Figura 1.8. Interação da radiação ionizante com o DNA.....	31
Figura 1.9. Radiofármaco para diagnóstico ^{111}In -pentetroetida.....	33
Figura 1.10. Reação de formação da base de Schiff (R_1 e $\text{R}_2 = \text{H}$, alquil ou aril).....	35
Figura 1.11. Estrutura geral de a) hidrazonas; b) <i>N</i> -acilhidrazonas; c) hidrazonas derivadas de 2-formilpiridina ($\text{R}_1 = \text{H}$), 2-acetilpiridina ($\text{R}_1 = \text{CH}_3$), e 2-benzoilpiridina ($\text{R}_1 = \text{C}_6\text{H}_5$), R_2 : H, alquil ou aril.....	35
Figura 1.12. Complexos de gálio(III) com 2-acetilpiridina- e 2-benzoilpiridina-benzoilhidrazonas.....	36
Figura 1.13. 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (hidrazonas), $\text{R}_1 = \text{H}$ e $\text{R}_2 = \text{H}$, alquil, aril; 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (hidrazonas), $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ e $\text{R}_2 = \text{H}$, alquil, aril.....	36
Figura 1.14. Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) com derivados de 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazona).....	37
Figura 1.15. Complexos de cobalto(II) com 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (4-hidroxibenzoilhidrazona).....	37
Figura 1.16. Estrutura geral de a) tiossemicarbazonas; b) tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina ($\text{R}_1 = \text{H}$), 2-acetilpiridina ($\text{R}_1 = \text{CH}_3$) e 2-benzoilpiridina ($\text{R}_1 = \text{C}_6\text{H}_5$), R_2 : H, alquil, aril.....	38
Figura 1.17. Representação estrutural da Triapina.....	38
Figura 1.18. Complexos de estanho(IV) com derivados de tiossemicarbazonas.....	39
Figura 1.19. Tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, onde <i>o</i> , <i>m</i> e <i>p</i> representam <i>orto</i> , <i>meta</i> e <i>para</i>	40

Figura 1.20. Complexos de índio(III) com 2-acetilpiridina <i>N</i> (4)- <i>orto</i> -fluorofeniltiossemicarbazona (HL), a) [In(L)Cl ₂ (MeOH)] e b) [In(L)Cl ₂].....	41
Figura 1.21. a) <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) derivadas de 2,6-diformilpiridina (R ₁ = H) e 2,6-diacetilpiridina (R ₁ = CH ₃) e b) <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) contendo diferentes grupos (R ₁ a R ₆ : H, alquil, aril).....	41
Figura 1.22. Representação estrutural dos ligantes 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas), 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona).....	44
Esquema 2.1. Esquema de síntese das 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e seus derivados.....	49
Esquema 2.2. Esquema de síntese de 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona) (H ₂ -2,6AcSc) e 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona) (H ₂ -2,6AcTsc).....	49
Esquema 2.3. Esquema de síntese dos complexos de In(III).....	50
Figura 3.1.1. Representação estrutural para os complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas).....	56
Figura 3.1.2. Termograma do complexo [In(2,6AcpCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)] (3).....	57
Figura 3.1.3. Espectros de infravermelho do ligante H ₂ -2,6AcPh e seu complexo [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1).....	58
Figura 3.1.4. Numeração dos átomos nos complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) R = H, [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1), R = Cl, [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) e R = CH ₃ , [In(2,6AcpCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)] (3).....	59
Figura 3.1.5. Espectro de RMN de ¹ H do ligante H ₂ -2,6AcPh e do complexo (1).....	60
Figura 3.1.6. O espectro de RMN COSY do complexo (1).....	60
Figura 3.1.7. Espectros de RMN de ¹³ C { ¹ H} do ligante H ₂ -2,6AcPh e do complexo (1).....	62
Figura 3.1.8. O espectro de RMN HMQC do complexo (1).....	62
Figura 3.1.9. Unidade assimétrica, estrutura e numeração dos átomos nos monocristais a) [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1) e b) [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2).....	64
Figura 3.1.10. Representação da geometria de coordenação do In do complexo (2).....	64
Figura 3.1.11. Célula unitária dos cristais [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1) e b) [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) ao longo dos eixos a) <i>a</i> , b) <i>b</i> e c) <i>c</i>	66

Figura 3.1.12. Ligações de hidrogênio do tipo a) OH...O e OH...Cl e b) não convencionais do tipo CH...Cl e c) redes simplificadas das ligações de hidrogênio observadas nos empacotamentos cristalinos dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1) e b) [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2).....	68
Figura 3.1.13. Comportamento de soluções de 2 mmolL ⁻¹ dos ligantes e complexos (1), (2) e (3) em DMSO expostas a uma lâmpada UV ~365 nm.....	69
Figura 3.1.14. Espectros de absorção (linha contínua) e emissão (linha tracejada) em DMSO a 25 °C para complexo (2) e o ligante, na concentração de 5 µmolL ⁻¹	69
Figura 3.1.15. Espectros de excitação e de emissão do complexo (1) em DMSO e do padrão sulfato de quinina em H ₂ SO ₄ 0,5 molL ⁻¹	70
Figura 3.1.16. Gráficos de área de fluorescência integrada <i>versus</i> absorbância do complexo (1) e padrão sulfato de quinina. Pontos representam os dados experimentais e a linha pontilhada o ajuste teórico.....	71
Figura 3.1.17. Espectros eletrônicos em função do tempo, de [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) (direita) e do ligante H ₂ -2,6AcpClPh (esquerda) na concentração de 2 x 10 ⁻⁵ molL ⁻¹ em DMSO.....	73
Figura 3.1.18. Espectros eletrônicos em função do tempo, de [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) (direita) e do ligante H ₂ -2,6AcpClPh (esquerda) na concentração de 2 x 10 ⁻⁵ molL ⁻¹ em solução tampão Tris-HCl (NaCl 50mmolL ⁻¹ /Tris-HCl 5 mmolL ⁻¹ , pH 7,2) com 2% de DMSO.....	73
Figura 3.2.1. Representação estrutural para os complexos de In(III) com 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas).....	74
Figura 3.2.2. Termograma do complexo [In(2,6FopCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]·H ₂ O (6).....	75
Figura 3.2.3. Espectros de infravermelho do ligante H ₂ -2,6FoPh e seu complexo [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4).....	76
Figura 3.2.4. Numeração dos átomos nos complexos de In(III) com 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) R = H, [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4), R = Cl, [In(2,6FopClPh)Cl(H ₂ O)]·3H ₂ O (5) e R = CH ₃ , [In(2,6FopCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]·H ₂ O (6).....	77
Figura 3.2.5. Espectro de RMN de ¹ H do ligante H ₂ -2,6FopCH ₃ Ph e do complexo (6).....	78
Figura 3.2.6. O espectro de RMN COSY do complexo [In(2,6FopCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]·H ₂ O (6).....	78
Figura 3.2.7. Espectros de RMN de ¹³ C{ ¹ H} do ligante H ₂ -2,6FoPh e do complexo (4).....	80
Figura 3.2.8. O espectro de RMN HMQC do complexo [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4).....	80

Figura 3.2.9. Espectros de excitação e de emissão do complexo [In(2,6FopClPh)Cl(H ₂ O)]·3H ₂ O (5) em DMSO e do padrão sulfato de quinina em H ₂ SO ₄ 0,5 molL ⁻¹	82
Figura 3.2.10. Gráficos de área de fluorescência integrada <i>versus</i> absorbância do complexo (5) e padrão sulfato de quinina. Pontos representam os dados experimentais e a linha pontilhada o ajuste teórico.....	83
Figura 3.2.11. Espectros eletrônicos em função do tempo de [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4) (direita) e do ligante (esquerda) na concentração de 20 μmolL ⁻¹ em a) DMSO; b) solução tampão Tris-HCl (NaCl 50 mmolL ⁻¹ / Tris-HCl 5 mmolL ⁻¹ , pH7,2) com 2% de DMSO; c) H ₂ -2,6FoPh em solução tampão Tris-HCl com 2% de DMSO.....	85
Figura 3.2.12. Espectros eletrônicos a) em função do tempo de [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4) em solução tampão PBS com 2% de DMSO b) em solução tampão PBS com 2% de DMSO após irradiação gama.....	86
Figura 3.2.13. Diagrama de decaimento do isótopo radioativo a) ^{115m} In e b) ^{114m} In.....	87
Figura 3.2.14. Espectro de raios γ do complexo (*4).....	88
Figura 3.2.15. Perfis cromatográficos dos complexos radioativos. Pontos representam os dados experimentais.....	88
Figura 3.2.16. Porcentagem de sobrevivência das células tumorais MCF-7 em função da concentração. Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC ₅₀ .(n = 9).....	90
Figura 3.2.17. Efeito da monoterapia com radiação gama com Cobalto-60 em células MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).....	90
Figura 3.2.18. Efeito citotóxico induzido, pelo tratamento combinado com complexos (4) ou (6) com radiação gama (1 Gy, 3 Gy ou 6 Gy), nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).....	91
Figura 3.2.19. Células MCF-7 tratadas com os complexos [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4) e [In(2,6FopCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]·H ₂ O (6) e seus análogos radioativos (*4) e (*6) (10 μmol/L) no ensaio de coloração DAPI. As setas mostram as mudanças morfológicas. Amplificação: 400X.....	95

Figura 3.2.20. Espectros de emissão do sistema BE - DNA ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) na ausência (- -) e presença (-) de quantidades crescentes dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6) (0 a $200 \mu\text{molL}^{-1}$) (esquerda) e efeito da concentração dos complexos (4) e (6) sobre a intensidade da fluorescência do sistema BE-DNA (direita).....	96
Figura 3.3.1. Representação estrutural para os complexos de In(III) com (R = O) 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona) e (R=S) 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona).	97
Figura 3.3.2. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8).....	98
Figura 3.3.3. Espectros de infravermelho do ligante H_2 -2,6AcTsc e seu complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8).....	99
Figura 3.3.4. Numeração dos átomos nos complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona) $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) (R = O) e 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona) $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) (R = S).....	100
Figura 3.3.5. Espectro de RMN de ^1H do ligante H_2 -2,6AcSc e do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7).....	101
Figura 3.3.6. Espectro de RMN de ^1H dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8).....	101
Figura 3.3.7 Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante H_2 -2,6AcSc e do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7).....	103
Figura 3.3.8. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7).....	103
Figura 3.3.9. Espectros eletrônicos em função do tempo a) do complexo (7) (direita) e seu ligante (esquerda) b) do complexo (8) (direita) e seu ligante (esquerda) em solução tampão Tris-HCl na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{molL}^{-1}$ com 2% de DMSO, até 48h.....	104
Figura 3.3.10. Espectros eletrônicos em função do tempo do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) a) em solução tampão PBS com 2% de DMSO b) em solução tampão PBS com 2% de DMSO após irradiação gama.....	105
Figura 3.3.11. Perfis cromatográficos do $^*\text{InCl}_3$ e dos complexos radioativos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (*7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (*8). Pontos representam os dados experimentais.....	106

Figura 3.3.12. Porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração e doses de radiação do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8). Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC_{50} . (n = 9).....	108
Figura 3.3.13. Células MDA-MB-231 tratadas com os complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) e seus análogos radioativos (* 7) e (* 8) (10 $\mu\text{mol/L}$) no ensaio de coloração DAPI. As setas mostram as mudanças morfológicas. Amplificação: 400X..	112
Figura 3.3.14. Espectros eletrônicos de $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) na ausência e presença de concentrações crescentes de DNA..	113
Figura 3.3.15. Gráficos de $[\text{DNA}]$ vs. $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ dos ligantes $\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$, $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e seus complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8).....	114
Figura 3.3.16. Espectros de emissão do sistema BE-DNA (10 μmolL^{-1}) na ausência (- -) e presença (-) de quantidades crescentes de $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) (0 a 200 μmolL^{-1}).....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Atribuição de tipo de eletrólito para soluções de concentração 1,0 mmolL ⁻¹ ...	46
Tabela 3.1.1. Rendimento da reação, ponto de fusão ^a , análise elementar de CHN ^b , análise termogravimétrica ^b , massa molar e condutividade molar eletrolítica ^c dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1), [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) e [In(2,6AcpCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)] (3).....	57
Tabela 3.1.2. Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e dos complexos (1), (2) e (3).....	58
Tabela 3.1.3. Atribuições, número de hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (J/Hz) dos sinais de RMN de ¹ H das <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1), [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) e [In(2,6AcpCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)] (3). (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..	61
Tabela 3.1.4. Atribuições, DEPT 135, deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de ¹³ C{ ¹ H} das <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1), [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) e [In(2,6AcpCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)] (3). (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)..	63
Tabela 3.1.5. Dados cristalográficos do cristal dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1) e b) [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2).....	65
Tabela 3.1.6. Distâncias e ângulos de ligações nos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1) e b) [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2).....	67
Tabela 3.1.7. Ligações de hidrogênio observadas nos cristais dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1) e b) [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2).....	68
Tabela 3.1.8. Parâmetros espectroscópicos dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)] (1), [In(2,6AcpClPh)Cl(H ₂ O)] (2) e [In(2,6AcpCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)] (3) em DMSO.....	71
Tabela 3.2.1. Rendimento da reação, ponto de fusão ^a , análise elementar de CHN ^b , análise termogravimétrica ^b , massa molar e condutividade molar eletrolítica ^c dos complexos [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4), [In(2,6FopClPh)Cl(H ₂ O)]·3H ₂ O (5) e [In(2,6FopCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]·H ₂ O (6).....	75
Tabela 3.2.2. Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e dos complexos [In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)] (4), [In(2,6FopClPh)Cl(H ₂ O)]·3H ₂ O (5) e [In(2,6FopCH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]·H ₂ O (6).....	76

Tabela 3.2.3. Atribuições, número de hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (J/Hz) dos sinais de RMN de ^1H das <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6). (400 MHz, DMSO- d_6).....	79
Tabela 3.2.4. Atribuições, DEPT 135, deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ das <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6). (100 MHz, DMSO- d_6).....	81
Tabela 3.2.5. Parâmetros espectroscópicos dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6) em DMSO..	83
Tabela 3.2.6. Características isotópicas de $^{114\text{m}}\text{In}$ e $^{115\text{m}}\text{In}$	87
Tabela 3.2.7. Atividade citotóxica (IC_{50}) e Índice de seletividade (IS) do sal InCl_3 e dos complexos (4) e (6), e seus análogo radioativo $^*\text{InCl}_3$, (*4) e (*6) frente às linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).....	89
Tabela 3.2.8. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada frente a células MCF-7, e MRC-5 em função da concentração dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6). (n = 9).....	92
Tabela 3.2.9. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada frente a células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6). (n = 9).....	92
Tabela 3.2.10. Porcentagem de sobrevivência das células MCF-7 e MRC-5 em função da concentração dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia $^{114\text{m}}\text{In}$ e terapia combinada. (n = 9).....	94
Tabela 3.2.11. Porcentagem de sobrevivência das células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia $^{114\text{m}}\text{In}$ e terapia combinada. (n = 9).....	94
Tabela 3.2.12. Concentração do composto que promove uma redução de 50% na intensidade de fluorescência (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6).....	96

Tabela 3.3.1. Rendimento da reação, ponto de fusão ^a , análise elementar de CHN ^b , análise termogravimétrica ^b , massa molar e condutividade molar eletrolítica ^c dos complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8).....	98
Tabela 3.3.2. Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) de H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8)...	100
Tabela 3.3.3. Atribuições, número de hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (J/Hz) dos sinais de RMN de ¹ H dos ligantes H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8). (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	102
Tabela 3.3.4. Atribuições, DEPT 135, deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de ¹³ C{ ¹ H} dos ligantes H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8).....	102
Tabela 3.3.5. Atividade citotóxica (IC ₅₀) e Índice de seletividade (IS) do sal InCl ₃ dos ligantes H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8) e seus análogo radioativo [*] InCl ₃ , (*7) e (*8) frente às linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).....	107
Tabela 3.3.6. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada das células MCF-7 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8). (n = 9).....	109
Tabela 3.3.7. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada das células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8). (n = 9).....	109
Tabela 3.3.8. % de sobrevivência das células MCF-7 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia (^{114m} In) e terapia combinada. (n = 9).....	111
Tabela 3.3.9. % de sobrevivência das células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H ₂ -2,6AcSc, H ₂ -2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia (^{114m} In) e terapia combinada. (n = 9).....	111
Tabela 3.3.10. Constante de ligação intrínseca (K _b) do ligante H ₂ -2,6AcTsc e seu complexo [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8).....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BE	Brometo de etídio.
Bq	Becquerel
COSY	Correlation Spectroscopy
CPM	Contagens por minuto
C ₅₀	Concentração do composto que promove uma redução de 50% na intensidade de fluorescência
DAPI	4',6-diamidina-2'-fenilindol
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DTA	Differential thermal analysis (Análise Térmica Diferencial)
DrTGA	Derivative thermo-gravimetry (Termogravimetria Derivada)
EC	Electron capture (Captura de elétrons)
eV	Elétron-volt
FP	Fator de potencialização
Gy	Gray
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPGe	High purity germanium detector
IC ₅₀	Concentração inibitória do desenvolvimento de 50 % dos indivíduos
IS	Índice de seletividade
IT	Isomeric Transition (Transição isomérica)
IV	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho
K _{app}	Constantes de ligação aparente
Kb	Constante de ligação intrínseca
LET	Linear energy transfer (Transferência linear de energia)
MCF-7	Linhagem de células de adenocarcinoma de mama estrógeno dependente
MDA-MB-231	Linhagem de células de adenocarcinoma de mama estrógeno independente
MRC-5	Linhagem de células de fibroblasto de pulmão de feto humano

MTT	3-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2il)-2,5-difenil-2H-3-tetrazólio
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato)
PET	Positron emission tomography (tomografia por emissão de pósitrons)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	Soro fetal bovino
SPECT	Single-photon emission computed tomography
T _{1/2}	Tempo de meia-vida
TGA	Thermal gravimetric analysis (Termogravimetria)
TLC	Thin layer chromatography (Cromatografia em camada delgada)
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta e Visível
Φ _F	Rendimento quântico

H ₂ -2,6AcPh	2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazona)
[In(2,6AcPh)Cl(H ₂ O)]	(1)
H ₂ -2,6Ac _p ClPh	2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (<i>para</i> -cloro-benzoilhidrazona)
[In(2,6Ac _p ClPh)Cl(H ₂ O)]	(2)
H ₂ -2,6Ac _p CH ₃ Ph	2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (<i>para</i> -toluil-benzoilhidrazona)
[In(2,6Ac _p CH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]	(3)
H ₂ -2,6FoPh	2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas)
[In(2,6FoPh)Cl(H ₂ O)]	(4)
H ₂ -2,6Fo _p ClPh	2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (<i>para</i> -cloro-benzoilhidrazona)
[In(2,6Fo _p ClPh)Cl(H ₂ O)]·3H ₂ O	(5)
H ₂ -2,6Fo _p CH ₃ Ph	2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (<i>para</i> -toluil-benzoilhidrazona)
[In(2,6Fo _p CH ₃ Ph)Cl(H ₂ O)]·H ₂ O	(6)
H ₂ -2,6AcSc	2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona)
[In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)]	(7)
H ₂ -2,6AcTsc	2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona)
[In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)]	(8)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Química Medicinal e Química Medicinal Inorgânica.....	24
1.2. Diagnostico e terapia do câncer.....	26
1.2.1 Câncer de mama.....	26
1.2.2 Radiofármacos para diagnóstico.....	27
1.2.3 Complexos metálicos para quimioterapia do câncer.....	29
1.2.4 Radioterapia no tratamento do câncer.....	30
1.3. Complexos de índio(III) como agentes de diagnóstico e potenciais agentes terapêuticos.....	32
1.4 Bases de Schiff como agentes quimioterapêuticos.....	35
1.4.1 Hidrazonas e <i>bis</i> (hidrazonas) como ligantes para complexos metálicos bioativos.....	35
1.4.2 Tiossemicarbazonas e <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) como ligantes para complexos metálicos bioativos.....	38
1.5 Objetivos do presente trabalho.....	43
1.5.1 Objetivo geral.....	43
1.5.2 Objetivos específicos.....	43
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
2.1. Materiais, equipamentos e procedimentos.....	45
2.1.1. Reagentes e solventes.....	45
2.1.2. Pesagens.....	45
2.1.3. Temperaturas de fusão.....	45
2.1.4. Análise elementar.....	45
2.1.5. Análises termogravimétricas (TG)	45
2.1.6. Análises Condutimétricas.....	45
2.1.7. Espectroscopia de infravermelho.....	46
2.1.8. Espectroscopia eletrônica.....	46
2.1.9. Espectroscopia de fluorescência e determinação de rendimento quântico (ΦF).....	46
2.1.10. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	47
2.1.11. Determinação de estruturas por Difração de Raios X.....	47
2.2. Sínteses de ligantes e complexos.....	48

2.2.1. Síntese dos ligantes 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas) e sus derivados.....	48
2.2.2. Síntese dos ligantes 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona)	49
2.2.3. Sínteses dos complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas), 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona).....	50
2.3. Ativação neutrônica dos complexos de In(III).....	50
2.3.1. Espectrometria de raios γ	51
2.3.2. Controle de qualidade dos compostos de índio após ativação neutrônica.....	51
2.4. Ensaio biológicos.....	52
2.4.1. Linhagem celulares e condições de cultura.....	52
2.4.2. Avaliação da atividade citotóxica.....	52
2.4.3. Avaliação morfológica e alterações do DNA cromossomal induzidas pelos tratamentos.....	54
2.4.4. Análises estatísticas.....	54
2.5. Estudos de interação com ácido desoxirribonucleico (DNA).....	55
2.5.1. Determinação da constante de ligação por espectrometria eletrônica.....	55
2.5.2. Determinação da constante de ligação por fluorescência.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1. Estudos estruturais e espectrais de complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina-<i>bis</i>(benzoilhidrazonas).....	56
3.1.1. Análises.....	56
3.1.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)	57
3.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	59
3.1.4. Cristalografia de raios X.....	64
3.1.5. Estudo de fluorescência dos complexos (1-3).....	69
3.1.6. Estudos de estabilidade dos complexos em solução.....	72
3.2. Complexos de In(III) e $^{114m}\text{In(III)}$ com 2,6-diformilpiridina-<i>bis</i>(benzoilhidrazonas): estudos de atividade citotóxica contra células tumorais e de efeitos combinados de quimioterapia e radioterapia.....	74
3.2.1. Análises.....	74
3.2.2. Espectroscopia no infravermelho (IV).....	75

3.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	77
3.2.4. Estudo de fluorescência dos complexos (4-6).....	82
3.2.5. Estudos de estabilidade dos complexos em solução.....	84
3.2.6. Ativação neutrônica dos complexos de In(III).....	86
3.2.7. Avaliação das atividades citotóxicas complexos de In(III) com 2,6-diformilpiridina- <i>bis</i> (benzoilhidrazonas).....	89
3.2.8. Alterações morfológicas no núcleo celular.....	95
3.2.9. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA).....	95
3.3 Complexos de In(III) e ^{114m}In(III) com 2,6-diacetilpiridina-<i>bis</i>(semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina-<i>bis</i>(tiossemicarbazona): estudos de atividade citotóxica contra células tumorais e de efeitos combinados de quimioterapia e radioterapia.....	97
3.3.1. Análises.....	97
3.3.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)	98
3.3.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	100
3.3.4. Estudos de estabilidade dos complexos em solução.....	104
3.3.5. Ativação neutrônica dos complexos de In(III).....	105
3.3.6. Avaliação das atividades citotóxicas dos complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (semicarbazona), [In(2,6AcSc)Cl(H ₂ O)] (7) e 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (tiossemicarbazona), [In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8).....	106
3.3.7. Alterações morfológicas no núcleo celular.....	112
3.3.8. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA).....	112
4. CONCLUSÕES.....	116
Apêndice A.....	119
Apêndice B.....	145
Apêndice C.....	149
Apêndice D.....	153
Apêndice E.....	154
Apêndice F.....	155

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química Medicinal e Química Medicinal Inorgânica

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a química medicinal é uma disciplina baseada em química, envolvendo também aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas. Está relacionada com a invenção, descoberta, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo de seu metabolismo, a interpretação de seu modo de ação no nível molecular e a construção de relações estruturais. ¹

O uso de metais na medicina remonta-se a civilizações antigas. O ouro era utilizado por volta de 3500 A.C. como agente terapêutico por chineses e árabes, o cobre era usado por egípcios desde 3000 A.C. para esterilizar a água, e fármacos à base de ferro eram usados desde 1500 A.C. no Egito. ² Na era renascentista o cloreto de mercúrio era usado como diurético e nos últimos 100 anos compostos de ouro, como $K[Au(CN)_2]$, foram usados para o tratamento de tuberculose e compostos de antimônio foram usados para o tratamento de leishmaniose. ³

Após a descoberta das propriedades antitumorais do *cis*[diaminodicloridoplatina(II)], conhecido como cisplatina em 1965 por Barnett Rosenberg ⁴, a Química Inorgânica tem dado importantes contribuições à Química Medicinal no desenvolvimento de compostos inorgânicos como potenciais agentes terapêuticos e de diagnóstico. ⁵

Vários compostos inorgânicos são usados na clínica, tais como compostos de bismuto empregados no tratamento de infecções bacterianas, ⁶ o nitroprussiato de sódio, um complexo de ferro empregado nas emergências hipertensivas, ⁷ a auranofina [(2,3,4,6-tetra-*o*-acetil- β -1-D-tiopiranosato-*S*)ouro(I)], que foi usada no tratamento de artrite reumatoide, ⁸ e complexos de antimônio, usados no tratamento de leishmanioses ⁹ (Figura 1.1).

¹ D. Wermuth, Camille Georges Aldous, David Raboisson, Pierre Rognan, Practice of Medicinal Chemistry (4th Edition) - Knovel, Elsevier, San Diego, 2015.

² L.N. Magner, O.J. Kim, A History of Medicine, CRC Press, 2017.

³ E.J. Baran, Metalofármacos: una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina, An. Acad. Nac. Cs. Ex., Fís. y Nat., Tomo. 66 (2014) 5–21.

⁴ B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, Nature. 205 (1965) 698–699.

⁵ T. Storr, K.H. Thompson, C. Orvig, Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry, Chem. Soc. Rev. 35 (2006) 534–544.

⁶ H. Li, H. Sun, Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth, Curr. Opin. Chem. Biol. 16 (2012) 74–83.

⁷ K.D. Mjos, C. Orvig, Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry, Chem. Rev. 114 (2014) 4540–4563.

⁸ A.G. Cox, K.K. Brown, E.S.J. Arner, M.B. Hampton, The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation, Biochem. Pharmacol. 76 (2008) 1097–1109.

⁹ E.R.T. Tiekink, Antimony and bismuth compounds in oncology, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42 (2002) 217–224.

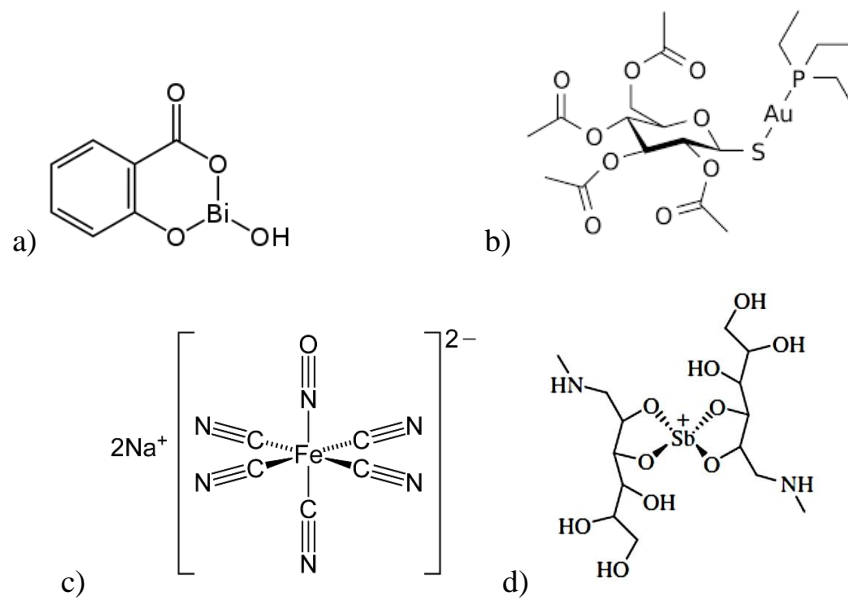


Figura 1.1. Representação estrutural dos compostos a) subsalicilato de bismuto b) auranofina, c) nitroprussiato de sódio d) antimoniato de meglumina.

1.2. Diagnóstico e terapia do câncer

Atualmente, o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. De acordo com Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o Brasil, a estimativa é de que no triênio 2023-2025 ocorrerão 704 mil casos novos de câncer. Nos países com maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), observa-se diminuição nas taxas de incidência e mortalidade por câncer, por meio de ações de prevenção, detecção precoce e tratamento. No entanto, nos países de médio ou baixo IDH, essas taxas seguem aumentando ou, no máximo, mantendo-se estáveis.¹⁰

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no Brasil para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.¹⁰

¹⁰ INCA, Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. (2022)

1.2.1. Câncer de mama

Nas mulheres, o câncer de mama é de maior incidência, com 2,3 milhões (24,5%) de casos novos no mundo. As taxas ajustadas de incidência de câncer de mama são as maiores tanto em países com alto IDH (55,9 por 100 mil) quanto naqueles com baixo ou médio IDH (29,7 por 100 mil).¹¹

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com grande variação em suas características morfológicas e moleculares. A classificação é determinada basicamente em três grupos terapêuticos: o grupo positivo para receptor de estrógeno (ER); o grupo positivo para receptor de progesterona (PR) e grupo positivo para receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2, do inglês Human Epidermal Growth Factor Receptor).¹²

Dessa forma, os tumores de mama podem ser estratificados em quatro subtipos:¹³

1. Luminal A (ER+, PR+, HER2-): tumor com células tumorais bem diferenciadas. Tendem a ter crescimento lento e são bem pouco agressivos.
2. Luminal B (ER+, PR+, HER2+): taxa de crescimento e agressividade mais elevados do que no Luminal A.
3. HER2 (ER-, PR-, HER2+): considerado hormônio negativo por não ter expressão de ER e PR, podem ser tratados com a utilização de terapia específica anti-HER2.
4. Basal (ER-, PR-, HER2 -): também chamado de Triplo-negativo (TN), na ausência dos três receptores, é um dos subtipos que tem um prognóstico ruim devido às opções limitadas de tratamento farmacológico, e por não ser passível de terapia hormonal, já que não apresenta expressão dos alvos terapêuticos. São altamente agressivos e de difícil tratamento.

Existem diversos tipos de tratamento indicados para combater o câncer de mama. As modalidades terapêuticas são a cirurgia e a radioterapia, para tratamento local e a quimioterapia e a hormonioterapia para tratamento sistêmico. A escolha do tratamento depende do estágio da doença, do tipo de câncer e do aparecimento de metástase ou não.¹⁴

¹¹ H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA. Cancer J. Clin. 71 (2021) 209–249.

¹² D.C. Koboldt, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, Nature. 490 (2012) 61–70.

¹³ X. Dai, L. Xiang, T. Li, Z. Bai, Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes, J. Cancer. 7 (2016) 1281–1294.

¹⁴ T. Moo, R. Sanford, C. Dang, M. Morrow, Overview of Breast Cancer Therapy, PET Clin. 13 (2018) 339–354.

Cirurgia: Tem por objetivo a retirada do tumor e existem vários tipos de cirurgia. Na cirurgia conservadora, a tumorectomia remove apenas o tumor e a setorectomia remove o tumor com margens de ressecção. Na cirurgia não conservadora temos diferentes tipos como: a adenomastectomia subcutânea retira a glândula mamária, a quadrantectomia retira apenas as partes da mama em que há presença de tumor, a mastectomia radical retira a mama por completo e a mastectomia modificada retira a mama, assim como os gânglios linfáticos e o tecido que reveste os músculos peitorais. As cirurgias não conservadoras são geralmente acompanhadas da retirada de nódulos linfáticos das axilas (linfonodos).

Radioterapia: Após cirurgia, deve-se irradiar toda a mama utilizando radiação ionizante com o objetivo de eliminar ou impedir a propagação das células que formam o câncer. Esta terapia diminui em 50% o risco de recorrência quando comparada à realização de cirurgia apenas.

Quimioterapia: Consiste na administração de medicamentos (antineoplásicos) com a função de impedir o crescimento desordenado das células anormais, diminuir o risco de recorrência e de doença metastática. Os medicamentos antineoplásicos são agrupados em categorias: agentes alquilantes, antimetabólitos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, enzimas, hormônios e modificadores da resposta biológica.

Hormonioterapia: Consiste na elevação ou redução da concentração de determinados hormônios. Empregada em certos cânceres de mama com receptor hormonal positivo, que precisam de estrogênio. Em cânceres de mama que precisam de estrogênio para crescer (receptor de estrogênio positivo, ER+) é administrado o medicamento Tamoxifeno, droga antiestrogênica que bloqueia os efeitos do estrogênio e pode causar a diminuição do volume do câncer.

1.2.2. Radiofármacos para diagnóstico

Os radiofármacos são amplamente empregados na Medicina Nuclear como agentes de contraste no diagnóstico por imagem e tratamento de doenças pelas radiações que emitem. Sua estrutura é composta por um carregador ou ligante não radioativo que direciona o composto ao órgão de interesse e um elemento radioativo (radionuclídeo).

Para o diagnóstico por imagem utilizando radiofármacos existem três técnicas: cintilografia planar, tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET). A cintilografia planar e a SPECT utilizam radionuclídeos emissores de radiação gama (γ) como: Tecnécio-99m (^{99m}Tc - $T_{1/2}$ de 6,0 h); Iodo-123 (^{123}I - $T_{1/2}$ de 13,0 h); Índio-111 (^{111}In - $T_{1/2}$ de 67,3 h); Tálcio-201 (^{201}Tl - $T_{1/2}$ de 73,0

h) e Gálio-67 (^{67}Ga - $T_{1/2}$ de 78,3 h). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ atualmente é o radionuclídeo utilizado em cerca de 80% dos exames realizados em hospitais e clínicas ao redor do mundo, pois apresenta propriedades físicas e químicas favoráveis, como: a meia-vida curta e a possibilidade de o metal atingir vários estados de oxidação e de coordenação, dando origem a diferentes radiofármacos.¹⁵ Dentre os radiofármacos utilizados para imagem, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - Metileno difosfonato (MDP) (Figura 1.3), é empregado em cintilografia óssea. Esta técnica produz uma imagem cintilográfica, que mostra as emissões de radiação γ no corpo do paciente e são registradas pelas câmeras à cintilação.

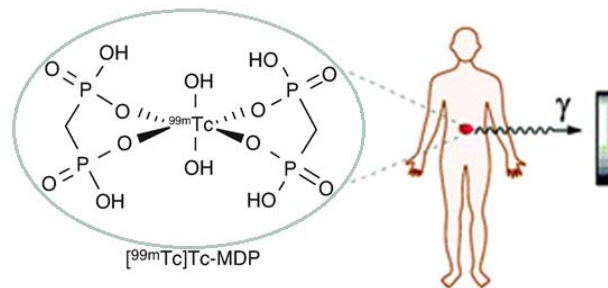


Figura 1.3. Radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP no processo de obtenção de imagem.

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) utiliza radionuclídeos emissores de pósitrons (β^+) como: Oxigênio-15 (^{15}O - $T_{1/2}$ de 2,0 min.); Nitrogênio-13 (^{13}N - $T_{1/2}$ de 9,9 min.); Carbono-11 (^{11}C - $T_{1/2}$ de 20,4 min.); Gálio-68 (^{68}Ga - $T_{1/2}$ de 67,7 min.); Flúor-18 (^{18}F - $T_{1/2}$ de 109,7 min.) e o Cobre-64 (^{64}Cu - $T_{1/2}$ de 12,7 horas). Os pósitrons reagem instantaneamente com elétrons, emitindo dois feixes de radiação, em direções perpendicularmente opostas, com energia de 511 keV, os quais são detetados em detectores arranjados em um anel (Figura 1.4). O radiofármaco mais utilizado nesta categoria é a ^{18}F fluorodeoxiglicose (^{18}F FDG) um análogo da glicose que permite detetar e mensurar a atividade glicolítica nas células.¹⁶

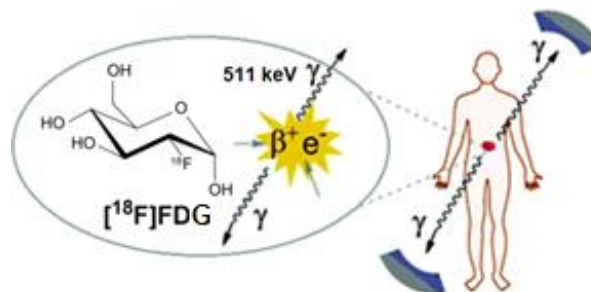


Figura 1.4. Radiofármacos ^{18}F FDG no processo de obtenção de imagem.

¹⁵ D. Papagiannopoulou, Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 60 (2017) 502–520.

¹⁶ V. Bouvet, H.S. Jans, M. Wuest, O.-M. Soueidan, T. Grant, J. Mercer, A.J. McEwan, F.G. West, C.I. Cheeseman, F. Wuest, Automated synthesis and dosimetry of 6-deoxy-6- ^{18}F fluoro-D-fructose (6- ^{18}F FDF): a radiotracer for imaging of GLUT5 in breast cancer., *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 4 (2014) 248–24859.

1.2.3. Complexos metálicos para quimioterapia do câncer

Na atualidade a cisplatina, representada na Figura 1.5, é o composto inorgânico majoritariamente usado na clínica por ser altamente eficaz para o tratamento de câncer de testículo e ovários. No entanto, a solubilidade limitada e os efeitos adversos associados à toxicidade severa, limitam a dose administrada ao paciente e alguns tumores apresentaram resistência natural ou resistência adquirida após o tratamento.¹⁷ Assim outros fármacos baseados em platina(II), como a carboplatina [cis-diamino-(1,1-ciclobutanocarboxilato)platina(II)] e oxaliplatina [1,2-ciclohexanodiamino-(oxalato)platina(II)], representados na Figura 1.5, foram desenvolvidos e aprovados mundialmente.¹⁸

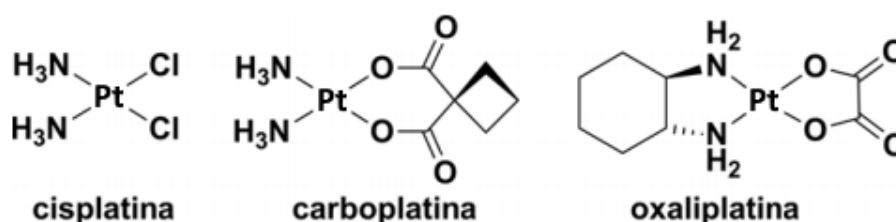


Figura 1.5. Representação estrutural: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina.

Na busca por novos agentes quimioterapêuticos contendo platina(II), a nedaplatina foi desenvolvida e aprovada unicamente no Japão, utilizada em combinação com outros fármacos, a heptaplatina foi aprovada na Coreia para tratamento de câncer gástrico e a lobaplatina foi aprovada na China para o tratamento de leucemia, câncer de pulmão e câncer de mama¹⁸ (Figura 1.6).

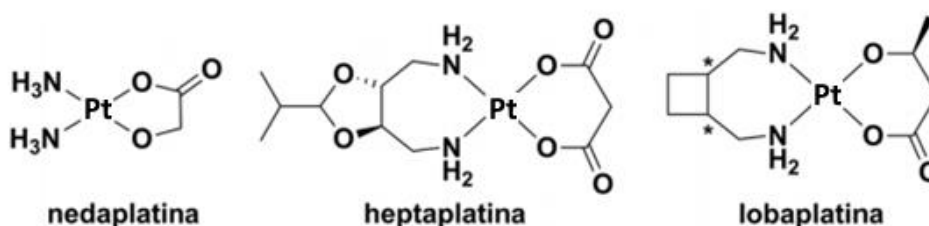


Figura 1.6. Representação estrutural: nedaplatina, heptaplatina, lobaplatina.

Atualmente, o gálio é o segundo metal utilizado no tratamento de câncer, depois da platina. Utilizado geralmente na forma de nitrato de gálio(III), foi aprovado unicamente para

¹⁷ E. Wong, C.M. Giandornenico, Current status of platinum-based antitumor drugs, Chem. Rev. 99 (1999) 2451–2466.

¹⁸ T.C. Johnstone, K. Suntharalingam, S.J. Lippard, The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs, Chem. Rev. 116 (2016) 3436–3486.

tratamentos de hipercalcemia severa (níveis altos de cálcio no sangue) e metástases ósseas relacionada ao câncer. Estudos clínicos também sugeriram que o nitrato de gálio(III) pode ser usado em outras doenças associadas à perda óssea acelerada, incluindo mieloma múltiplo, doença de Paget, osteoporose e no tratamento de melanoma metastático.¹⁹

Além disso, complexos de gálio(III) têm sido desenvolvidos como fármacos para administração oral, melhorando a biodisponibilidade e citotoxicidade frente a células tumorais (Figura 1.7). O *tris*(8-quinolinolato)gálio(III), conhecido por KP46, concluiu os ensaios de fase I, com o resultado de tolerabilidade promissora e evidência de atividade clínica no carcinoma de células renais, e encontra-se em fase clínica II.²⁰ O maltolato de gálio, encontra-se em fase clínica I, e mostrou-se promissor para o tratamento do carcinoma hepatocelular.^{21,22}

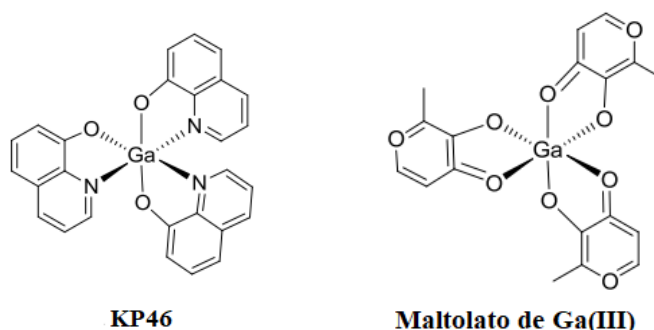


Figura 1.7. Representação estrutural dos complexos KP46 e Maltolato de gálio.

1.2.4. Radioterapia no tratamento do câncer

A radioterapia é um tratamento no qual se utilizam radiações ionizantes para destruir ou impedir que células do tumor se multipliquem e assim alcançar um índice terapêutico favorável. O mecanismo de ação consiste na danificação do DNA por meio da ação direta, onde a radiação interage diretamente com a molécula de DNA promovendo a ionização da mesma, que resulta na quebra das fitas duplas contendo as bases nitrogenadas, ou por meio da ação indireta, mediante a interação da radiação com as moléculas de água presentes nas células formando radicais livres que irão interagir quimicamente com o DNA²³ (Figura 1.8).

¹⁹ R. Bockman, The effects of gallium nitrate on bone resorption., *Semin. Oncol.* 30 (2003) 5–12.

²⁰ N.L. Wilke, L.O. Abodo, C. Frias, J. Frias, J. Baas, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, A. Prokop, The gallium complex KP46 sensitizes resistant leukemia cells and overcomes Bcl-2-induced multidrug resistance in lymphoma cells via upregulation of Harakiri and downregulation of XIAP in vitro, *Biomed. Pharmacother.* 156 (2022) 113974.

²¹ P. Mikuš, M. Melník, A. Forgáčsová, D. Krajčiová, E. Havránek, Gallium compounds in nuclear medicine and oncology, *Main Gr. Met. Chem.* 37 (2014) 53–65.

²² Oral Gallium Maltolate for the Treatment of Relapsed and Refractory Glioblastoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04319276> [28/05/2023]

²³ Brasil. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente. Comissão Assessora de Radiofarmácia, Radiofarmácia, 2019.

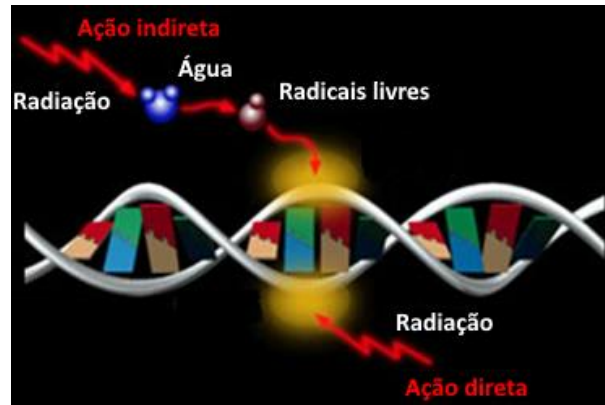


Figura 1.8. Interação da radiação ionizante com o DNA.

Radioterapia externa ou teleterapia: Conhecida como radioterapia convencional, quando a fonte emissora de radiação fica afastada do paciente. Os feixes externos penetram nos tecidos, sendo então possível sua aplicabilidade em tecidos mais profundos. Os principais equipamentos utilizados atualmente em teleterapia são as fontes de ^{60}Co e os aceleradores lineares.

Radioterapia interna: A radioterapia interna é um tratamento no qual os radionuclídeos são colocados dentro do corpo na forma sólida ou líquida. A radioterapia interna na forma sólida é chamada de braquiterapia, tratamento que utiliza fontes radioativas em contato direto com o tumor. A radioterapia interna na forma líquida é chamada de terapia sistêmica, tratamento que utiliza radionuclídeos administrados sozinhos ou associados a um fármaco direcionador. São utilizados na terapia pela emissão da radiação ionizante de um radionuclídeo e a transferência linear de energia (LET) de partículas α , partículas β^- ou elétrons Auger sobre o tecido ou órgão alvo, expressa em quiloeltronvolts por milímetro de comprimento do tecido (keV/mm). Esta interação permite curar, mitigar ou controlar um processo patológico.²⁴

1. Radionuclídeo emissores de partículas β^- apresentam baixa LET ($\sim 0,2$ keV/mm) e um alcance de 0,05-12 mm no tecido. Atualmente são utilizados na clínica: Lutécio-177 (^{177}Lu - $T_{1/2}$ de 64,0 h); Samário-153 (^{153}Sm - $T_{1/2}$ de 48,0 h); Ítrio-90 (^{90}Y - $T_{1/2}$ de 67,9 h); Rênio-186 (^{186}Re - $T_{1/2}$ de 73,0 h) e o Iodo-131 (^{131}I - $T_{1/2}$ de 8,0 dias). O ^{131}I – iodeto de sódio é amplamente utilizado no tratamento de hipertireoidismo e carcinoma papilar e o ^{131}I -Metaiodobenzilguanidina (MIBG) no tratamento de tumores neuroendócrinos como neuroblastomas e feocromocitomas.

²⁴ T. Moo, R. Sanford, C. Dang, M. Morrow, Overview of Breast Cancer Therapy, PET Clin. 13 (2018) 339–354.

2. Radionuclídeos emissores de partículas α , que são partículas mais pesadas (^4He) apresentam curto alcance, de 40-100 μm no tecido, com LET de 80 keV/mm.²⁵ São utilizados na clínica: Bismuto-212 (^{212}Bi - $T_{1/2}$ de 1,0 h); Bismuto-213 (^{213}Bi - $T_{1/2}$ de 0,76 h) e o Rádio-223 (^{223}Ra - $T_{1/2}$ de 11,4 dias) para tratamento de tumores pequenos.
3. Os emissores de elétrons Auger possuem baixas energias (eV - keV) e apresentam curto alcance, de 2-500 nm no tecido, com LET de 4 - 26 keV/mm o que os torna altamente eficazes. Quando se encontram situados no citoplasma celular interagem diretamente com o DNA, minimizando a probabilidade de danificar as células circundantes.²⁶ Ainda não existem radiofármacos comercializados emissores de elétrons *Auger*.

Terapia combinada (radioterapia e quimioterapia): utilização de radiação ionizante combinada a fármacos (quimioterapia), que podem reduzir o efeito da radiação (radioprotetores), ou aumentar o efeito das radiações ionizantes (radiossensibilizadores). Compostos radiossensibilizadores tornam as células mais sensíveis aos efeitos da radioterapia, melhorando o prognóstico de pacientes com tumores radio-resistentes.

1.3. Complexos de índio(III) como agentes de diagnóstico e potenciais agentes terapêuticos

O índio é um elemento químico do grupo 13 da tabela periódica, com configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2 5p^1$, e com estado de oxidação mais prevalente +3. Composto por um isótopo estável ^{113}In , com uma abundância de 4,28% e um isótopo debilmente radioativo ^{115}In com uma abundância de 95,72% e $T_{1/2}$ de 441 bilhões de anos.²⁷

O Índio-111 (^{111}In - $T_{1/2}$ de 2,8 dias) é um radionuclídeo produzido artificialmente por acelerador de partículas (ciclotron) pela reação nuclear $^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$, e decai por captura eletrônica com emissão de elétrons *Auger*, (interessante para abordagens terapêuticas) e radiação γ de 171,3 keV e 245,4 keV.²⁸ Atualmente é usado em cintilografia SPECT para diagnóstico de tumores neuroendócrinos (NETs).

Os radiofármacos usados clinicamente são: ^{111}In -pentetrotida (OctreoScan®) (Figura 1.9), na detecção de tumores neuroendócrinos e metástases; ^{111}In -satumomabe pentetida

²⁵ K.E. Baidoo, K. Yong, M.W. Brechbiel, Molecular pathways: Targeted α - Particle radiation therapy, Clin. Cancer Res. 19 (2013) 530–537.

²⁶ C.F. Ramogida, C. Orvig, Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy, Chem. Commun. 49 (2013) 4720–4739.

²⁷ Atomic Weight of Indium | Commission on Isotopic Abundances and Atomic Weights. <https://www.ciaaw.org/indium.htm> [07/07/2022].

²⁸ S. Lahiri, M. Maiti, K. Ghosh, Production and separation of ^{111}In : An important radionuclide in life sciences: A mini review, J. Radioanal. Nucl. Chem. 297 (2013) 309–318.

(OncoScint CR/OV®), na localização de tumor colorretal e dos ovários; ^{111}In -capromabe pendetida (ProstaScint®), nas detecções de tumores primários da próstata; e ^{111}In -imciromabe pendetida (MyoScint®), para detecção de áreas necrosadas no enfarte do miocárdio.²⁹

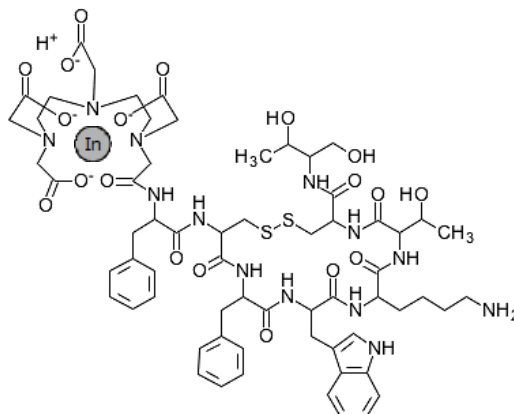


Figura 1.9. Radiofármaco para diagnóstico ^{111}In -pentetreotida.

Além do diagnóstico por imagem, radiofármacos de ^{111}In potencialmente podem ser usados na terapia do câncer através da emissão de elétrons *Auger*, uma vez que possuem uma curta faixa de penetração no tecido, danificando o DNA e produzindo morte celular, sendo potenciais agentes teranósticos. Recentemente, complexos não radioativos de índio(III) têm sido estudados por suas potenciais aplicações na terapia do câncer. Serão descritos brevemente alguns estudos realizados desde 2005 até a atualidade,³⁰ listados abaixo:

1. Complexos na forma InL_3 derivados de curcumina (CUR) e diacetil-curcumina (DAC) demonstraram ação citotóxica frente a células de linfoma de camundongo. O complexo $[\text{In}(\text{CUR})_3]$ apresentou maior toxicidade em relação aos ligantes.³¹
2. O complexo de meso-tetrafenilporfirina de cloroíndio(III) (TPPIn-Cl) e seus derivados (TPPIn-X) (X= fenol e derivados) foram testados frente a células de câncer de mama (MCF-7), câncer de próstata (PC-3) e câncer de pulmão (A549), apresentando maior ação citotóxica frente a células de câncer de pulmão e próstata.³²

²⁹ R. Oliveira, D. Santos, D. Ferreira, P. Coelho, F. Veiga, Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações, Brazilian J. Pharm. Sci. 42 (2006) 151–165.

³⁰ H. Beraldo, Pharmacological applications of non-radioactive indium(III) complexes: A field yet to be explored, Coord. Chem. Rev. 419 (2020) 1–9.

³¹ K. Mohammadi, K.H. Thompson, B.O. Patrick, T. Storr, C. Martins, E. Polishchuk, V.G. Yuen, J.H. McNeill, C. Orvig, Synthesis and characterization of dual function vanadyl, gallium and indium curcumin complexes for medicinal applications, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 2217–2225.

³² G.D. Bajju, A. Ahmed, D. Gupta, A. Kapahi, G. Devi, Synthesis and Spectroscopic Characterization of Some New Axially Ligated Indium(III) Macrocyclic Complexes and Their Biological Activities., Bioinorg. Chem. Appl. 2014 (2014) 865407.

3. Candidato à terapia fotodinâmica, o complexo de índio com ftalocianina (PC) In-PC foi testado frente a células de neuroblastomas SH-SY5Y, mediante incubação durante 5 dias, e não apresentou mudanças na proliferação celular. Após irradiação das células tratadas se observou que a metade das células sofreram apoptoses.³³ O complexo In-PC ligado a nanopartículas magnéticas de amina (AMNPs) apresentou efeitos fotocitotóxico frente a células de câncer de mama (MCF-7).³⁴
4. O complexo de índio(III) ligado a um fotossensibilizador de clorina biotinilada foi estudado como candidato para terapia de câncer colorretal (CT26), provocando inibição celular e apoptoses após irradiação.³⁵
5. Um complexo de índio(III) com 2-benzoilpiridina *N*(4)-ciclohexiltiossemicarbazona (HL), na forma $[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$, tem sido estudado quanto aos efeitos citotóxicos frente a células tumorais e células saudáveis (QSG7701), obtendo-se um valor de IC_{50} na faixa nanomolar frente a células de carcinoma hepatocelular (HepG-2), além de apresentar fluorescência.³⁶
6. Um complexo de índio(III) com 2-acetilpiridina *N*(4)-feniltiossemicarbazona (HL), na forma $[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$, apresentou efeitos citotóxicos frente a células de carcinoma hepatocelular HepG-2 com um IC_{50} na faixa nanomolar. O complexo apresenta fluorescência, podendo então ser candidato a sonda fluorescente além de agente terapêutico.³⁷
7. O complexo de índio(III) derivado de 5-hidroxi flavona, na forma $[\text{In}(\text{L})_3]$ apresentou atividade citotóxica frente a células de câncer humano (HeLa, LoVo, MCF-7 e SK-Ov-3).³⁸

Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa também têm relatado a atividade citotóxica de complexos de índio(III) com 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas contra diversas linhagens de células de tumores sólidos e de leucemia (ver seção 1.5.2)

³³ M. Neagu, C. Constantin, M. Tampa, C. Matei, A. Lupu, E. Manole, R.M. Ion, C. Fenga, A.M. Tsatsakis, Toxicological and efficacy assessment of post-transition metal (Indium) phthalocyanine for photodynamic therapy in neuroblastoma, *Oncotarget*. 7 (2016) 69718–69732.

³⁴ G.G. Matlou, D.O. Oluwole, T. Nyokong, Evaluation of the photosensitizing properties of zinc and indium tetra cinnamic acid phthalocyanines linked to magnetic nanoparticles on human breast adenocarcinoma cells, *J. Lumin.* 205 (2019) 385–392..

³⁵ M.F. Isaac-Lam, D.M. Hammonds, Biotinylated chlorin and its zinc and indium complexes: Synthesis and in vitro biological evaluation for photodynamic therapy, *Pharmaceuticals*. 10 (2017).

³⁶ Y.X. Tai, Y.M. Ji, Y.L. Lu, M.X. Li, Y.Y. Wu, Q.X. Han, Cadmium(II) and indium(III) complexes derived from 2-benzoylpyridine *N*(4)-cyclohexylthiosemicarbazone: Synthesis, crystal structures, spectroscopic characterization and cytotoxicity, *Synth. Met.* 219 (2016) 109–114.

³⁷ Y.T. Wang, Y. Fang, M. Zhao, M.X. Li, Y.M. Ji, Q.X. Han, Cu(II), Ga(III) and In(III) complexes of 2-acetylpyridine: *N*(4)-phenylthiosemicarbazone: Synthesis, spectral characterization and biological activities, *Medchemcomm.* 8 (2017) 2125–2132.

³⁸ A.C. Munteanu, M. Badea, R. Olar, L. Silvestro, M. Mihaila, L.I. Brasoveanu, M.G. Musat, A. Andries, V. Uivarosi, Cytotoxicity studies, DNA interaction and protein binding of new Al (III), Ga (III) and In (III) complexes with 5-hydroxyflavone, *Appl. Organomet. Chem.* 32 (2018) 1–17.

1.4. Bases de Schiff como agentes quimioterapêuticos

Bases de Schiff são compostos orgânicos conhecidos como iminas, que apresentam uma ligação dupla entre carbono e nitrogênio, $R_1R_2C=N-R$ ($R \neq H$),³⁹ e são formadas a partir da reação de condensação de uma amina primária com um grupo carbonila (aldeído ou cetona) na presença de um catalisador ácido (Figura 1.10). Diversos estudos têm mostrado que as bases de Schiff são compostos com um grande número de bioatividades, como no caso das hidrazonas e tiossemicarbazonas.⁴⁰

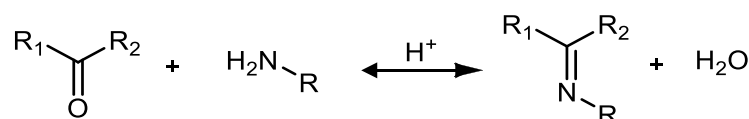


Figura 1.10. Reação de formação da base de Schiff (R_1 e $R_2 = H$, alquil ou aril).

1.4.1. Hidrazonas e bis(hidrazonas) como ligantes para complexos metálicos bioativos

As hidrazonas são bases de Schiff que apresentam a fórmula $R_1R_2C=N-NHR_3$ (Figura 1.11.a), obtidas pela condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos, sendo necessária a utilização de um catalisador ácido.

As *N*-acilhidrazonas (Figura 1.11.b) apresentam um sítio doador $C=O$ adicional, possibilitando a formação de complexos com vários metais de transição. Foram testados compostos derivados de *N*-acilhidrazonas em células de câncer de mama (T47D) para determinar atividade antitumoral, tendo sido demonstrado que os compostos induziram apoptose com valores de IC_{50} na faixa nanomolar.⁴¹

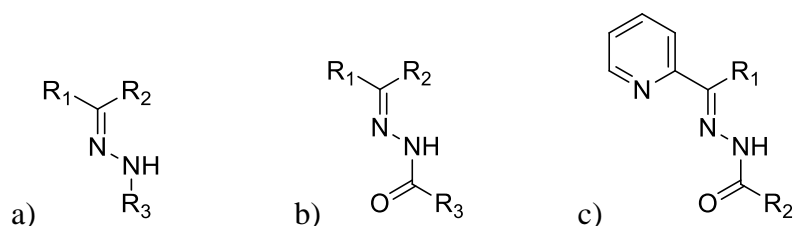


Figura 1.11. Estrutura geral de a) hidrazonas; b) *N*-acilhidrazonas; c) hidrazonas derivadas de 2-formilpiridina ($R_1 = H$), 2-acetilpiridina ($R_1 = CH_3$), e 2-benzoilpiridina ($R_1 = C_6H_5$), $R_2: H$, alquil ou aril.

³⁹ Schiff bases (Schiff's bases), in: IUPAC Compend. Chem. Terminol., IUPAC, 2008.

⁴⁰ H. Beraldo, Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos, Quim. Nova. 27 (2004) 461–471.

⁴¹ H.Z. Zhang, J. Drewe, B. Tseng, S. Kasibhatla, S.X. Cai, Discovery and SAR of indole-2-carboxylic acid benzylidene-hydrazides as a new series of potent apoptosis inducers using a cell-based HTS assay, Bioorganic Med. Chem. 12 (2004) 3649–3655.

Hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina (Figura 1.11.c) mostraram efeito citotóxico frente a células de glioma (U87 e T98), e após coordenação ao gálio(III) observou-se um efeito citotóxico mais pronunciado frente a células U87⁴² (Figura 1.12).

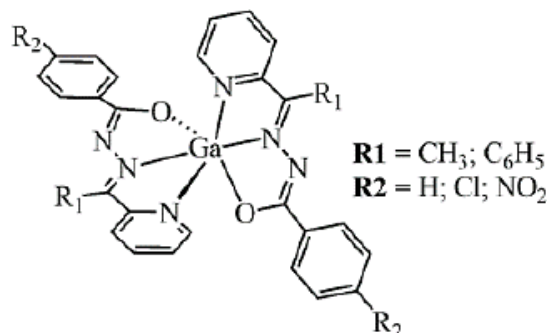


Figura 1.12. Complexos de gálio(III) com 2-acetilpiridina- e 2-benzoilpiridina-benzoilhidrazonas.

Bis(acilhidrazonas) derivadas de 2,6-diformilpiridina e 2,6-diacetilpiridina são agentes quelantes polidentados que se coordenam mediante o sistema O,N,N_{py},N,O, que têm afinidade por diferentes cátions (Figura 1.13).

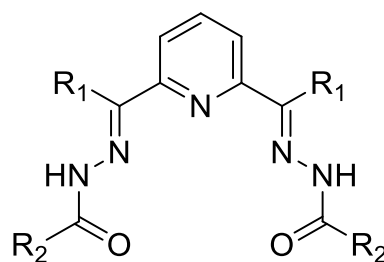


Figura 1.13. 2,6-diformilpiridina-*bis*(hidrazonas), R₁ = H e R₂ = H, alquil, aril ; 2,6-diacetilpiridina-*bis*(hidrazonas), R₁ = CH₃ e R₂ = H, alquil, aril.

Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) com derivados de 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona) apresentaram atividade citotóxica frente a células leucêmicas (Jurkat e HL-60) e células de tumores sólidos (HCT-116, MCF-7). Os complexos demonstraram ser mais ativos em relação a seus ligantes, e o complexo de bismuto(III) resultou ser mais ativo que a cisplatina, produzindo morte celular por apoptoses (Figura 1.14).⁴³

⁴² A.A.R. Despaigne, G.L. Parrilha, J.B. Izidoro, P.R. Da Costa, R.G. Dos Santos, O.E. Piro, E.E. Castellano, W.R. Rocha, H. Beraldo, 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells, *Eur. J. Med. Chem.* 50 (2012) 163–172.

⁴³ K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. Da Silva, L.F. De Miranda, C.F.D. Romeiro, E.M. Souza-Fagundes, I.C. Mendes, H. Beraldo, Investigation on the pharmacological profile of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) derivatives and their antimony(III) and bismuth(III) complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 53 (2012) 98–106.

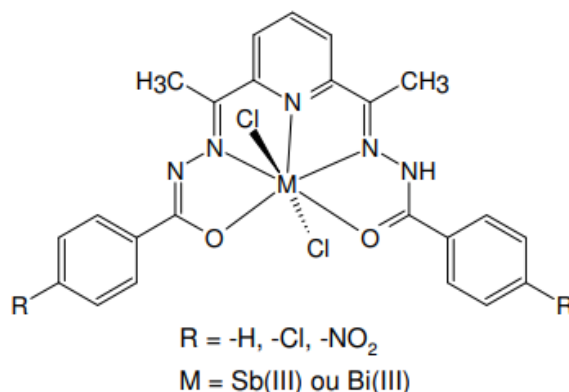


Figura 1.14. Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) com derivados de 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona).

Complexos de gálio(III) e rutênio(III) com *bis*(hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina apresentaram propriedades fluorescentes e poderiam ser usados na detecção ou terapia de tumores. Os compostos foram capazes de inibir o crescimento de células tumorais sólidas MCF-7, HepG-2, NCI-H460, T24, Hela e A549, apresentando efeitos superiores em relação das *bis*(hidrazonas) não complexadas.^{44, 45}

Estudos por espectroscopia eletrônica dos complexos [Co(H₄L)(H₂O)₂] (1), [Co(H₄L)(N₃)₂] (2) e [Co(H₄L)(NCS)₂] (3), sendo H₄L = 2,6-diacetilpiridina-*bis*(4-hidroxi benzoilhidrazona), demonstraram interação covalente com DNA de timo de bezerro (CT-DNA). Além disso, experimentos de eletroforese em gel de agarose sugerem que os complexos realizam a clivagem do DNA⁴⁶ (Figura 1.15)

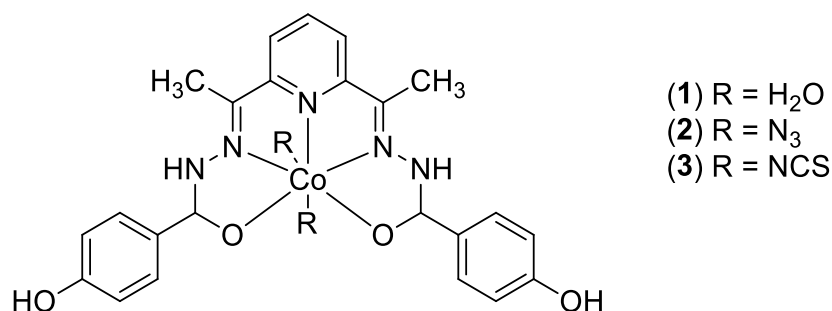


Figura 1.15. Complexos de cobalto(II) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(4-hidroxi benzoilhidrazona).

⁴⁴ 王怡红齐金旭曹万宝, Gallium fluorescent probe, preparation method, application and application product thereof, 2021. <https://patents.google.com/patent/CN109627210B/en>

⁴⁵ 王怡红齐金旭曹万宝魏来王雪娇, Ruthenium fluorescent probe, and preparation method, application and application product thereof, 2021. <https://patents.google.com/patent/CN109666047B/en>

⁴⁶ R. Gup, C. Gökçe, N. Dilek, Seven-coordinated cobalt(II) complexes with 2,6-diacetylpyridine bis(4-hydroxybenzoylhydrazones): Synthesis, characterisation, DNA binding and cleavage properties, *Supramol. Chem.* 27 (2015) 629–641.

1.4.2. Tiossemicarbazonas e bis(tiossemicarbazonas) como ligantes para complexos metálicos bioativos

As tiossemicarbazonas são bases de Schiff que apresentam a fórmula $R_1R_2C=N-NH-(C=S)-NHR_3$ (Figura 1.16.a), obtidas pela condensação quimiosseletiva da tiossemicarbazida com aldeídos ou cetonas, sendo necessária a utilização de um catalisador ácido. Esses compostos apresentam uma versatilidade de obtenção, com um amplo perfil farmacológico, como agentes antitumorais, antifúngicos, antibacterianos, antimaláricos, antivirais, dentre outros.⁴⁷

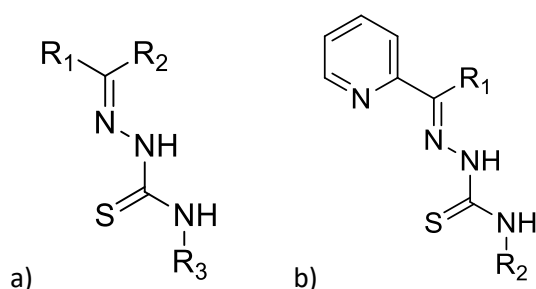


Figura 1.16. Estrutura geral de a) tiossemicarbazonas; b) tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina ($R_1 = H$), 2-acetilpiridina ($R_1 = CH_3$) e 2-benzoilpiridina ($R_1 = C_6H_5$), R_2 : H, alquil, aril.

Na procura de agentes antitumorais, derivados de tiossemicarbazonas têm sido amplamente estudados por sua capacidade de inibição da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), a qual está envolvida na biossíntese do ácido desoxirribonucléico (DNA).

A 3-aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona (Triapina, Figura 1.17) é um inibidor de RDR que apresentou atividade antitumoral de amplo espectro, para o tratamento de tumores de próstata, pâncreas, rins, ovário e pulmão, *in vitro* e atualmente está sendo avaliada em vários ensaios clínicos. Estudos com derivados de triapina demonstraram que seu complexo de cobre(II) poderia ser aplicado ao tratamento de câncer hematopoiético.⁴⁸

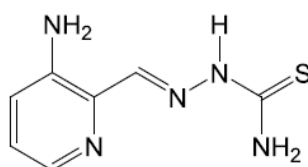


Figura 1.17. Representação estrutural da Triapina.

⁴⁷ H. Beraldo, Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos, *Quim. Nova*. 27 (2004) 461–471.

⁴⁸ G. Chen, C. Niu, J. Yi, L. Sun, H. Cao, Y. Fang, T. Jin, Y. Li, C. Lou, J. Kang, W. Wei, J. Zhu, Novel Triapine Derivative Induces Copper-Dependent Cell Death in Hematopoietic Cancers, *J. Med. Chem.* 62 (2019) 3107–3121.

Derivados de tiossemicarbazonas que apresentam um anel heteroaromático, no grupo R_1 (Figura 1.16.b), fornecem um sítio doador adicional para a coordenação a metais. Assim, complexos de estanho(IV) com 2-benzoilpiridina *N*(4)-feniltiossemicarbazona apresentaram atividade citotóxica frente a células de tumores sólidos (MCF-7, TK-10 e UACC-62)⁴⁹ e complexos de estanho(IV) com 2-piridinoformamida-tiossemicarbazona também apresentaram atividade citotóxica, sendo mais potentes que a cisplatina frente a células de glioblastomas.⁵⁰ (Figura 1.18).

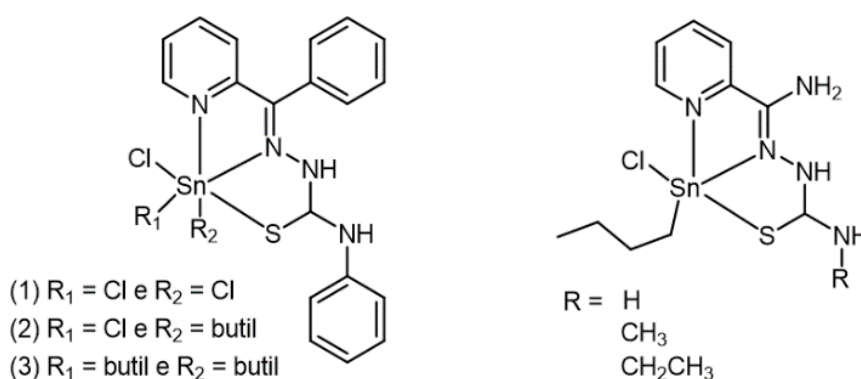


Figura 1.18. Complexos de estanho(IV) com derivados de tiossemicarbazonas.

2-acetilpiridina *N*(4)-toluil-tiossemicarbazonas apresentaram ação citotóxica frente a células de glioma (U-87 e T98) e após coordenação com platina(II), platina(IV) e ouro(III) a citotoxicidade foi aumentada, sugerindo que o mecanismo de ação dos complexos de platina seja pela ligação ao DNA e o complexo de ouro pela inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR).⁵¹

Uma série de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina apresentaram alta atividade citotóxica contra células de tumor de mama MCF-7 e contra células de glioma T98G e U87, com valores de IC_{50} na ordem de nanomolar, e alta seletividade pelas células tumorais.⁵² (Figura 1.19).

⁴⁹ A. Perez-Rebolledo, J.D. Ayala, G.M. De Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Structural studies and cytotoxic activity of *N*(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone Sn(IV) complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 467–472.

⁵⁰ I.C. Mendes, J.P. Moreira, J.D. Ardisson, R.G. dos Santos, P.R.O. da Silva, I. Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Organotin(IV) complexes of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: Antimicrobial and cytotoxic effects, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1454–1461.

⁵¹ K.S.O. Ferraz, J.G. Da Silva, F.M. Costa, B.M. Mendes, B.L. Rodrigues, R.G. dos Santos, H. Beraldo, *N*(4)-tolyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazones and their platinum(II,IV) and gold(III) complexes: cytotoxicity against human glioma cells and studies on the mode of action, *Biometals.* 26 (2013) 677–691..

⁵² M.A. Soares, J.A. Lessa, I.C. Mendes, J.G. Da Silva, R.G. Dos Santos, L.B. Salum, H. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, J.L. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo, *N* 4-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the mechanism of action, *Bioorganic Med. Chem.* 20 (2012) 3396–3409.

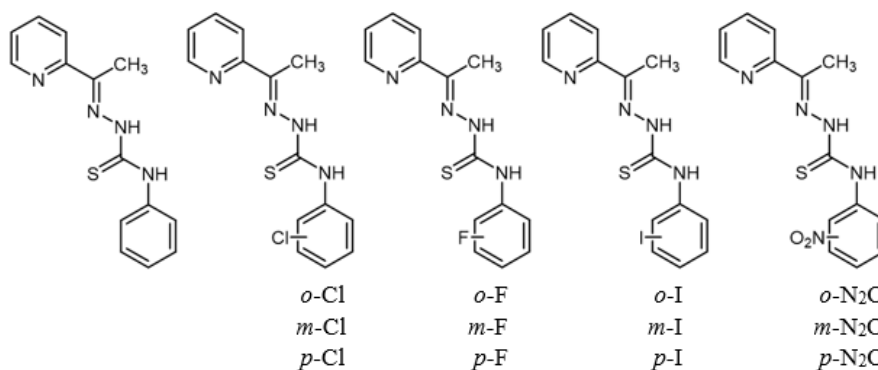


Figura 1.19. Tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, onde *o*, *m* e *p* representam *orto*, *meta* e *para*.

Dentre todos os compostos, a 2-acetilpiridina *N*(4)-*orto*-clorofeniltiossemicarbazona apresentou maior atividade antineoplásica e foi empregado para a formação de complexos de paládio(II), platina(II), bismuto(III), antimônio(III), ouro(III), gálio(III) e estanho(IV), os quais mostraram ação citotóxica frente a células de câncer de mama (MCF-7) e adenocarcinoma de cólon (HT-29).⁵³

Complexos de índio(III) com 2-acetilpiridina *N*(4)-feniltiossemicarbazona (HL), e derivados *N*(4)-*meta*-clorofenil-, *N*(4)-*para*-clorofenil- e *N*(4)-*meta*-iodofenil-, na forma $[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$, foram testados por nosso grupo quanto à ação citotóxica frente a células leucêmicas (THP-1, Jurkat e HL-60), células de tumores sólidos (HCT-116, MCF-7 e MDA-MB-231) e células saudáveis de mamíferos (Vero), demonstrando serem altamente ativos e seletivos em comparação a seus ligantes.⁵⁴

Demonstramos que complexos de índio(III) na forma $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$, sendo HL = 2-acetilpiridina *N*(4)-feniltiossemicarbazona, e os derivados *N*(4)-*orto*-cloro-fenil, *N*(4)-*para*-cloro-fenil, *N*(4)-*para*-fluor-fenil, *N*(4)-*para*-iodo-fenil, testados quanto à ação citotóxica frente a células leucêmicas (THP-1, Jurkat e HL-60), células de tumores sólidos (HCT-116, MCF-7 e MDA-MB-231) e células saudáveis de mamíferos (Vero) mostraram citotoxicidade e os índices de seletividade aumentados em comparação aos ligantes livres. Os complexos apresentaram interação com o DNA e albumina sérica humana (HSA).⁵⁵

⁵³ G.L. Parrilha, K.S.O. Ferraz, J.A. Lessa, K.N. De Oliveira, B.L. Rodrigues, J.P. Ramos, E.M. Souza-Fagundes, I. Ott, H. Beraldo, Metal complexes with 2-acetylpyridine-*N*(4)- orthochlorophenylthiosemicarbazone: Cytotoxicity and effect on the enzymatic activity of thioredoxin reductase and glutathione reductase, Eur. J. Med. Chem. 84 (2014) 537–544.

⁵⁴ A.A. Oliveira, G.M.C. Perdigão, J.G. da Silva, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones exhibit cytotoxic activity against human leukemia and solid tumor cell lines, Polyhedron. 135 (2017) 72–78.

⁵⁵ A.A. Oliveira, G.M.C. Perdigão, L.E. Rodrigues, J.G. Da Silva, E.M. Souza-Fagundes, J.A. Takahashi, W.R. Rocha, H. Beraldo, Cytotoxic and antimicrobial effects of indium(iii) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones, Dalt. Trans. 46 (2017) 918–932.

Por ativação neutrônica se obtiveram os análogos radioativos contendo os radionuclídeos $^{114m}\text{In}/^{115m}\text{In}$ dos complexos $[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$ e $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$, em que HL são ligantes derivados de 2-acetilpiridina *N*(4)-feniltiossemicarbazona. Demonstrou-se que após ativação neutrônica, os complexos radioativos apresentaram ação citotóxica 10^3 a 10^4 vezes mais potente do que os análogos não radioativos.⁵⁶

Recentemente demonstramos que complexos de índio(III), derivados de 2-acetilpiridina *N*(4)-*orto*-fluoro-feniltiossemicarbazona, na forma $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ e $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2]$, e seus análogos radioativos contendo ^{114m}In , apresentaram efeitos citotóxicos frente a células tumorais de glioblastoma (U87) com um IC_{50} na faixa nanomolar⁵⁷ (Figura 1.20).

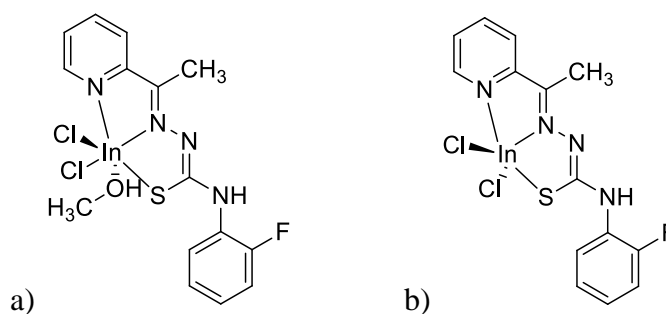


Figura 1.20. Complexos de índio(III) com 2-acetilpiridina *N*(4)-*orto*-fluoro-feniltiossemicarbazona (HL), a) $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ e b) $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2]$.

Bis(tiossemicarbazonas) (Figura 1.21) são ligantes polidentados com grande capacidade quelante e têm sido amplamente investigadas para o preparo de complexos metálicos com aplicações em terapia e diagnóstico.

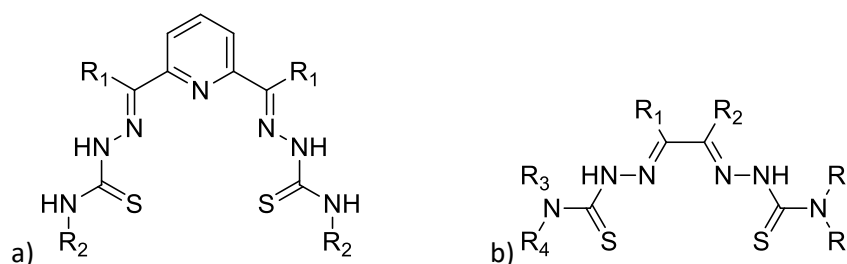


Figura 1.21. a) *bis*(tiossemicarbazonas) derivadas de 2,6-diformilpiridina ($\text{R}_1 = \text{H}$) e 2,6-diacetilpiridina ($\text{R}_1 = \text{CH}_3$) e b) *bis*(tiossemicarbazonas) contendo diferentes grupos (R_1 a R_6 : H, alquil, aril).

⁵⁶ A.A. Oliveira, L.L. Franco, R.G. Dos Santos, G.M.C. Perdigão, J.G. Da Silva, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Neutron activation of In(III) complexes with thiosemicarbazones leads to the production of potential radiopharmaceuticals for the treatment of breast cancer, *New J. Chem.* 41 (2017) 9041–9050.

⁵⁷ A.R. Aguirre, G.L. Parrilha, R. Diniz, B.C. Ribeiro, R.G.D. Santos, H. Beraldo, Cytotoxic effects of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*-fluorophenylthiosemicarbazone and their radioactive ^{114m}In analogues against human glioma cells, *Polyhedron*. 164 (2019) 219–227.

Em particular, complexos de cobre(II) com *bis*(tiossemicarbazonas) tais como diacetil-*bis*(*N*(4)-metiltiossemicarbazona) (ATSM). Cu(ATSM) têm sido amplamente investigados para imagem de tumores e de tecidos em hipóxia, quando se utilizam os isótopos ^{60}Cu , ^{62}Cu e ^{64}Cu , que permitem obter imagens PET.⁵⁸

Estudos *in vivo* do complexo $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{L})(\text{NO}_3)_2]\text{NO}_3$, $\text{H}_2\text{L} = 2,6$ -diacetilpiridina *bis*(*N*(4)-metiltiossemicarbazona) demonstraram a inibição do crescimento tumoral em camundongos com células tumorais transplantadas de hepatoma H22. O controle positivo inibiu o crescimento tumoral em 43%, no entanto, o complexo de bismuto(III) inibiu o crescimento tumoral em 62%.⁵⁹

Complexos de paládio(II) e platina(II), do tipo [ML], sendo $\text{H}_2\text{L} = 2,6$ -diacetilpiridina *bis*(*N*(4)-*para*-clorofeniltiossemicarbazona), apresentaram efeitos antiproliferativos frente a células de câncer humano NCI-H460, T-47D, A2780 e A2780cisR.⁶⁰

Complexos de índio(III) e complexos binucleares de zinco(II) com ligantes de 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazonas), com diferentes substituintes no nitrogênio terminal *N*4, apresentaram efeitos citotóxicos contra células T24 de tumor de bexiga humana. O modo de ação envolve a interrupção do ciclo celular e a indução de autofagia e apoptose em células T24.^{61,62}

Complexos de índio(III) com *bis*(tiossemicarbazonas) seriam igualmente de grande interesse uma vez que poderiam, em princípio, atuar em medicina diagnóstica e apresentar potenciais aplicações terapêuticas. Em tratamentos contra o câncer de mama atualmente utilizados na medicina nuclear, teriam potenciais aplicações na radioquimioterapia e poderiam atuar como potenciais radiosensibilizadores, elevando a eficácia terapêutica da radiação, como estratégias de ação terapêutica.

⁵⁸ G.L. Parrilha, R.G. dos Santos, H. Beraldo, Applications of radiocomplexes with thiosemicarbazones and bis(thiosemicarbazones) in diagnostic and therapeutic nuclear medicine, *Coord. Chem. Rev.* 458 (2022) 214418.

⁵⁹ M.X. Li, M. Yang, J.Y. Niu, L.Z. Zhang, S.Q. Xie, A nine-coordinated bismuth(III) complex derived from pentadentate 2,6-diacetylpyridine bis(4*N*-methylthiosemicarbazone): Crystal structure and both *in vitro* and *in vivo* biological evaluation, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 12521–12526.

⁶⁰ A.I. Matesanz, C. Hernández, P. Souza, New bioactive 2,6-diacetylpyridine bis(*p*-chlorophenylthiosemicarbazone) ligand and its Pd(II) and Pt(II) complexes: Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding ability, *J. Inorg. Biochem.* 138 (2014) 16–23.

⁶¹ S. Li, M.H. Khan, X. Wang, M. Cai, J. Zhang, M. Jiang, Z. Zhang, X.-A. Wen, H. Liang, F. Yang, Synthesis of a series of novel In(III) 2,6-diacetylpyridine bis(thiosemicarbazide) complexes: structure, anticancer function and mechanism., *Dalt. Trans.* 49 (2020) 17207–17220.

⁶² P. Yu, J. Deng, J. Cai, Z. Zhang, J. Zhang, M. Hamid Khan, H. Liang, F. Yang, Anticancer and biological properties of a Zn-2,6-diacetylpyridine bis(thiosemicarbazone) complex, *Metallomics.* 11 (2019) 1372–1386.

1.5. Objetivos do presente trabalho

1.5.1. Objetivo geral

Considerando que a estratégia por nós desenvolvida de complexar tiossemicarbazonas com índio(III) resultou na formação de compostos altamente citotóxicos contra diferentes linhagens de células tumorais,^{63, 64, 65} e que os compostos análogos de ^{114m}In mostraram-se ainda mais ativos e seletivos,⁶⁶ o presente projeto visou a obtenção de complexos de índio(III) de *bis*(benzoilhidrazonas), *bis*(semicarbazonas) e *bis*(tiossemicarbazonas) e seus análogos radioativos com ^{114m}In , e avaliar a atividade citotóxica dos complexos não radioativos e radioativos frente a células de câncer de mama estrógeno dependente (MCF-7) (ER+), e em estrógeno independente (MDA-MB-231) (triplo negativa) assim como frente a células saudáveis de fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5). Pretendeu-se verificar os efeitos dos complexos sobre as diferentes linhagens celulares após os tratamentos por quimioterapia, por radioterapia com ^{60}Co , e terapia combinada (quimioterapia e radioterapia). Pretendeu-se também realizar estudos preliminares de mecanismos de ação por meio de investigações de interações entre os complexos e o DNA.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Constituíram objetivos do presente trabalho as sínteses e caracterização de complexos de índio(III) com ligantes 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) (Figuras 1.22).
2. Avaliar a atividade citotóxica desses complexos em células de tumor mamário estrógeno dependentes MCF-7 e estrógeno independentes MDA-MB-231 e frente a células saudáveis de fibroblasto de pulmão de feto humano MRC-5.

⁶³ A.A. Oliveira, G.M.C. Perdigão, J.G. da Silva, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones exhibit cytotoxic activity against human leukemia and solid tumor cell lines, *Polyhedron*. 135 (2017) 72–78.

⁶⁴ A.A. Oliveira, G.M.C. Perdigão, L.E. Rodrigues, J.G. Da Silva, E.M. Souza-Fagundes, J.A. Takahashi, W.R. Rocha, H. Beraldo, Cytotoxic and antimicrobial effects of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones, *Dalt. Trans.* 46 (2017) 918–932.

⁶⁵ A.R. Aguirre, G.L. Parrilha, R. Diniz, B.C. Ribeiro, R.G.D. Santos, H. Beraldo, Cytotoxic effects of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-N(4)-ortho-fluorophenylthiosemicarbazone and their radioactive ^{114m}In analogues against human glioma cells, *Polyhedron*. 164 (2019) 219–227.

⁶⁶ A.A. Oliveira, L.L. Franco, R.G. Dos Santos, G.M.C. Perdigão, J.G. Da Silva, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Neutron activation of In(III) complexes with thiosemicarbazones leads to the production of potential radiopharmaceuticals for the treatment of breast cancer, *New J. Chem.* 41 (2017) 9041–9050.

3. Constituiu igualmente objetivo do presente trabalho a obtenção dos análogos radioativos contendo ^{114m}In , pela ativação neutrônica dos complexos não radioativos e avaliar a atividade citotóxica dos complexos em células tumorais e sadias.
4. Constituiu ainda objetivo do presente trabalho comparar os efeitos, sobre as células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 e sadias MRC-5, da quimioterapia com os complexos não radioativos e radioativos de índio(III), da radioterapia com ^{60}Co e da terapia combinada (radioterapia e quimioterapia).
5. Pretendeu-se realizar estudos estruturais e espectrais de complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas).
6. Pretendeu-se estudar as interações dos complexos não radioativos com o DNA.

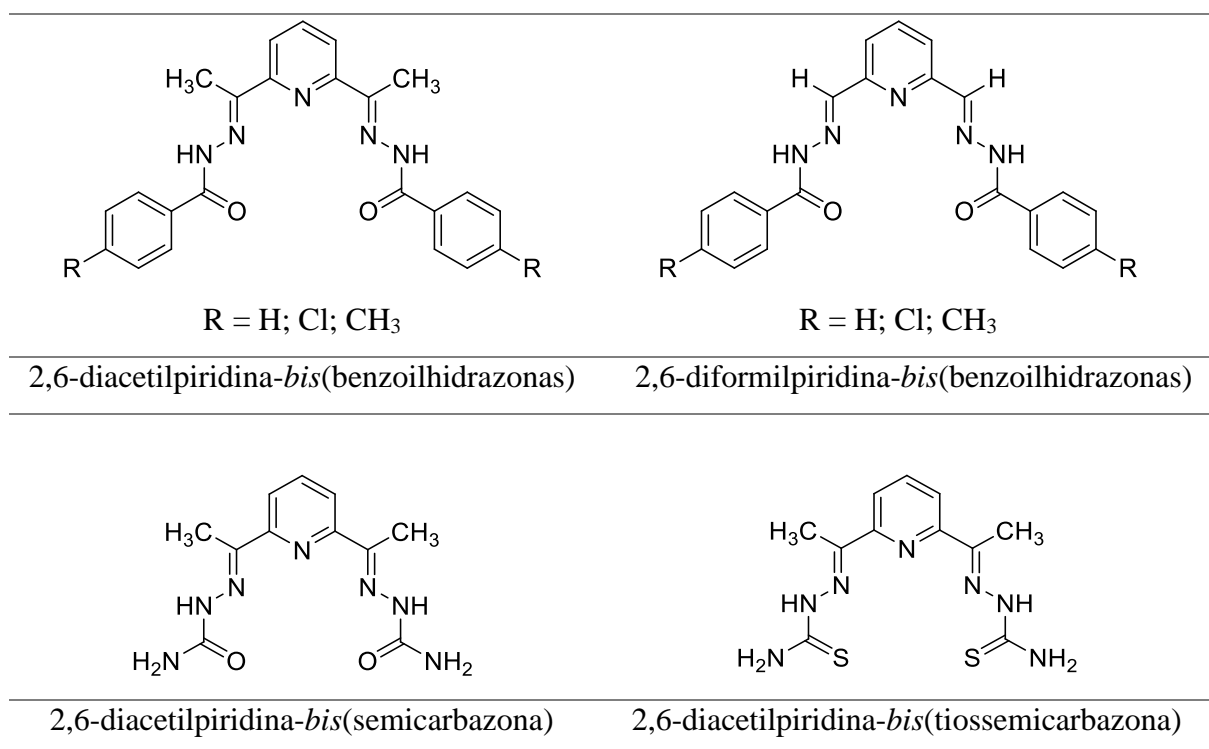


Figura 1.22. Representação estrutural dos ligantes 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais, equipamentos e procedimentos

2.1.1. Reagentes e solventes

As reações foram realizadas utilizando reagentes e solventes P.A. com alto grau de pureza, sem purificação prévia, que foram adquiridos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Merck, Synth). O solvente deuterado DMSO- d_6 de procedência Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL) foi adquirido da companhia Sigma-Aldrich.

2.1.2. Pesagens

As medidas de massa foram realizadas nas balanças analíticas Sartorius-MSU225S, com sensibilidade de 0,00001g e Gehaka - AG200, com sensibilidade de 0,0001 g.

2.1.3. Temperaturas de fusão

As faixas de temperatura de fusão ou a temperatura de decomposição dos complexos foram determinadas utilizando-se o equipamento digital Micro-Química modelo MQAPF-302.

2.1.4. Análise elementar

As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos complexos foram determinadas usando-se o aparelho Perkin Elmer modelo CHN-2400 na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

2.1.5. Análises termogravimétricas (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas na Termobalança Shimadzu-TGA50H, alocada no Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera de N_2 , na faixa de temperatura de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 10° C min⁻¹. O Apêndice A (Figuras A1-A8) contém os termogramas dos complexos (1-8).

2.1.6. Análises condutimétricas

As medidas de condutividades molar eletrolítica (Λ_M) foram feitas usando-se o condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica de constante

0,088 cm⁻¹ do mesmo fabricante. Foram usadas soluções dos complexos (1,0 mmolL⁻¹), utilizando-se dimetilformamida (DMF) como solvente. Os resultados foram analisados conforme dados reportados na literatura⁶⁷ (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Atribuição de tipo de eletrólito para soluções de concentração 1,0 mmolL⁻¹.

Solvente	Λ_M (cm ² . Ω^{-1} .mol ⁻¹)	Tipo de eletrólito
DMF	65-90	1:1
	130-170	2:1
	200-240	3:1

2.1.7. Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados na faixa 4000-400 cm⁻¹, empregando pastilhas de KBr, utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, alocado no Departamento de Química da UFMG. O Apêndice A (Figuras A9-A16) contém os espectros de infravermelho dos ligantes e seus complexos.

2.1.8. Espectroscopia eletrônica

Os espectros de absorção nas regiões do UV-Vis foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro HP8453 diode array – Hewlett Packard, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, alocado no Departamento de Química da UFMG.

Os estudos de estabilidade dos complexos em solução foram realizados medindo-se os espectros eletrônicos na faixa de 250 - 600 nm em função do tempo (30 - 120 minutos e após 24 e 48 horas). As soluções dos complexos foram preparadas nas concentrações de 2 x 10⁻⁵ molL⁻¹ em: DMSO (grau espectroscópico); solução tampão Tris-HCl (NaCl 50 mmolL⁻¹, Tris-HCl 5 mmolL⁻¹, pH 7,2) com 2% de DMSO; solução tampão fosfato PBS (NaCl 137 mmolL⁻¹, KCl 2,7 mmolL⁻¹, Na₂HPO₄ 10 mmolL⁻¹, KH₂PO₄ 1,8 mmolL⁻¹, pH 7,2) com 2% de DMSO.

2.1.9. Espectroscopia de fluorescência e determinação de rendimento quântico (Φ_F)

Os espectros de absorção foram obtidos nos espectrofotômetros Varian Cary 60 Bio (Agilent Technologies) utilizando uma cubeta de quartzo de 5 cm de caminho óptico e os espectros de fluorescência foram obtidos no espectrômetro CARY Eclipse–Varian (Agilent Technologies), alocado no Departamento de Química da UFMG.

⁶⁷ W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81–122.

Para determinar o rendimento quântico de fluorescência dos complexos (**1-6**) foi empregado o método comparativo de Williams e col.⁶⁸ utilizando como amostra padrão sulfato de quinina com Φ_F conhecido ($\Phi = 54\%$) em H_2SO_4 $0,5 \text{ molL}^{-1}$.⁶⁹

Foram usadas diferentes concentrações das amostras ($1-5 \mu\text{molL}^{-1}$) em DMSO (grau espectroscópico), obtendo-se valores menores que 0,5 como absorvância. As soluções utilizadas nos espectros de absorção foram as mesmas dos espectros de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram medidos em condições idênticas, com uma excitação à 393 nm para a amostra padrão e os complexos (**1-6**). As fendas de emissão e excitação foram de 10 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O Apêndice A (Figura A49-A54) contém os espectros de excitação e de emissão do complexo (**1-6**).

2.1.10. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RNM foram registrados no espectrômetro Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) localizado no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG. As soluções foram preparadas utilizando-se DMSO- d_6 como solvente, em tubos de 5 mm de diâmetro externo, utilizando-se como referência interna o sinal residual do próprio solvente deuterado (δ 2,5 ppm).

Os sinais nos espectros de RMN de ^1H foram atribuídos com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades e utilizando espectroscopia de correlação homonuclear (^1H - ^1H) COSY (Homonuclear Correlation Spectroscopy). O tipo de carbono (C, CH) foi determinado por meio de experimentos de DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) e suas atribuições foram feitas com o auxílio do experimento de HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation). O Apêndice A (Figura A17-A48) contém os espectros de RMN de ^1H dos ligantes e dos complexos de índio(III), e os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, DEPT-135, COSY e HMQC dos complexos (**1-8**).

2.1.11. Determinação de estruturas por Difração de Raios X

As estruturas cristalográficas dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**) e $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) foram determinadas pela Profa. Renata Diniz do Departamento de Química da UFMG, utilizando-se um difratômetro Oxford-Rigaku Gemini A-Ultra do

⁶⁸ A.T.R. Williams, S.A. Winfield, J.N. Miller, Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer, *Analyst*. 108 (1983) 1067–1071.

⁶⁹ A.M. Brouwer, Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.* 83 (2011) 2213–2228.

Departamento de Física ICEX – UFMG em temperatura ambiente (298 K) e como fonte de radiação um tubo selado MoK α ($\lambda=0,71073 \text{ \AA}$). A coleta dos dados, os refinamentos e a redução das células unitárias foram realizados utilizando o programa CrysAlis RED, Rigaku– Version 1.171.32.38.⁷⁰ As estruturas dos complexos foram resolvidas e refinadas utilizando-se os programas SHELXL-2018-3.⁷¹ As figuras foram desenhadas utilizando-se os programas ORTEP-3 para Windows⁷² e Mercury.⁷³

2.2. Sínteses de ligantes e complexos

2.2.1. Síntese dos ligantes 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e seus derivados

As sínteses de 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona) (H₂-2,6AcPh), 2,6-diacetilpiridina-*bis*(*para*-cloro-benzoilhidrazona) (H₂-2,6AcPClPh), 2,6-diacetilpiridina-*bis*(*para*-toluil-benzoilhidrazona) (H₂-2,6AcPCH₃Ph), 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) (H₂-2,6FoPh), 2,6-diformilpiridina-*bis*(*para*-cloro-benzoilhidrazona) (H₂-2,6FopClPh) e 2,6-diformilpiridina-*bis*(*para*-toluil-benzoilhidrazona) (H₂-2,6FopCH₃Ph), foram realizadas conforme método descrito na literatura com algumas modificações.^{74,75}

As sínteses foram feitas a partir da reação de 10 mmol de 2,6-diacetilpiridina ou 2,6-diformilpiridina com 20 mmol da hidrazina desejada em metanol, sendo necessária a adição de três gotas de ácido acético como catalisador. A mistura reacional permaneceu 4 horas sob refluxo (Esquema 2.1). Os compostos foram filtrados, lavados com metanol gelado e éter etílico e secados sob pressão reduzida. As identidades das *bis*(benzoilhidrazonas) foram confirmadas por RMN de ¹H. Os rendimentos foram entre 80 – 90%.

⁷⁰ R.O. Diffraction, Rigaku Oxford Diffraction. Rigaku Corporation, , Japan.tle, CrysAlis Pro. Rigaku Cor (2015) Japan.

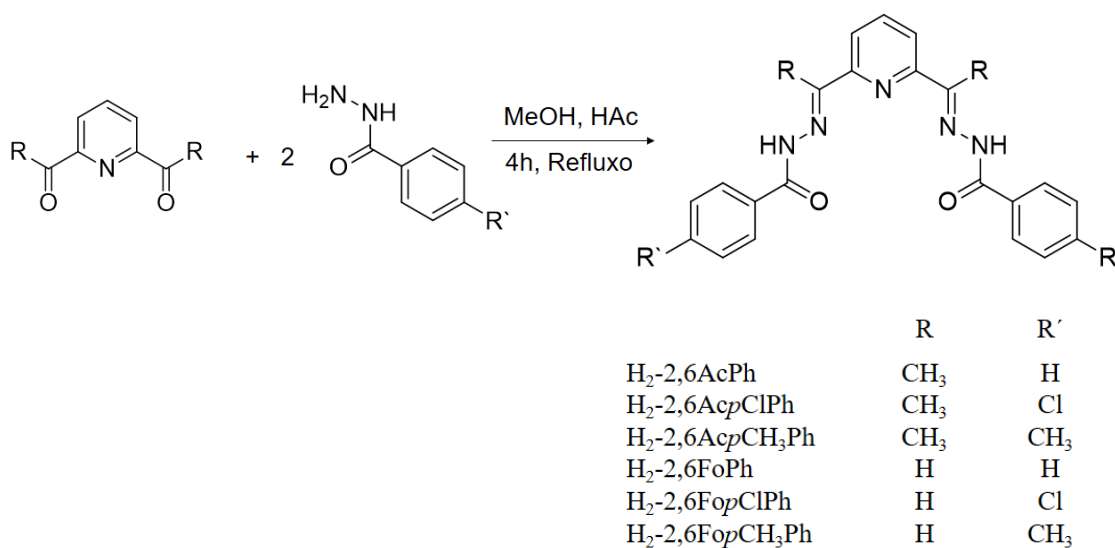
⁷¹ G.M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL, Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem. 71 (2015) 3–8.

⁷² L.J. Farrugia, ORTEP-3 for windows - A version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI), J. Appl. Crystallogr. 30 (1997) 565.

⁷³ 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.

⁷⁴ K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. Da Silva, L.F. De Miranda, C.F.D. Romeiro, E.M. Souza-Fagundes, I.C. Mendes, H. Beraldo, Investigation on the pharmacological profile of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) derivatives and their antimony(III) and bismuth(III) complexes, Eur. J. Med. Chem. 53 (2012) 98–106.

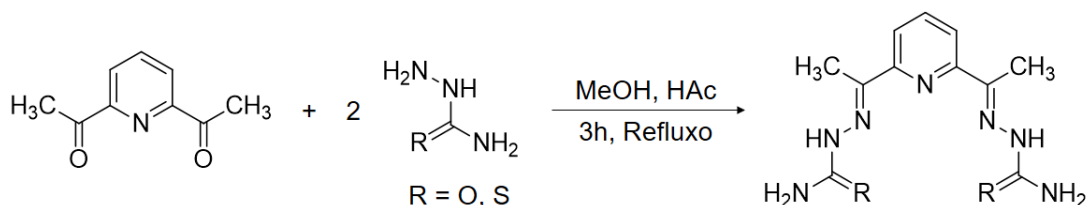
⁷⁵ A.F. Santos, I.P. Ferreira, C.B. Pinheiro, J.A. Takahashi, L.R. Teixeira, H. Beraldo, Silver(I) complexes with 2,6-diacetylpyridine-*bis*(benzoylhydrazones): Antifungal activity and interaction with DNA, Polyhedron. 138 (2017) 270–276.



Esquema 2.1. Esquema de síntese das 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e seus derivados.

2.2.2. Síntese dos ligantes 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona)

As sínteses de 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) (H₂-2,6AcSc) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) (H₂-2,6AcTsc) foram realizadas conforme método descrito na literatura⁷⁶ com algumas modificações. As sínteses foram feitas a partir da reação de 10 mmol de 2,6-diacetilpiridina com 20 mmol de semicarbazida ou tiossemicarbazida em metanol, sendo necessária a adição de três gotas de ácido acético como catalisador. A mistura reacional permaneceu 3 horas sob refluxo. Os compostos foram filtrados, lavados com metanol gelado e éter etílico e secados sob pressão reduzida (Esquema 2.3). As identidades de H₂-2,6AcSc e H₂-2,6AcTsc foram confirmadas por RMN de ¹H. Os rendimentos foram de 69% e 82% respectivamente.

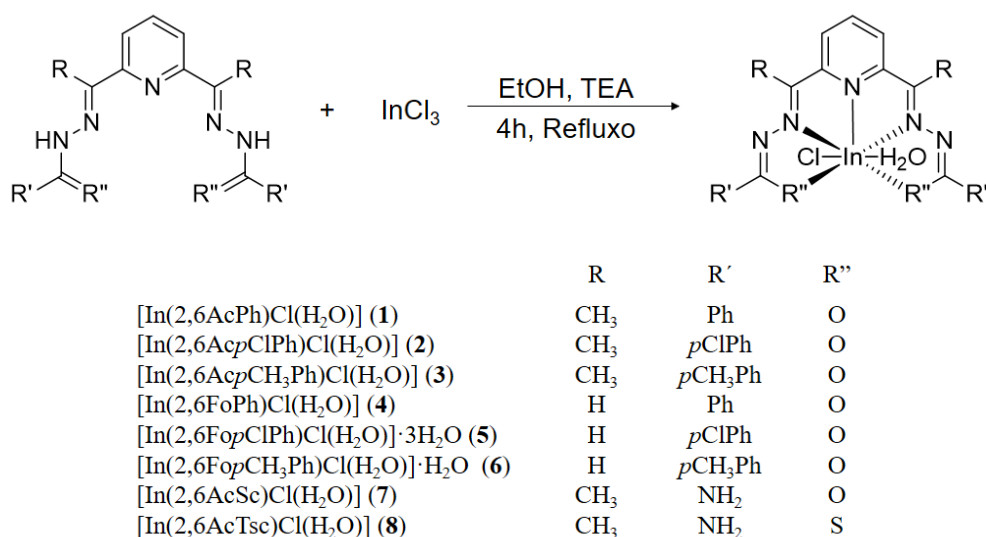


Esquema 2.2. Esquema de síntese de 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) (H₂-2,6AcSc) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) (H₂-2,6AcTsc).

⁷⁶ A.A.A. Abu-Hussen, W. Linert, Redox, thermodynamic and spectroscopic of some transition metal complexes containing heterocyclic Schiff base ligands, Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 74 (2009) 214–223.

2.2.3. Sínteses dos complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas), 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona)

Foram sintetizados os complexos [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**1**), [In(2,6Ac*p*ClPh)Cl(H₂O)] (**2**), [In(2,6Ac*p*CH₃Ph)Cl(H₂O)] (**3**), [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (**4**), [In(2,6FopClPh)Cl(H₂O)]·3H₂O (**5**), [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (**6**), [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (**7**) e [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (**8**). Os complexos (**1-8**) foram obtidos a partir da reação de 1 mmol do ligante desejado com 1,1 mmol de InCl₃, em 15 mL de etanol, sendo necessária a adição de 2 mmol de trietilamina. As misturas reacionais foram mantidas em refluxo e sob agitação por 4 horas (Esquema 2.2). Os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com etanol quente, e secados sob pressão reduzida. Os rendimentos foram entre 58 – 86 %.



Esquema 2.3. Esquema de síntese dos complexos de In(III).

2.3. Ativação neutrônica dos complexos de In(III)

Aproximadamente 1,0 mg dos complexos (**4**, **6**, **7** e **8**) assim como o sal InCl₃ foram acondicionadas em tubos de polietileno e submetidos a ativação neutrônica. Foram irradiados durante 4 horas nas posições 6, 7 e 8 da mesa giratória no reator TRIGA (Training, Research, Isotopes, General Atomics) MARK I IPR R-1, localizado no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) em Belo Horizonte. As taxas médias de fluência de nêutrons térmicos e epitérmicos foram de $5,8 \times 10^{11} \pm 0,13 \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $2,4 \times 10^{11} \pm 0,18 \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.⁷⁷

⁷⁷ D.M. Zangirolami, A.H. de Oliveira, A.V. Ferreira, Thermal and epithermal neutron fluence rates in the irradiation facilities of the TRIGA IPR-R1 nuclear reactor, Brazilian J. Phys. 40 (2010) 47–51.

A manipulação das amostras radioativas (*InCl₃, *4, *6, *7 e *8) foi realizada sob a supervisão do profissional habilitado para o uso e manuseio de material radioativo dentro das dependências do CDTN e após realização dos Cursos: Introdução à Proteção Radiológica, e Radioproteção para o Preparo, Uso e Manuseio de Fontes Radioativas, fornecidos pela instituição (Ver nos Apêndices D e E).

Todos os experimentos foram realizados seguindo os cuidados de radioproteção conforme a norma CNEN-NE-3.01.⁷⁸ Uso de blindagem de chumbo, utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs), tais como jalecos, luvas cirúrgicas descartáveis, anteparo com vidro plumbífero e dosímetros individuais. Para evitar a contaminação, as bancadas foram forradas com uma camada de plástico e outra de papel toalha. Durante e após os procedimentos com o material radioativo, as superfícies foram monitoradas com o detector Geiger-Muller.

Os rejeitos radioativos, sólidos ou líquidos, foram separados e armazenados em sacos plásticos, lixeiras blindadas e bombonas de polipropileno e isolados até o decaimento abaixo dos níveis de dispensa recomendado na norma CNEN NE 8.01⁷⁹ (Ver Apêndice C).

2.3.1. Espectrometria de raios γ

Após um tempo de resfriamento apropriado, as amostras foram submetidas à espectrometria de raios γ em um sistema CANBERRA 5019 equipado com detector de germânio de alta pureza (HPGe - high purity germanium detector) com eficiência de contagem de 50%; resolução FWHM 1,85 keV para a energia 1332 keV do ⁶⁰Co). Por meio do software CANBERRA Gennie 2000 v2.0 foram analisados os espectros e calculadas as radioatividades específicas induzidas nos compostos.

2.3.2. Controle de qualidade dos compostos de índio após ativação neutrônica

A pureza radioquímica do *InCl₃ e dos complexos (*4), (*6), (*7) e (*8) foi verificada por meio de cromatografia em papel Whatman quantitativo utilizando uma solução de metanol/acetato de amônia 10% 1:1(v/v) como fase móvel.⁸⁰

Para avaliar a radioatividade do ^{114m}In foi utilizado um espectrômetro raios γ automático Perkin Elmer – modelo 2480 com cristal cintilador de NaI(Tl) como detector. Em tiras de 2 x 10 cm de papel Whatman quantitativo, a amostra foi aplicada a 0,5 cm da origem e após a

⁷⁸ CNEN: Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica, in: Com. Nac. Energ. Nucl. 05 (2011), p. 1–24.

⁷⁹ CNEN: Gerência de rejeitos radioativos de baixo e médio níveis de radiação, in: Com. Nac. Energ. Nucl. (2014), p. 44.

⁸⁰ Y. Barbier, M.L. Biechlin-Chassel, G. Galy, S. Lao, Les radiopharmaceutiques: Guide pratique du contrôle de qualité en Radiopharmacie, EDP Sciences, 2009.

eluição, as tiras foram cortadas em 10 segmentos de 1 cm cada e depositadas nos tubos de polietileno do espectrômetro. Os resultados são relatados em termos de fator de retenção (Rf).

2.4. Ensaios biológicos

Os ensaios da atividade citotóxica dos complexos (**4**, **6**, **7** e **8**) e seus análogos radioativos (***4**, ***6**, ***7** e ***8**) contra células tumorais e sadias foram realizados em parceria, na Unidade de Radiobiologia do Centro de Tecnologia Nuclear (CDTN) com a Dra. Raquel Gouvêa dos Santos.

2.4.1. Linhagem celulares e condições de cultura

As linhagens das células MCF-7 (adenocarcinoma mamário), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão de feto humano) foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC, USA). As células foram mantidas em fase de crescimento logarítmico no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) alta glicose, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e com antibiótico/antimicótico (sulfato de gentamicina 50 mg/L e anfotericina B 25 µg/mL), as culturas foram mantidas em uma incubadora a 37 °C com jaqueta de água sob uma atmosfera de 5 % CO₂ e 95 % de ar.

2.4.2. Avaliação da atividade citotóxica

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de coloração amarela, que é reduzido por desidrogenases mitocondriais e intracitoplasmáticas de células metabolicamente ativas, produzindo cristais de formazan, de coloração roxa. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas.⁸¹ O ensaio permite avaliar a proliferação e a viabilidade metabólica celular⁸² para determinar o valor da concentração que inibe 50 % da viabilidade celular (IC₅₀) de cada complexo.

As células foram semeadas em placas de 96 poços, e a quantidade de células foi determinada para cada linhagem, sendo 5000 células/poço para MCF-7 e MDA-MB-231 e 1000 células/poço para MRC-5 em DMEM, densidades adequadas para garantir crescimento

⁸¹ T. Mahshid Ghasemi, S.S. Turnbull, I. Kempson, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 12827.

⁸² J.A. Plumb, R. Milroyf, S.B. Kaye, The activity of verapamil as a resistance modifier in vitro in drug resistant human tumour cell lines is not stereospecific, *Biochem. Pharmacol.* 39 (1990) 787–792.

exponencial. Em seguida foram incubadas por 24 horas a 37 °C sob uma atmosfera de 5 % CO₂ para permitir a adaptação das células antes de serem testadas.

As células em crescimento exponencial foram tratadas como descrito a seguir:

- Controle: células tratadas somente com meio de cultura DMEM;
- Controle positivos: células tratadas com o antineoplásico usado na clínica, cisplatina, em diferentes concentrações ($1,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em meio de cultura DMEM);
- Quimioterapia: células tratadas com os compostos em diferentes concentrações ($1,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em meio de cultura DMEM com 1% de DMSO);
- Radioquimioterapia: células tratadas com os compostos radioativos ($^{114\text{m}}\text{In}$) em diferentes concentrações ($1,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em meio de cultura DMEM com 1% de DMSO);
- Monoterapia: células tratadas com radiação gama nas doses de 1, 3 ou 6 Gy com um irradiador multipropósito panorâmico MDS Nordion (Ottawa, ON, Canadá) com Co (200TBq) estocado a seco (Gamma cell- E1=1172,3 keV e E2: 1332,5 keV);
- Terapia combinada: células tratadas com os compostos em diferentes concentrações ($1,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em meio de cultura DMEM com 1% de DMSO) e radiação gama nas doses de 1, 3 ou 6 Gy.

Após os diferentes tratamentos, as células foram incubadas por 48 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato) e foram adicionados em cada poço 0,5 mg/mL de MTT diluído com DMEM, seguido de incubação por mais 4 horas ao abrigo da luz. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos com DMSO e a absorbância característica do formazan foi medida a 570 nm por espectrofotometria.

Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular em relação ao controle, usando como comparação as leituras de densidade óptica na placa de controle negativo, arbitrariamente definidas como sendo 100% de viabilidade. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a expressão:

$$\%Viabilidade\ celular = \frac{Abs.\ Células\ Tratadas}{Abs.\ Controle\ negativo} \times 100$$

Os valores de IC₅₀ (concentração da droga que inibiu 50% de sobrevivência celular) foram calculados utilizando programa *Graphpad prism 5*, a partir da curva de sobrevivência.

Em seguida, os índices de seletividade (IS) dos compostos testados foram calculados, usando os valores de IC₅₀ obtidos ($IS = IC_{50MRC5}/IC_{50 MCF7}$ ou $MDA-MB-231$). Através desta relação, foi possível avaliar se os compostos foram mais seletivos para as linhagens tumorais de tumor mamário. IS com valores maiores ou iguais a 2 foram considerados indicativos de boa seletividade. O índice de seletividade indica a seletividade dos compostos estudados e sua potencial utilização para os testes pré-clínicos e clínicos.

Os resultados da terapia combinada foram expressos como fator de potencialização (FP) calculado conforme a expressão:

$$FP = \frac{\% \text{ células mortas após a terapia combinada}}{\% \text{ células mortas após a monoterapia com radiação}}$$

O Apêndice B (Figura B1-B4) contém as porcentagens de sobrevivência das células em função da concentração e doses de radiação dos complexos (4, 6, 7 e 8).

2.4.3. Avaliação morfológica e alterações do DNA cromossomal induzidas pelos tratamentos

Alterações no DNA cromossomal foram detectadas mediante coloração com 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). DAPI é um corante fluorescente capaz de se ligar especificamente à dupla fita do DNA cromossomal.

Após 48 horas de incubação com o composto sob investigação, as células tumorais foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e fixadas em metanol gelado à temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após, as células foram incubadas com 0,4 µg/mL de DAPI por 1 hora ao abrigo de luz e, em seguida, lavadas com PBS.

Alterações morfológicas na membrana celular foram analisadas por microscopia de contraste de fase, usando um microscópio invertido de fluorescência, Nikon Eclipse TS100, 385-410 nm, acoplado a uma câmera digital.

2.4.4. Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como o valor medido ± desvio padrão (SD) de três experimentos independentes testados em triplicada. As diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo controle foram avaliadas pelos testes t de Student ou ANOVA, foram consideradas significativas quando o nível aceitável de significância foi de 95% (p<0,05), utilizando-se Prisma Graph Pad 5.01 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA) para as análises estatísticas.

2.5. Estudos de interação com ácido desoxirribonucleico (DNA)

A solução estoque de DNA extraído do timo de vitelo (Sigma-Aldrich) foi preparada em solução tampão Tris-HCl (NaCl 50 mmolL⁻¹/Tris-HCl 5 mmolL⁻¹, pH 7,2) sob agitação orbital de 120 rpm a 37°C por 24h. A concentração foi calculada a partir de medidas de densidade óptica, utilizando-se 6600 M⁻¹cm⁻¹ como coeficiente de absortividade molar em 260 nm.⁸³ A solução estoque de brometo de etídio 5 x 10⁻⁴ molL⁻¹ foi preparada em solução tampão Tris-HCl (NaCl 50 mmolL⁻¹/Tris-HCl 5 mmolL⁻¹, pH 7,2) e armazenada a 0 - 4°C ao abrigo da luz.

2.5.1. Determinação da constante de ligação por espectrometria eletrônica

Experimentos de titulação espectrofotométrica foram realizados usando 2,0 mL da solução do composto a ser avaliado (30 µM, solução contendo 3% de DMSO em tampão Tris-HCl) e titulada por adições sucessivas da solução de DNA até alcançar uma relação molar final de 1:1 entre as concentrações de composto e nucleotídeos. Após cada adição, a solução foi agitada e mantida em repouso por 5 minutos antes de serem obtidos os espectros, registrados na faixa de 240-600 nm à temperatura ambiente.

2.5.2. Determinação da constante de ligação por fluorescência

A constante de ligação dos compostos foi determinada mediante experimentos de intercalação competitiva, entre soluções dos compostos e soluções de brometo de etídio (BE) à temperatura ambiente. Durante o experimento, um volume de 3,0 mL da solução DNA-BE foi titulado com repetidas alíquotas do composto a ser avaliado (1,0 mM, solução estoque em DMSO) e após 5 minutos as leituras da fluorescência foram registradas. A intensidade de fluorescência em 605 nm (excitação em 545 nm) foi medida em função da concentração do composto.⁸⁴

⁸³ I. Potočňák, P. Vranec, V. Farkasová, D. Sabolová, M. Vataščinová, J. Kudláčová, I.D. Radojević, L.R. Čomić, B.S. Markovic, V. Volarevic, N. Arsenijevic, S.R. Trifunović, Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part VI: Synthesis, structures, in vitro DNA binding, antimicrobial and anticancer properties of first row transition metal complexes with 5-chloro-quinolin-8-ol, *J. Inorg. Biochem.* 154 (2016) 67–77.

⁸⁴ T.C. Jenkins, Optical Absorbance and Fluorescence Techniques for Measuring DNA--Drug Interactions, in: K.R. Fox (Ed.), *Drug-DNA Interact. Protoc.*, Humana Press, Totowa, NJ, 1997: pp. 195–218.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudos estruturais e espectrais de complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas)

Aqui serão apresentadas as caracterizações de novos complexos de índio(III), $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**), $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) e $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**3**), com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona) (H_2 -2,6AcPh) e seus derivados 2,6-diacetilpiridina-*bis*(*para*-cloro-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6AcpClPh) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(*para*-toluil-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6AcpCH₃Ph) (Figura 3.1.1).

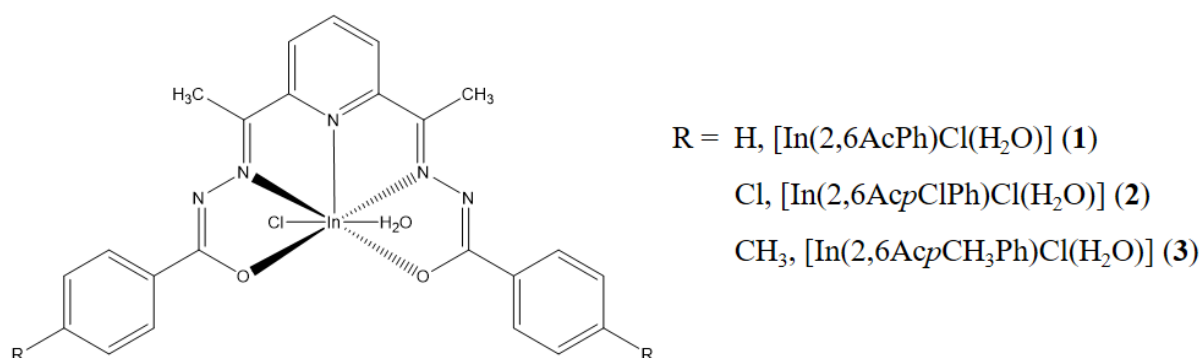


Figura 3.1.1. Representação estrutural para os complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas).

3.1.1. Análises

Os rendimentos das reações, a temperatura de fusão, os dados de análise elementar de CHN, análise termogravimétrica, massa molar, condutividade molar eletrolítica (DMF, 1 mmolL⁻¹) para os complexos (**1**, **2** e **3**) estão apresentados na Tabela 3.1.1.

As análises de CHN sugerem a formação de complexos do tipo $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1-3**) $\text{H}_2\text{L} = \text{H}_2$ -2,6AcPh, H_2 -2,6AcpClPh e H_2 -2,6AcpCH₃Ph. A presença de uma molécula de água de coordenação foi confirmada pelas curvas termogravimétricas dos compostos (Figura 3.1.2). A faixa de temperatura sugere a presença de água coordenada ao centro metálico. Os valores baixos de condutividade molar confirmam que os complexos são não-eletrólitos.

Tabela 3.1.1. Rendimento da reação, ponto de fusão^a, análise elementar de CHN^b, análise termogravimétrica^b, massa molar e condutividade molar eletrolítica^c dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**1**), [In(2,6Ac_pClPh)Cl(H₂O)] (**2**) e [In(2,6Ac_pCH₃Ph)Cl(H₂O)] (**3**).

Compostos	Rend %	P _{fusão} °C	%C	%H	%N	TG %	MM g mol ⁻¹	Λ _M cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹
1	78	>300 (236-237)	49,24 (48,83)	3,52 (3,74)	12,54 (12,38)	3,4 (3,18)	565,73	0,53
2	86	>300 (262-263)	44,08 (43,53)	2,92 (3,02)	11,19 (11,04)	2,92 (2,84)	634,62	2,8
3	85	>300 (232-235)	50,60 (50,57)	4,30 (4,24)	11,90 (11,79)	2,96 (3,03)	593,78	1,74

^a Ponto de fusão do ligante entre parênteses.

^b Valores teóricos entre parênteses.

^c Λ_M (cm²Ω⁻¹ mol⁻¹) concentração de 1 mmolL⁻¹ em DMF.

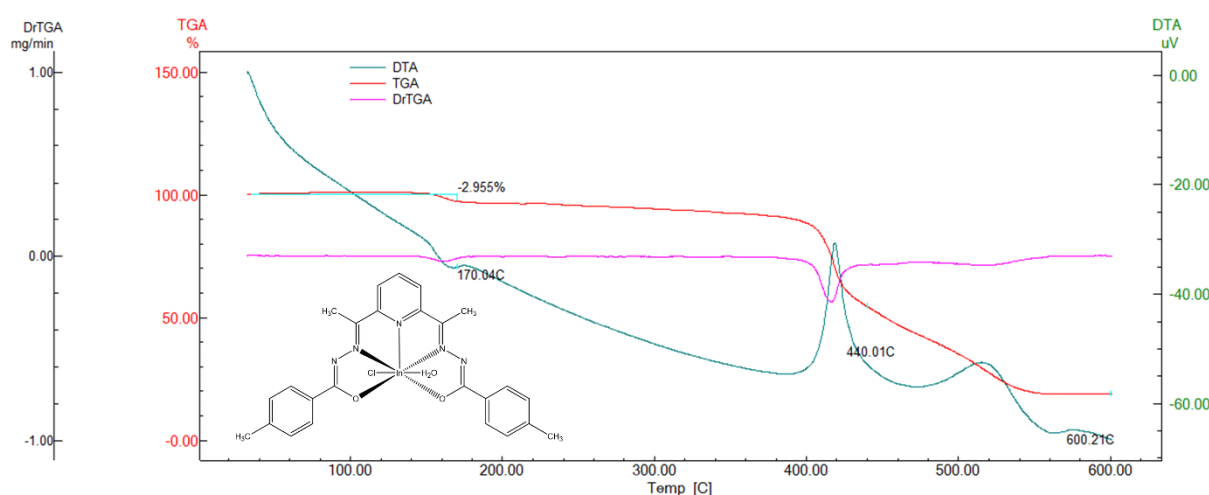


Figura 3.1.2. Termograma do complexo [In(2,6Ac_pCH₃Ph)Cl(H₂O)] (**3**).

3.1.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)

As principais bandas nos espectros de infravermelho das 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**1**), [In(2,6Ac_pClPh)Cl(H₂O)] (**2**) e [In(2,6Ac_pCH₃Ph)Cl(H₂O)] (**3**) encontram-se na Tabela 3.1.2 e o espectro do ligante H₂-2,6AcPh em comparação com seu complexo [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**1**) são mostrados na Figura 3.1.3. Após a complexação das 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) com o In(III) ocorre o deslocamento das principais bandas dos ligantes, indicando o modo de coordenação ao centro metálico. Os resultados são analisados a seguir:

- O estiramento $\nu(\text{N-H})$ na região entre $3214\text{-}3281\text{ cm}^{-1}$ nas 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) livres não foi observado nos espectros dos complexos, indicando a desprotonação nos ligantes.
- O estiramento $\nu(\text{C=N})$ na região entre $1527\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ nas 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) livres, desloca-se para $1492\text{-}1497\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos sugerindo a coordenação do metal pelo nitrogênio imínico.
- O estiramento $\nu(\text{C=O})$, observado na região entre $1655\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ nas 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) livres desloca-se para menor energia entre $1370\text{-}1372\text{ cm}^{-1}$ nos complexos, sugerindo a coordenação do ligante ao metal pelo oxigênio carbonílico.
- O estiramento $\nu(\text{O-H})$, na região $3433\text{-}3448\text{ cm}^{-1}$ nos complexos refere-se à molécula de água coordenada ao centro metálico.

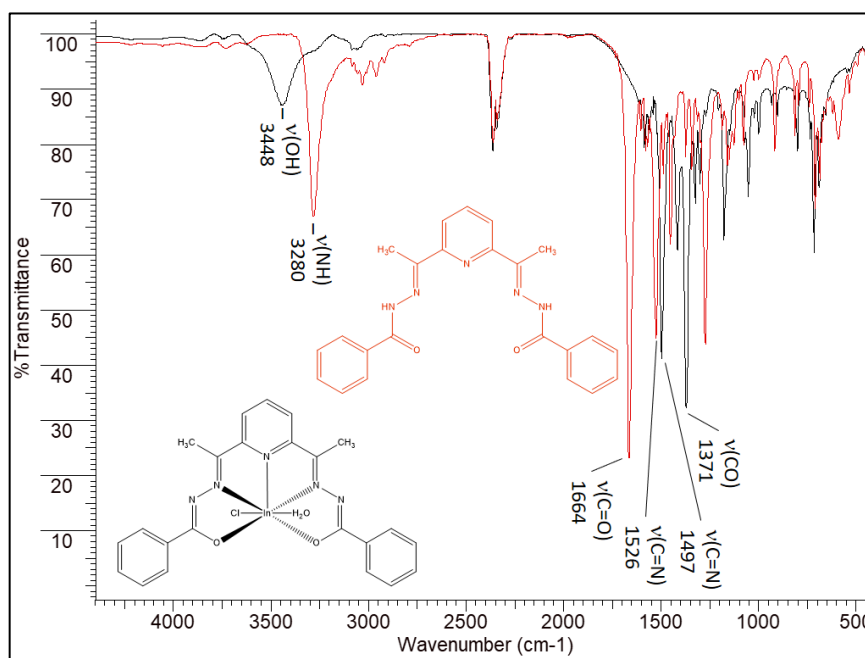


Figura 3.1.3. Espectros de infravermelho do ligante $\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcPh}$ e seu complexo $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1).

Tabela 3.1.2. Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos (1), (2) e (3).

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$
$\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcPh}$	-	3281	1527	1665	-
$[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1)	3448	-	1497	-	1371
$\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcPhClPh}$	-	3214	1542	1655	-
$[\text{In}(2,6\text{AcPhClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2)	3436	-	1493	-	1370
$\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcPhCH}_3\text{Ph}$	-	3232	1610	1670	-
$[\text{In}(2,6\text{AcPhCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3)	3433	-	1492	-	1372

3.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os ligantes 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e seus complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**), $[\text{In}(2,6\text{AcPhClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) e $[\text{In}(2,6\text{AcPhCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**3**) foram caracterizados por RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, e suas atribuições foram feitas com o auxílio de experimentos bidimensionais. As numerações dos átomos das 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos de índio(III) estão representadas na Figura 3.1.4.

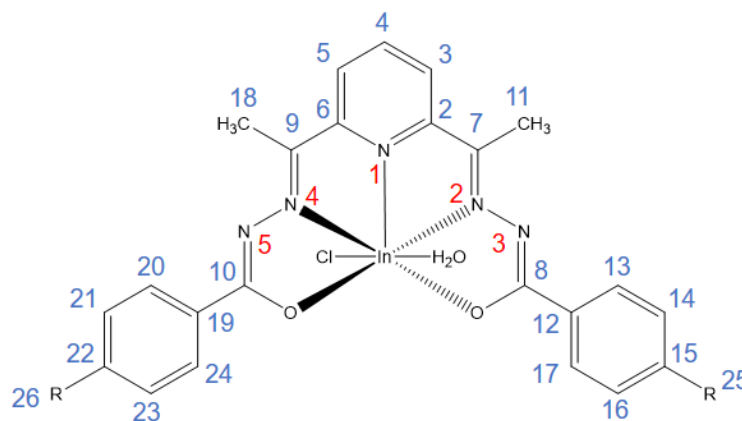


Figura 3.1.4. Numeração dos átomos nos complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) R = H, $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**), R = Cl, $[\text{In}(2,6\text{AcPhClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) e R = CH₃, $[\text{In}(2,6\text{AcPhCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**3**).

Após a complexação com In(III) os espectros de RMN de ^1H em DMSO-*d*₆ (Figura 3.1.5) mostram a ausência dos sinais de N(3)-H e N(5)-H, indicando a desprotonação do ligante e a coordenação das 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) na forma dianiônica. Os sinais dos hidrogênios apresentaram deslocamentos em relação aos ligantes livres, observando-se como principais sinais afetados os hidrogênios piridínicos e os hidrogênios H11 e H18, mudanças associadas à ligação ao metal.

Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante H₂-2,6AcPh e do complexo **1** são apresentados na Figura 3.1.7 mostrando os deslocamentos referentes aos carbonos C8 e C10 (C=O) nos complexos em relação às suas posições no ligante livre. Os deslocamentos sugerem a coordenação do ligante H₂-2,6AcPh pelo sistema quelante O - N iminico - N piridínico - N iminico - O de forma pentadentada.

As atribuições dos sinais de RMN ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos ligantes e complexos (**1**, **2** e **3**) são apresentadas nas Tabelas 3.1.3 e 3.1.4 respectivamente e foram realizadas com auxílio dos experimentos bidimensionais COSY (pelo acoplamento ^1H - ^1H) na Figura 3.1.6 e HMQC (pelo acoplamento ^1H - ^{13}C) na Figura 3.1.8.

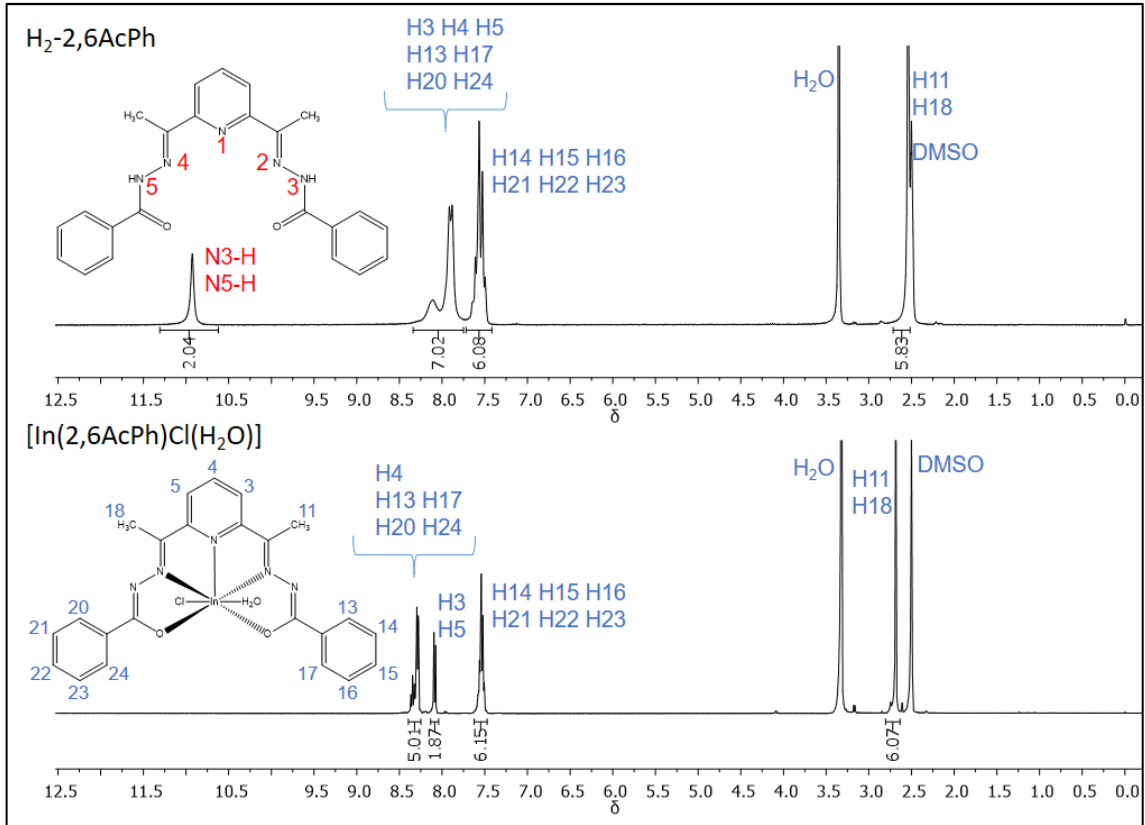


Figura 3.1.5. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcPh}$ e do complexo (1).

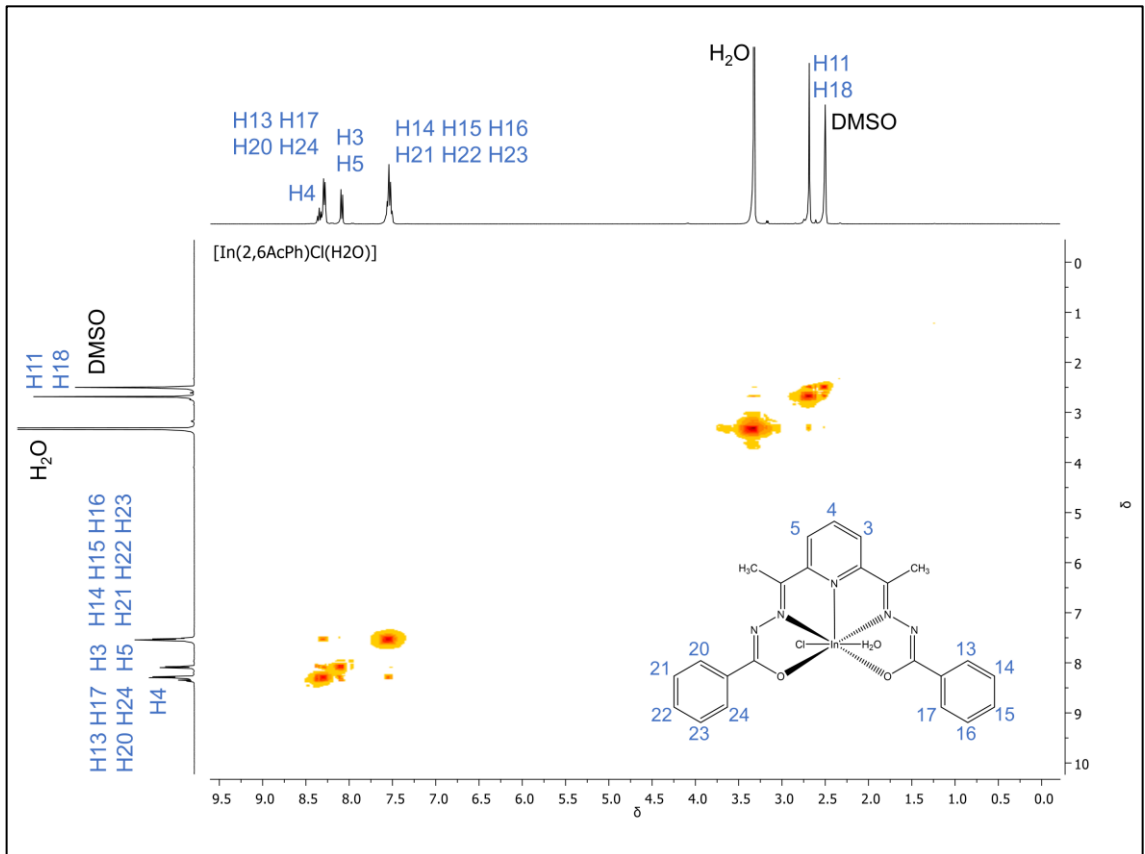


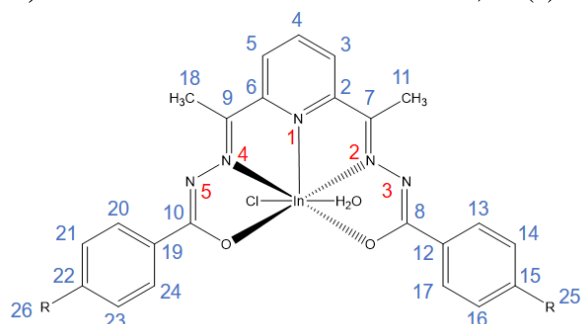
Figura 3.1.6. O espectro de RMN COSY do complexo (1).

Tabela 3.1.3. Atribuições, número de hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (J/Hz) dos sinais de RMN de ^1H das *bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1), $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) e $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3). (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Atribuições	Número de hidrogênio	H_2 -2,6AcPh	$[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1)
N3-H, N5-H	2	10,93 (s)	-
H4	1	7,89 (d) ($J=5,8$)	8,35 (t) ($J = 7,9$)
H3, H5	2	8,37-8,03 (m)	8,09 (d) ($J = 7,9$)
H11, H18	6	2,53 (s)	2,68 (s)
H13, H17	2	7,89 (d) ($J=5,8$)	8,29 (d) ($J = 6,7$)
H14, H16	2	7,71-7,39 (m)	7,66 - 7,44 (m)
H15, H22	2	7,71-7,39 (m)	7,66 - 7,44 (m)
H20, H24	2	7,89 (d) ($J=5,8$)	8,29 (d) ($J = 6,7$)
H21, H23	2	7,71-7,39 (m)	7,66 - 7,44 (m)

Atribuições	Número de hidrogênio	H_2 -2,6AcpClPh	$[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2)
N3-H, N5-H	2	10,96 (s)	-
H4	1	7,89 (d) ($J=7,4$)	8,35 (t) ($J = 7,9$)
H3, H5	2	8,19-7,99 (m)	8,10 (d) ($J=7,9$)
H11, H18	6	2,67 (s)	2,68 (s)
H13, H17	2	7,89 (d) ($J=7,4$)	8,28 (d) ($J = 8,5$)
H14, H16	2	7,57 (d) ($J=8,4$)	7,59 (d) ($J = 8,5$)
H20, H24	2	7,89 (d) ($J=7,4$)	8,28 (d) ($J = 8,5$)
H21, H23	2	7,57 (d) ($J=8,4$)	7,59 (d) ($J = 8,5$)

Atribuições	Número de hidrogênio	H_2 -2,6AcpCH ₃ Ph	$[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3)
N3-H, N5-H	2	10,74 (s)	-
H4	1	7,84 (d) ($J=7,4$)	8,32 (t) ($J = 7,8$)
H3, H5	2	8,10-7,91 (m)	8,05 (d) ($J = 7,9$)
H11, H18	6	2,30 (s)	2,69 (s)
H13, H17	2	7,73 (d) ($J=7,7$)	8,18 (d) ($J = 7,8$)
H14, H16	2	7,24 (d) ($J=8,0$)	7,33 (d) ($J = 7,9$)
H20, H24	2	7,73 (d) ($J=7,7$)	8,18 (d) ($J = 7,8$)
H21, H23	2	7,24 (d) ($J=8,0$)	7,33 (d) ($J = 7,9$)
H25, H26	6	2,44 (s)	2,41 (s)



R = H, $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1)
 Cl, $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2)
 CH₃, $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3)

^a Multiplicidade: s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; m = multiplete; dd = duplo duplete.

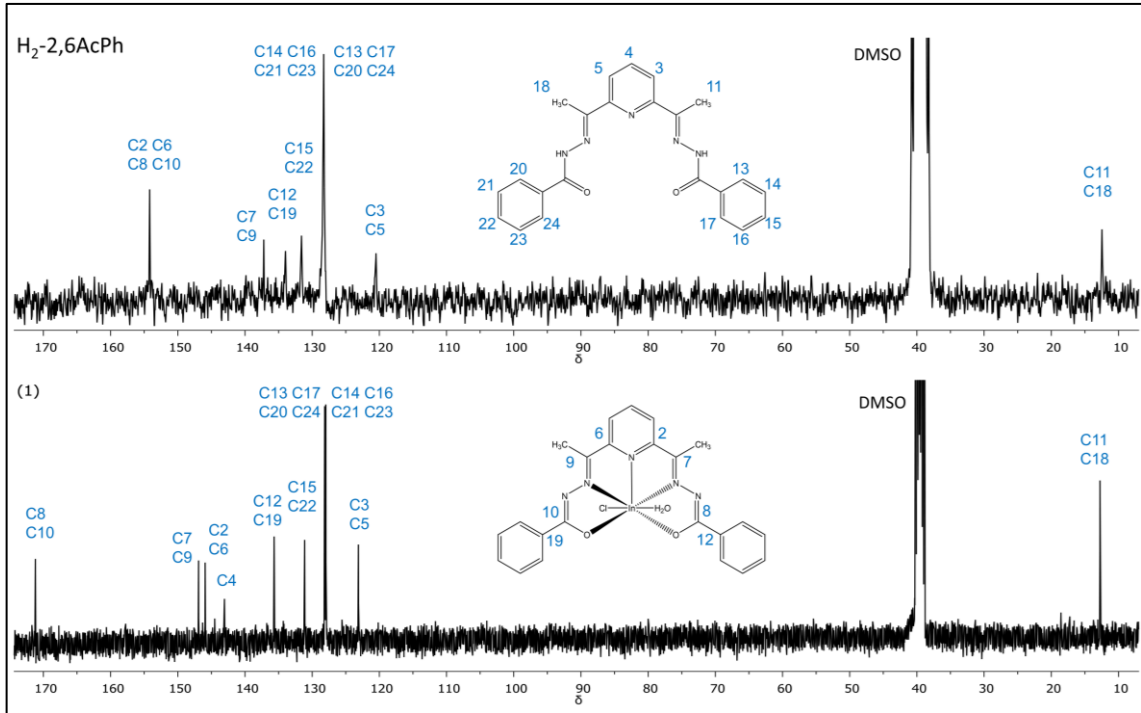


Figura 3.1.7. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcPh}$ e do complexo (1).

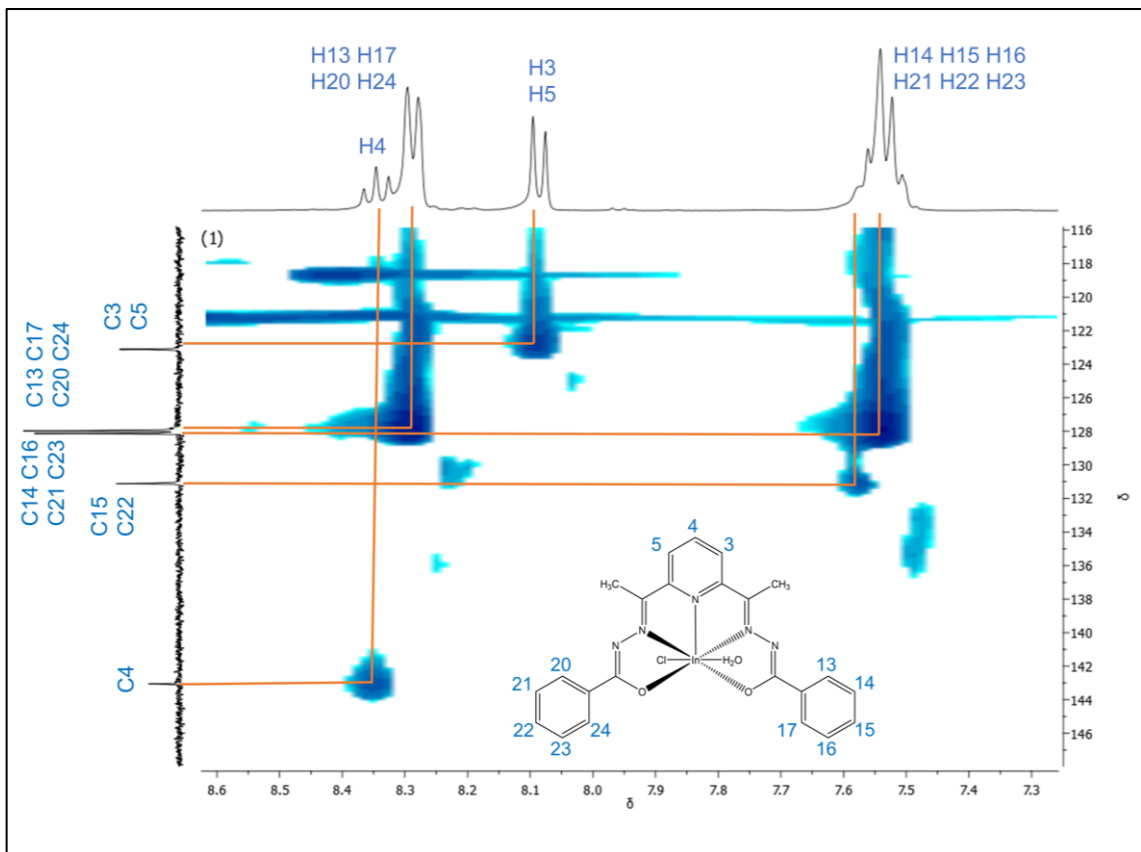
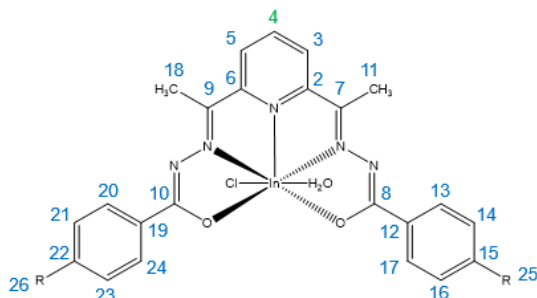


Figura 3.1.8. O espectro de RMN HMQC do complexo (1).

Tabela 3.1.4. Atribuições, DEPT 135, deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ das *bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1), $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) e $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3). (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

Atribuições	DEPT	$\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcPh}$	$[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1)
C2, C6	-	154,2	145,9
C3, C5	↑	120,5	123,1
C4	↑	143,6	143,1
C7, C9	-	137,2	146,9
C8, C10	-	154,2	171,2
C11, C18	↑	12,5	12,8
C12, C19	-	134,0	135,7
C13, C17, C20, C24	↑	128,3	128,1
C14, C16, C21, C23	↑	128,3	128,0
C15, C22	↑	131,6	131,1
Atribuições	DEPT	$\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpClPh}$	$[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2)
C2, C6	-	152,6	146,6
C3, C5	↑	120,3	123,4
C4	↑	136,1	143,1
C7, C9	-	154,2	146,8
C8, C10	-	162,8	170,3
C11, C18	↑	12,4	12,8
C12, C19	-	133,8	135,4
C13, C17, C20, C24	↑	128,0	129,7
C14, C16, C21, C23	↑	136,9	128,3
C15, C22	-	135,6	134,5
Atribuições	DEPT	$\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph}$	$[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3)
C2, C6	-	154,5	145,3
C3, C5	↑	120,7	122,9
C4	↑	137,4	143,0
C7, C9	-	142,0	147,0
C8, C10	-	168,2	171,2
C11, C18	↑	12,7	12,7
C12, C19	-	131,3	141,0
C13, C17, C20, C24	↑	128,6	128,7
C14, C16, C21, C23	↑	129,1	128,0
C15, C22	-	141,5	132,9
C25, C26	↑	21,4	21,2



R = H, $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1)

Cl, $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2)

CH_3 , $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3)

3.1.4. Cristalografia de raios X

Foram obtidos monocristais de $[\text{In}(\text{2,6AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**) e $[\text{In}(\text{2,6AcPhClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) a partir da evaporação lenta em solução de etanol à temperatura ambiente. As estruturas cristalográficas dos compostos e a numeração utilizada estão apresentados na Figura 3.1.9 e a Tabela 3.1.5 mostra os resultados da coleta de dados e do refinamento das estruturas cristalinas dos complexos (**1**) e (**2**).

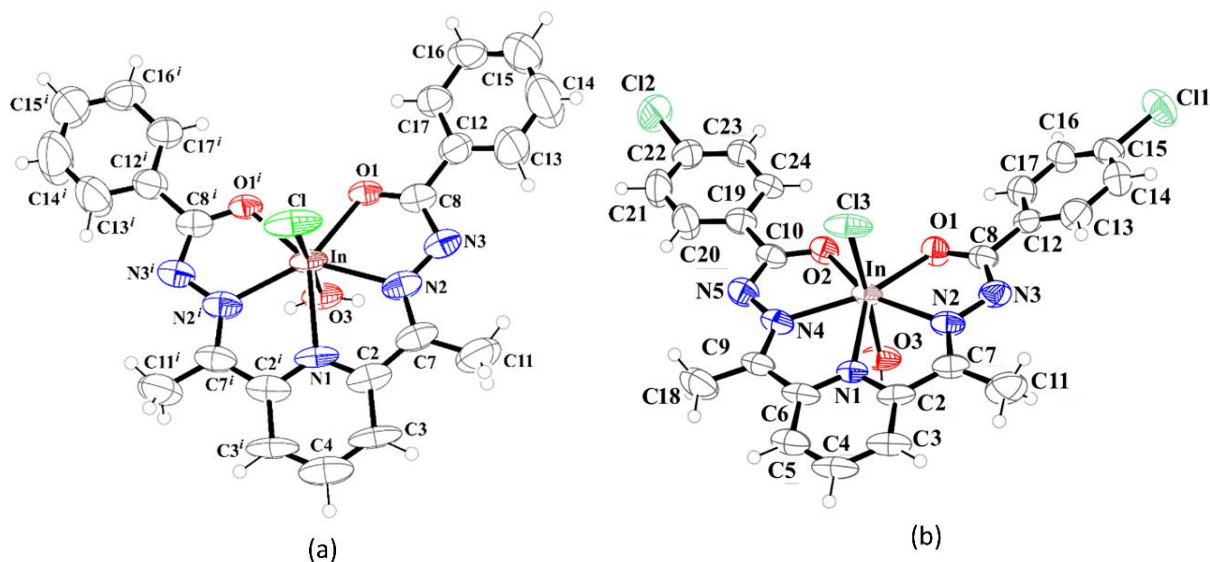


Figura 3.1.9. Unidade assimétrica, estrutura e numeração dos átomos nos monocristais a) $[\text{In}(\text{2,6AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**) e b) $[\text{In}(\text{2,6AcPhClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**).

Ambas as estruturas cristalinas são formadas por uma *bis*(benzoilhidrazona), um íon índio(III), um íon cloreto e uma molécula de água. O índio(III) está coordenado a três átomos de nitrogênio e a dois de oxigênio do ligante, a um íon cloreto e a uma molécula de água, formando uma geometria de coordenação bipirâmide pentagonal, como pode ser observado na Figura 3.1.10.

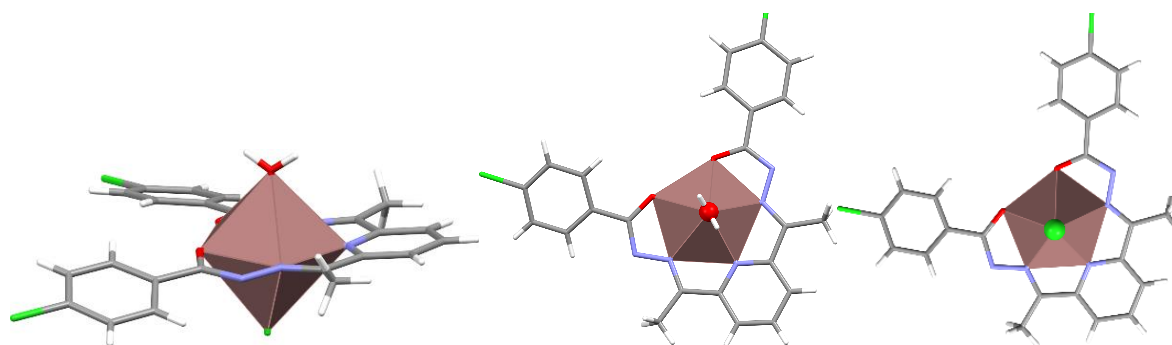


Figura 3.1.10. Representação da geometria de coordenação do In do complexo (**2**).

Tabela 3.1.5. Dados cristalográficos do cristal dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**1**) e b) [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**2**).

Cristal	Cristal (1)	Cristal (2)
Fórmula	C ₂₃ H ₂₁ ClInN ₅ O ₃	C ₂₃ H ₁₉ Cl ₃ InN ₅ O ₃
MM / g mol⁻¹	564,71	634,6
Sistema cristalino	Tetragonal	Monoclínico
Grupo espacial	P4 ₂ /mbc	P2 ₁ /c
a / Å	13,5205(2)	14,3293(10)
b / Å	13,5205(2)	13,6261(6)
c / Å	26,1243(13)	13,4033(8)
α / °	90,00	90,00
β / °	90,00	106,229(7)
γ / °	90,00	90,00
V / Å³	4775,6(3)	2512,7(3)
Temperatura / K	298(2)	298(2)
Z	8	4
D_{calc} / g cm⁻³	1,571	1,677
Tamanho do cristal / mm	0,12 x 0,38 x 0,43	0,10 x 0,31 x 0,65
μ(Mo Kα) / cm⁻¹	1,136	1,295
Reflexões medidas	47092	10073
R_{int}	0,0931	0,0919
Reflexões observadas [F_o² > 2σ(F_o²)]	3738	5948
Parâmetros refinados	318	318
R_{obs} [F_o > 2σ(F_o)]	0,0843	0,0556
R_{all}	0,1329	0,0993
wR_{obs} [F_o² > 2σ(F_o)²]	0,1644	0,1596
wR_{all}	0,1791	0,1785
S	1,194	0,936
RMS / e Å⁻³	0,126	0,159

Os ângulos entre os anéis aromáticos presentes no ligante são 19,1(4)° e 28,1(2)° (entre os dois anéis clorofenil) no complexo (**1**) e (**2**), respectivamente, e os ângulos entre o anel piridil e os anéis clorofenil (contendo Cl1 e Cl2, respectivamente) são 12,0(4)° no complexo (**1**), e 23,7(2)° e 12,7(3)° no complexo (**2**). Na Figura 3.1.11 está mostrada a célula unitária dos complexos (**1**) e (**2**) vista ao longo dos eixos *a*, *b* e *c*. Na Tabela 3.1.6 as principais distâncias e ângulos de ligação.

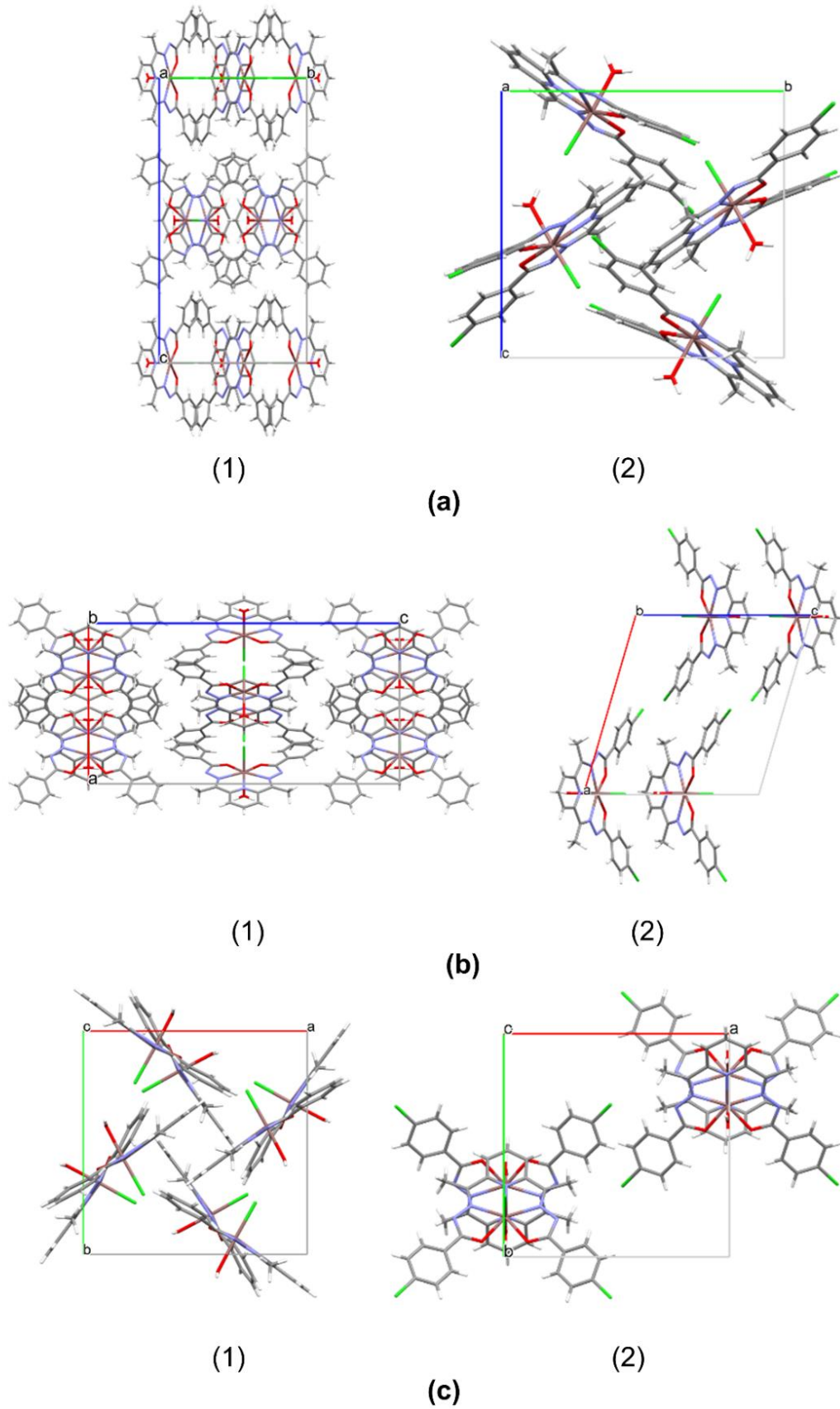


Figura 3.1.11. Célula unitária dos cristais [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (1) e b) [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (2) ao longo dos eixos a) *a*, b) *b* e c) *c*.

Tabela 3.1.6. Distâncias e ângulos de ligações nos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (1) e b) [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (2).

Distância de ligação / Å					
	(1)	(2)		(1)	(2)
In-Cl(3)	2,440(3)	2,446(2)	C7-N2	1,307(9)	1,281(8)
In-O1	2,193(5)	2,165(4)	N2-N3	1,369(10)	1,375(8)
In-O2	-	2,179(4)	C8-N3	1,329(10)	1,338(9)
In-O3	2,275(7)	2,227(4)	C8-O1	1,278(10)	1,297(8)
In-N1	2,315(8)	2,303(4)	C10-N5	-	1,323(8)
In-N2	2,275(7)	2,267(6)	N5-N4	-	1,373(8)
In-N4	-	2,270(6)	C9-N4	-	1,291(8)
			C10-O2	-	1,301(8)
Ângulo de ligação / °					
	(1)	(2)		(1)	(2)
Cl(3)-In-O3	178,5(2)	176,67(13)	O2-In-N1	-	137,97(18)
Cl(3)-In-O1	95,32(16)	96,43(14)	O2-In-N2	-	150,72(18)
Cl(3)-In-O2	-	95,72(13)	O2-In-N4	-	69,93(19)
Cl(3)-In-N1	96,61(18)	94,40(11)	N1-In-N2	69,09(18)	68,7(2)
Cl(3)-In-N2	94,16(17)	92,90(15)	N1-In-N4	-	69,0(2)
Cl(3)-In-N4	-	92,40(14)	N2-In-N2ⁱ(N4)	138,0(4)	137,6(2)
O3-In-O1	85,8(2)	86,66(18)	O1-C8-N3	125,9(8)	124,9(6)
O3-In-O2	-	85,71(18)	C8-N3-N2	108,9(7)	110,0(6)
O3-In-N1	81,9(3)	82,55(15)	C8-O1-In	116,2(5)	128,8(5)
O3-In-N2	85,31(18)	82,32(16)	N3-N2-In	118,4(5)	116,1(4)
O3-In-N4	-	85,26(19)	N3-N2-C7	120,0(8)	120,2(6)
O1-In-O1ⁱ(O2)	82,0(3)	80,70(16)	O2-C10-N5	-	124,3(6)
O1-In-N1	137,17(15)	138,20(19)	C10-N5-N4	-	110,7(6)
O1-In-N2	69,1(2)	70,53(18)	N5-N4-C9	-	120,0(6)
O1-In-N2ⁱ(N4)	150,3(2)	150,00(19)	N5-N4-In	-	117,4(4)
			C10-O2-In	-	116,5(4)

Código de simetria : i: x, y, 1-z.

Os sólidos são estabilizados por ligações de hidrogênio do tipo OH...O e OH...Cl entre as moléculas de água e átomos de O do ligante e Cl. Essas ligações formam uma rede bidimensional no plano *ab* no complexo (1) e *bc* no complexo (2) (Figura 3.1.12.a). A distância de ligação O3...Cl3 é de 3,167(9) Å no complexo (1) e 3,127(4) Å no complexo (2). A distância de ligação O3...O1 é de 2,776(9) no complexo (1), e as distancias de ligação O3...O1 e O3...O2 no complexo (2), são respectivamente, 2,913(6) e 2,758(6) Å. Ligações de hidrogênio não convencionais do tipo CH...Cl são observadas entre os átomos C...Cl formando um dímero (Figura 3.1.12.b), cuja distância C4...Cl é de 3,603(14) Å e C4...Cl3 é de 3,656(7) nos complexos (1) e (2), respectivamente. Não foram observadas interações de empacotamento π nesses compostos. Os parâmetros geométricos dessas interações estão dispostos na Tabela 3.1.7.

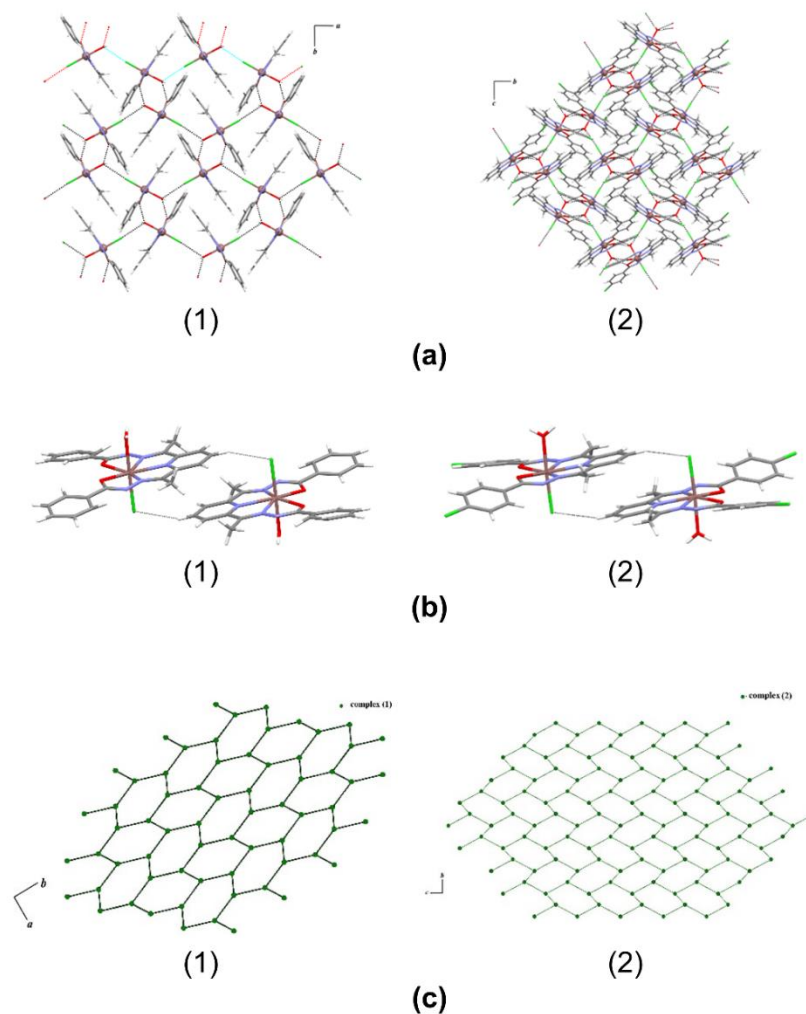


Figura 3.1.12. Ligações de hidrogênio do tipo a) $\text{OH}\cdots\text{O}$ e $\text{OH}\cdots\text{Cl}$ e b) não convencionais do tipo $\text{CH}\cdots\text{Cl}$ e c) redes simplificadas das ligações de hidrogênio observadas nos empacotamentos cristalinos dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1) e b) $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2).

Tabela 3.1.7. Ligações de hidrogênio observadas nos cristais dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1) e b) $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2).

	D-H...A	D-H / Å	H...A / Å	D...A / Å	D-H...A / °
Complexo (1)	O3-H3w...Cl ⁱ	0,93	3,06	3,167(14)	89,0
	O3-H3w...O1 ⁱⁱ	0,89	2,31	2,776(9)	112,0
	C4-H4...Cl ⁱⁱⁱ	0,93	2,73	3,603(14)	156,0
Complexo (2)	O3-H3a...Cl3 ⁱ	0,84	2,30	3,127(4)	165,0
	O3-H3b...O1 ⁱⁱ	0,83	2,29	2,913(6)	132,0
	O3-H3b...O2 ⁱⁱ	0,83	2,07	2,758(4)	140,0
	C4-H4...Cl3 ⁱⁱⁱ	0,93	2,79	3,656(7)	156,0

Código de simetria:

Complexo (1): *i* ($\frac{1}{2} + x, \frac{1}{2} - y, 1 - z$), *ii* ($1 - x, -y, z$), *iii* ($1 - x, 1 - y, -z$).

Complexo (2): *i* ($x, \frac{1}{2} - y, -\frac{1}{2} + z$), *ii* ($2 - x, -y, 1 - z$), *iii* ($2 - x, 1 - y, 1 - z$).

3.1.5. Estudo de fluorescência dos complexos (1-3)

O aumento da conjugação nos ligantes e a rigidez dos complexos $[\text{In}(\text{2,6AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1), $[\text{In}(\text{2,6AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) e $[\text{In}(\text{2,6AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3) faz com que apresentem fluorescência, como mostrado na Figura 3.1.13, o que permitiria determinar a localização dos mesmos dentro das células em futuros ensaios biológicos *in vitro*.

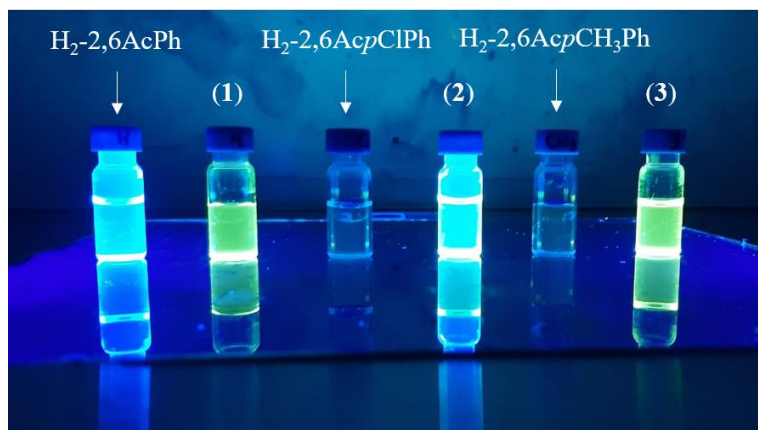


Figura 3.1.13. Comportamento de soluções de 2 mmolL^{-1} dos ligantes e complexos (1), (2) e (3) em DMSO expostas a uma lâmpada UV $\sim 365 \text{ nm}$.

Os espectros de absorção (Figura 3.1.14) dos ligantes mostram bandas intensas, típicas de transições $\pi \rightarrow \pi^*$, centradas em 315 nm e absorções fracas na região de $375\text{-}450 \text{ nm}$. Após complexação com índio(III) e desprotonação do ligante, se observam nos espectros de absorção dos complexos desvios hiperacrômicos e batocrômicos perto de 350 nm , assim como o aparecimento de uma nova banda de absorção forte em 425 nm .

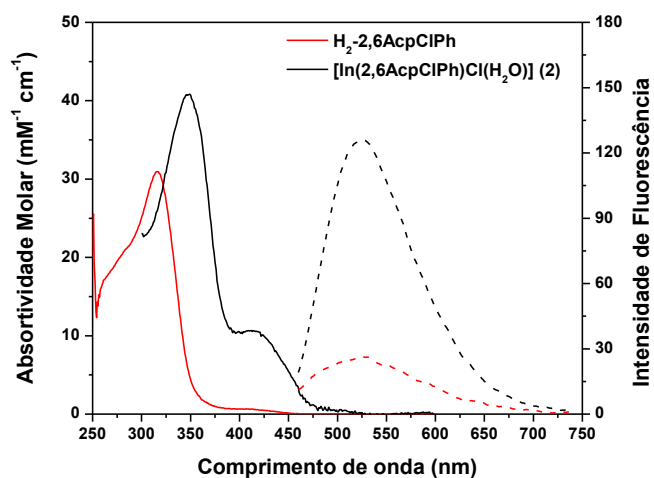


Figura 3.1.14. Espectros de absorção (linha contínua) e emissão (linha tracejada) em DMSO a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para complexo (2) e o ligante, na concentração de $5 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$.

Os espectros de emissão (Figura 3.1.14) após excitação a 393 nm, foram registrados em DMSO à temperatura ambiente usando as mesmas configurações para os ligantes e complexos de índio(III). As emissões dos complexos são semelhantes, na faixa de 525-528 nm, e foram observadas na mesma região de emissão dos ligantes. A diferença mais considerável em relação aos ligantes reside na maior emissão de fluorescência dos complexos. Tomado em conjunto com a baixa absortividade dos ligantes, o resultado é um forte brilho de fluorescência dos complexos, conforme observado na Figura 3.1.13.

Para determinar o rendimento quântico dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**), $[\text{In}(2,6\text{AcPcIPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) e $[\text{In}(2,6\text{AcPCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**3**) em DMSO, é utilizada como amostra padrão a solução de sulfato de quinina em H_2SO_4 $0,5 \text{ molL}^{-1}$ ($\Phi_F = 54\%$).

Os espectros de fluorescência dos complexos e do padrão foram registrados no mesmo comprimento de onda de excitação e medidos em condições idênticas, para assumir que é absorvido o mesmo número de fótons em todas as amostras. Com o aumento da concentração dos complexos, pode-se observar o aumento das bandas de absorção e fluorescência, na Figura 3.1.15.

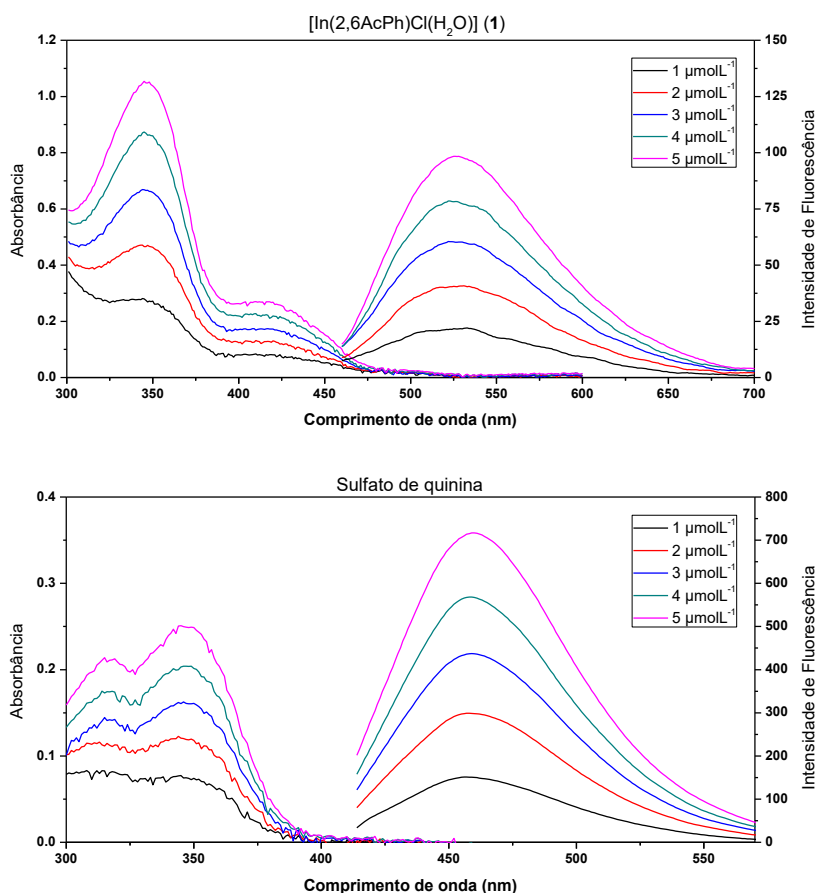


Figura 3.1.15. Espectros de excitação e de emissão do complexo (**1**) em DMSO e do padrão sulfato de quinina em H_2SO_4 $0,5 \text{ molL}^{-1}$.

Foram feitos gráficos de intensidade de fluorescência *versus* absorvância dos complexos e do padrão, calculando-se o coeficiente angular m da reta com intercepto = 0 (Figura 3.1.16).

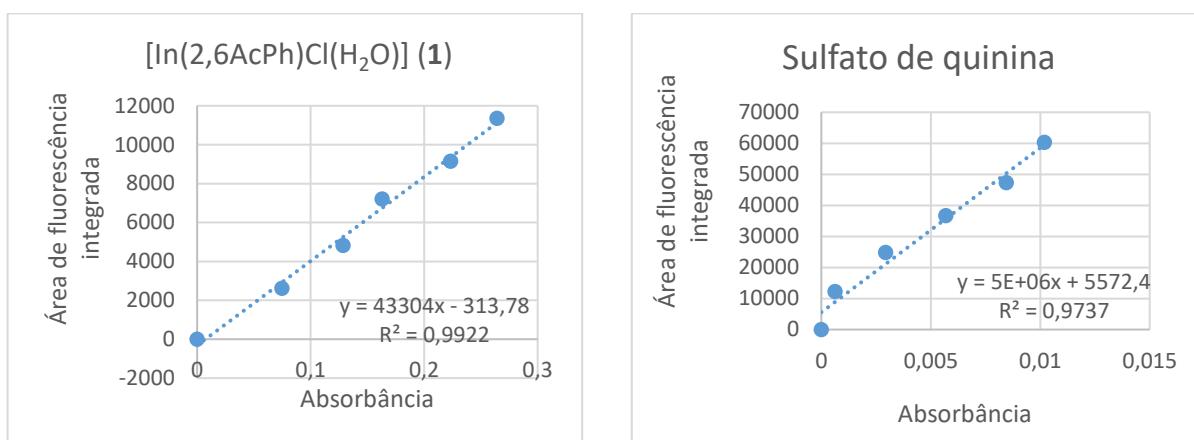


Figura 3.1.16. Gráficos de área de fluorescência integrada *versus* absorvância do complexo (1) e padrão sulfato de quinina. Pontos representam os dados experimentais e a linha pontilhada o ajuste teórico.

O rendimento quântico dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1), $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) e $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3) em DMSO é calculado pela equação abaixo:

$$\Phi_X = \Phi_{pad} \left(\frac{m_X}{m_{pad}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{pad}^2} \right)$$

Onde: pad = amostra padrão,

x = amostra a estudar

η = índice de refração dos solventes.

Tabela 3.1.8. Parâmetros espectroscópicos dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1), $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) e $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3) em DMSO.

Complexos	λ_{max} (abs) (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (em) ^a (nm)	Φ_F (%)
(1)	346 412	41330 10180	525	0,54
(2)	348 411	40770 10650	526	0,64
(3)	349 418	36920 9390	528	0,70

^a Excitação em 393 nm.

Os rendimentos quânticos para os complexos de índio(III) aqui relatados estão entre 0,54 e 0,70% (Tabela 3.1.8), que, apesar de pequenos, proporcionam um brilho de fluorescência significativo devido à forte absorção de luz na região próximo do UV. Esses complexos fornecem novos exemplos de compostos derivados da 2,6-diacetilpiridina com ampla emissão de 450 nm a 700 nm.

Podemos observar valores próximos de rendimento quântico em estudos de complexos de índio com outros ligantes. Por exemplo, complexos de índio(III) com *bis*(tiosemicarbazonas) derivados de 1,8-naftil exibem emissão na faixa de 475-600 nm e rendimentos quânticos de cerca de 0,25% em DMSO.⁸⁵ Um complexo de índio(III) com *tris*(dipirrinato) apresenta emissão na faixa de 550–700 nm com rendimento quântico de 0,41% em tolueno.⁸⁶

3.1.6. Estudos de estabilidade dos complexos em solução

No desenvolvimento de possíveis fármacos, o estudo de estabilidade em solução dos complexos é fundamental para avaliar a estabilidade química e física na caracterização e posteriores ensaios biológicos. Os espectros eletrônicos dos complexos [In(2,6AcPh)Cl(H₂O)] (**1**), [In(2,6Ac_pClPh)Cl(H₂O)] (**2**) e [In(2,6Ac_pCH₃Ph)Cl(H₂O)] (**3**) foram monitorados em função do tempo por espectroscopia eletrônica.

Nos espectros eletrônicos em DMSO, apresentados na Figura 3.1.17, observam-se a banda de absorção em 316 nm correspondente ao ligante e a banda em 334 nm correspondente ao complexo (**2**). As bandas de absorção da solução do complexo (**2**) não apresentaram alterações, observando-se perfis idênticos entre eles o que indica a estabilidade da solução por até 48h.

Na avaliação da estabilidade em solução tampão Tris-HCl com 2% de DMSO, Figura 3.1.18, observa-se a diminuição da banda de absorção em 334 nm, correspondente ao complexo (**2**), o que sugere a instabilidade e formação de precipitado no decorrer de duas horas. A diminuição da absorbância sugere a baixa solubilidade dos complexos em meio aquoso, impossibilitando futuros ensaios biológicos.

⁸⁵ R.L. Arrowsmith, P.A. Waghorn, M.W. Jones, A. Bauman, S.K. Brayshaw, Z. Hu, G. Kociok-Kohn, T.L. Mindt, R.M. Tyrrell, S.W. Botchway, J.R. Dilworth, S.I. Pascu, Fluorescent gallium and indium bis(thiosemicarbazones) and their radiolabelled analogues: Synthesis, structures and cellular confocal fluorescence imaging investigations, *Dalt. Trans.* 40 (2011) 6238–6252.

⁸⁶ S. Kusaka, R. Sakamoto, H. Nishihara, Luminescent Heteroleptic Tris(dipyrinato)indium(III) Complexes, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 3275–3277.

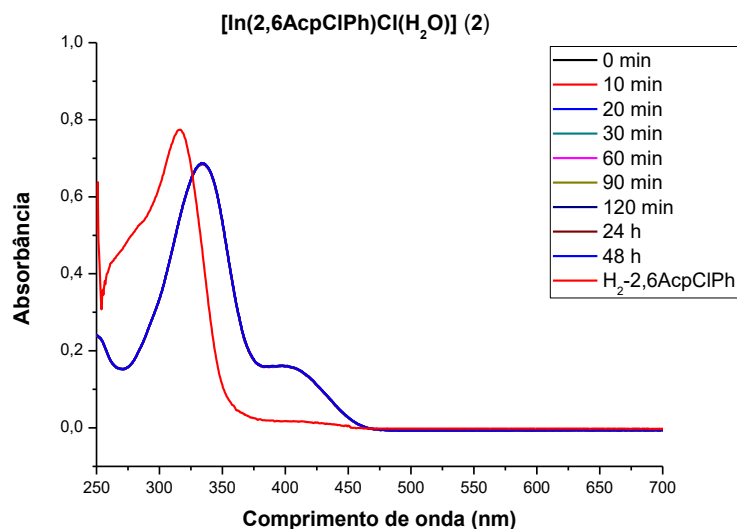


Figura 3.1.17. Espectros eletrônicos em função do tempo, de $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) (direita) e do ligante $\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpClPh}$ (esquerda) na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em DMSO.

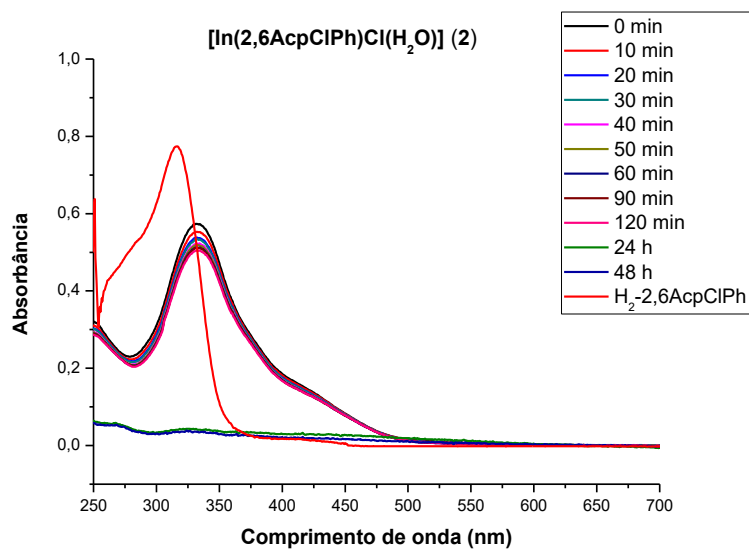


Figura 3.1.18. Espectros eletrônicos em função do tempo, de $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) (direita) e do ligante $\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpClPh}$ (esquerda) na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl ($\text{NaCl } 50 \text{ mmolL}^{-1}/\text{Tris-HCl } 5 \text{ mmolL}^{-1}$, pH 7,2) com 2% de DMSO.

3.2. Complexos de In(III) e $^{114m}\text{In(III)}$ com 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas): estudos de atividade citotóxica contra células tumorais e de efeitos combinados de quimioterapia e radioterapia

Aqui serão estudados novos complexos de índio(III) com *bis*(benzoilhidrazonas) derivadas de 2,6-diformilpiridina, $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**6**), obtidos com o objetivo de manter a coordenação pentadentada e melhorar a solubilidade para futuros ensaios biológicos. A representação estrutural para os complexos é mostrada na Figura 3.2.1.

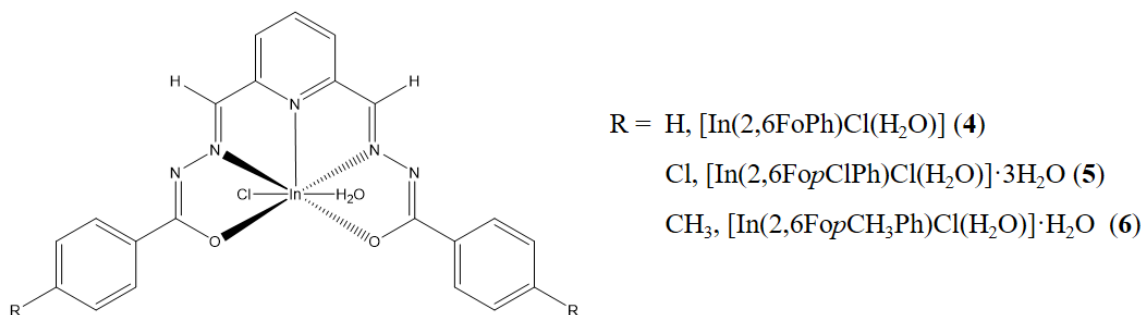


Figura 3.2.1. Representação estrutural para os complexos de In(III) com 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas).

3.2.1. Análises

Os complexos (**4**), (**5**) e (**6**) foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar de CHN, análise termogravimétrica, condutividade molar eletrolítica (DMF, 1 mmolL^{-1}) e os resultados das análises estão apresentados na Tabela 3.2.1.

As análises de CHN concordam com a formação de complexos contendo um átomo de índio, um ligante na forma dianiônica, um íon cloreto e a presença de uma molécula de água. Conforme discutido anteriormente, os baixos valores de condutividade molar sugerem que os complexos são não eletrólitos. Pelas curvas termogravimétricas (ver exemplo na Figura 3.2.2), perdas de massa, na faixa de temperatura entre 25 e 100 °C, caracterizam água de hidratação e na faixa de temperatura entre 100 e 250 °C sugerem água de coordenação ao centro metálico.

Tabela 3.2.1. Rendimento da reação, ponto de fusão^a, análise elementar de CHN^b, análise termogravimétrica^b, massa molar e condutividade molar eletrolítica^c dos complexos [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (4), [In(2,6FopClPh)Cl(H₂O)]·3H₂O (5) e [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (6).

Compostos	Rend %	P fusão °C	%C	%H	%N	TG %	MM g mol ⁻¹	Λ _M cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹
(4)	57	>300 (223-225)	46,50 (46,91)	3,24 (3,19)	12,89 (13,03)	3,56 (3,35)	537,67	1,43
(5)	64	>300 (257-260)	38,02 (38,18)	3,27 (3,20)	10,40 (10,60)	11,3 (10,9)	660,60	1,83
(6)	68	>300 (249-250)	46,62 (47,32)	3,95 (3,97)	11,79 (12,00)	5,98 (6,17)	583,74	2,16

^a Ponto de fusão do ligante entre parênteses

^b Valores teóricos entre parênteses

^c Λ_M (cm²Ω⁻¹ mol⁻¹) concentração de 1 mmolL⁻¹ em DMF.

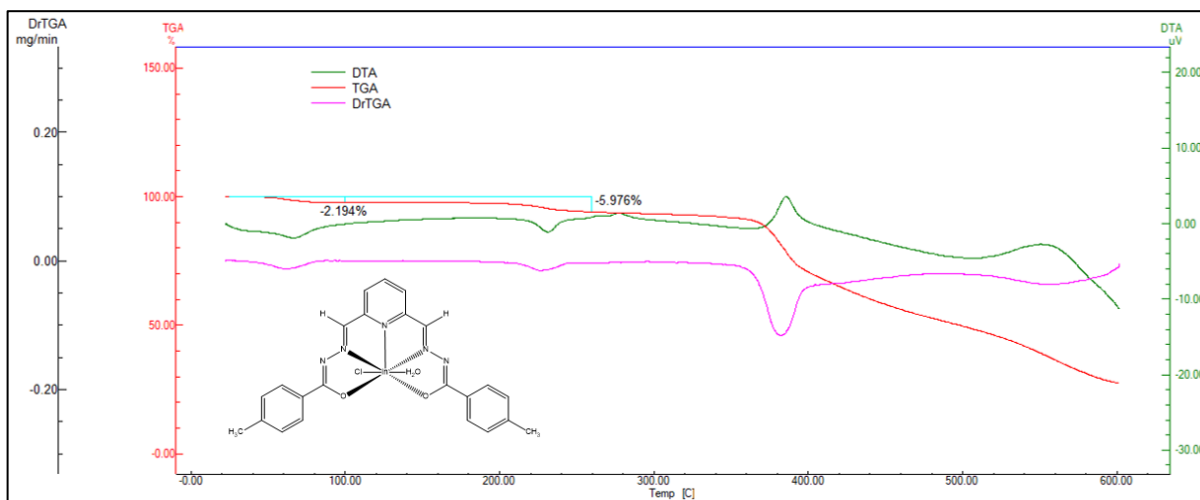


Figura 3.2.2. Termograma do complexo [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (6).

3.2.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)

A atribuição das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho das 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (4), [In(2,6FopClPh)Cl(H₂O)]·3H₂O (5) e [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (6) é apresentada na Tabela 3.2.2.

Nos espectros dos ligantes, destacam-se as bandas ν(N-H), que apresentam uma absorção na região entre 3190-3276 cm⁻¹ nas 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) livres. Nos complexos, o desaparecimento do modo vibracional ν(N-H) indica a desprotonação

dos ligantes. Após coordenação, as bandas correspondentes ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, atribuídas na região entre $1527\text{-}1554\text{ cm}^{-1}$ nas 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) livres, deslocam-se com a complexação para menores energias $1498\text{-}1519\text{ cm}^{-1}$, sugerindo a coordenação do metal pelo nitrogênio imínico. As bandas correspondentes ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$, observadas na região entre $1654\text{-}1671\text{ cm}^{-1}$ nas 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) livres, apresentaram um deslocamento para menor energia e novas bandas foram observadas em entre $1350\text{-}1368\text{ cm}^{-1}$ nos complexos, confirmando a coordenação do ligante ao metal através dos átomos de oxigênio. Finalmente a banda correspondente ao estiramento $\nu(\text{O}-\text{H})$, na região $3432\text{-}3480\text{ cm}^{-1}$ confirma a presença de água nos complexos.

Tabela 3.2.2. Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6).

Composto	$\nu(\text{O}-\text{H})$	$\nu(\text{N}-\text{H})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$
H₂-2,6FoPh	-	3276	1527	1662	-
$[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4)	3432	-	1502	-	1368
H₂-2,6FopClPh	-	3212	1532	1654	-
$[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5)	3440	-	1498	-	1350
H₂-2,6FopCH₃Ph	-	3190	1554	1671	-
$[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6)	3480	-	1519	-	1352

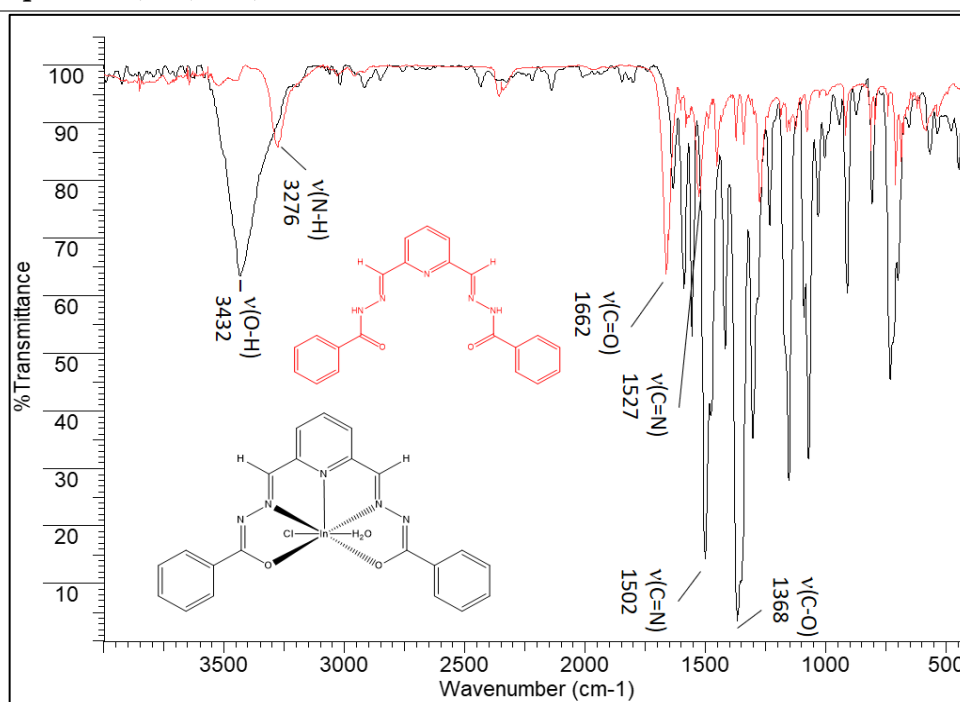


Figura 3.2.3. Espectros de infravermelho do ligante H₂-2,6FoPh e seu complexo $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4).

3.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os ligantes 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) e seus complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**6**) foram caracterizados por RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, e suas atribuições foram feitas com o auxílio de experimentos bidimensionais. A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das *bis*(benzoilhidrazonas) e seus complexos é apresentada na Figura 3.2.4.

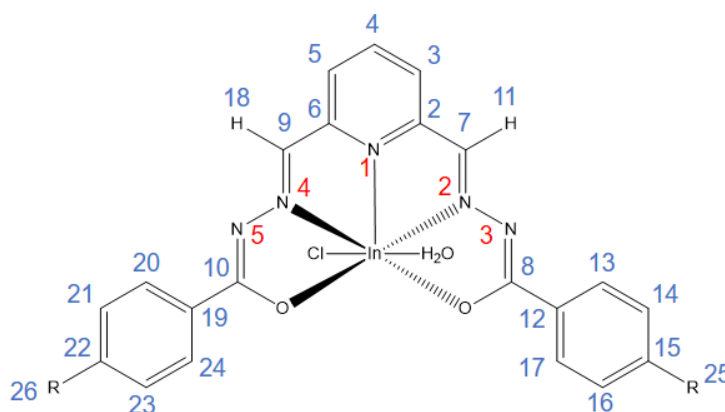


Figura 3.2.4. Numeração dos átomos nos complexos de In(III) com 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) R = H, $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**), R = Cl, $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e R = CH₃, $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**6**).

Após a complexação com In(III) os espectros de RMN de ^1H em DMSO-*d*₆ (Figura 3.2.5) mostram a ausência dos sinais de N(3)-H e N(5)-H, confirmando a desprotonação do ligante e a coordenação das 2,6-diformilpiridina-*bis*(benzoilhidrazonas) na forma dianiônica. Conforme apresentado na Figura 3.2.5, os sinais de todos os hidrogênios tiveram significativos deslocamentos em relação à posição nos ligantes livres.

Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante H₂-2,6FoPh e do complexo (**4**) apresentados na Figura 3.2.7, mostraram deslocamentos referentes aos carbonos C8 e C10 (C=O) no complexo em relação ao ligante livre. Os núcleos de carbono do anel piridínico tiveram deslocamentos significativos, indicando a coordenação através de um sistema quelante O - N imínico - N piridínico - N imínico - O de forma pentadentada.

As atribuições de todos os sinais presentes nos espectros de RMN ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos ligantes e complexos (**4**), (**5**) e (**6**) são apresentadas nas Tabelas 3.2.3 e 3.2.4 respectivamente e foram realizadas com auxílio dos experimentos bidimensionais COSY (pelo acoplamento ^1H - ^1H) e HMQC (pelo acoplamento ^1H - ^{13}C).

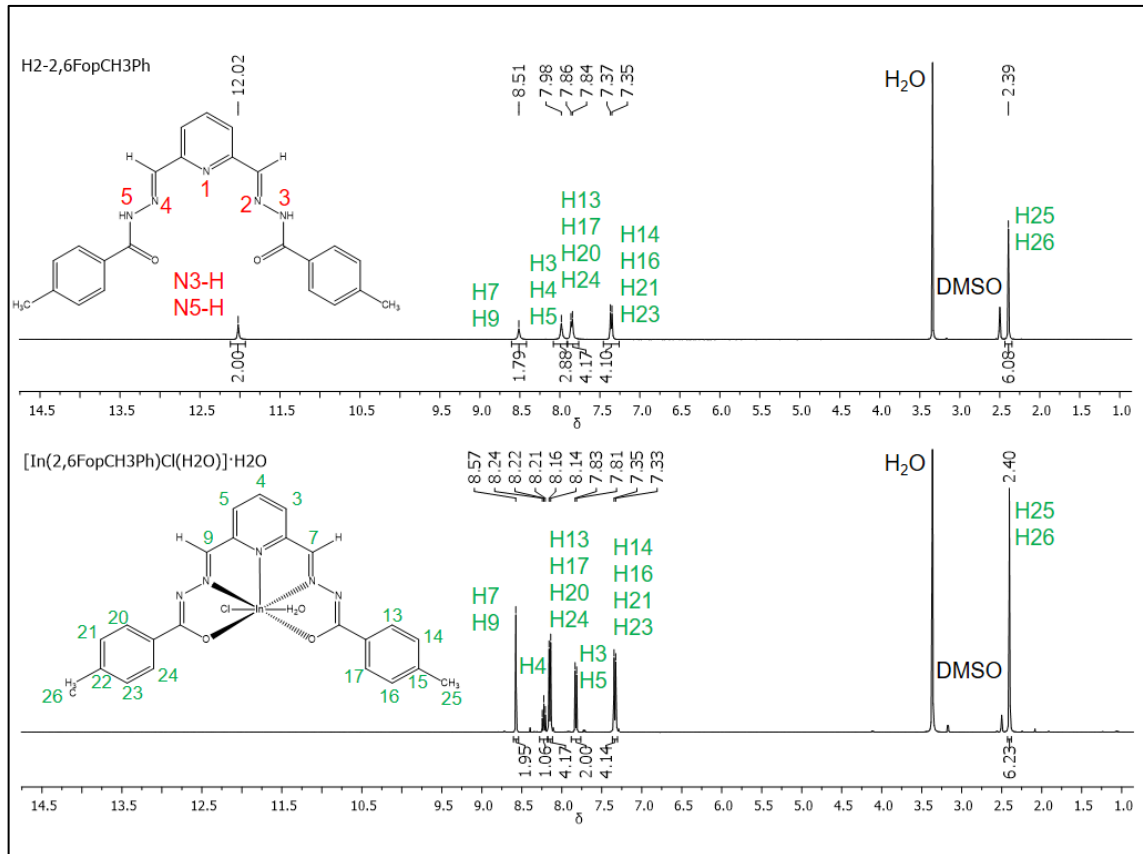


Figura 3.2.5. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{-2,6FopCH}_3\text{Ph}$ e do complexo (6).

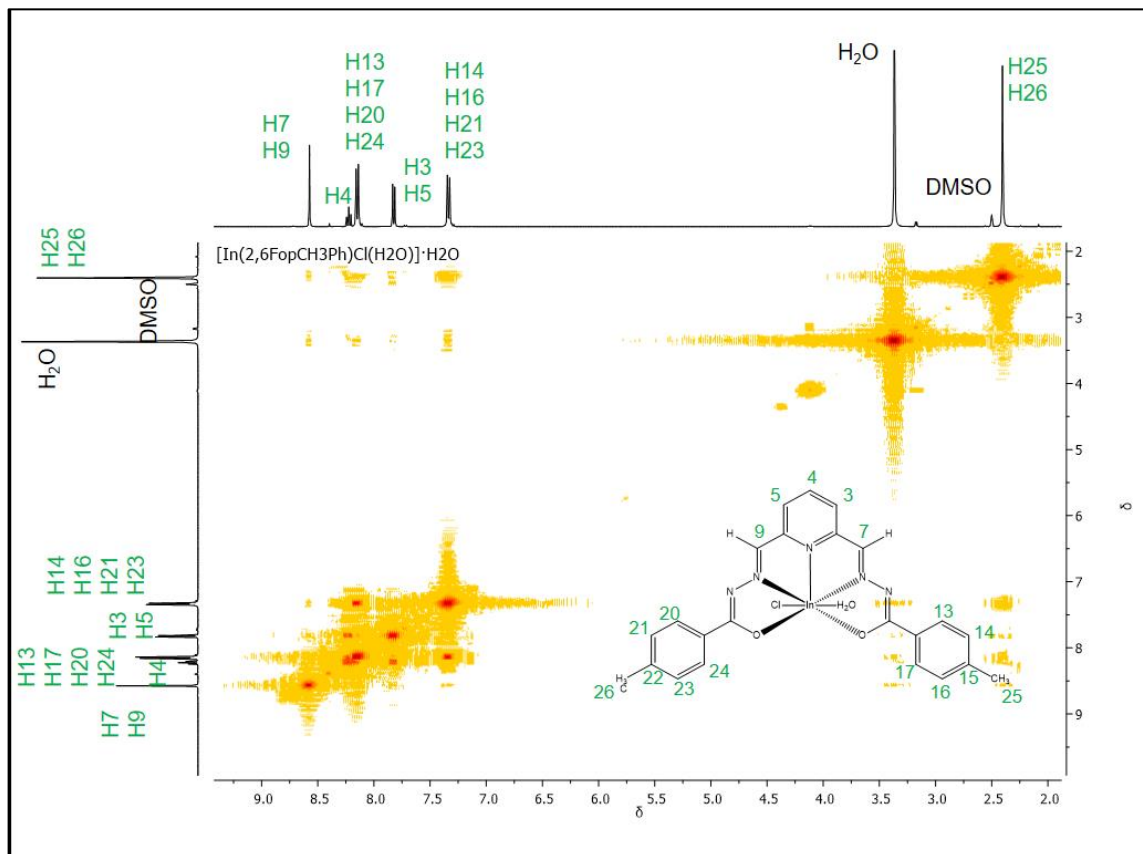


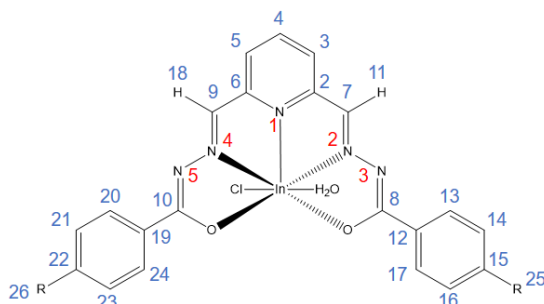
Figura 3.2.6. O espectro de RMN COSY do complexo $[\text{In}(\text{2,6FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6).

Tabela 3.2.3. Atribuições, número de hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (J/Hz) dos sinais de RMN de ^1H das *bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6). (400 MHz, DMSO- d_6)

Atribuições	Número de hidrogênio	H ₂ -2,6FoPh	$[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4)
N3-H, N5-H	2	12,10 (s)	-
H4	1	8,00-7,93 (m)	8,26-8,23 (m)
H3, H5	2	8,00-7,93 (m)	7,85 (d) ($J = 7,9$)
H7, H9	2	8,52 (s)	8,62 (s)
H13, H17	2	8,00-7,93 (m)	8,26-8,23 (m)
H14, H16	2	7,64-7,54 (m)	7,60 - 7,51 (m)
H15, H22	2	7,64-7,54 (m)	7,60 - 7,51 (m)
H20, H24	2	8,00-7,93 (m)	8,26-8,23 (m)
H21, H23	2	7,64-7,54 (m)	7,60 - 7,51 (m)

Atribuições	Número de hidrogênio	H ₂ -2,6FopClPh	$[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5)
N3-H, N5-H	2	12,15 (s)	-
H4	1	8,00-7,96 (m)	8,26-8,22 (m)
H3, H5	2	8,00-7,96 (m)	7,88 (d) ($J = 7,9$)
H7, H9	2	8,51 (s)	8,64 (s)
H13, H17	2	8,00-7,96 (m)	8,26-8,22 (m)
H14, H16	2	7,64 (d) ($J = 8,4$)	7,59 (d) ($J = 8,5$)
H20, H24	2	8,00-7,96 (m)	8,26-8,22 (m)
H21, H23	2	7,64 (d) ($J = 8,4$)	7,59 (d) ($J = 8,5$)

Atribuições	Número de hidrogênio	H ₂ -2,6FopCH ₃ Ph	$[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6)
N3-H, N5-H	2	12,02 (s)	-
H4	1	8,00-7,96 (m)	8,22 (t) ($J = 7,8$)
H3, H5	2	8,00-7,96 (m)	8,82 (d) ($J = 7,9$)
H7, H9	2	8,51 (s)	8,57 (s)
H13, H17	2	7,85 (d) ($J = 7,7$)	8,15 (d) ($J = 7,8$)
H14, H16	2	7,36 (d) ($J = 7,7$)	7,34 (d) ($J = 7,9$)
H20, H24	2	7,85 (d) ($J = 7,7$)	8,15 (d) ($J = 7,8$)
H21, H23	2	7,36 (d) ($J = 7,7$)	7,34 (d) ($J = 7,9$)
H25, H26	6	2,39 (s)	2,40 (s)



R = H, $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4)

Cl, $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5)

CH₃, $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6)

^a Multiplicidade: s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; m = multiplete; dd = duplo duplete.

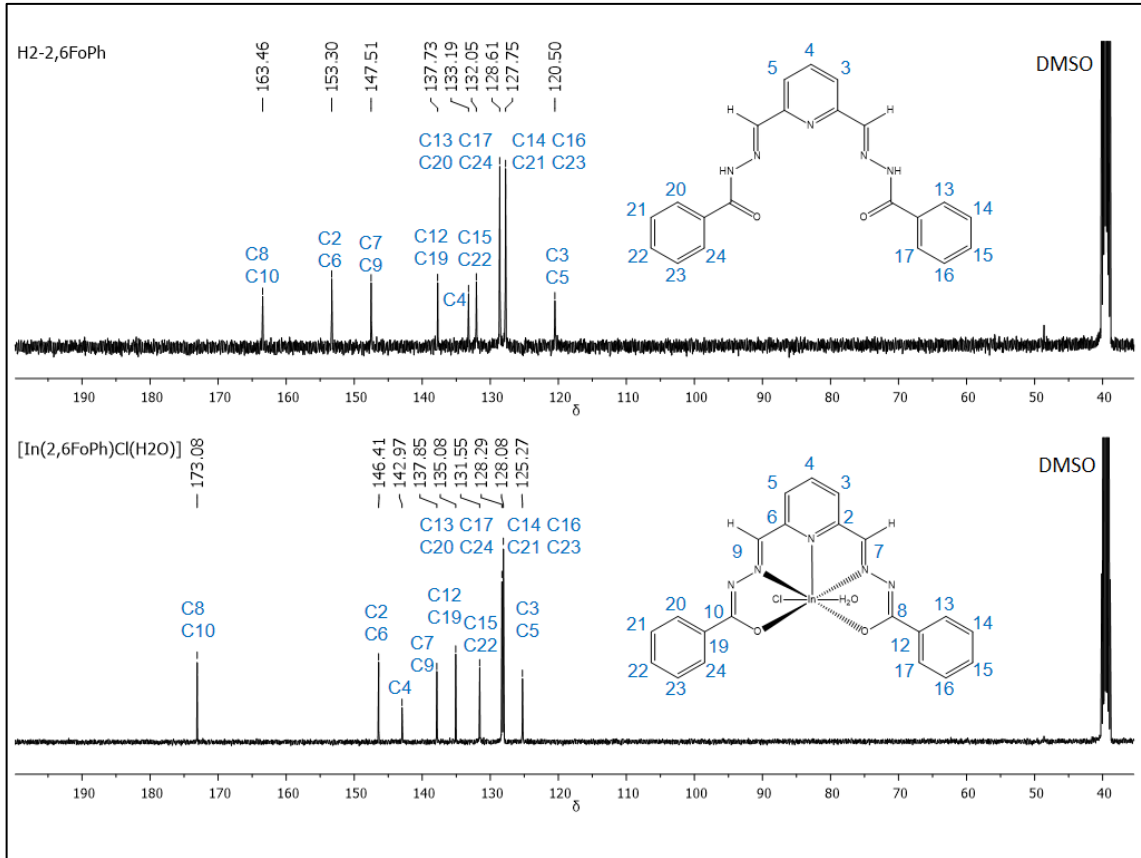


Figura 3.2.7. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante $\text{H}_2\text{-2,6FoPh}$ e do complexo (4).

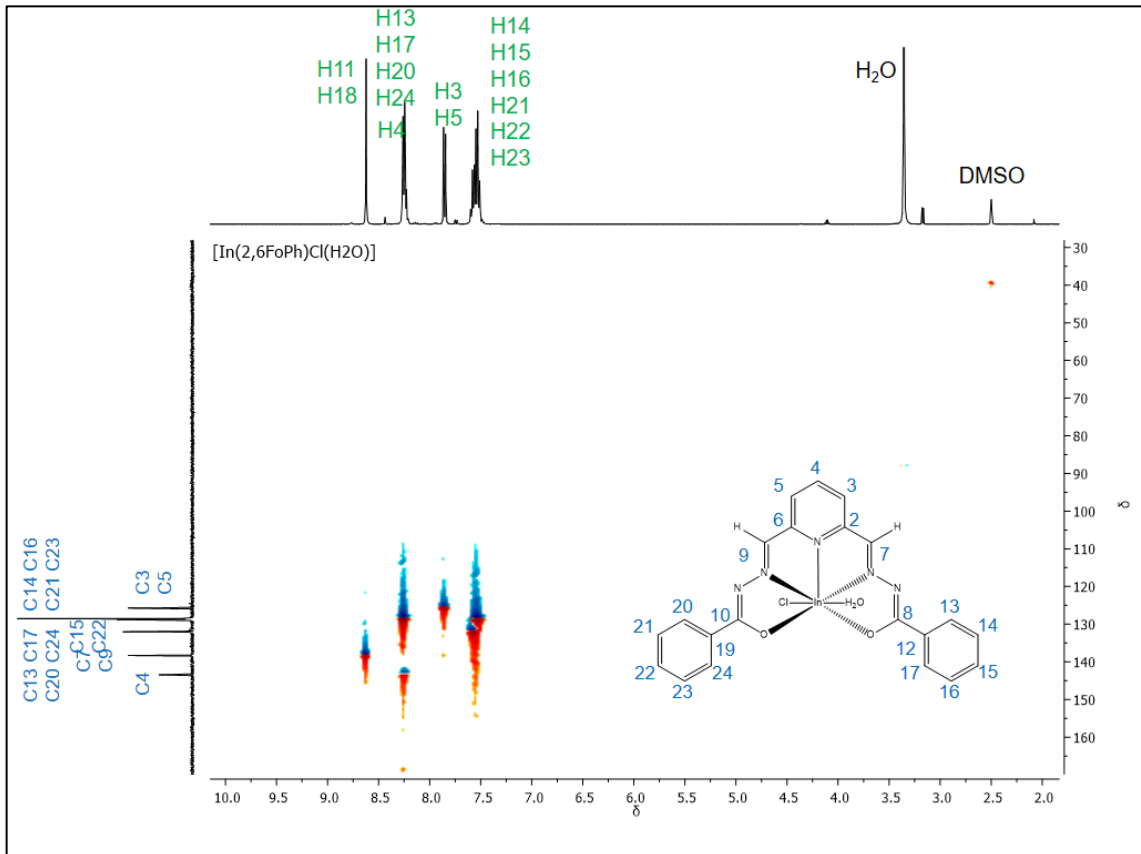
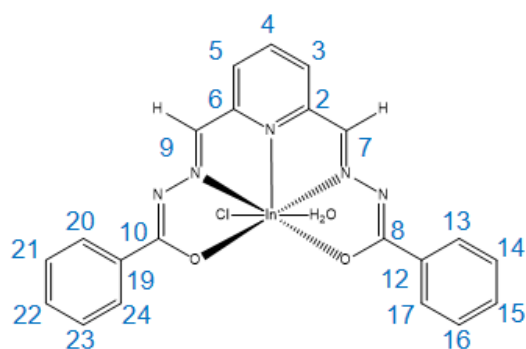


Figura 3.2.8. O espectro de RMN HMQC do complexo $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4).

Tabela 3.2.4. Atribuições, DEPT 135, deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ das *bis*(benzoilhidrazonas) e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6). (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Atribuições	DEPT	$\text{H}_2-2,6\text{FoPh}$	$[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4)
C2, C6	-	153,3	146,4
C3, C5	↑	120,5	125,3
C4	↑	133,2	143,0
C7, C9	↑	147,5	137,9
C8,C10	-	163,5	173,1
C12, C19	-	137,7	135,1
C13, C17, C20, C24	↑	128,6	128,3
C14, C16, C21, C23	↑	127,8	128,1
C15, C22	↑	132,1	131,5
Atribuições	DEPT	$\text{H}_2-2,6\text{AFopClPh}$	$[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5)
C2, C6	-	154,5	146,3
C3, C5	↑	120,7	125,6
C4	↑	137,4	143,1
C7, C9	↑	142,0	138,5
C8,C10	-	168,2	172,1
C12, C19	-	131,3	136,3
C13, C17, C20, C24	↑	128,6	129,8
C14, C16, C21, C23	↑	129,1	128,5
C15, C22	-	141,5	133,9
Atribuições	DEPT	$\text{H}_2-2,6\text{FopCH}_3\text{Ph}$	$[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6)
C2, C6	-	152,3	146,5
C3, C5	↑	121,3	125,0
C4	↑	135,9	142,9
C7, C9	↑	141,6	137,9
C8,C10	-	163,8	173,1
C12, C19	-	137,3	141,5
C13, C17, C20, C24	↑	129,3	128,9
C14, C16, C21, C23	↑	128,1	128,2
C15, C22	-	144,2	132,3
C25, C26	↑	21,0	21,4



R = H, $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4)

Cl, $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5)

CH_3 , $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (6)

3.2.4. Estudo de fluorescência dos complexos (4-6)

Os complexos (**4**, **5** e **6**) também apresentaram luminescência quando expostos à luz UV~365 nm, pelo aumento da conjugação nos ligantes e a rigidez dos complexos. Baseado nisso, foi determinado o rendimento quântico utilizando-se como amostra padrão a solução de sulfato de quinina em H_2SO_4 $0,5 \text{ molL}^{-1}$ ($\Phi_F = 54\%$).

Para assumir que é absorvido o mesmo número de fótons em todas as amostras, os espectros de fluorescência dos complexos e o padrão foram registrados no mesmo comprimento de onda de excitação e medidos em condições idênticas. Com o aumento da concentração dos complexos, pode-se observar o aumento das bandas de absorção e fluorescência, na Figura 3.2.9.

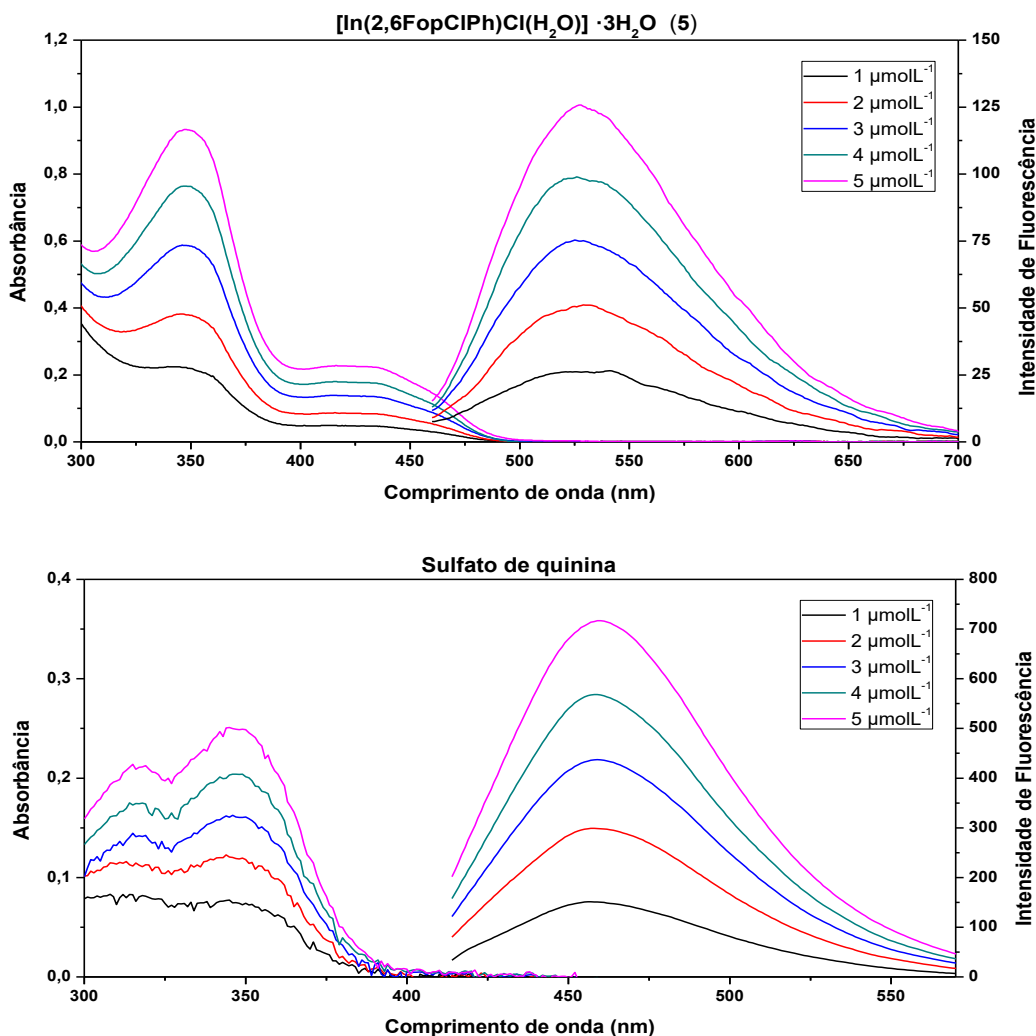


Figura 3.2.9. Espectros de excitação e de emissão do complexo $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**5**) em DMSO e do padrão sulfato de quinina em H_2SO_4 $0,5 \text{ molL}^{-1}$.

Foram feitos gráficos de área de fluorescência integrada versus absorvância dos complexos e o padrão, calculando o coeficiente angular m da reta com intercepto = 0. O rendimento quântico dos complexos (4), (5) e (6) em DMSO é calculado pela equação abaixo:

$$\Phi_x = \Phi_{pad} \left(\frac{m_x}{m_{pad}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{pad}^2} \right)$$

Onde: pad = amostra padrão,

x = amostra a estudar

η = índice de refração dos solventes.

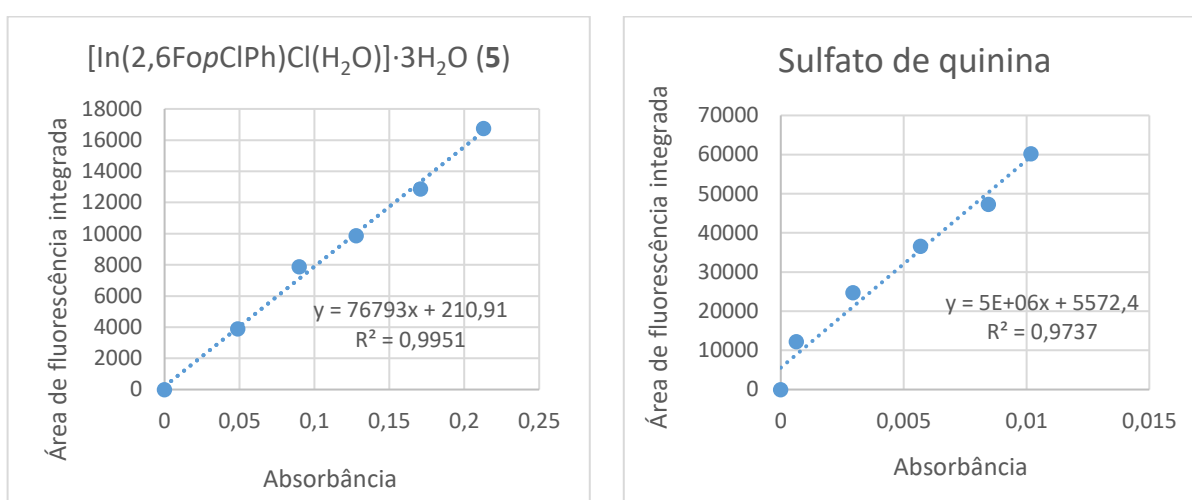


Figura 3.2.10. Gráficos de área de fluorescência integrada *versus* absorvância do complexo (5) e padrão sulfato de quinina. Pontos representam os dados experimentais e a linha pontilhada o ajuste teórico.

Tabela 3.2.5. Parâmetros espectroscópicos dos complexos [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (4), [In(2,6FopClPh)Cl(H₂O)]·3H₂O (5) e [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (6) em DMSO.

Complexos	λ_{max} (abs)	ϵ	λ_{max} (em) ^a	Φ_F
	(nm)		(nm)	
(4)	346	42200	523	1,02
	434	10000		
(5)	348	35550	519	0,77
	426	8900		
(6)	352	37000	525	0,96
	438	9250		

^a Excitação em 393 nm.

Os rendimentos quânticos para os complexos de índio(III) estão entre 0,77 e 1,02% (Tabela 3.2.5). Neste caso, os complexos (4-6) apresentaram valores significativamente maiores de rendimento quântico e também proporcionam um brilho de fluorescência significativo devido à forte absorção de luz na região próximo do UV.

3.2.5. Estudos de estabilidade dos complexos em solução

Os espectros eletrônicos dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6) foram monitorados em função do tempo por espectrometria eletrônica em diferentes solventes, para avaliar a possibilidade de futuros ensaios biológicos.

Os espectros eletrônicos em DMSO, dos complexos e ligantes, na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, não apresentaram alterações com o tempo, observando-se perfis idênticos entre eles o que indica a estabilidade da solução por até 48h. Na Figura 3.2.11a, observa-se a banda de absorção em 297 nm correspondente ao ligante e a banda em 328 nm correspondente ao complexo (4).

Na avaliação da estabilidade em solução tampão Tris-HCl na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ com 2% de DMSO, observaram-se perfis idênticos para os complexos (4) e (6) por até 48h (Figura 3.2.11b), mas para o complexo (5) ocorreu diminuição da banda de absorção, o que sugere a baixa solubilidade do complexo em meio aquoso. Nos espectros eletrônicos dos respectivos ligantes observa-se a rápida diminuição da absorbância e formação de precipitado no decorrer de duas horas, indicando a baixa solubilidade dos ligantes em meio aquoso, impossibilitando ensaios biológicos. (Figura 3.2.11c)

Foi também estudada a estabilidade dos complexos em solução tampão PBS, com o objetivo de comparar os espectros eletrônicos após irradiação gama. Como observa-se na Figura 3.2.12b, as bandas de absorção têm o mesmo perfil, o que indica que não houve descomplexação ou quebra nas ligações dos complexos após irradiação.

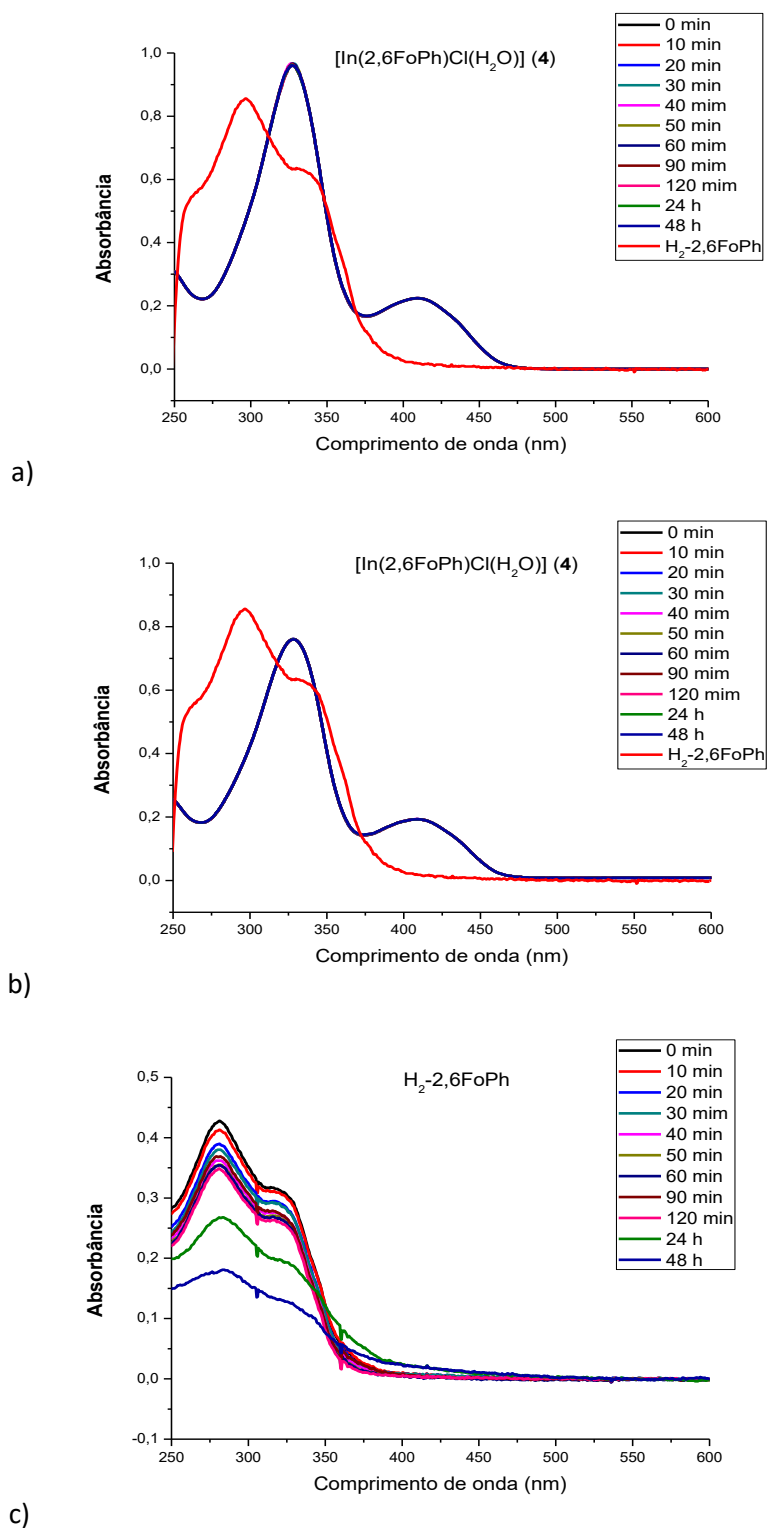
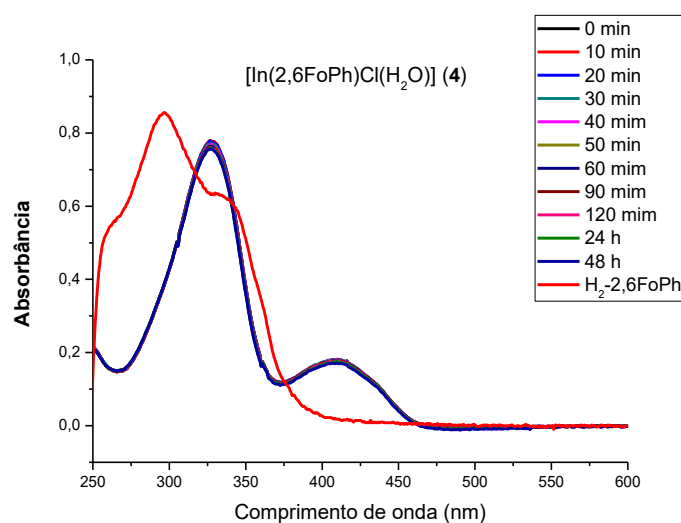
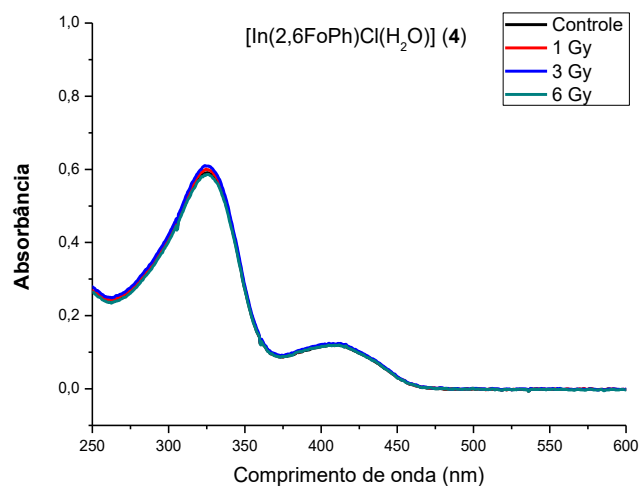


Figura 3.2.11. Espectros eletrônicos em função do tempo de $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \text{ (4)}$ (direita) e do ligante (esquerda) na concentração de $20 \mu\text{molL}^{-1}$ em a) DMSO; b) solução tampão Tris-HCl ($\text{NaCl } 50 \text{ mmolL}^{-1}/ \text{Tris-HCl } 5 \text{ mmolL}^{-1}$, pH 7,2) com 2% de DMSO; c) $\text{H}_2\text{-2,6FoPh}$ em solução tampão Tris-HCl com 2% de DMSO.



a)



b)

Figura 3.2.12. Espectros eletrônicos a) em função do tempo de $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**) em solução tampão PBS com 2% de DMSO b) em solução tampão PBS com 2% de DMSO após irradiação gama.

3.2.6. Ativação neutrônica dos complexos de In(III)

Amostras do sal InCl_3 e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**), e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**6**), foram ativadas neutronicamente com a finalidade de serem produzidos seus derivados radioativos. A partir da reação nuclear (n,γ) dos isótopos naturais ^{113}In e ^{115}In , obtivemos os isótopos radioativos $^{114\text{m}}\text{In}$ e $^{115\text{m}}\text{In}$. Na Tabela 3.2.6 são apresentadas as características isotópicas.

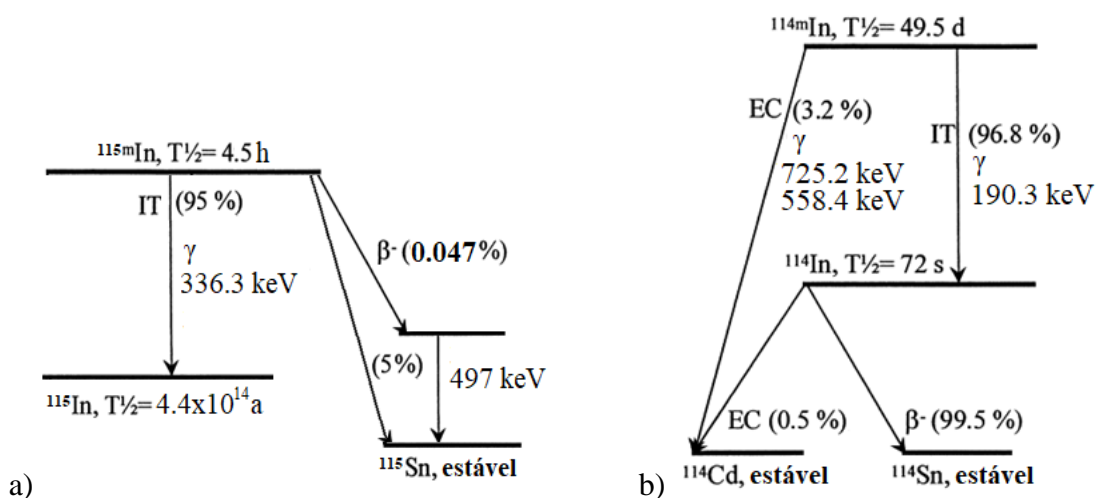
Tabela 3.2.6. Características isotópicas de ^{114m}In e ^{115m}In .

Isótopo	Abundancia isotópica (%)	Reação Nuclear	Produto isotópico	$T_{1/2}$	Energia (keV)
^{113}In estável	4,3	$^{113}\text{In}(n,\gamma)^{114m}\text{In}$	^{114m}In	49,51 d	190,27 558,43 725,24
^{115}In $T_{1/2} = 4.41 \times 10^{14}$ a	95,7	$^{115}\text{In}(n,\gamma)^{115m}\text{In}$	^{115m}In	4,49 h	336,26

O decaimento dos isótopos radioativos apresenta diferentes características, que serão detalhadas a seguir e representadas na Figura 3.2.13.

O isótopo radioativo ^{115m}In tem uma meia-vida de 4,5 horas. O mecanismo de transição isomérica (IT) para o isótopo ^{115}In , acontece em maior proporção (95%) e no decaimento é emitida radiação γ de 336,2 keV. Por outro lado, os 5% restantes do isótopo radioativo ^{115m}In decaem por emissão de partículas β^- para o isótopo estável ^{115}Sn .

O isótopo radioativo ^{114m}In tem uma meia-vida de 49,5 dias, e pelo mecanismo de transição isomérica (IT) decai para o isótopo ^{114}In (meia-vida de 72 segundos) emitindo radiação γ de 190,27 keV. Após esse decaimento ocorrem dois tipos de decaimento do ^{114}In , emissão de partículas β^- (223,80 keV e 778,72 keV) para o isótopo estável ^{114}Sn e, em uma pequena proporção, captura eletrônica do ^{114}In para ^{114}Cd onde são produzidos os elétrons Auger de baixa energia (2,72 keV e 19,30 keV). Por outro lado, 3,2 % do isótopo radioativo ^{114m}In decai por captura eletrônica, emitindo radiação γ de 725,24 keV e 558,43 keV para o isótopo estável ^{114}Cd .⁸⁷

Figura 3.2.13. Diagrama de decaimento do isótopo radioativo a) ^{115m}In e b) ^{114m}In .

⁸⁷ J. Katakura: Decay Radiation Results ^{114}In , in: Nuclear Data Sheets, p. 112, 495. <https://www.nndc.bnl.gov/nudat3/DecayRadiationServlet> [23/06/2023].

Após ativação neutrônica as amostras foram submetidas à espectrometria de raios γ . Observam-se na Figura 3.2.14 os picos de energia caraterísticos de cada isótopo radioativo, confirmando a presença dos isótopos radioativos ^{114m}In e ^{115m}In .

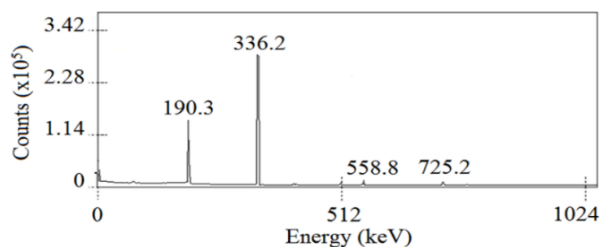


Figura 3.2.14. Espectro de raios γ do complexo (*4).

As atividades específicas induzidas totais no $^*\text{InCl}_3$ e nos complexos (*4) e (*6) foram consideradas como a soma da atividade específica induzida no pico de energia de 190,3 keV do ^{114m}In com o pico de energia de 336,2 keV do ^{115m}In , e foram expressas em GBq/mol, sendo de 10,62 GBq/mol para o $^*\text{InCl}_3$, 10,41 GBq/mol para o complexo (*4) e de 12,10 GBq/mol para o complexo (*6).

Para verificar a estabilidade dos complexos após ativação neutrônica, foi realizado um controle de qualidade por meio de cromatografia de camada delgada (TLC). Nas mesmas condições de análise, os perfis cromatográficos dos compostos não radioativos foram iguais, confirmando a estabilidade dos compostos após a ativação neutrônica (Figura 3.2.15).

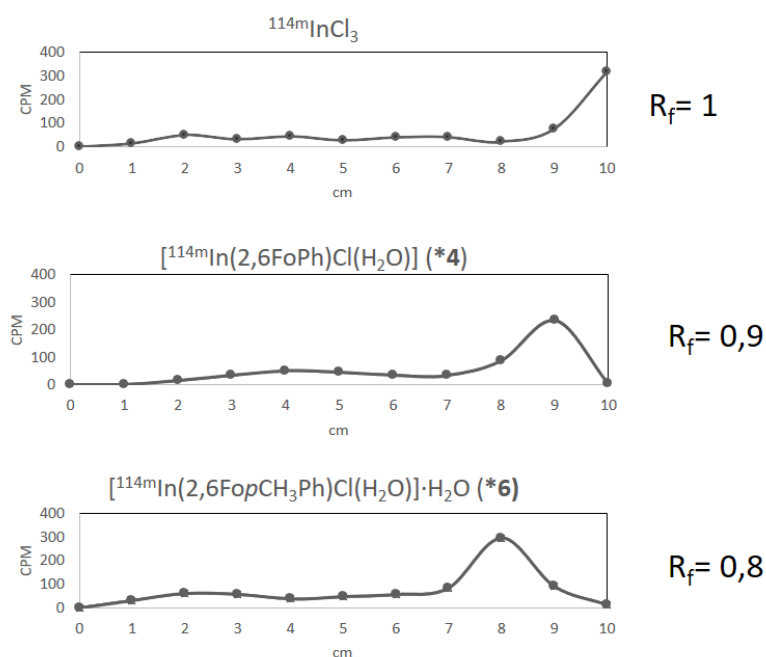


Figura 3.2.15. Perfis cromatográficos dos complexos radioativos. Pontos representam os dados experimentais.

3.2.7. Avaliação das atividades citotóxicas complexos de In(III) com 2,6-diformilpiridina-bis(benzoilhidrazonas)

Foram realizados os ensaios da atividade citotóxica do sal InCl_3 e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**), e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**6**), assim como de seus análogos radioativos $^*\text{InCl}_3$, (***4**) e (***6**) contra duas diferentes linhagens células de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e células de fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5) usadas como modelo de célula não tumoral (Tabela 3.2.7).

Conforme mostrado na Tabela 3.2.7, o sal de índio assim como seu análogo radioativo, foram inativos frente às três linhagens celulares. Nenhum dos compostos mostrou atividade citotóxica frente às células MDA-MB-231. O complexo (**4**) apresentou atividade citotóxica na faixa micromolar para a linhagem MCF-7, porém não foi possível calcular o IC_{50} , em concentrações de até $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, para as linhagens MDA-MB-231 e MRC-5. O seu análogo radioativo (***4**) apresentou um aumento significativo de atividade contra as células tumorais de MCF-7 sem atingir as células sadias MRC-5 e com citotoxicidade muito superior à da cisplatina usada como controle (Figura 3.2.16). A radioquimioterapia com o complexo (***4**) resultou em uma diminuição de 3,78 vezes no IC_{50} com relação ao análogo não radioativo (**4**) na linhagem MCF-7.

Tabela 3.2.7. Atividade citotóxica (IC_{50}) e Índice de seletividade (IS) do sal InCl_3 e dos complexos (**4**) e (**6**), e seus análogo radioativo $^*\text{InCl}_3$, (***4**) e (***6**) frente às linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).

Compostos	$\text{IC}_{50} \mu\text{mol L}^{-1}$ e Índice de seletividade (IS)				
	MCF-7	MDA-MB-231	MRC-5	IS ¹	IS ²
InCl₃	ND	ND	ND	ND	ND
*InCl₃	ND	ND	ND	ND	ND
(4)	$8,70 \pm 1,45$	ND	ND	ND	ND
(*4)	$2,30 \pm 0,34$	ND	ND	ND	ND
(6)	ND	ND	ND	ND	ND
(*6)	$5,48 \pm 1,46$	ND	$5,95 \pm 0,87$	1,09	ND
Cisplatina	$39,95 \pm 4,38$	$53,72 \pm 9,20$	$5,70 \pm 0,92$	0,14	0,11

ND: IC_{50} não foi determinado; o valor de $\text{IC}_{50} > 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

$$\text{IS}^1 = \text{IC}_{50 \text{ MRC-5}} / \text{IC}_{50 \text{ MCF-7}}$$

$$\text{IS}^2 = \text{IC}_{50 \text{ MRC-5}} / \text{IC}_{50 \text{ MDA-MB-231}}$$

O complexo (6) mostrou-se inativo contra as três linhagens celulares, mas seu análogo radioativo (*6) apresentou atividade citotóxica frente às células MCF-7. No entanto foi também citotóxico frente às células saudáveis MRC-5. É importante notar que o complexo (*6) e a cisplatina foram igualmente ativos contra as células saudáveis. Dessa forma, podemos concluir que as células de MCF-7 mostraram-se mais sensíveis aos complexos.

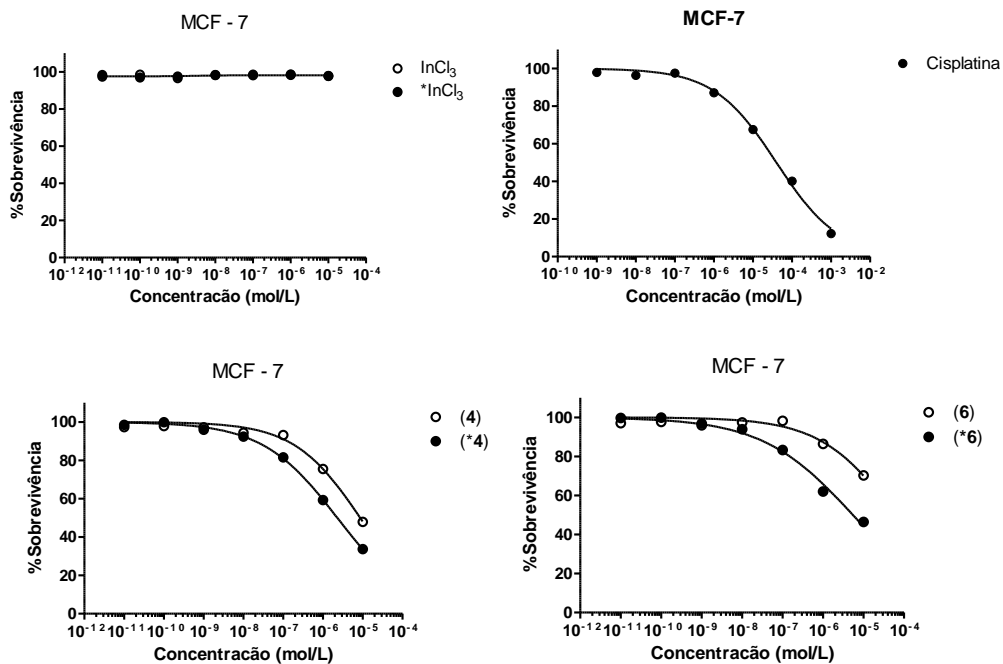


Figura 3.2.16. Porcentagem de sobrevivência das células tumorais MCF-7 em função da concentração. Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC_{50} . (n = 9).

Na Figura 3.2.17, observa-se o impacto que tem a radiação gama sobre a porcentagem de sobrevivência em cada linhagem celular, irradiadas nas doses de radiação 1, 3 ou 6 Gy com taxa de dose média de 90 Gy/h.

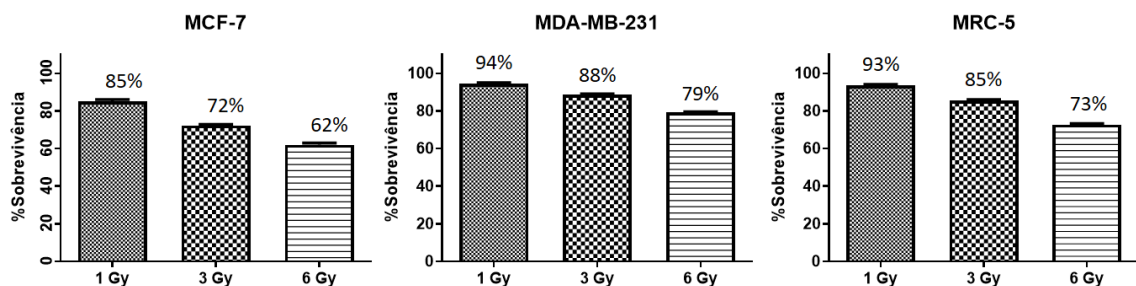
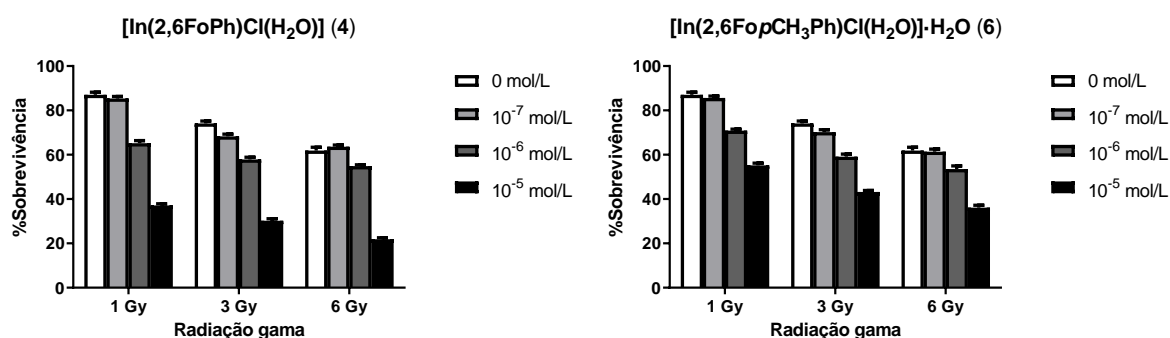


Figura 3.2.17. Efeito da monoterapia com radiação gama com Cobalto-60 em células MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).

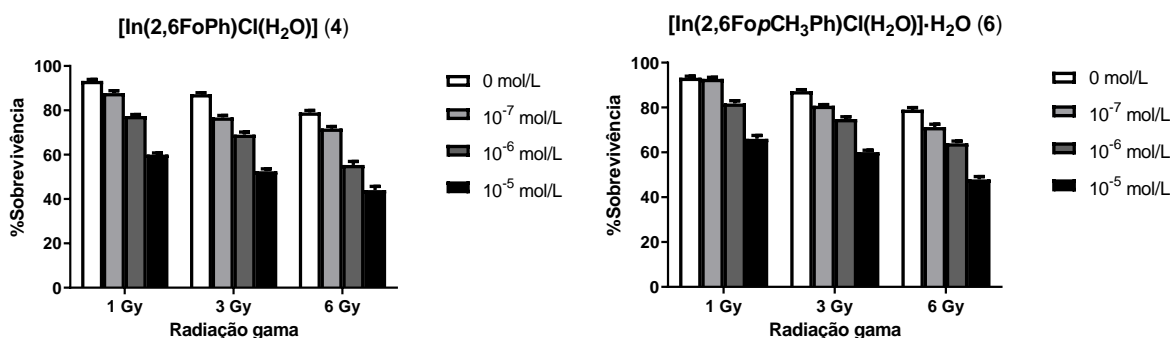
A resistência de células tumorais a drogas tem sido um grande desafio na clínica oncológica. Uma estratégia interessante para aumentar a atividade citotóxica dos complexos é mediante a utilização de radiação gama. Atualmente dentre as modalidades de tratamento do câncer, a radioterapia e a quimioterapia são as mais utilizadas.

As linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5 foram tratadas com os complexos $[\text{In}(\text{2,6FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(\text{2,6FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6) e irradiadas nas doses de radiação 1 Gy, 3 Gy ou 6 Gy com taxa de dose média de 90 Gy/h (Figura 3.2.18).

MCF-7



MDA-MB-231



MRC-5

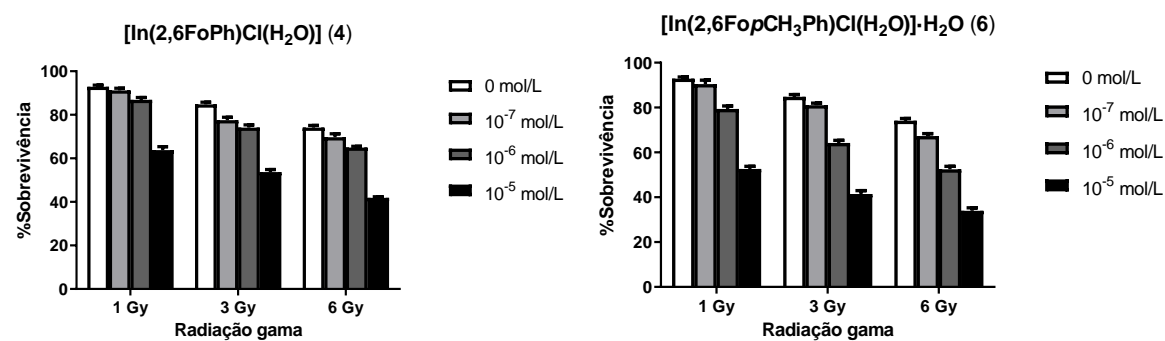


Figura 3.2.18. Efeito citotóxico induzido, pelo tratamento combinado com complexos (4) ou (6) com radiação gama (1 Gy, 3 Gy ou 6 Gy), nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).

Na Figura 3.2.18, observa-se a porcentagem de sobrevivência das células em relação ao aumento das doses de radiação, e é importante ainda notar que os complexos para os quais não havia sido possível calcular IC_{50} são agora capazes de inibir em 50% a sobrevivência das células. Nas Tabelas 3.2.8 e 3.2.9, observa-se o fator de potencialização (FP) da radiação na terapia combinada.

Tabela 3.2.8. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada frente a células MCF-7, e MRC-5 em função da concentração dos complexos $[In(2,6FoPh)Cl(H_2O)]$ (4) e $[In(2,6FopCH_3Ph)Cl(H_2O)] \cdot H_2O$ (6). (n = 9).

Complexo		Fator de potencialização (FP)					
		MCF-7			MRC-5		
		Terapia combinada			Terapia combinada		
Concentração (mol/L)	1 Gy	3 Gy	6 Gy	1 Gy	3 Gy	6 Gy	
(4)	10^{-7}	0,97	1,13	0,96	1,25	1,50	1,12
	10^{-6}	2,32	1,50	1,19	1,87	1,73	1,30
	10^{-5}	4,19	2,49	2,06	5,17	3,09	2,15
(6)	10^{-7}	0,96	1,06	1,02	1,36	1,26	1,21
	10^{-6}	1,94	1,46	1,22	2,94	2,39	1,76
	10^{-5}	2,99	2,03	1,68	6,77	3,90	2,45

Tabela 3.2.9. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada frente a células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos complexos $[In(2,6FoPh)Cl(H_2O)]$ (4) e $[In(2,6FopCH_3Ph)Cl(H_2O)] \cdot H_2O$ (6). (n = 9).

Complexo		Fator de potencialização (FP)					
		MDA-MB-231			MRC-5		
		Terapia combinada			Terapia combinada		
Concentração (mol/L)	1 Gy	3 Gy	6 Gy	1 Gy	3 Gy	6 Gy	
(4)	10^{-7}	2,04	1,94	1,34	1,50	1,25	1,12
	10^{-6}	3,76	2,58	2,12	1,87	1,73	1,30
	10^{-5}	6,66	3,96	2,67	5,17	3,09	2,15
(6)	10^{-7}	1,60	1,41	1,27	1,36	1,26	1,21
	10^{-6}	3,03	2,09	1,71	2,94	2,39	1,76
	10^{-5}	5,65	3,33	2,48	6,77	3,90	2,45

O tratamento com os complexos fez aumentar a eficácia terapêutica da radiação, tornando as células cancerosas mais sensíveis aos efeitos da radioterapia, quando comparado com a radioterapia isoladamente.

O tratamento combinado na concentração de 1 micromolar do complexo (4) com 1 Gy resultou em um aumento de 2,32 vezes na porcentagem de morte celular na linhagem MCF-7 e 3,76 vezes na linhagem MDA-MB-231, enquanto um aumento de 1,87 vezes na porcentagem de morte celular foi observado nas células saudias MRC-5. No entanto, o tratamento com o complexo (6) potencializou a radiação de igual forma nas células tumorais como nas células saudáveis.

Os valores de FP diminuíram com o aumento da dose de radiação para 3 Gy e 6 Gy. O resultado pode estar relacionado ao fato de que ao aumentar a dose de radiação, o dano da célula por radiação ultrapassou o exercido pelo radiosensibilizador, assim o efeito sensibilizante foi menos perceptível.

Na Tabela 3.2.10, foi possível comparar a porcentagem de sobrevivência das células na quimioterapia (complexos (4) e (6)), radioquimioterapia (complexos (*4) e (*6)) e terapia combinada. O complexo (*4) na concentração de 10 micromolar foi mais ativo que o análogo não radioativo (4) contra células MCF-7. A terapia combinada fez aumentar a citotoxicidade nas taxas de dosagem 3 Gy e 6 Gy. O complexo (4) e seu análogo (*4) foram menos citotóxicos frente às células saudias tanto pela quimioterapia quanto pela radioquimioterapia e pela terapia combinada nas diferentes taxas, o que torna este composto muito promissor.

Na concentração de 10 micromolar, o complexo (*6) mostrou-se mais ativo que o análogo não radioativo contra células MCF-7. A terapia combinada usando-se a taxa de dosagem de 6 Gy também favoreceu a atividade com relação ao composto não radioativos e ao análogo radioativo. No entanto, em todos os casos os compostos foram igualmente ou mais citotóxicos frente às células saudias MRC-5.

Na Tabela 3.2.11, com relação às células MDA-MB-231 observa-se que os complexos (*4) e (*6) na concentração de 10 micromolar foram mais ativos que os análogos não radioativos. A terapia combinada se mostrou vantajosa apenas com a taxa de dosagem de 6 Gy. No entanto, (*4) e (*6) também foram mais citotóxicos do que os análogos não radioativos frente às células não tumorais MRC-5. A terapia combinada também favoreceu a citotoxicidade contra as células saudias nos dois casos.

Tabela 3.2.10. Porcentagem de sobrevivência das células MCF-7 e MRC-5 em função da concentração dos complexos [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (4) e [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (6) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia ^{114m}In e terapia combinada. (n = 9).

Composto	Concentração (mol/L)	MCF-7					MRC-5				
		Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada			Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada		
				1Gy	3Gy	6Gy			1Gy	3Gy	6Gy
(4)	10 ⁻⁶	75,4	59,3	65,2	57,8	54,8	93,2	74,6	86,9	74,0	64,9
	10 ⁻⁵	47,9	33,6	37,1	30,2	21,8	73,9	55,1	63,8	53,7	41,8
(6)	10 ⁻⁶	86,3	62,0	70,8	59,1	53,5	84,2	72,1	79,4	64,2	52,4
	10 ⁻⁵	70,2	46,4	55,2	43,2	36,1	57,5	42,9	52,6	41,5	33,9

Tabela 3.2.11. Porcentagem de sobrevivência das células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos complexos [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (4) e [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (6) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia ^{114m}In e terapia combinada. (n = 9).

Composto	Concentração (mol/L)	MDA-MB-231					MRC-5				
		Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada			Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada		
				1Gy	3Gy	6Gy			1Gy	3Gy	6Gy
(4)	10 ⁻⁶	80,3	69,2	77,4	69,0	55,3	93,2	74,6	86,9	74,0	64,9
	10 ⁻⁵	62,9	51,5	60,0	52,5	44,0	73,9	55,1	63,8	53,7	41,8
(6)	10 ⁻⁶	85,0	73,6	81,8	74,9	64,0	84,2	72,1	79,4	64,2	52,4
	10 ⁻⁵	71,6	57,0	66,0	60,1	47,9	57,5	42,9	52,6	41,5	33,9

3.2.8. Alterações morfológicas no núcleo celular

Para determinar o tipo de morte celular induzida pelos complexos de In(III) se utilizou o ensaio de coloração DAPI, o qual detecta DNA fragmentado e cromatina condensada. Os resultados do ensaio de coloração são apresentados na figura 3.2.19, mostrando-se o controle, as células tumorais com os complexos (4) e (6) e seus análogos radioativos (*4) e (*6).

Como se mostra na Figura 3.2.19, mudanças nas formas das células tratadas podem ser claramente observadas, assim como arredondamento celular, núcleos em formato de ferradura e características morfológicas de morte celular programada (apoptose) em relação as células de controle que apresentam expansão citoplasmática.

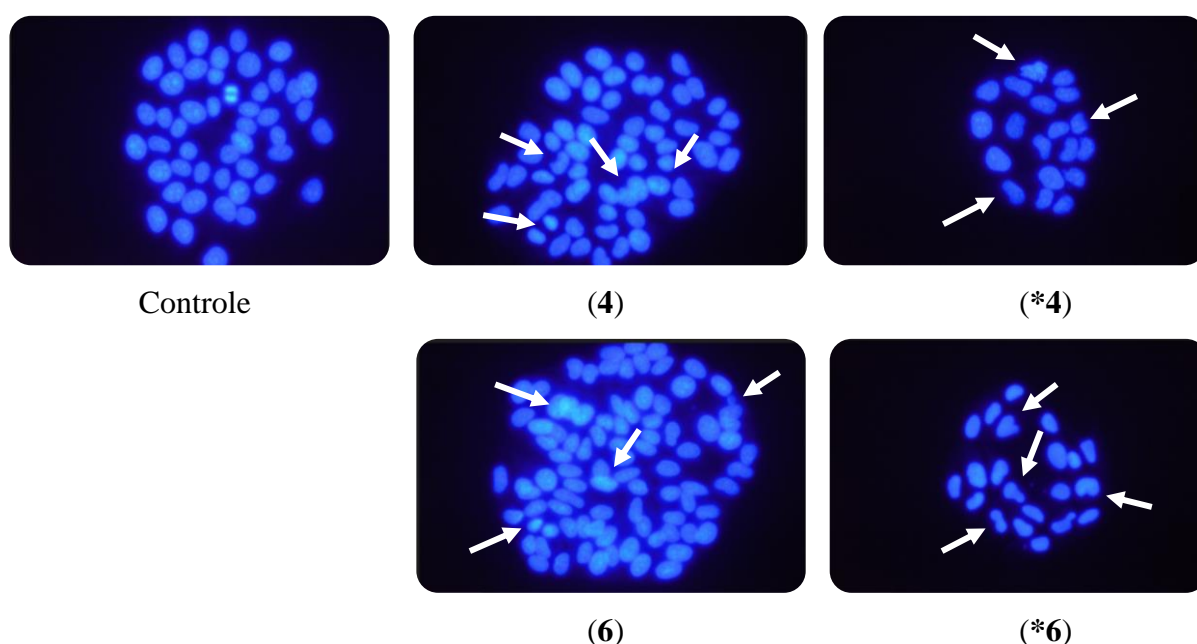


Figura 3.2.19. Células MCF-7 tratadas com os complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6) e seus análogos radioativos (*4) e (*6) (10 $\mu\text{mol/L}$) no ensaio de coloração DAPI. As setas mostram as mudanças morfológicas. Amplificação: 400X.

3.2.9. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA)

O método para avaliar a possível interação dos complexos com o DNA por intercalação é mediante a análise competitiva de interação entre soluções dos complexos e solução de brometo de etídio. Na Figura 3.2.20 encontram-se os espectros de fluorescência do DNA ligado ao BE na presença de concentrações crescentes dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6). Observa-se a supressão parcial da fluorescência, o que sugere um mecanismo intercalante.

Foram feitos gráficos de intensidade de fluorescência *versus* concentração dos complexos, para calcular os valores de C_{50} , que é a concentração do composto que promove

uma redução de 50% na intensidade de fluorescência do sistema BE-DNA. Desta forma, foram calculadas as constantes de ligação aparente K_{app} dos complexos (4) e (6), pela seguinte equação: $K_{app} = \frac{K_{BE} \times [BE]}{C_{50}}$ Onde o K_{BE} é a constante de ligação entre brometo de etídio e DNA ($1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) e $[BE]$ é a concentração de brometo de etídio utilizada.

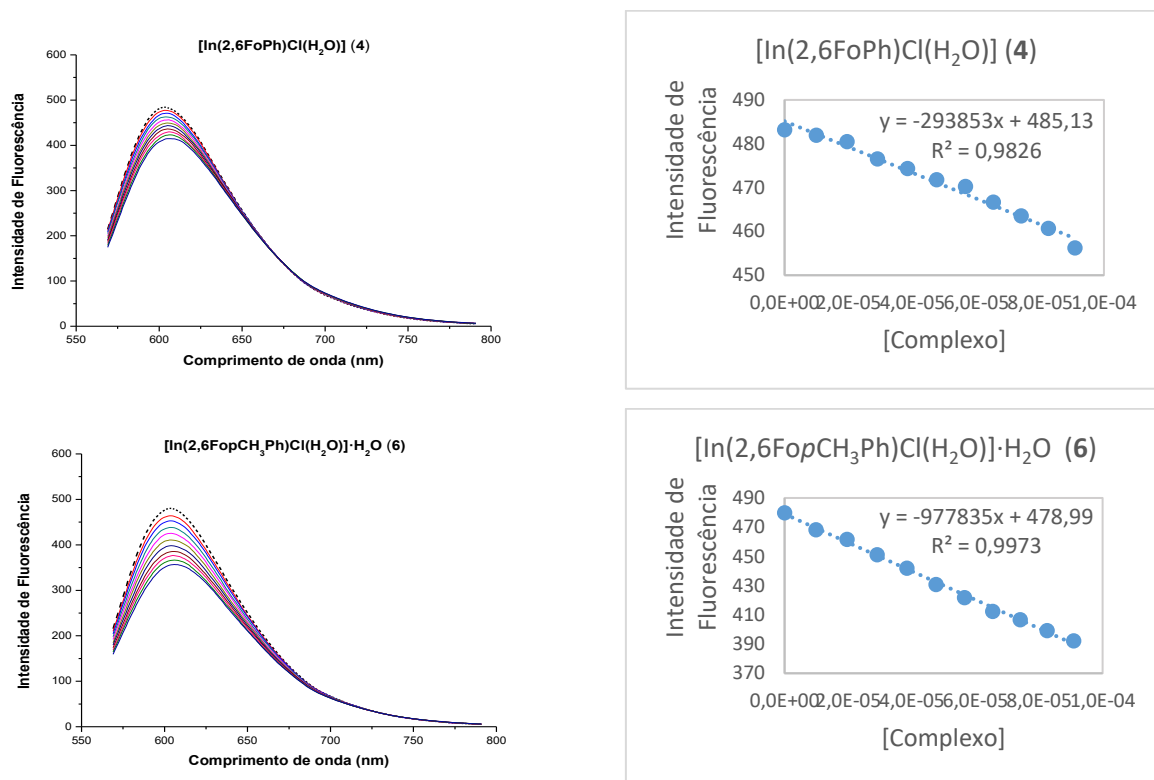


Figura 3.2.20. Espectros de emissão do sistema BE - DNA ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) na ausência (---) e presença (—) de quantidades crescentes dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6) (0 a $200 \mu\text{molL}^{-1}$) (esquerda) e efeito da concentração dos complexos (4) e (6) sobre a intensidade da fluorescência do sistema BE-DNA (direita).

Os valores de K_{app} dos complexos (Tabela 3.2.12) encontram-se na mesma ordem de grandeza do agente intercalador actinomicina D ($K_{app} = 9,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) um fármaco antitumoral.⁸⁸

Tabela 3.2.12. Concentração do composto que promove uma redução de 50% na intensidade de fluorescência (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) dos complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4) e $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6).

Complexos	C_{50} (mM)	K_{app} (M^{-1})
$[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4)	0,83	$1,2 \times 10^5$
$[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6)	0,25	$4,1 \times 10^5$

⁸⁸ Hollstein U. Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. Chem Rev 1974;74:625–52.

3.3. Complexos de In(III) e $^{114m}\text{In(III)}$ com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona): estudos de atividade citotóxica contra células tumorais e de efeitos combinados de quimioterapia e radioterapia

Aqui serão apresentados os complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**), com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) ($\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcSc}$) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) ($\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcTsc}$) Figura 3.3.1.

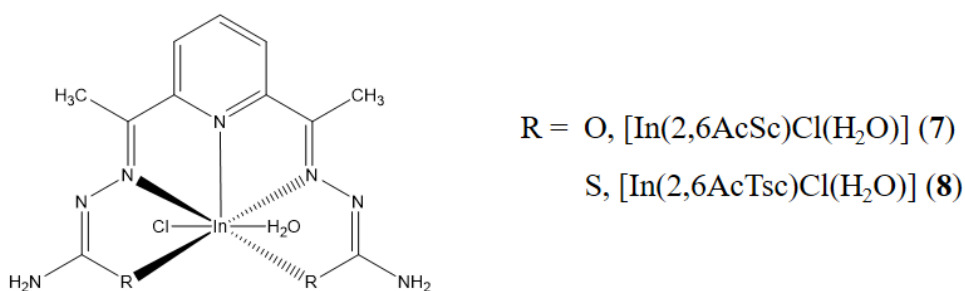


Figura 3.3.1. Representação estrutural para os complexos de In(III) com (R = O) 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) e (R = S) 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona).

3.3.1. Análises

Na Tabela 3.3.1 estão apresentados os rendimentos das reações resultados das análises, a temperatura de fusão, os dados de análise elementar de CHN, análise termogravimétrica, massa molar e condutividade molar eletrolítica (DMF, 1mmolL^{-1}) para os complexos (**7**) e (**8**).

Os resultados de análise elementar concordam com a formação de complexos do tipo metal:ligante (1:1), onde os ligantes encontram-se na forma dianiônica, bem como a presença de um íon cloreto e uma molécula de água. A curva termogravimétrica (Figura 3.3.2) apresentou uma perda de massa equivalente a uma molécula de água nos complexos (**7**) e (**8**). A faixa de temperatura entre 100 e 250 °C sugere uma água de coordenação ao centro metálico e os baixos valores de condutividade molar, confirmam que os complexos são não eletrólitos e que o íon cloreto se encontra coordenado ao centro metálico.

Tabela 3.3.1. Rendimento da reação, ponto de fusão^a, análise elementar de CHN^b, análise termogravimétrica^b, massa molar e condutividade molar eletrolítica^c dos complexos [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (**7**) e [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (**8**).

Compostos	Rend %	P _{fusão} °C	%C	%H	%N	TG %	MM g mol ⁻¹	Λ _M cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹
(7)	82	>300 (239-242)	29,79 (29,79)	3,44 (3,41)	21,52 (22,10)	4,12 (4,06)	443,56	2,64
(8)	87	>300 (215-217)	28,06 (27,78)	3,23 (3,18)	20,55 (20,61)	3,81 (3,79)	475,68	4,79

^a Ponto de fusão do ligante entre parênteses.

^b Valores teóricos entre parênteses.

^c Λ_M (cm²Ω⁻¹ mol⁻¹) concentração de 1 mmolL⁻¹ em DMF.

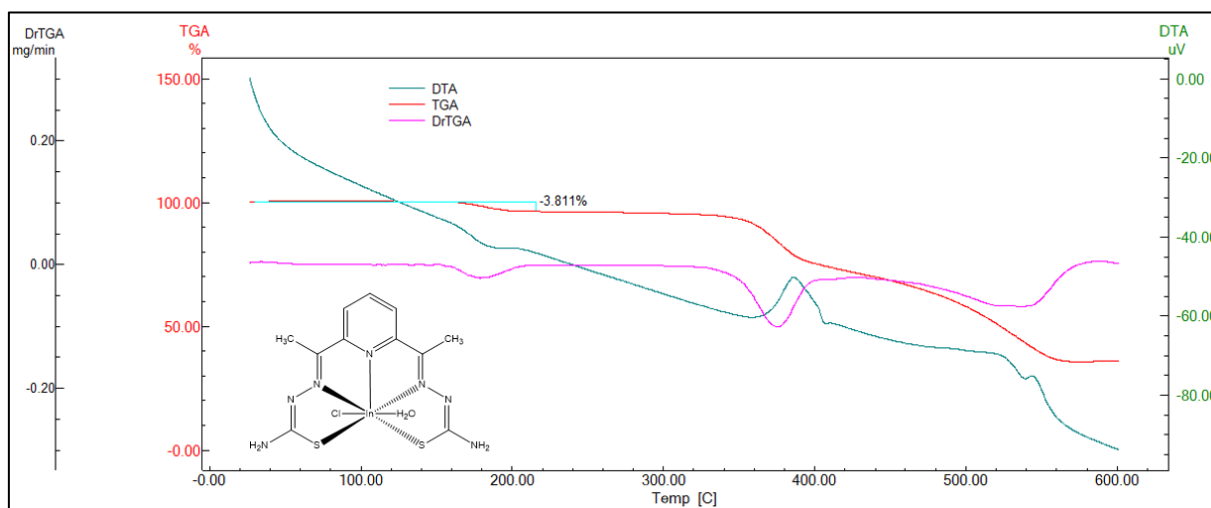


Figura 3.3.2. Termograma do complexo [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (**8**).

3.3.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)

As principais bandas nos espectros de infravermelho da 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) (H₂-2,6AcSc), da 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) (H₂-2,6AcTsc) e dos complexos [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (**7**) e [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (**8**) encontram-se na Tabela 3.3.2. Os espectros do ligante H₂-2,6AcTsc em comparação com seu complexo (**8**) se observa na Figura 3.3.3.

Nos espectros dos ligantes, as bandas observadas em 3201-3274 são atribuídas ao modo ν(N-H). Após a complexação com o índio(III) se observa a ausência da banda, indicando a desprotonação do ligante. A presença de grupos (NH₂) nos ligantes e nos complexos gera duas bandas na região entre 3305-2582 cm⁻¹.

Após a coordenação, as absorções relativas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, entre 1586-1606 cm^{-1} nos ligantes livres, deslocam-se levemente para menores energias, 1552-1595 cm^{-1} , sugerindo a coordenação do metal pelo nitrogênio imínico.

A banda observada em 1711 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação (C=O) na *bis*(semicarbazona), deslocou-se para 1402 cm^{-1} no complexo, indicando a coordenação pelo oxigênio no complexo (7).

Outro ponto a destaque é o estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$, observado em 821 cm^{-1} na *bis*(tiossemicarbazona), que após a complexação desloca-se para 793 cm^{-1} , indicando a coordenação pelo enxofre no complexo (8).

A banda $\nu(\text{O}-\text{H})$, na região 3098-3190 cm^{-1} confirma a presença de água nos complexos.

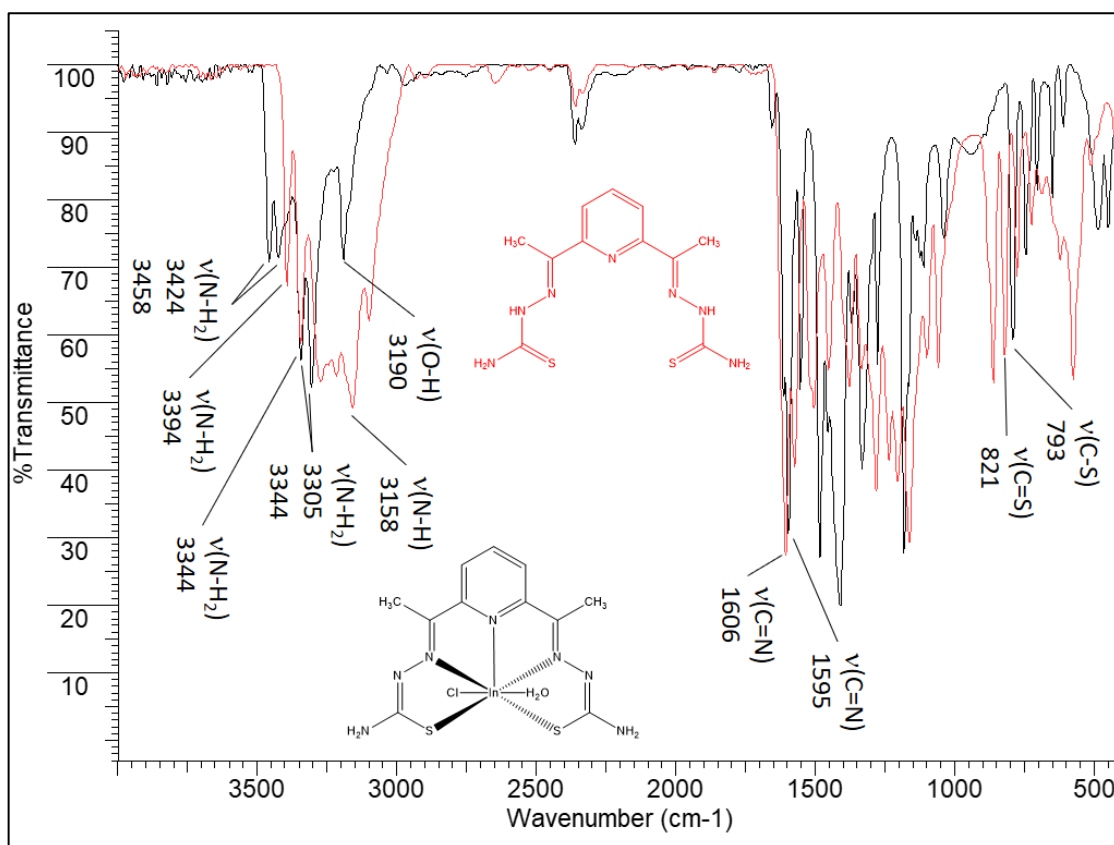


Figura 3.3.3. Espectros de infravermelho do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e seu complexo $[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8).

Tabela 3.3.2. Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de $\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$, $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e seus complexos $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**).

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{N-H}_2)$	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$	$\nu(\text{C=S})$	$\nu(\text{C-S})$
$\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$	3201	3484 3582	-	1586	1711	-	-	-
(7)	-	3368 3500	3098	1552	-	1402	-	-
$\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$	3274	3345 3394	-	1606	-	-	821	-
(8)	-	3305 3343	3190	1595	-	-	-	793

3.3.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os ligantes 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) e seus respectivos complexos $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**) foram caracterizados por RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, e suas atribuições foram feitas com o auxílio de experimentos bidimensionais. A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos é apresentada na Figura 3.3.4.

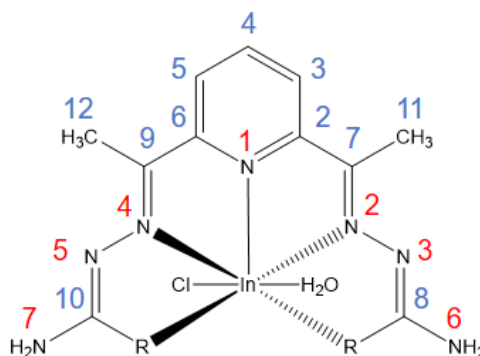


Figura 3.3.4. Numeração dos átomos nos complexos de $\text{In}(\text{III})$ com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) ($\text{R} = \text{O}$) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) $[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**) ($\text{R} = \text{S}$).

Após a complexação com $\text{In}(\text{III})$ os espectros de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (Figura 3.3.5) mostram a ausência dos sinais de $\text{N}(3)\text{-H}$ e $\text{N}(5)\text{-H}$, indicando a desprotonação do ligante e a coordenação na forma dianiônica. As atribuições dos sinais de RMN ^1H dos ligantes e complexos (**7**) e (**8**) são apresentadas nas Tabelas 3.3.3 e 3.3.4.

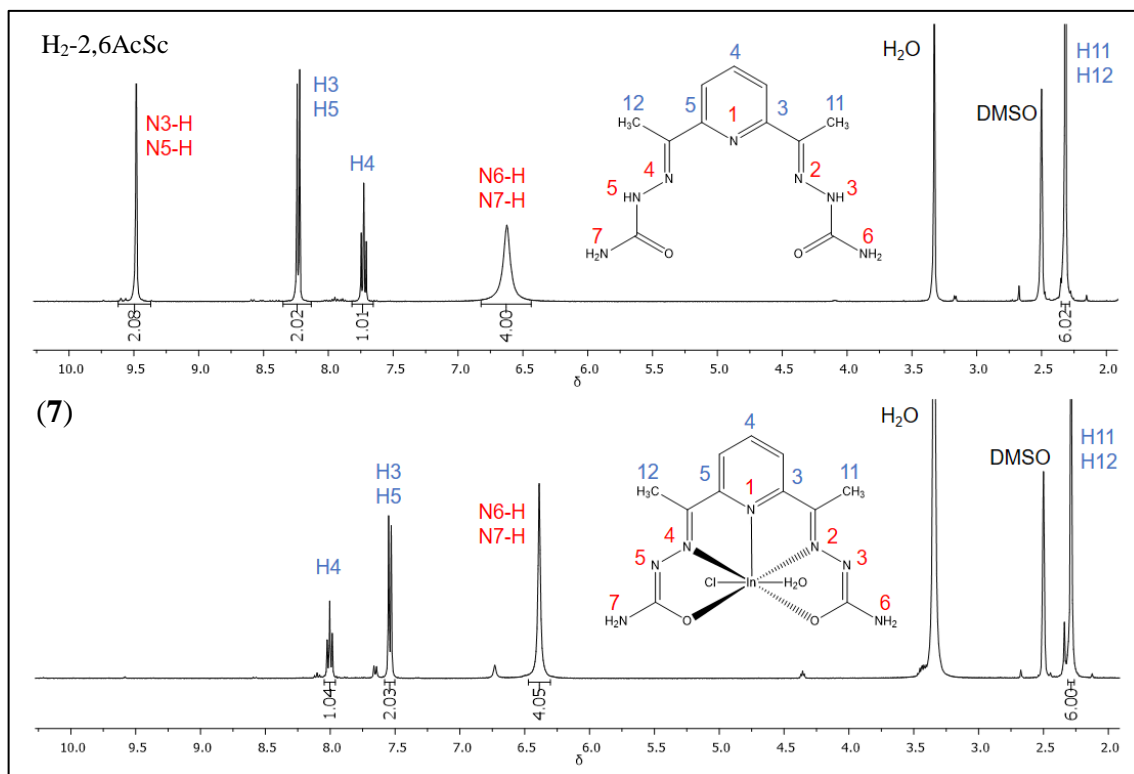


Figura 3.3.5. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$ e do complexo $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7).

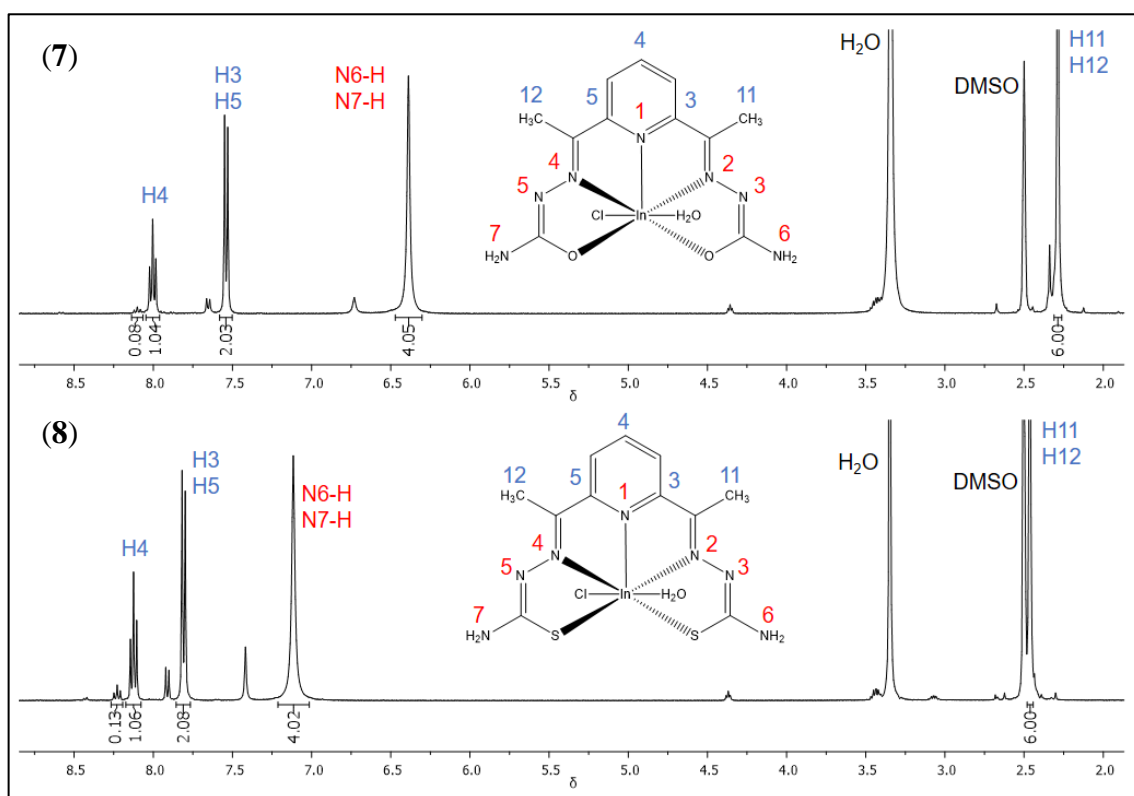


Figura 3.3.6. Espectro de RMN de ^1H dos complexos $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e $[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8).

Tabela 3.3.3. Atribuições, número de hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (J/Hz) dos sinais de RMN de ^1H dos ligantes $\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$, $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e seus complexos $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**). (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

Atribuições	Número de hidrogênio	$\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$	$[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7)
N3-H, N5-H	2	9,48 (s)	-
N6-H, N7-H	4	6,62 (s)	6,39 (s)
H4	1	7,73 (t) ($J=7,9$)	8,00 (t) ($J=7,9$)
H3, H5	2	8,23 (d) ($J=7,9$)	7,54 (d) ($J=7,9$)
H11, H12	6	2,32 (s)	2,29 (s)
Atribuições	Número de hidrogênio	$\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$	$[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8)
N3-H, N5-H	2	10,31 (s)	-
N6-H, N7-H	4	8,41 (s)	7,12 (s)
H4	1	7,77 (t) ($J=7,9$)	8,12 (t) ($J=7,9$)
H3, H5	2	8,15 (d) ($J=7,9$)	7,81 (d) ($J=7,9$)
H11, H12	6	2,43 (s)	2,46 (s)

^a Multiplicidade: s = simpleto; d = duplete; t = tripleto

Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante ($\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$) e do complexo (**7**) são apresentados na Figura 3.3.7. Observam-se deslocamentos referentes aos carbonos C8 e C10 (C=O) no complexo em relação ao ligante. Os núcleos de carbono do anel piridínico tiveram significantes deslocamentos, assim como o grupo metil.

Tabela 3.3.4. Atribuições, DEPT 135, deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos ligantes $\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$, $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e seus complexos $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**).

Atribuições	DEPT	$\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$	$[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7)
C2, C6	-	153,9	147,8
C3, C5	↑	119,5	118,3
C4	↑	136,5	141,8
C7, C9	-	144,8	132,1
C8,C10	-	157,0	168,1
C11, C12	↑	11,4	12,0
Atribuições	DEPT	$\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$	$[\text{In}(\text{2,6AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8)
C2, C6	-	153,5	177,3
C3, C5	↑	120,9	121,6
C4	↑	136,7	141,6
C7, C9	-	148,1	147,4
C8,C10	-	179,1	177,3
C11, C12	↑	12,1	14,1

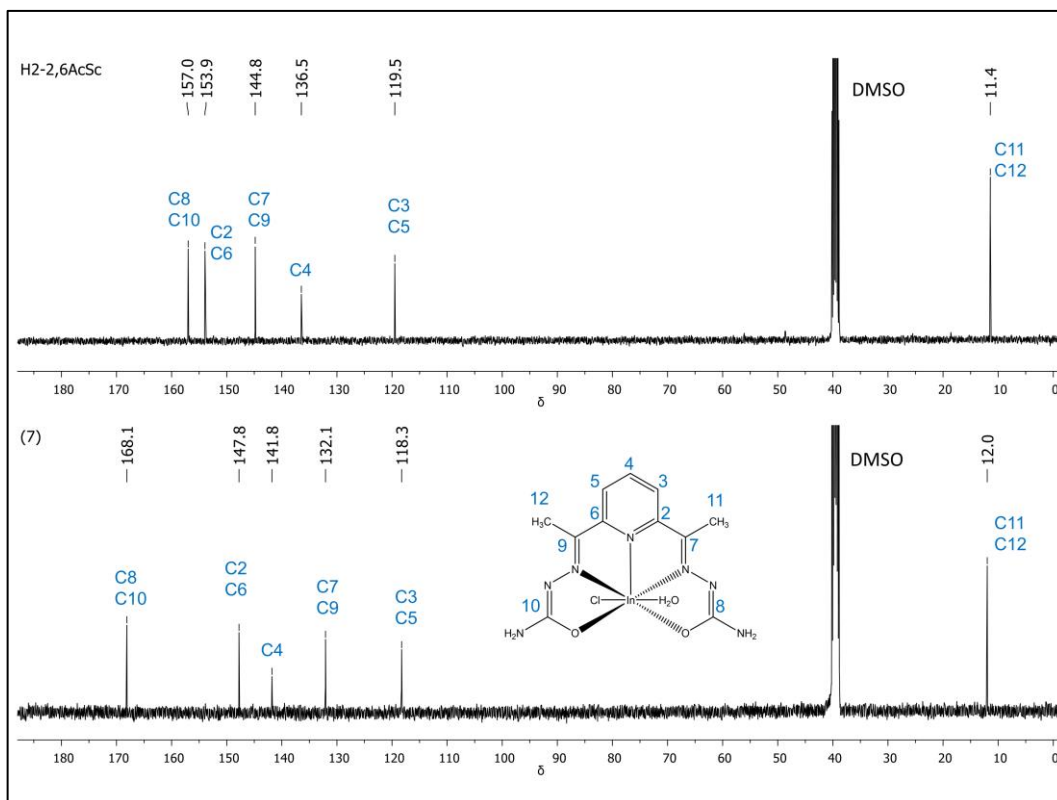


Figura 3.3.7 Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcSc}$ e do complexo $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7).

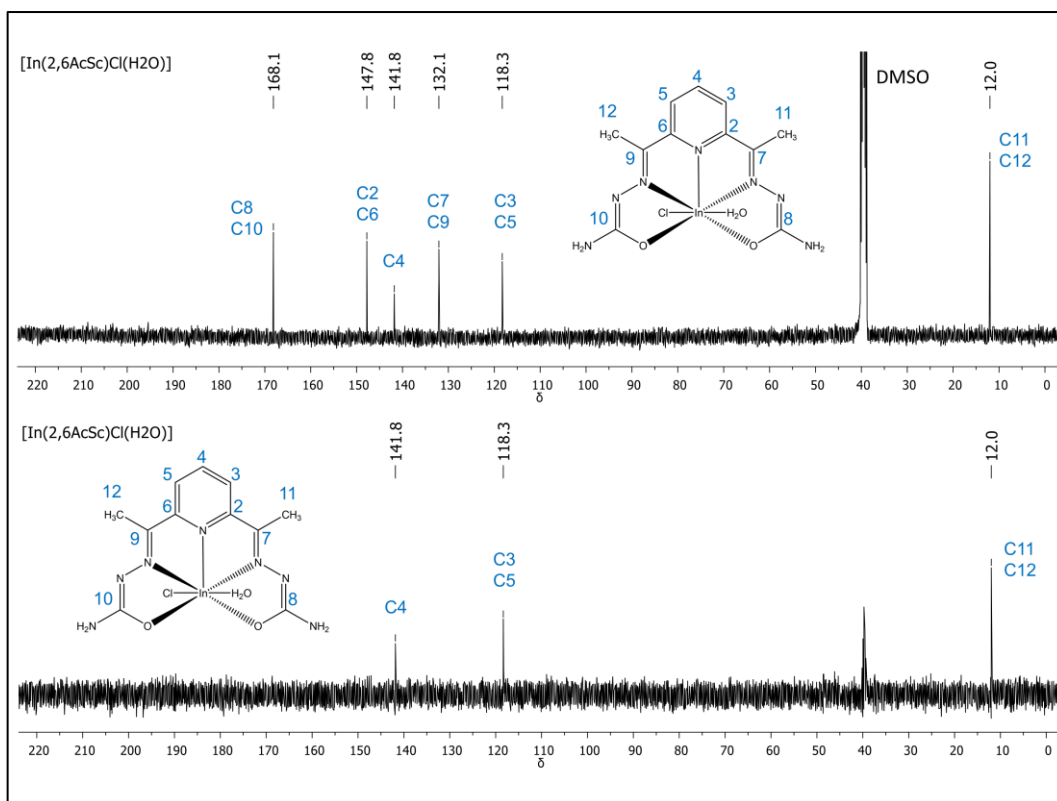


Figura 3.3.8. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo $[\text{In}(\text{2,6AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7).

3.3.4. Estudos de estabilidade dos complexos em solução

As estabilidades dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**) foram monitoradas em função do tempo por espectrometria eletrônica em diferentes solventes. Os espectros eletrônicos em DMSO, dos complexos e ligantes, na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, não apresentaram alterações com o tempo, observando-se perfis idênticos entre eles, o que indica a estabilidade da solução por até 48h. Na avaliação da estabilidade em solução tampão Tris-HCl na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ com 2% de DMSO, observaram-se perfis idênticos no complexo (**7**) e (**8**) e seus respectivos ligantes, o que indica a estabilidade da solução por até 48h (Figura 3.3.9).

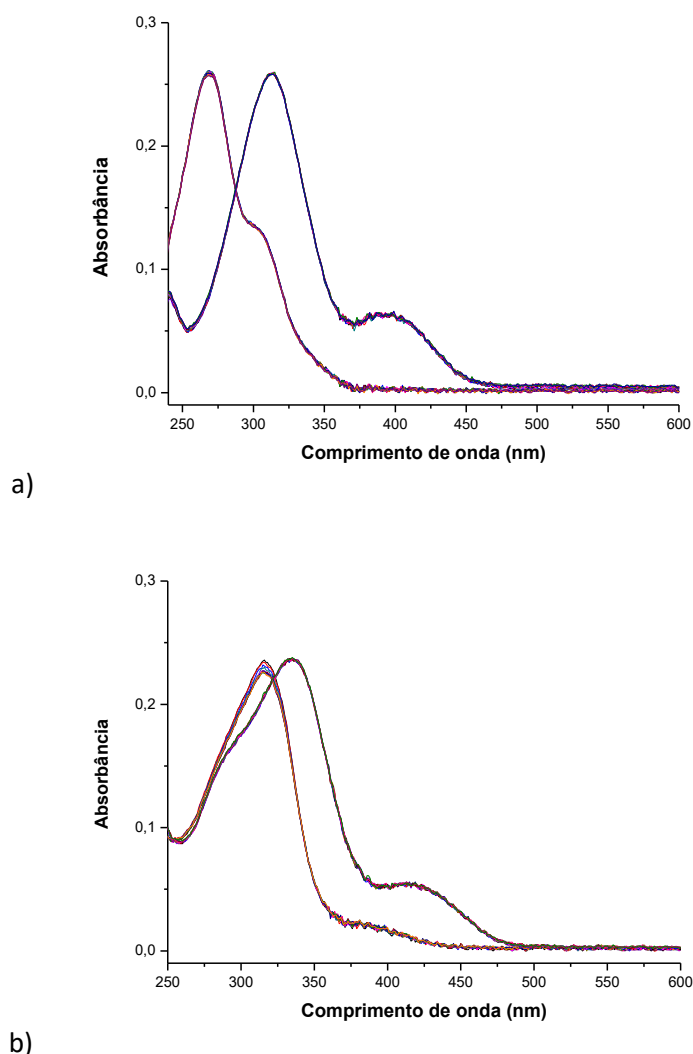
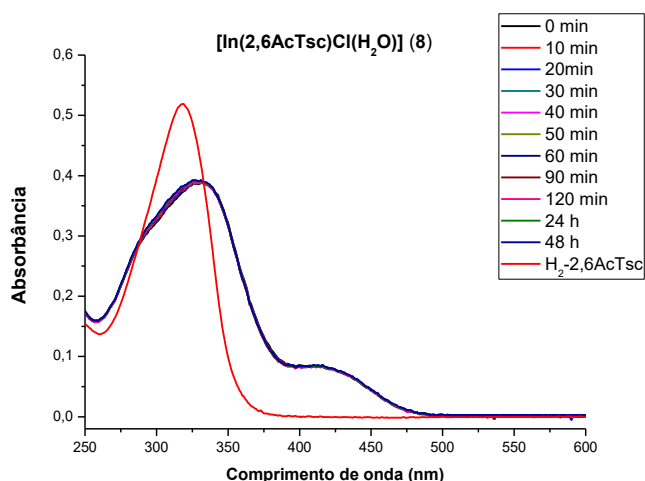
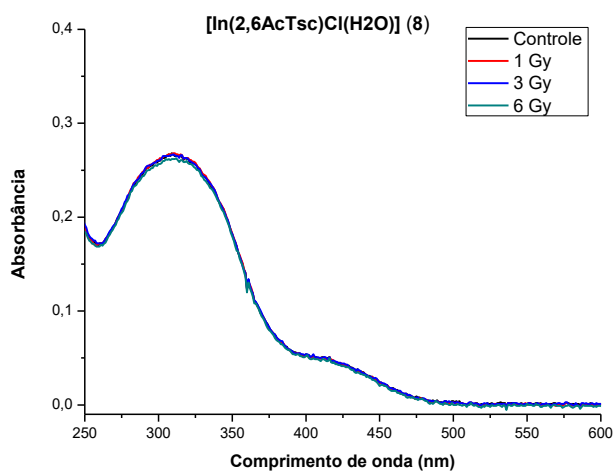


Figura 3.3.9. Espectros eletrônicos em função do tempo a) do complexo (**7**) (direita) e seu ligante (esquerda) b) do complexo (**8**) (direita) e seu ligante (esquerda) em solução tampão Tris-HCl na concentração de $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ com 2% de DMSO, até 48h.

As bandas de absorção dos complexos (7) e (8) e seus respectivos ligantes não apresentaram alterações, observando-se perfis idênticos na avaliação da estabilidade em solução tampão PBS e após irradiação (Figura 3.3.10).



a)



b)

Figura 3.3.10. Espectros eletrônicos em função do tempo do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) a) em solução tampão PBS com 2% de DMSO b) em solução tampão PBS com 2% de DMSO após irradiação gama.

3.3.5. Ativação neutrônica dos complexos de In(III)

Amostras do sal InCl_3 e dos complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8), foram sometidas a ativação neutrônica com a finalidade de serem produzidos seus derivados radioativos.

As atividades específicas induzidas totais no $^{114m}\text{InCl}_3$ e nos complexos (*7) e (*8) foram consideradas como a soma da atividade específica induzida no pico de energia de 190,3 keV do ^{114m}In com o pico de energia de 336,2 keV do ^{115m}In , e foram expressas em GBq/mol, sendo de 10,62 GBq/mol para o $^{114m}\text{InCl}_3$, 9,95 GBq/mol para o complexo (*7) e de 12,52 GBq/mol para o complexo (*8).

Foi realizado um controle de qualidade por meio de cromatografia de camada delgada (TLC) para verificar a estabilidade dos complexos após ativação neutrônica. Os perfis cromatográficos dos compostos não radioativos foram iguais, confirmando a estabilidade dos compostos após a ativação neutrônica (Figura 3.3.11).

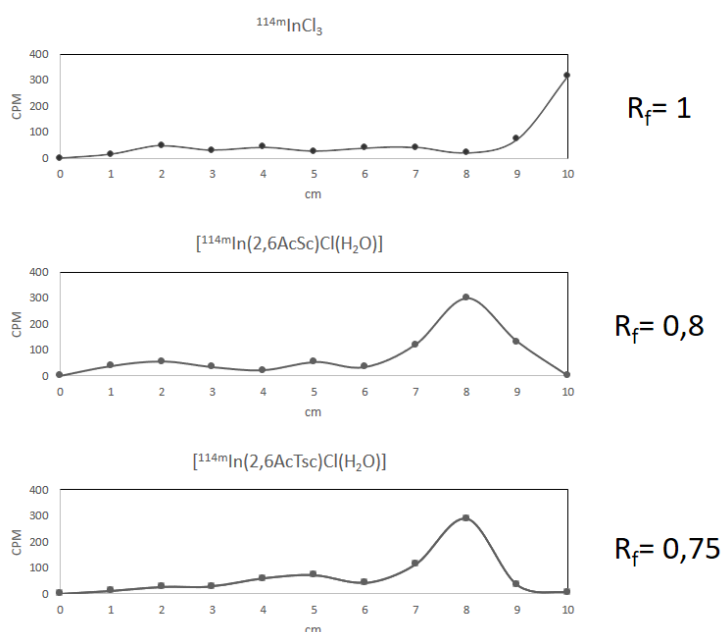


Figura 3.3.11. Perfis cromatográficos do $^{114m}\text{InCl}_3$ e dos complexos radioativos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (*7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (*8). Pontos representam os dados experimentais.

3.3.6 Avaliação das atividades citotóxicas dos complexos de In(III) com 2,6-diacetilpiridina-bis(semicarbazona), $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e 2,6-diacetilpiridina-bis(tiossemicarbazona), $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8)

As atividades citotóxicas do sal InCl_3 , dos ligantes $\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcSc}$, $\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcTsc}$ e seus complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8), assim como dos seus análogos radioativos $^{114m}\text{InCl}_3$, (*7) e (*8) foram investigadas utilizando-se diferentes células de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e células saudáveis de fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5) (Tabela 3.3.5).

Conforme mostrado na Tabela 3.3.5, o sal de índio, seu análogo radioativo e os ligantes H₂-2,6AcSc, H₂-2,6AcTsc, foram inativos frente às três linhagens celulares. Para o complexo (7) não foi possível calcular o IC₅₀, em concentrações de até 10 μmol L⁻¹, mas seu análogo radioativo (*7) apresentou atividade citotóxica na faixa micromolar para as linhagens tumoral MCF-7 e também para células sadias MRC-5. No entanto, o complexo (*7) foi tão citototóxico quanto a cisplatina contra as células não tumorais. (*7) não apresentou citotoxicidade contra células MDA-MB-231 mas foi tão citotóxico quanto a cisplatina em células saudáveis MRC-5.

Tabela 3.3.5. Atividade citotóxica (IC₅₀) e Índice de seletividade (IS) do sal InCl₃ dos ligantes H₂-2,6AcSc, H₂-2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (8) e seus análogo radioativo *InCl₃, (*7) e (*8) frente às linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5. (n = 9).

Compostos	IC ₅₀ μmol L ⁻¹ e Índice de seletividade (IS)				
	MCF-7	MDA-MB-231	MRC-5	IS ¹	IS ²
InCl ₃	ND	ND	ND	ND	ND
*InCl ₃	ND	ND	ND	ND	ND
H ₂ -2,6AcSc	ND	ND	ND	ND	ND
(7)	ND	ND	ND	ND	ND
(*7)	9,54 ± 1,81	ND	5,85 ± 0,98	0,61	ND
H ₂ -2,6AcTs	ND	ND	ND	ND	ND
(8)	7,69 ± 1,61	ND	ND	ND	ND
(*8)	0,69 ± 0,10	3,86 ± 0,81	5,30 ± 0,81	7,68	1,37
Cisplatina	39,95 ± 4,38	53,72 ± 9,20	5,70 ± 0,92	0,14	0,11

ND: IC₅₀ não foi determinado; o valor de IC₅₀ > 10⁻⁵ mol L⁻¹.

IS¹ = IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ MCF-7

IS² = IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ MDA-MB-231

O complexo (8) mostrou-se inativo contra as linhagens celulares MDA-MB-231 e MRC-5, em concentrações de até 10 μmol L⁻¹, no entanto apresentou atividade citotóxica frente às células MCF-7 na faixa micromolar. Por outro lado, o seu análogo radioativo (*8) apresentou atividade citotóxica frente às três linhagens celulares. A radioquimioterapia com o complexo (*8) resultou em uma diminuição de 11,14 vezes no IC₅₀ frente à linhagem MCF-7. Os índices de seletividade (IS¹ = IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ MCF-7 e IS² = IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ MDA-MB-231) para o complexo

radioativo foram $IS^1 = 7,7$ e $IS^2 = 1,4$, respectivamente, indicando que a irradiação representou uma estratégia interessante para aumentar a seletividade dos compostos.

Para avaliar o efeito citotóxico induzido pelo tratamento combinado dos compostos com radiação gama, as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MRC-5 foram tratadas com os ligantes $H_2-2,6AcSc$, $H_2-2,6AcTsc$ e seus complexos (7) e (8) e irradiadas nas doses de radiação 1 Gy, 3 Gy ou 6 Gy com taxa de dose média de 90 Gy/h (Figura 3.3.12). Na Figura 3.2.17, observou-se o impacto que tem a radiação gama sobre a porcentagem de sobrevivência em cada linhagem celular. Nas Tabelas 3.3.6 e 3.3.7, observa-se o fator de potencialização (FP) da radiação na terapia combinada.

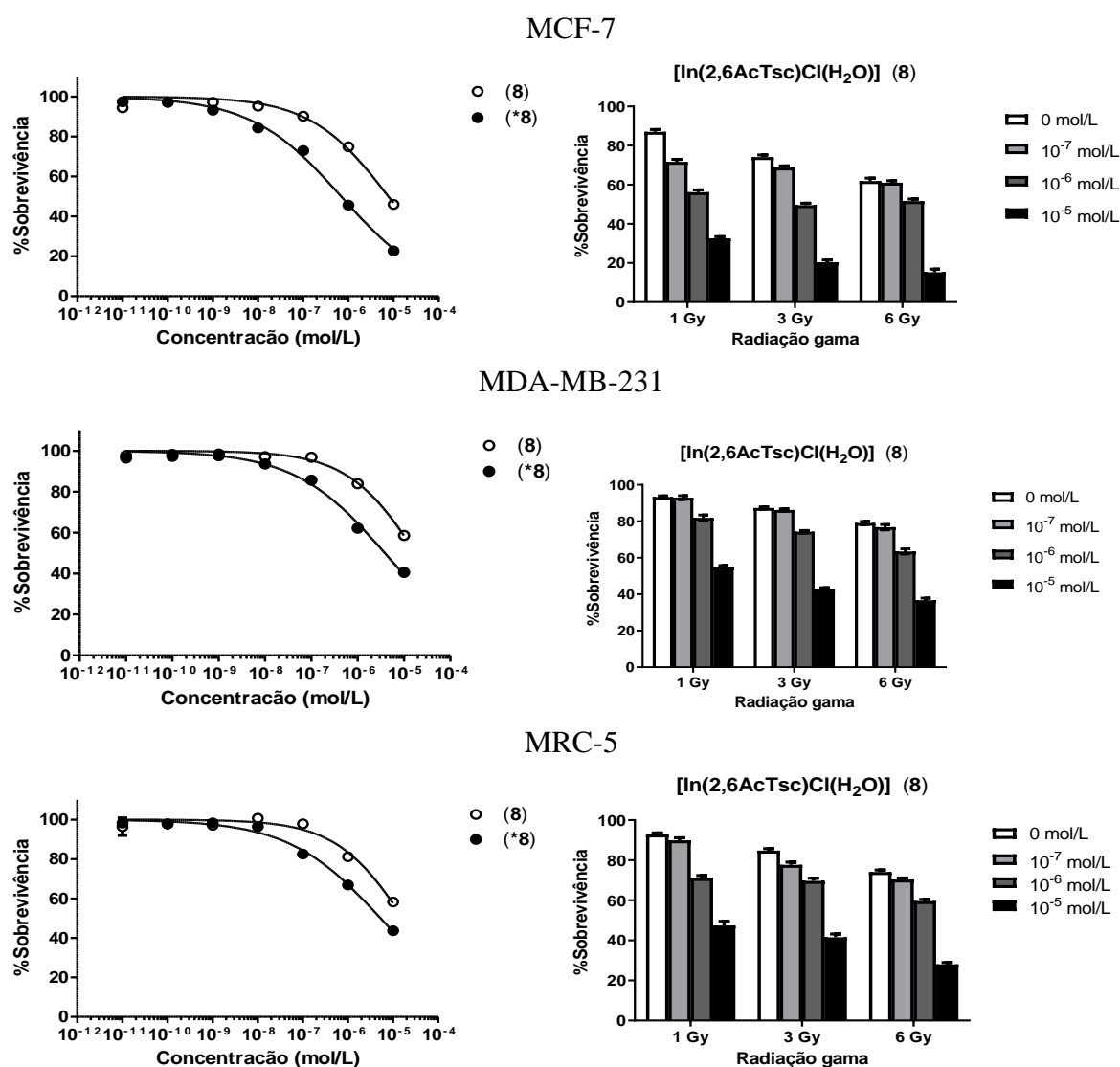


Figura 3.3.12. Porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração e doses de radiação do complexo $[In(2,6AcTsc)Cl(H_2O)]$ (8). Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC_{50} . (n = 9).

Tabela 3.3.6. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada das células MCF-7 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H₂-2,6AcSc, H₂-2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (8). (n = 9).

		Fator de potencialização (FP)					
		MCF-7			MRC-5		
Complexo	Concentração (mol/L)	Terapia combinada			Terapia combinada		
		1 Gy	3 Gy	6 Gy	1 Gy	3 Gy	6 Gy
H ₂ -2,6AcSc	10 ⁻⁷	1,11	1,05	1,01	1,27	1,15	1,01
	10 ⁻⁶	1,34	1,33	1,19	1,91	1,50	1,22
	10 ⁻⁵	2,27	1,80	1,54	4,50	2,42	1,71
(7)	10 ⁻⁷	0,83	1,10	1,13	1,73	1,14	1,08
	10 ⁻⁶	1,72	1,46	1,42	3,54	2,05	1,68
	10 ⁻⁵	3,45	2,26	1,74	6,59	3,69	2,41
H ₂ -2,6AcTsc	10 ⁻⁷	0,82	1,10	0,93	1,11	1,07	1,19
	10 ⁻⁶	1,37	1,42	1,14	3,07	1,64	1,50
	10 ⁻⁵	3,00	1,85	1,67	5,21	2,81	2,10
(8)	10 ⁻⁷	1,89	1,11	1,02	1,44	1,49	1,10
	10 ⁻⁶	2,91	1,80	1,41	4,13	2,02	1,50
	10 ⁻⁵	4,49	2,84	2,23	7,51	3,90	2,67

Tabela 3.3.7. Fator de potencialização da radiação na terapia combinada das células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H₂-2,6AcSc, H₂-2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (8). (n = 9).

		Fator de potencialização (FP)					
		MDA-MB-231			MRC-5		
Complexo	Concentração (mol/L)	Terapia combinada			Terapia combinada		
		1 Gy	3 Gy	6 Gy	1 Gy	3 Gy	6 Gy
H ₂ -2,6AcSc	10 ⁻⁷	1,30	1,48	1,03	1,27	1,15	1,01
	10 ⁻⁶	2,02	1,68	1,20	1,91	1,50	1,22
	10 ⁻⁵	5,27	3,01	2,11	4,50	2,42	1,71
(7)	10 ⁻⁷	0,95	1,46	1,29	1,73	1,14	1,08
	10 ⁻⁶	3,65	2,04	1,70	3,54	2,05	1,68
	10 ⁻⁵	6,38	3,74	2,66	6,59	3,69	2,41
H ₂ -2,6AcTsc	10 ⁻⁷	1,17	1,13	1,04	1,11	1,07	1,19
	10 ⁻⁶	2,08	1,74	1,20	3,07	1,64	1,50
	10 ⁻⁵	5,52	3,44	2,19	5,21	2,81	2,10
(8)	10 ⁻⁷	1,17	1,15	1,11	1,44	1,49	1,10
	10 ⁻⁶	3,02	2,14	1,74	4,13	2,02	1,50
	10 ⁻⁵	7,53	4,76	3,01	7,51	3,90	2,67

O tratamento com os ligantes e os complexos fez aumentar a eficácia terapêutica da radiação, tornando as células cancerosas mais sensíveis aos efeitos da radioterapia, no entanto, pontenciabilizou a radiação de igual forma nas células saudáveis. Os valores de FP diminuíram com o aumento da dose de radiação para 3 Gy e 6 Gy, confirmando que ao aumentar a dose de radiação, o dano da célula por radiação ultrapassou o exercido pelo radiosensibilizador, e assim o efeito sensibilizante foi menos perceptível.

Nas Tabelas 3.3.8 e 3.3.9, é possível comparar a porcentagem de sobrevivência das células em relação aos 3 tipos de tratamento (quimioterapia, radioquimioterapia e terapia combinada). Analisando os resultados obtidos, nenhum dos ligantes apresentou citotoxicidade na concentração de até $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra células MCF-7. Com a terapia combinada de H₂-2,6AcSc ou H₂-2,6AcTsc com radiação observou-se a diminuição da porcentagem de sobrevivência das células usando-se as taxas de dosagem 3 Gy e 6 Gy. A terapia combinada com os dois ligantes fez aumentar a citotoxicidade frente às células MDA-MB-231 com todas as taxas de dosagem.

No entanto, os ligantes mostram-se citotóxicos também frente às células saudáveis MRC-5, mas foram ligeiramente menos tóxicos em relação às células MCF-7 e MDA-MB-231. No caso do complexo (7) na concentração de 1 micromolar a radioquimioterapia, assim como a terapia combinada com taxas de dosagens de 3 Gy e 6 Gy mostraram-se eficazes para aumentar a citotoxicidade frente às células MCF-7. Apesar de que a radioquimioterapia ter provado um aumento de citotoxicidade também frente às células saudáveis MRC-5, a terapia combinada com taxas de dosagem 3 Gy e 6 Gy mostrou-se ligeiramente menos eficaz contra as células saudáveis do que contra as células MCF-7. Em 10 micromolar os efeitos de todas as estratégias foram similares nas células tumorais e sadias.

No caso do complexo (8) na concentração de 1 micromolar a radioquimioterapia e as terapias combinadas com taxas de dosagem de 3 Gy e 6 Gy mostraram resultados similares frente às células MCF-7. Em 10 micromolar a radioquimioterapia potencializou os efeitos citotóxicos. A terapia combinada mostrou-se vantajosa na taxa de dosagem de 6 Gy. Nas duas concentrações a atividade citotóxica frente às células MCF-7 foi maior do que frente às células saudáveis MRC-5.

Para os complexos (7) e (8) na concentração de 10 micromolar a radioquimioterapia e as terapias combinadas fizeram aumentar a citotoxicidade frente às células MDA-MB-231. No entanto, os efeitos sobre as células saudáveis foram similares. É importante considerar que o complexo (*8), foi o único composto que teve atividade na concentração de $10 \mu\text{mol/L}$ com frente às células MDA-MB-231.

Tabela 3.3.8. % de sobrevivência das células MCF-7 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H₂-2,6AcSc, H₂-2,6AcTsc e seus complexos (7) e (8) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia (^{114m}In) e terapia combinada. (n = 9).

Composto	Concentração (mol/L)	MCF-7					MRC-5				
		Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada			Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada		
				1Gy	3Gy	6Gy			1Gy	3Gy	6Gy
H₂-2,6AcSc	10 ⁻⁵	74,9	-	65,9	49,5	41,4	77,1	-	68,5	63,7	53,8
(7)	10 ⁻⁶	87,0	68,1	74,2	59,1	46,2	88,2	68,1	75,2	69,2	54,7
	10 ⁻⁵	66,1	50,2	48,3	36,7	33,8	62,5	44,0	53,9	44,7	35,0
H₂-2,6AcTsc	10 ⁻⁵	72,2	-	55,0	48,2	36,5	69,7	-	63,5	57,8	43,4
(8)	10 ⁻⁶	74,8	45,6	56,3	49,5	46,6	81,2	66,8	71,1	69,7	59,6
	10 ⁻⁵	45,9	22,7	32,6	20,4	15,3	58,2	43,7	47,4	41,5	28,0

Tabela 3.3.9. % de sobrevivência das células MDA-MB-231 e MRC-5 em função da concentração dos ligantes H₂-2,6AcSc, H₂-2,6AcTsc e seus complexos (7) e (8) avaliados nas formas quimioterapia, radioquimioterapia (^{114m}In) e terapia combinada. (n = 9).

Composto	Concentração (mol/L)	MDA-MB-231					MRC-5				
		Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada			Quimioterapia	Radioquimioterapia (^{114m} In)	Terapia combinada		
				1Gy	3Gy	6Gy			1Gy	3Gy	6Gy
H₂-2,6AcSc	10 ⁻⁵	77,1	-	68,4	63,9	55,6	77,1	-	68,5	63,7	53,8
(7)	10 ⁻⁵	66,2	60,0	61,7	55,1	44,2	62,5	44,0	53,9	44,7	35,0
H₂-2,6AcTsc	10 ⁻⁵	72,3	-	66,9	58,7	54,1	69,7	-	63,5	57,8	43,4
(8)	10 ⁻⁵	58,6	40,6	54,8	42,9	36,7	58,2	43,7	47,4	41,5	28,0

3.3.7. Alterações morfológicas no núcleo celular

Os resultados do ensaio de coloração DAPI são apresentados na Figura 3.3.13, mostrando-se o controle, as células tumorais com os complexos (7) e (8) e seus análogos radioativos (*7) e (*8).

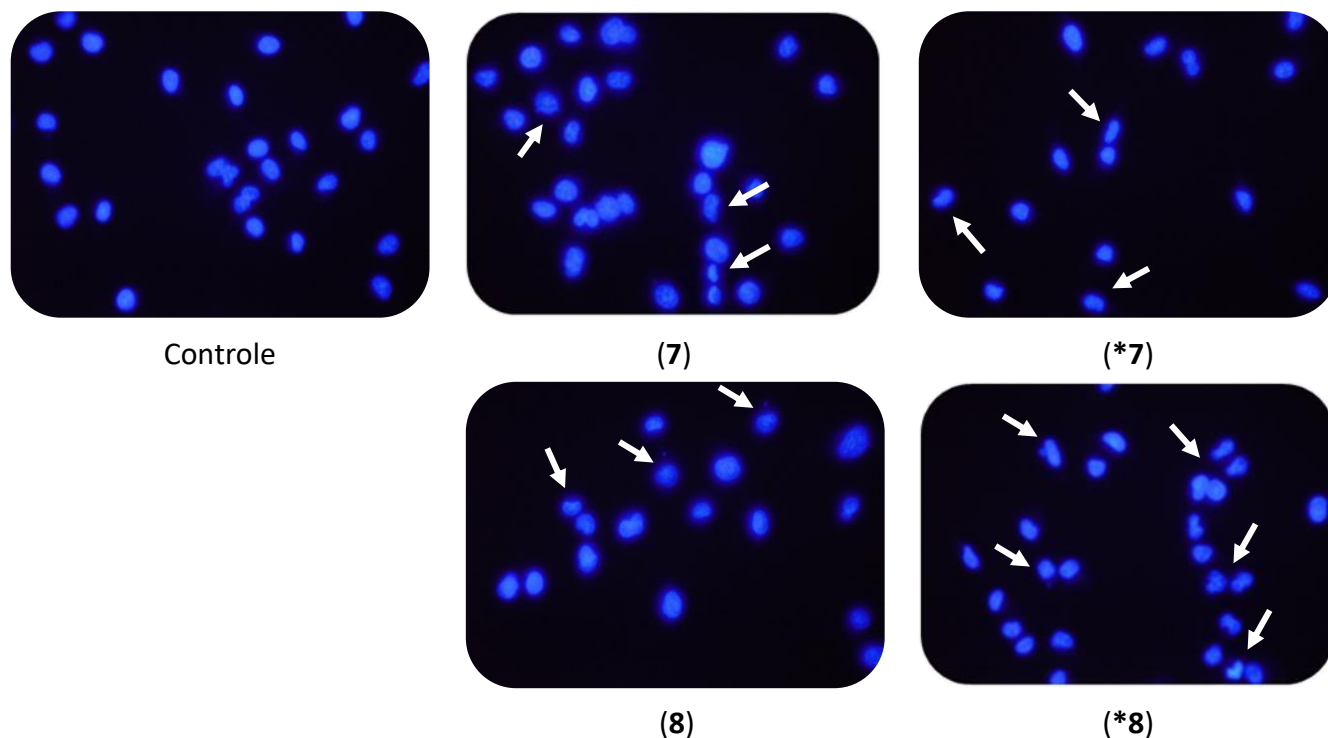


Figura 3.3.13. Células MDA-MB-231 tratadas com os complexos $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7) e $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) e seus análogos radioativos (*7) e (*8) (10 $\mu\text{mol/L}$) no ensaio de coloração DAPI. As setas mostram as mudanças morfológicas. Amplificação: 400X.

Como se mostra na Figura 3.3.13, os complexos e seus análogos radioativos induziram mudanças nas formas das células tratadas, como arredondamento celular, núcleos em formato de ferradura e características morfológicas de apoptose em relação as células de controle.

3.3.8. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA)

Titulação espectrofotométrica

Foi investigada a interação do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8) e seu ligante com o DNA por titulação espectrofotométrica no UV-Vis. Após a adição do DNA observou-se um efeito de hipocromismo nos máximos das bandas do ligante e do complexo (8), com um ponto isobéstico, sugerindo contribuições ópticas de duas espécies diferentes. (Figura 3.3.14)

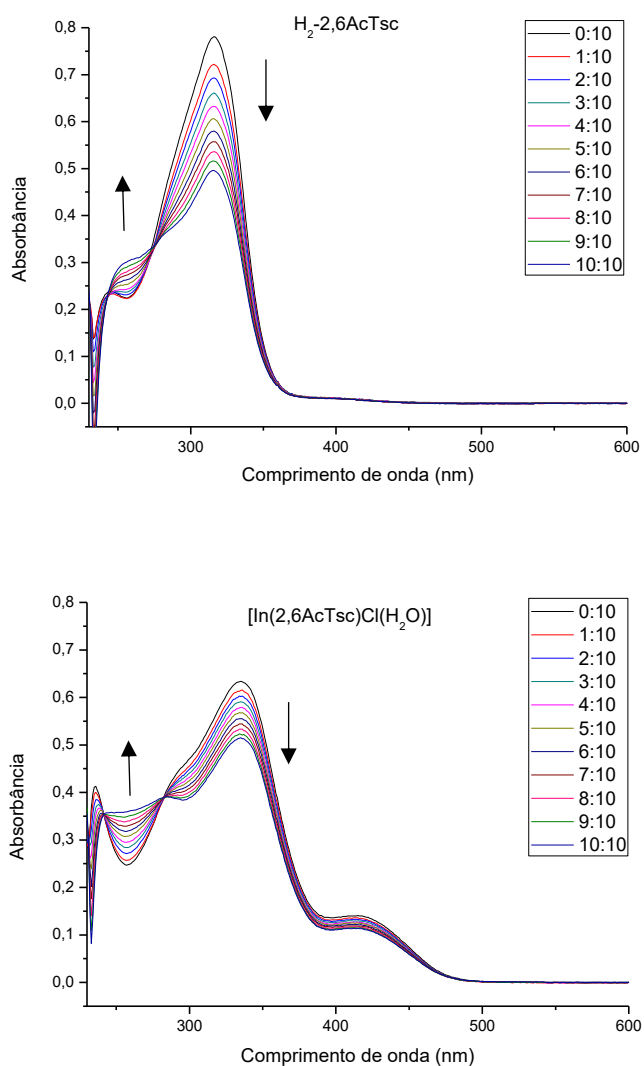


Figura 3.3.14. Espectros eletrônicos de $H_2-2,6AcTsc$ e do complexo $[In(2,6AcTsc)Cl(H_2O)]$ (8) na ausência e presença de concentrações crescentes de DNA.

Os dados foram ajustados com a seguinte equação:

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

Do gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs (DNA), é possível calcular a constante de ligação intrínseca (K_b), pela razão entre o coeficiente angular $[1/(\epsilon_b - \epsilon_f)]$ e o intercepto $[1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$.

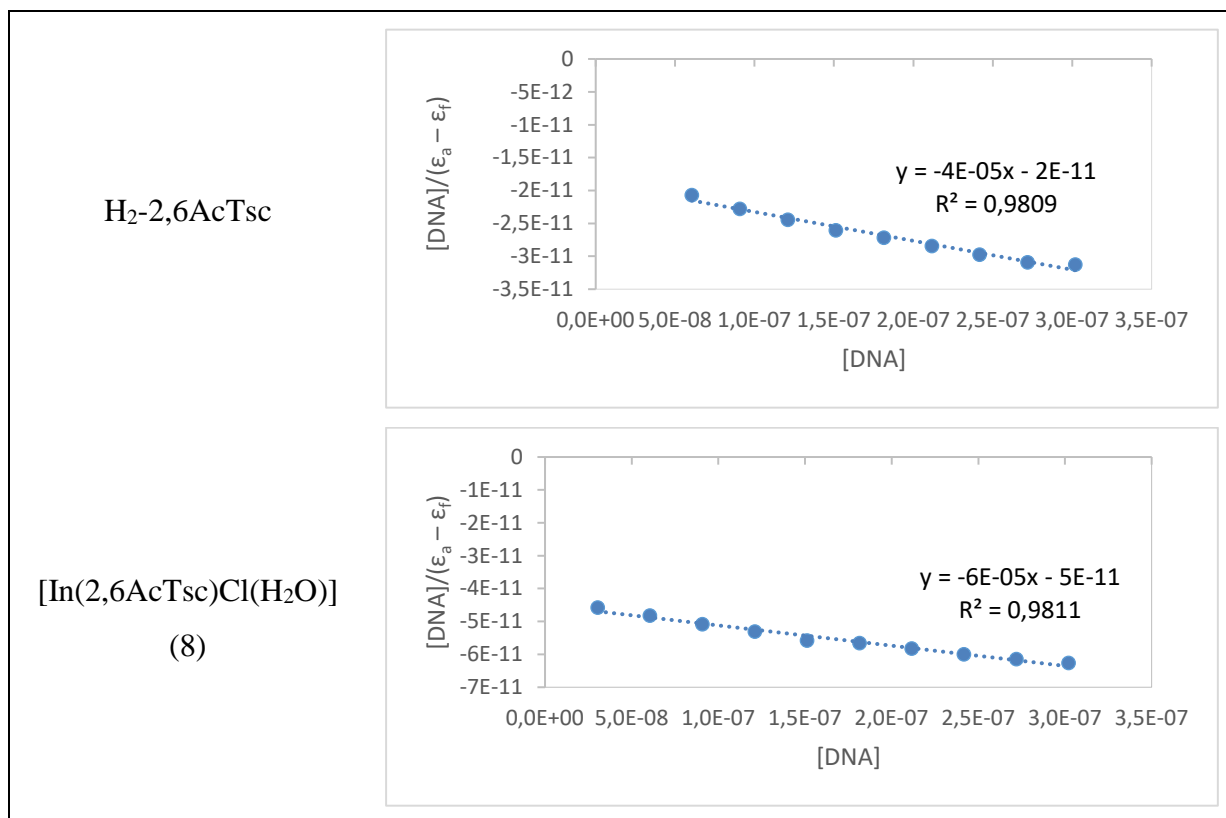


Figura 3.3.15. Gráficos de [DNA] vs. [DNA]/($\epsilon_a - \epsilon_f$) dos ligantes H₂-2,6AcTsc, H₂-2,6AcTsc e seus complexos [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (7) e [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (8).

Tabela 3.3.10. Constante de ligação intrínseca (K_b) do ligante H₂-2,6AcTsc e seu complexo [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (8).

Compostos	K _b (M ⁻¹)
H ₂ -2,6AcTsc	2,0 x 10 ⁶
[In(2,6AcTsc)Cl(H ₂ O)] (8)	1,2 x 10 ⁶

Deslocamento competitivo do cátion etídio

O método competitivo para avaliar a possível intercalação dos compostos com o DNA é mediante a análise de interação entre os compostos e o sistema DNA/ brometo de etídio.

Na presença do ligante H₂-2,6AcTsc observou-se pouca supressão e a sobreposição das bandas de fluorescência do DNA ligado ao BE (Figura 3.3.16), o que sugere que a intercalação não deve ser um mecanismo principal de interação desse composto com DNA. Na presença do complexo [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (8) observa-se inicialmente a supressão da intensidade da fluorescência e, posteriormente, indicando que existe um mecanismo de interação intercalante, porém não promove uma redução de 50% na intensidade de fluorescência do sistema BE-DNA.

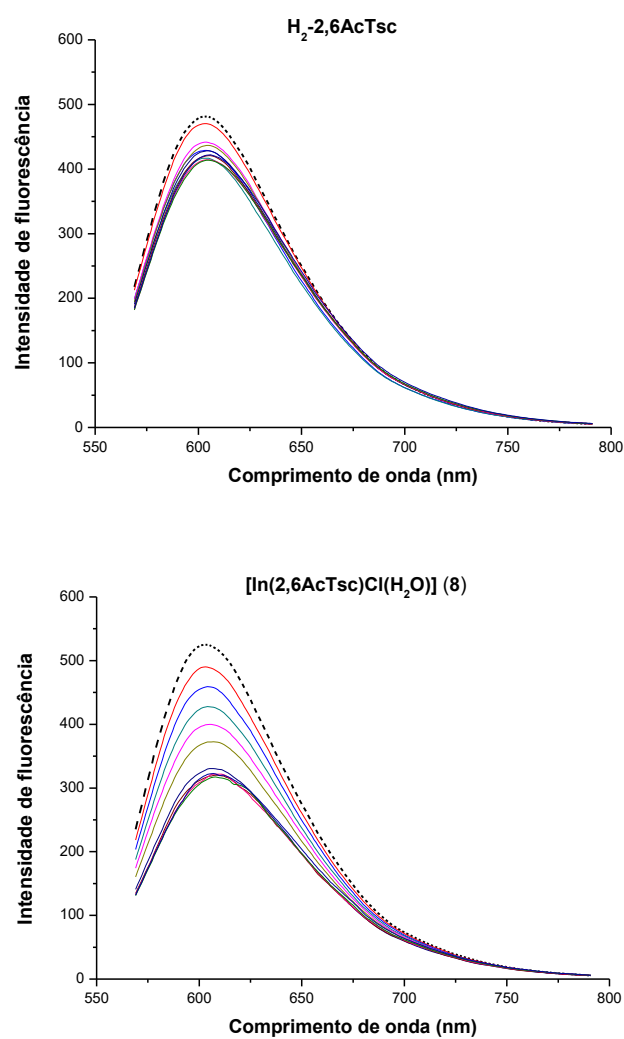


Figura 3.3.16. Espectros de emissão do sistema BE - DNA ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) na ausência (- - -) e presença (-) de quantidades crescentes de H₂-2,6AcTsc e do complexo [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (**8**) (0 a $200 \mu\text{molL}^{-1}$).

4. CONCLUSÕES

Considerando-se que complexos de $^{111}\text{In(III)}$ são usados clinicamente na medicina nuclear para obtenção de imagem, o presente trabalho fez uso da Química Medicinal Inorgânica na busca por novos candidatos a metalofármacos e radiometalofármacos para o tratamento de tumores mamários, usando-se bases de Schiff polidentadas como ligantes para formar complexos com índio(III) não radioativos e radioativos com potenciais aplicações no diagnóstico e terapia de tumores de mama. Foram utilizadas para os ensaios células MCF-7 de tumor estrógeno-dependente, MDA-MB-231 de tumor triplo negativo e células sadias de fibroblasto de pulmão de feto humano MRC-5.

Foram sintetizados e caracterizados os complexos $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**1**), $[\text{In}(2,6\text{AcpClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**2**) e $[\text{In}(2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**3**) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona) (H_2 -2,6AcPh) e seus derivados -*bis*(*para*-cloro-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6AcpClPh) e -*bis*(*para*-toluil-hidrazona) (H_2 -2,6AcpCH₃Ph), os complexos $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**4**), $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**5**) $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**6**) com 2,6-difomilpiridina-*bis*(benzoilhidrazona) (H_2 -2,6FoPh) e seus derivados -*bis*(*para*-cloro-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6FopClPh) e -*bis*(*para*-toluil-benzoilhidrazona) (H_2 -2,6FopCH₃Ph) e os complexos $[\text{In}(2,6\text{-AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**7**) e $[\text{In}(2,6\text{-AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (**8**) com 2,6-diacetilpiridina-*bis*(semicarbazona) (H_2 -2,6AcSc) e 2,6-diacetilpiridina-*bis*(tiossemicarbazona) (H_2 -2,6AcTsc). Nos complexos um ligante dianiônico se une ao metal como um agente quelante pentadentado através do sistema O-N-N_{py}-N-O, no caso das *bis*(hidrazonas) e *bis*(semicarbazona), e do sistema S-N-N_{py}-N-S no caso da *bis*(tiossemicarbazona). A esfera de coordenação do centro de índio(III) é completada por um ligante cloreto e uma molécula de água.

Estruturas cristalográficas determinadas para os complexos (**1**) e (**2**) revelam que o metal está coordenado a três átomos de nitrogênio e a dois de oxigênio do ligante, a um íon cloreto e a uma molécula de água, em uma geometria pentagonal bipyramidal.

Após a coordenação há um aumento da conjugação no ligante pela desprotonação das *bis*(benzoilhidrazonas) o qual, aliado à rigidez do ligante nos complexos, faz com que esses apresentem fluorescência. Os complexos (**1-6**) exibem emissão em DMSO na faixa 425-575 nm, com valores de rendimento quântico menores de 1,5%, usando-se hemissulfato de quinina como padrão. Os compostos mostram significativa luminosidade de fluorescência em razão da forte absorção na região do UV próximo. Assim, poderiam ser usados como sondas fluorescentes dentro das células.

Todos os compostos foram estáveis em DMSO, mas apenas os complexos (4, 6, 7 e 8) e os ligantes H₂-2,6AcSc e H₂-2,6AcTsc foram estáveis em meio aquoso por até 48 h, possibilitando a avaliação de suas atividades citotóxicas frente a células de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e células saudáveis de fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5).

Amostras do sal InCl₃ e dos complexos (4), (6), (7) e (8), foram submetidas a ativação neutrônica com a finalidade de serem produzidos seus análogos radioativos *InCl₃, (*4), (*6), (*7) e (*8) contendo ^{114m}In. Por meio de cromatografia de camada delgada (TLC) foi confirmando a estabilidade dos compostos após a ativação neutrônica.

O precursor InCl₃ e seu análogo radioativo *InCl₃ demonstraram ser inativos contra as três linhagens celulares, em concentrações de até 10 μmolL⁻¹. Os complexos de índio(III) apresentaram atividade citotóxica e se observou um efeito aditivo pela combinação do tratamento das células tumorais com os complexos e radiações ionizantes (radioquimioterapia com complexos de ^{114m}In e radioterapia combinada com uma fonte de ⁶⁰Co).

Os complexos (4), (6), (7) e (8) apresentaram forte potencial radiosensibilizador aumentando o efeito terapêutico de 1 Gy de radiação gama em até 4,5 vezes para MCF-7 e 7,5 vezes para MDA-MB-231.

O complexo (4) apresentou atividade citotóxica na faixa micromolar contra as células MCF-7 e seu análogo com ^{114m}In (*4) foi cerca de 4 vezes mais potente, ambos com citotoxicidade superior à da cisplatina. Embora os complexos (6) e (7) apresentassem baixa atividade citotóxica, seus análogos radioativos com ^{114m}In (*6) e (*7) apresentaram potente efeito citotóxico em concentrações micromolares, frente às células MCF-7.

O complexo (8) apresentou atividade citotóxica na faixa micromolar contra as células MCF-7 e seu análogo com ^{114m}In (*8) foi cerca de 7 vezes mais potente, ambos com citotoxicidade superior à da cisplatina. De forma notável, de todos os complexos avaliados (8) e (*8), em concentrações da faixa micromolar, mostraram-se ativos frente às células MDA-MB-231 (tumor mamário triplo negativo). O complexo (*8) tem potenciais aplicações na radioquimioterapia de tumores de mama MCF-7 e especialmente para o tumor triplo negativo MDA-MB-231.

Nas duas linhagens de células tumorais foram observadas alterações morfológicas no núcleo celular pelo ensaio de coloração DAPI, como arredondamento celular, núcleos em formato de ferradura e características morfológicas de apoptose em relação as células de controle após quimioterapia com todos os complexos de índio(III) não radioativos ou radioativos.

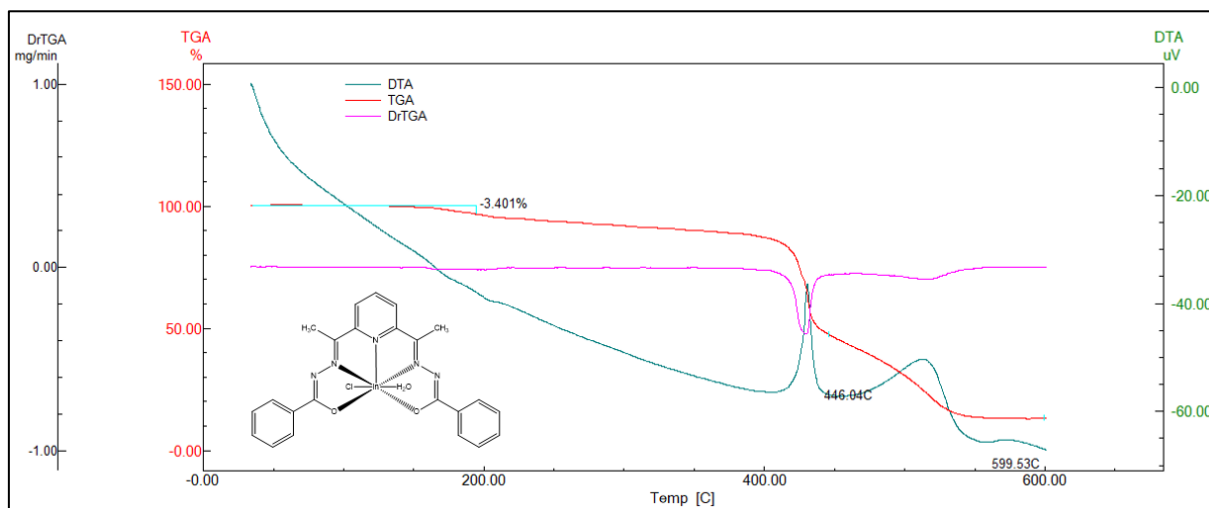
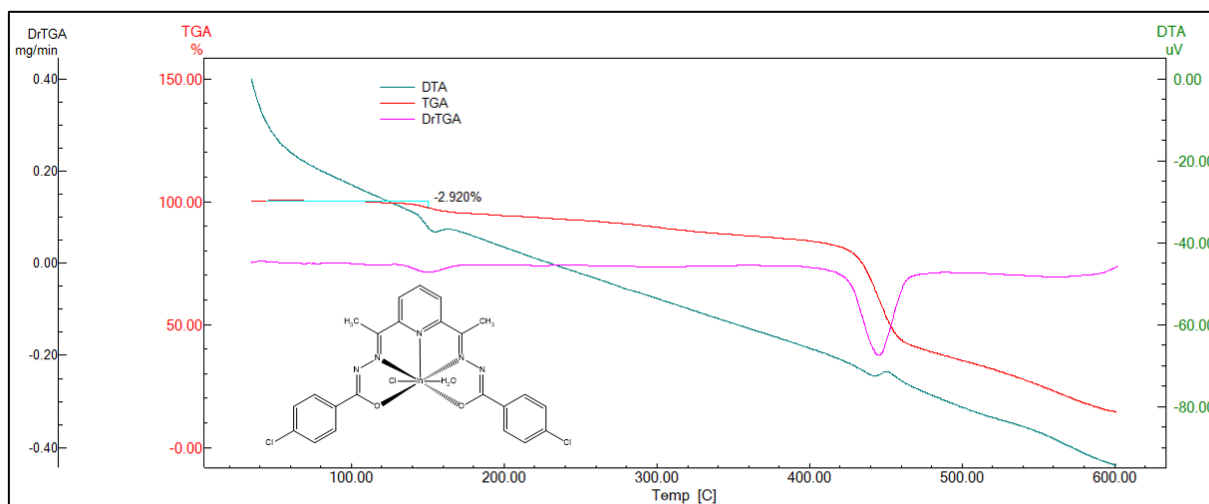
Investigações preliminares de mecanismos de ação revelaram que os complexos (4) e (6) atuam como agentes intercalantes do DNA *in vitro* e que o complexo (8) seria um fraco agente intercalante. No entanto (8) e seu ligante interagiram com o DNA com constantes de ligação intrínseca ($K_b = \sim 10^6$).

O presente trabalho constitui importante contribuição à Química Inorgânica bem como ao estudo de compostos que teriam potenciais aplicações na radioquimioterapia e poderiam atuar como potenciais radiosensibilizadores, elevando a eficácia terapêutica da radiação, como estratégia de ação terapêutica para cânceres de mama estrógeno-dependente e triplo negativo.

APÊNDICE A

Termogramas, espectros de infravermelho e espectros de RMN

Termogramas dos complexos de índio(III)

Figura A1. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1).Figura A2. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2).

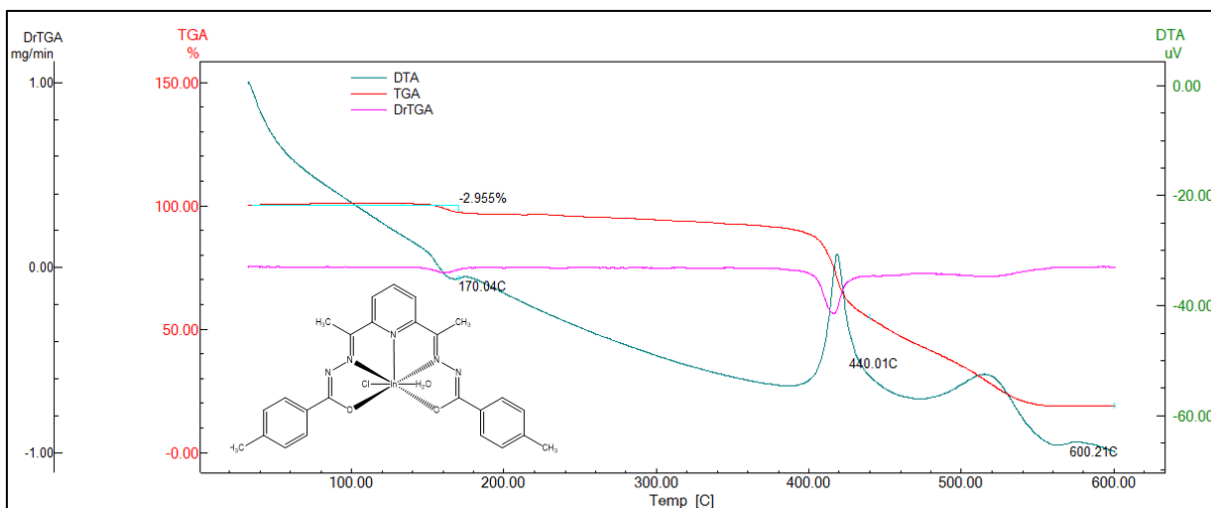


Figura A3. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcPCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (3).

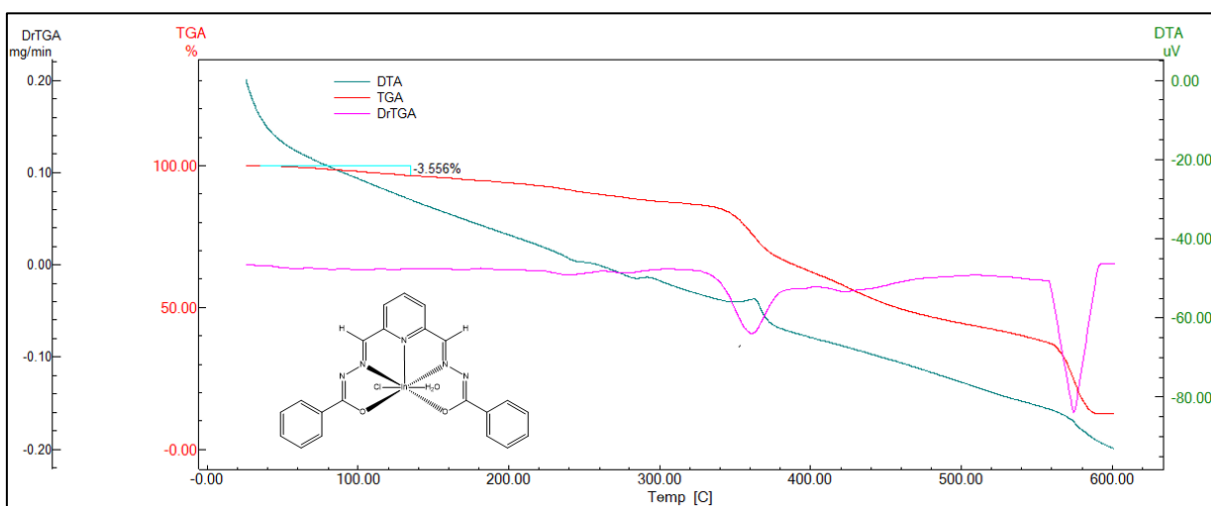


Figura A4. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{FoPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (4).

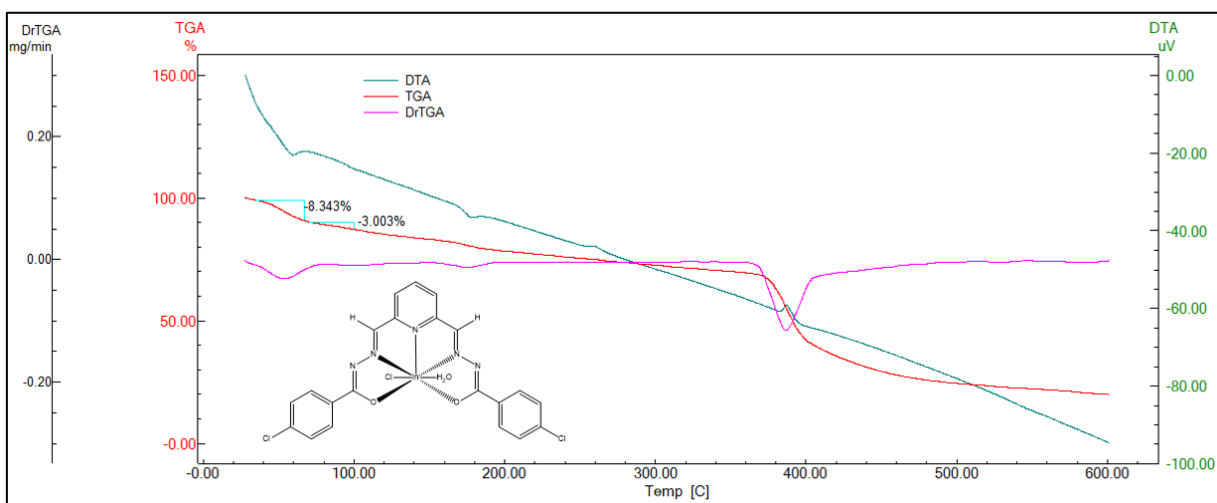


Figura A5. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{FopClPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5).

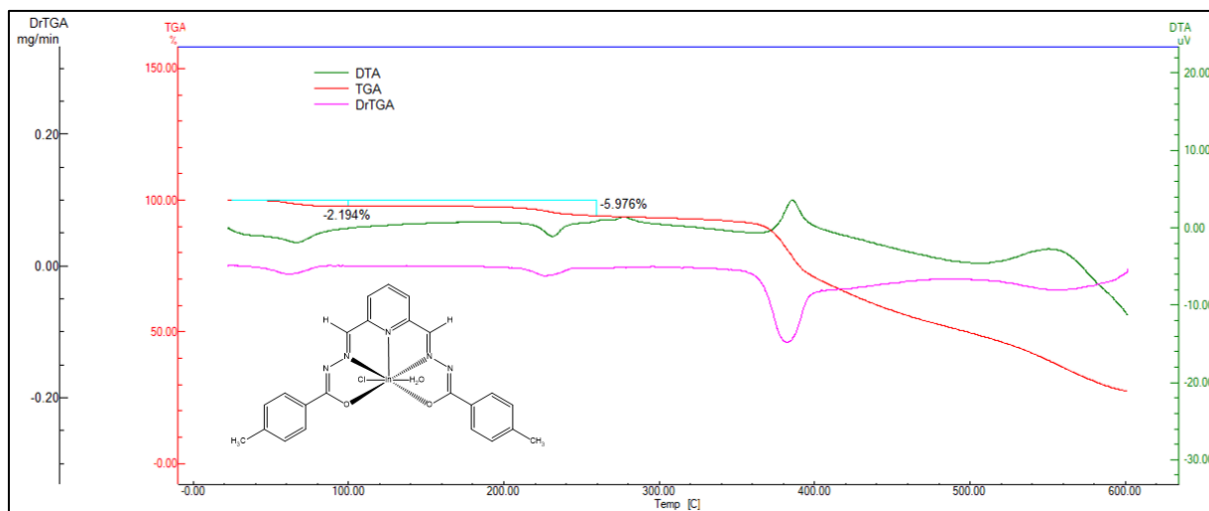


Figura A6. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{FopCH}_3\text{Ph})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6).

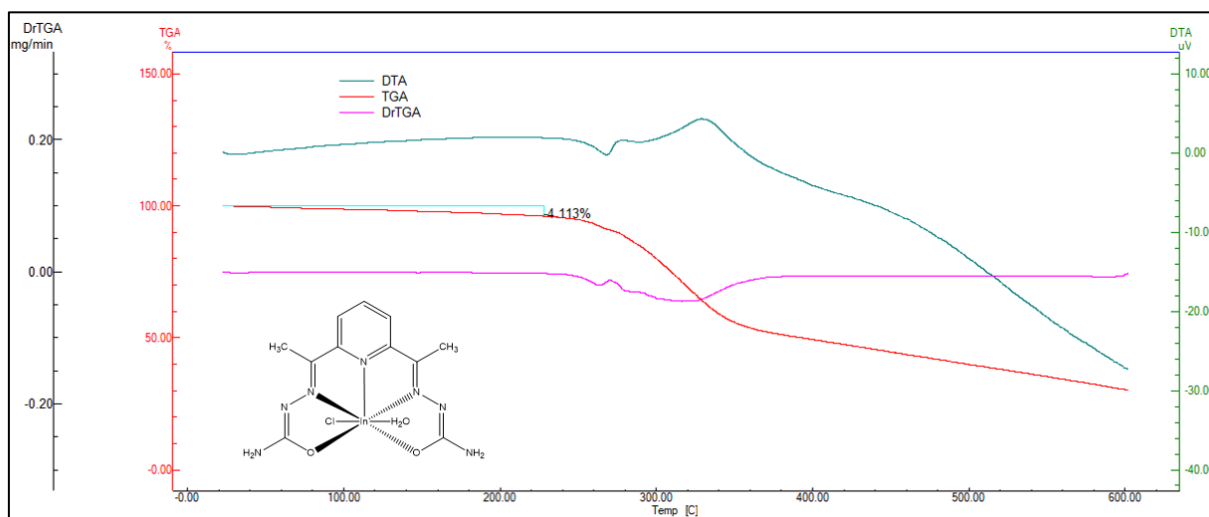


Figura A7. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcSc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (7).

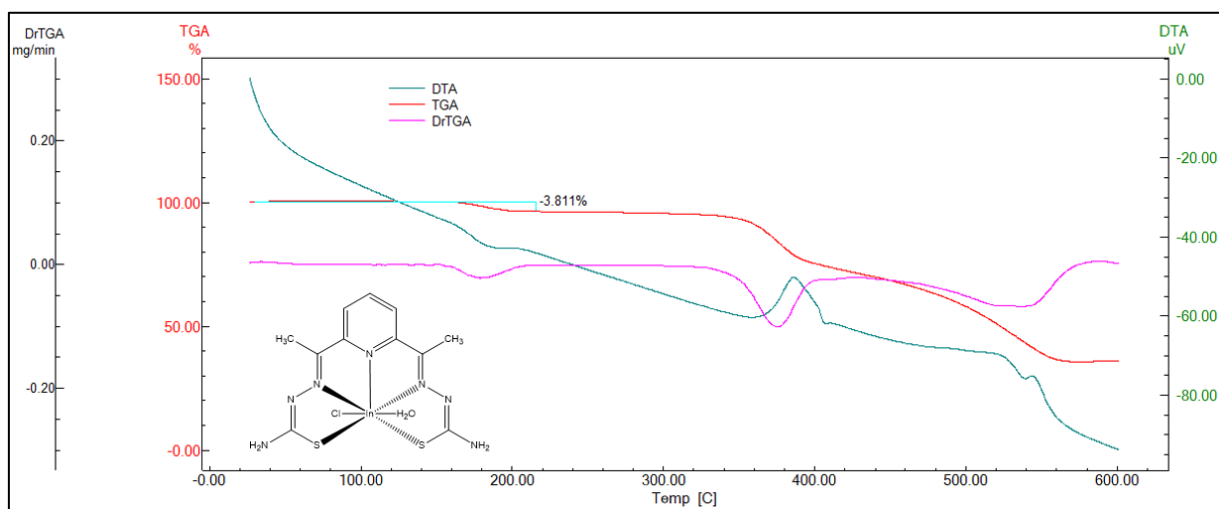


Figura A8. Termograma do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcTsc})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (8).

Espectros de infravermelho dos ligantes e seus complexos de índio(III)

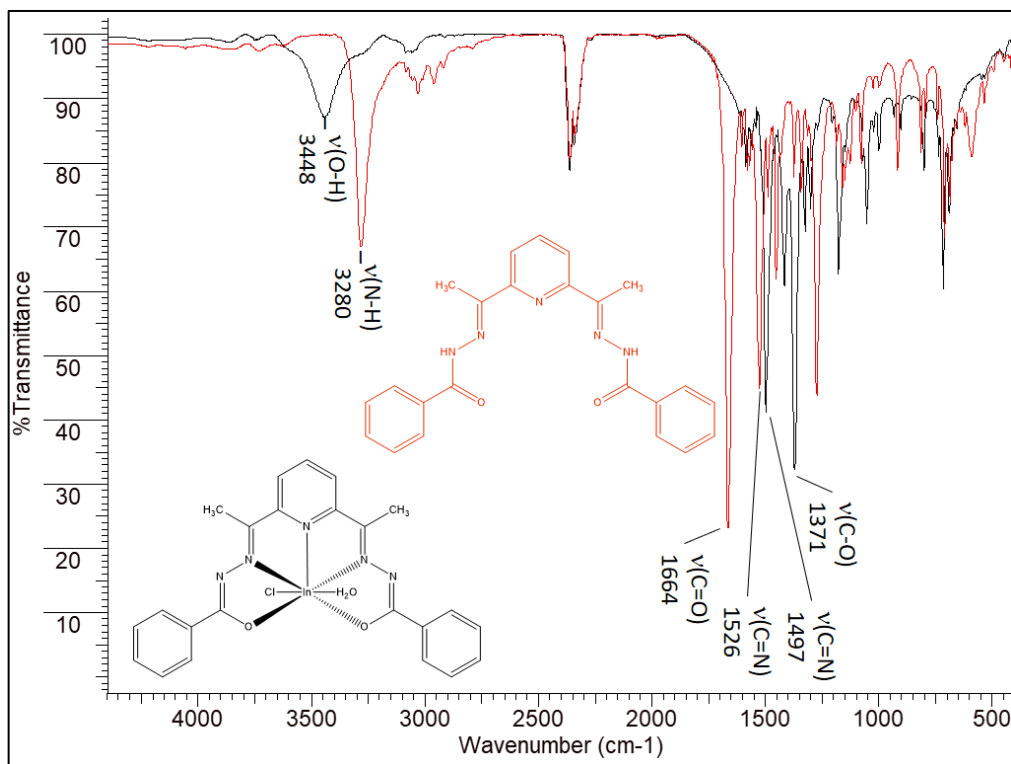


Figura A9. Espectros de infravermelho do ligante $H_2-2,6AcPh$ e seu complexo $[In(2,6AcPh)Cl(H_2O)]$ (1).

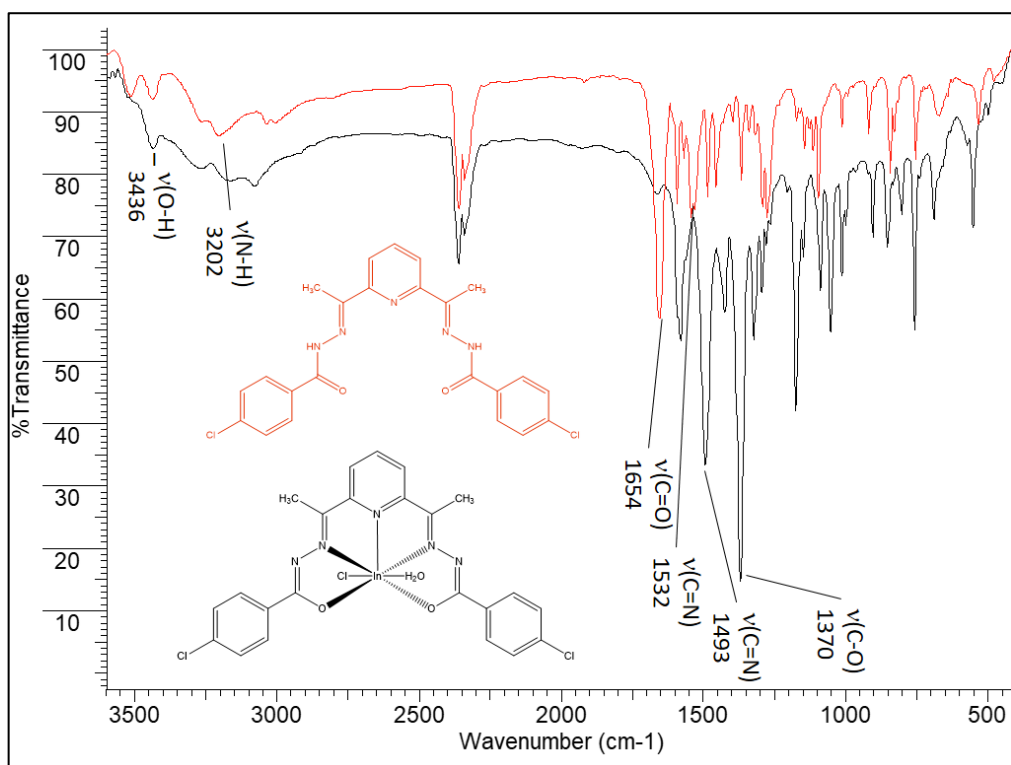


Figura A10. Espectros de infravermelho do ligante $H_2-2,6AcPhClPh$ e seu complexo $[In(2,6AcPhClPh)Cl(H_2O)]$ (2).

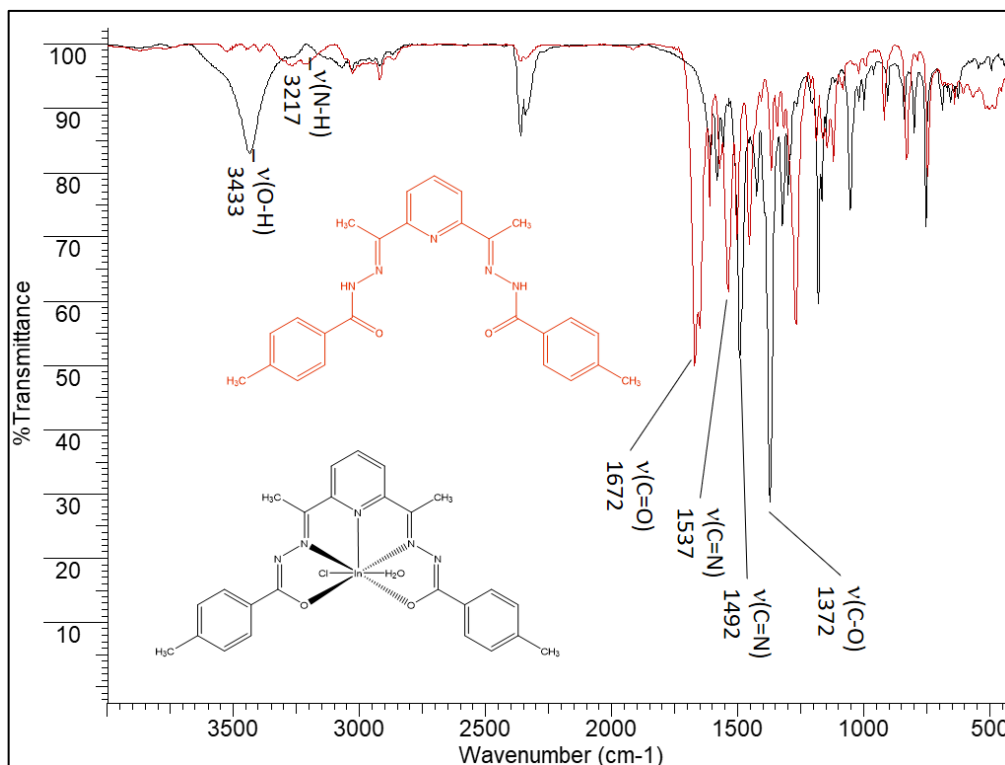


Figura A11. Espectros de infravermelho do ligante $H_2-2,6AcpCH_3Ph$ e seu complexo $[In(2,6AcpCH_3Ph)Cl(H_2O)]$ (3).

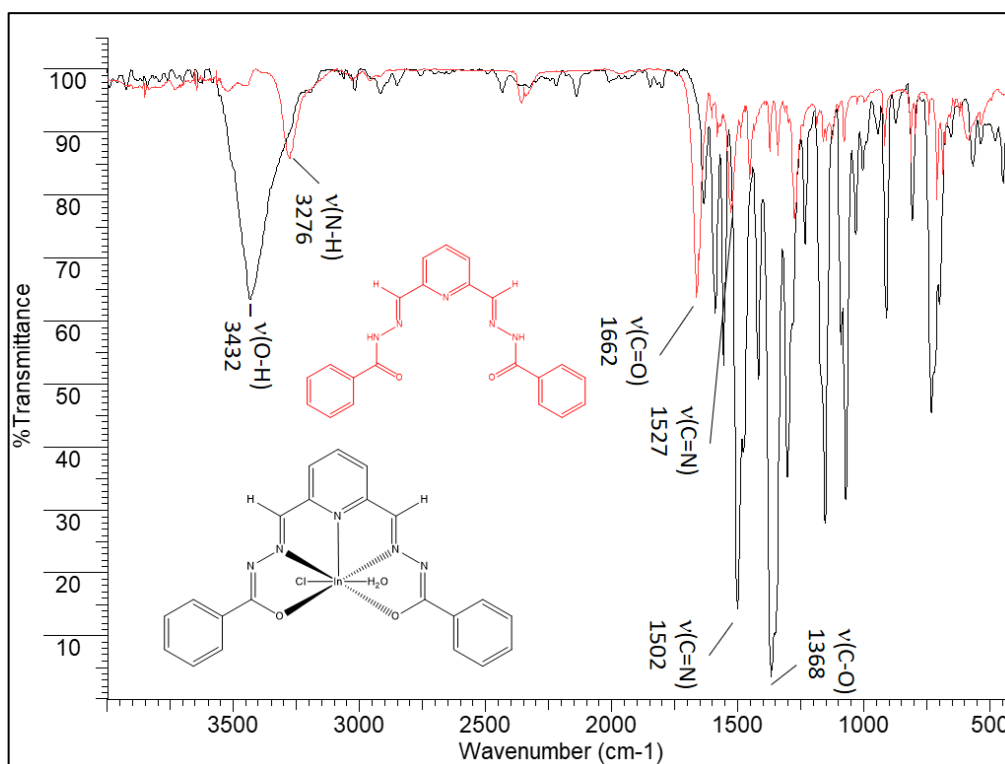


Figura A12. Espectros de infravermelho do ligante $H_2-2,6FoPh$ e seu complexo $[In(2,6FoPh)Cl(H_2O)]$ (4).

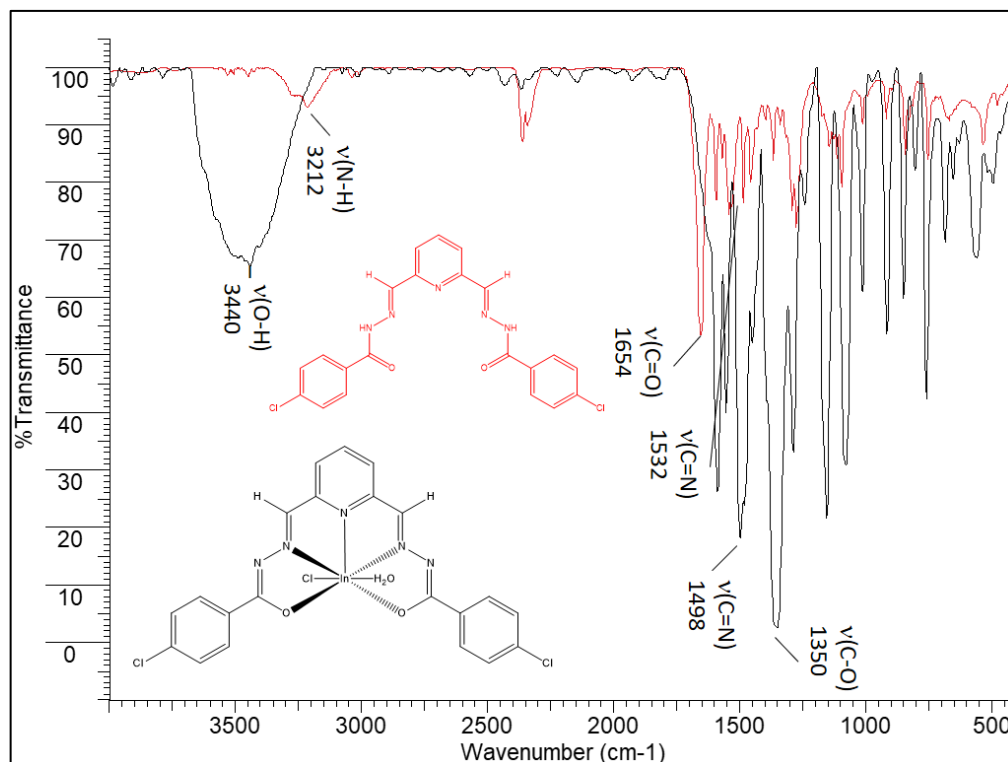


Figura A13. Espectros de infravermelho do ligante $H_2-2,6FopClPh$ e seu complexo $[In(2,6FopClPh)Cl(H_2O)] \cdot 3H_2O$ (5).

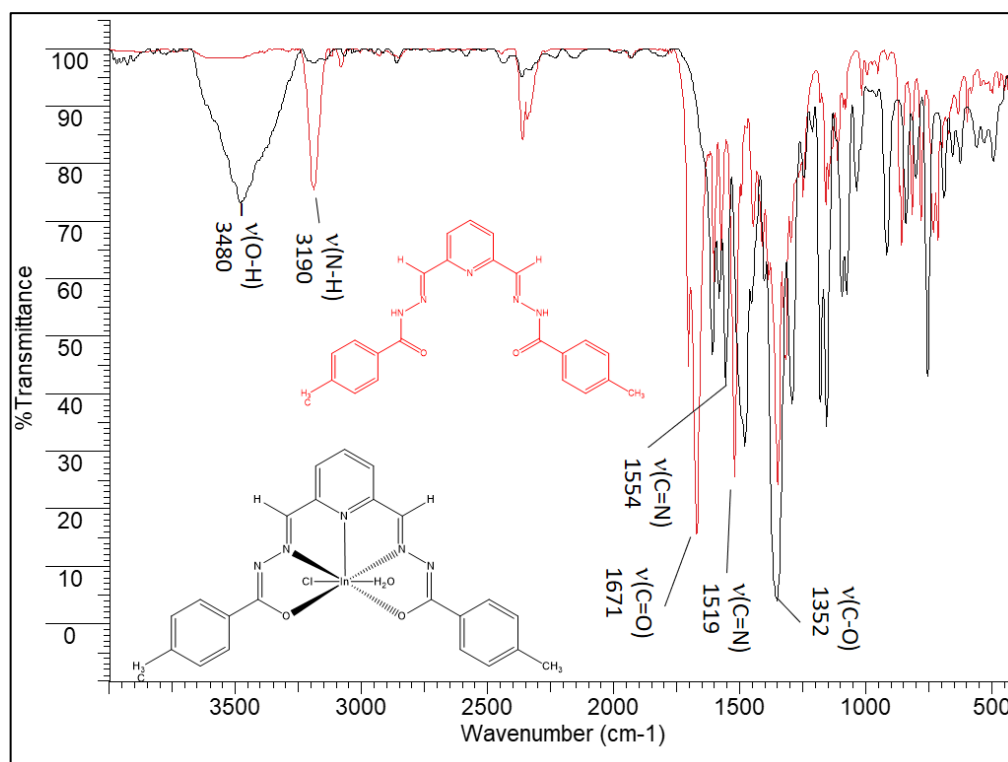


Figura A14. Espectros de infravermelho do ligante $H_2-2,6FopCH_3Ph$ e seu complexo $[In(2,6FopCH_3Ph)Cl(H_2O)] \cdot H_2O$ (6).

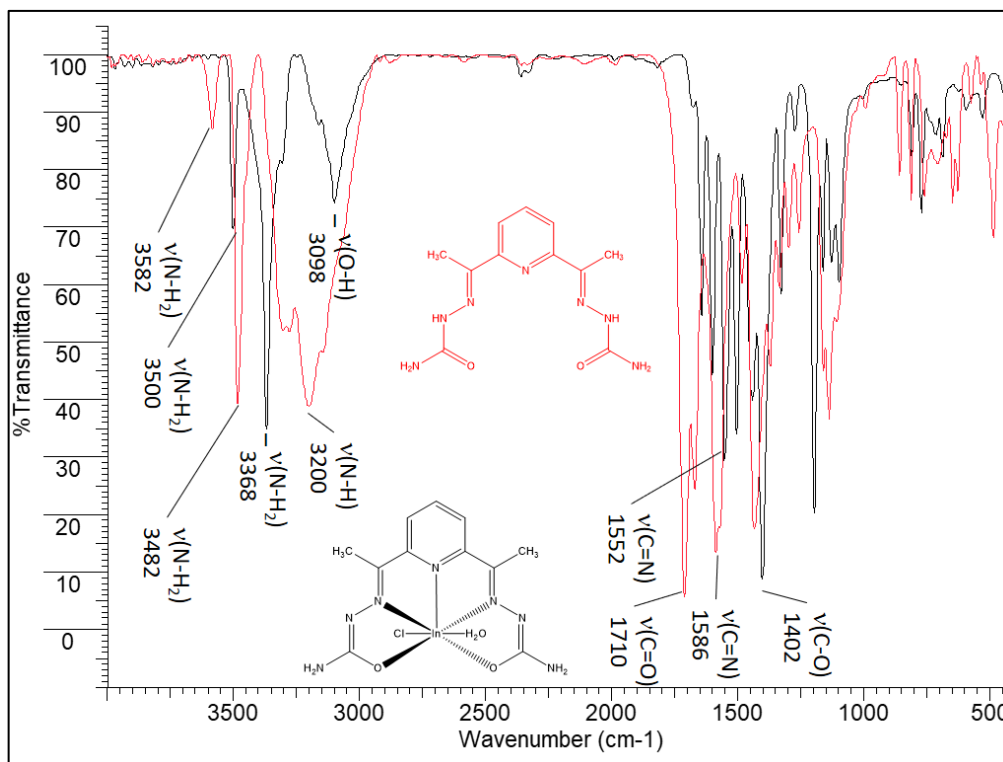


Figura A15. Espectros de infravermelho do ligante H_2 -2,6AcSc e seu complexo $[In(2,6AcSc)Cl(H_2O)]$ (7).

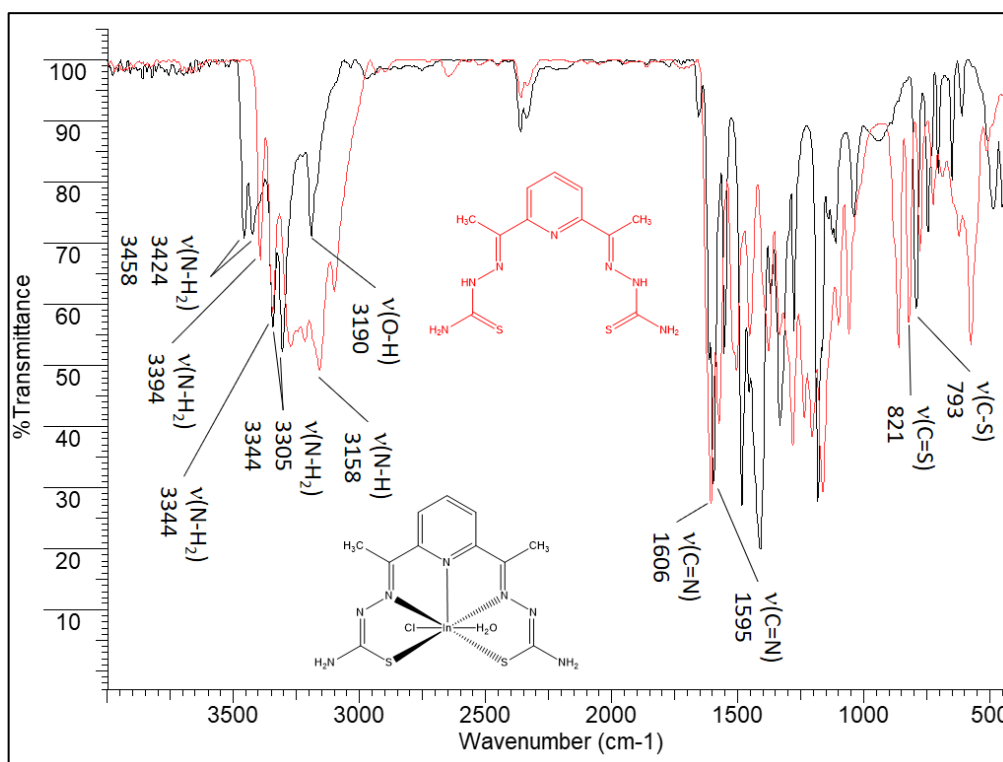


Figura A16. Espectros de infravermelho do ligante H_2 -2,6AcTsc e seu complexo $[In(2,6AcTsc)Cl(H_2O)]$ (8).

Espectros ressonância magnética nuclear (RMN)

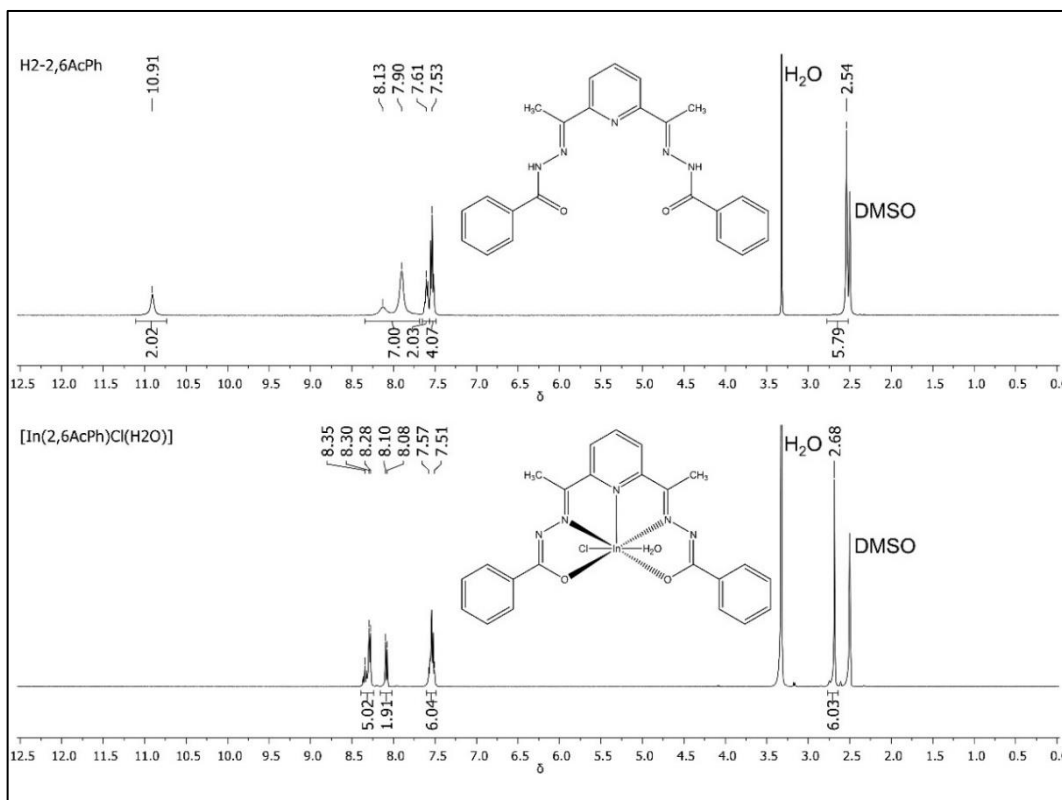


Figura A17. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcPh}$ e do complexo (1).

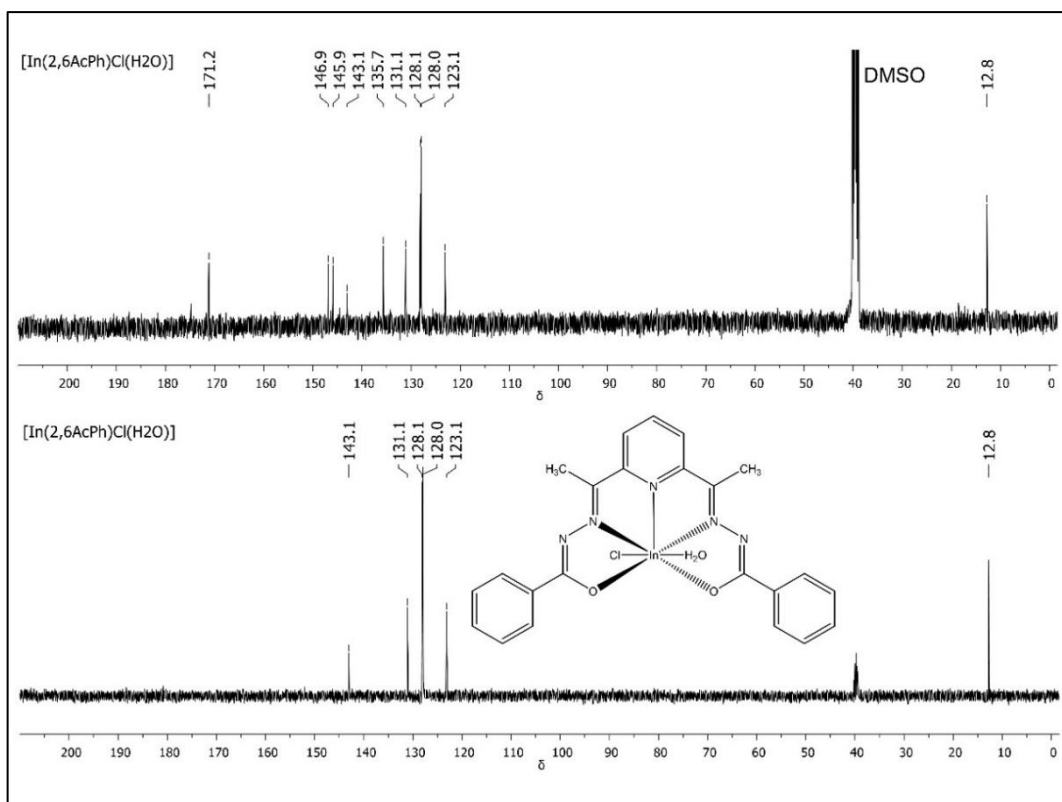


Figura A18. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (1).

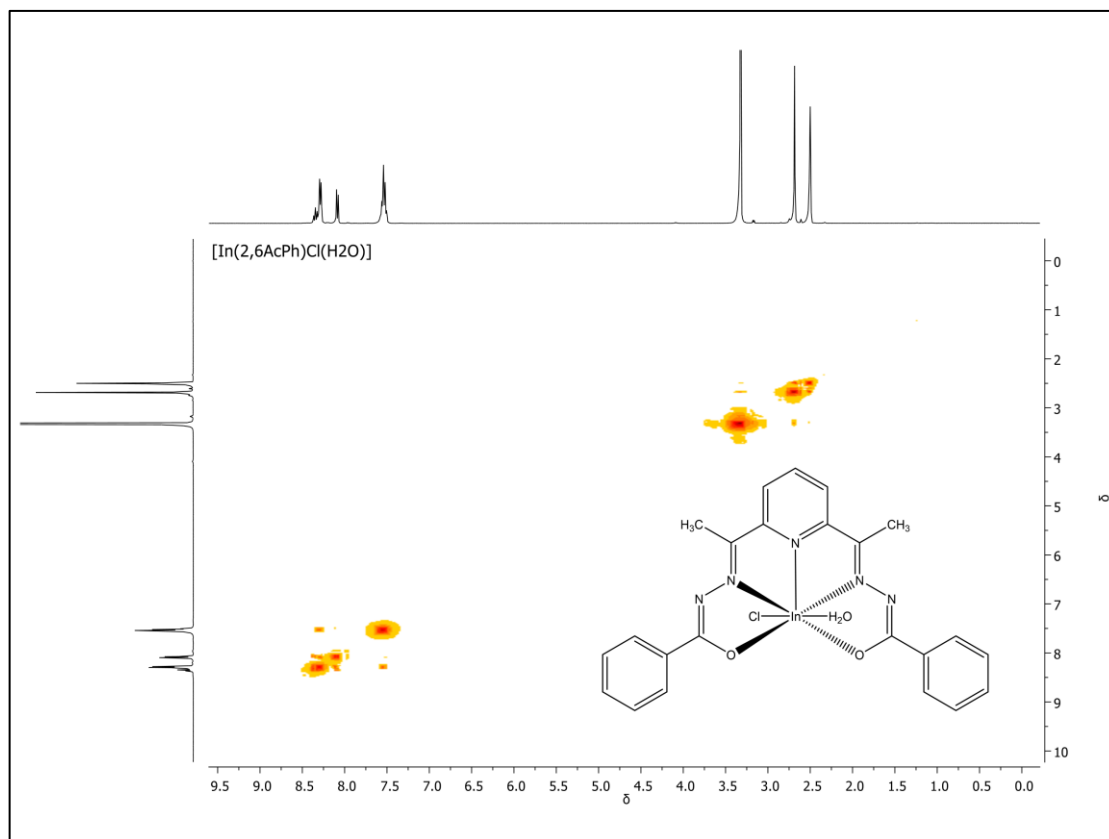


Figura A19. O espectro de RMN COSY do complexo (1).

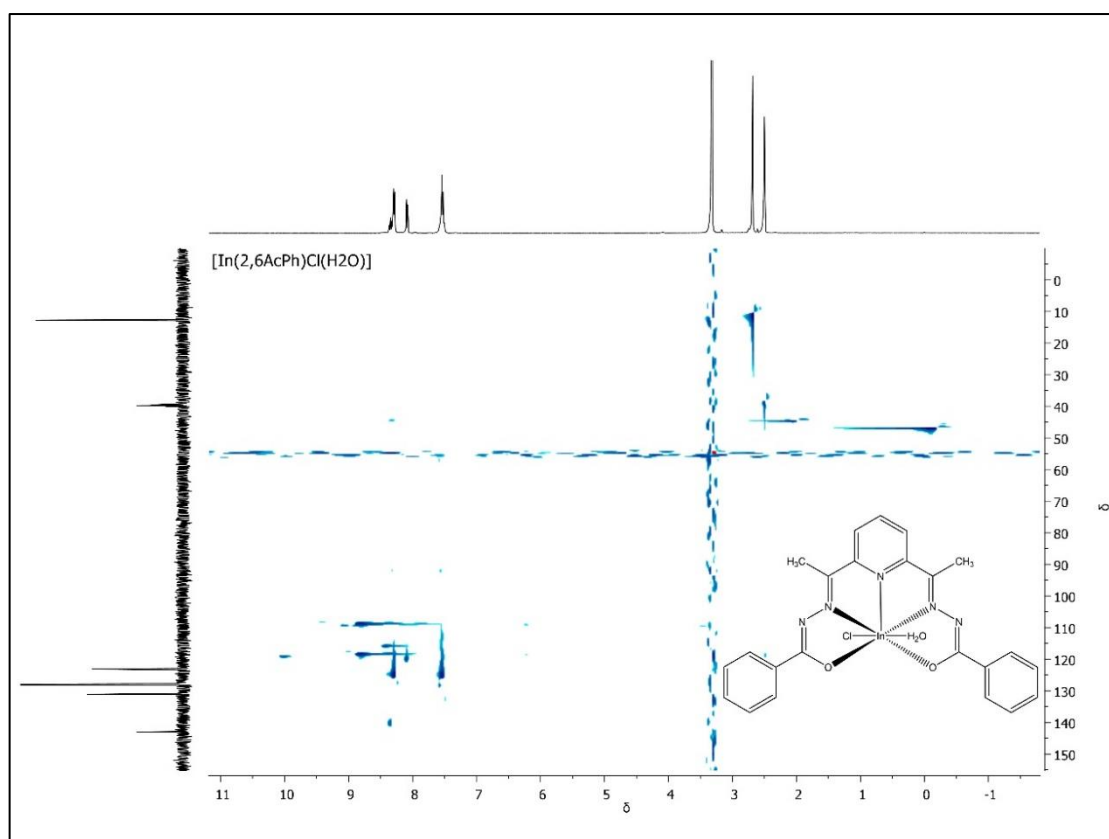


Figura A20. O espectro de RMN HMQC do complexo (1).

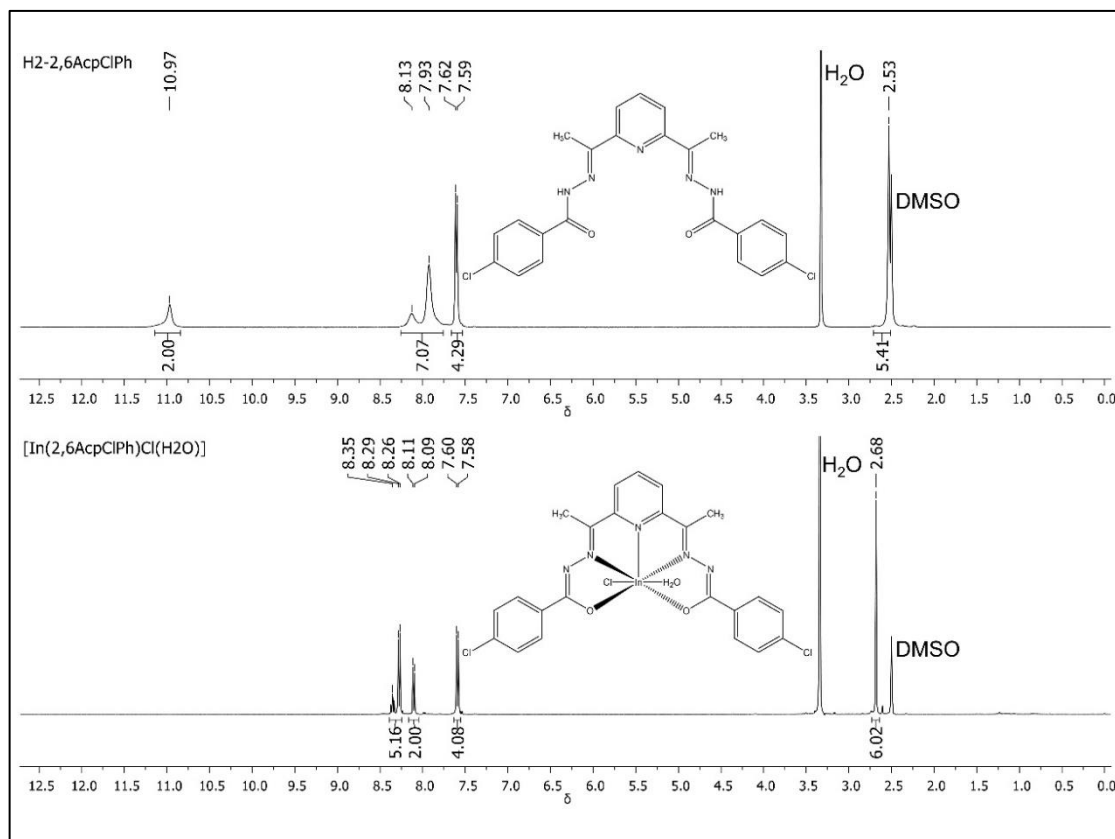


Figura A21. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcpClPh}$ e do complexo (2).

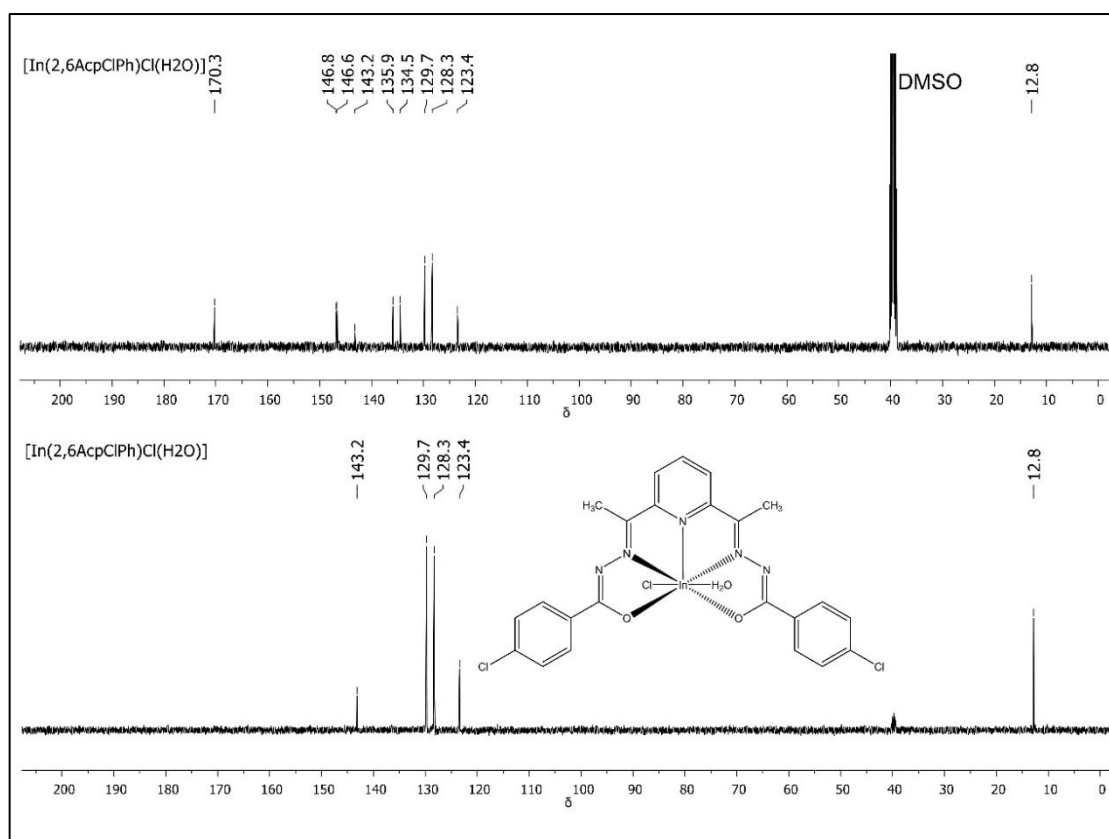


Figura A22. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (2).

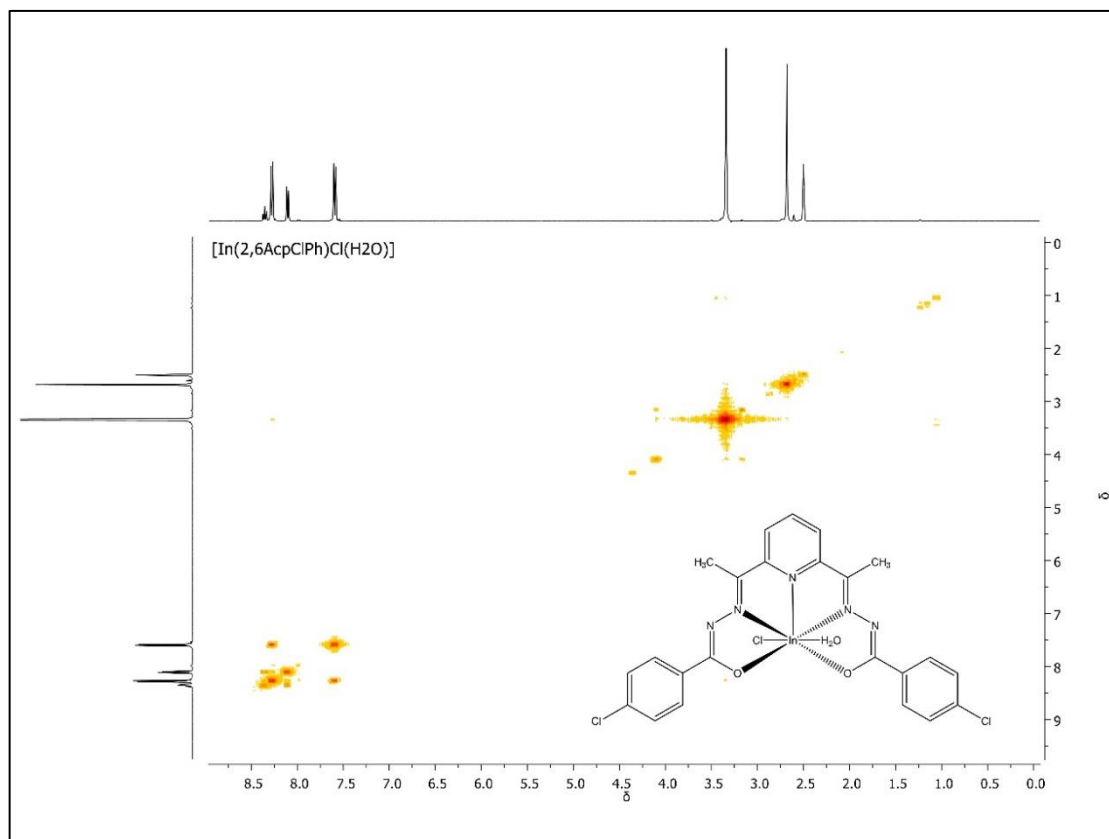


Figura A23. O espectro de RMN COSY do complexo (2).

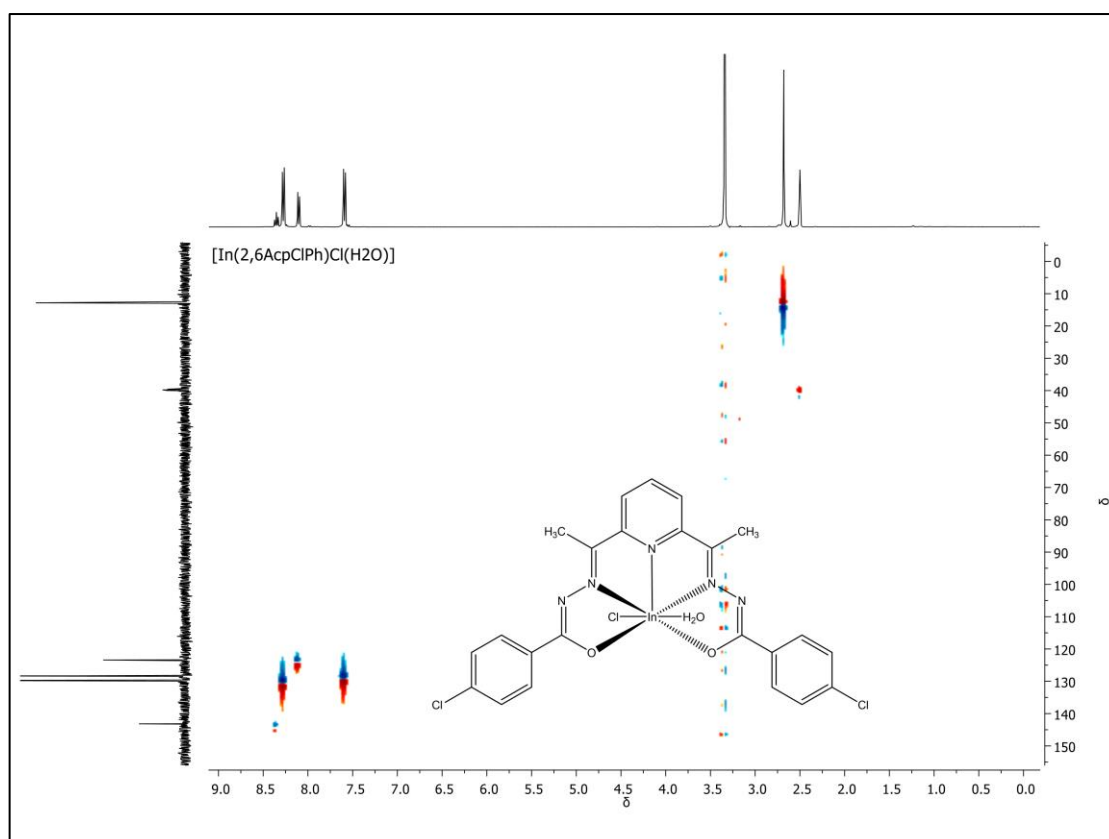


Figura A24. O espectro de RMN HMQC do complexo (2).

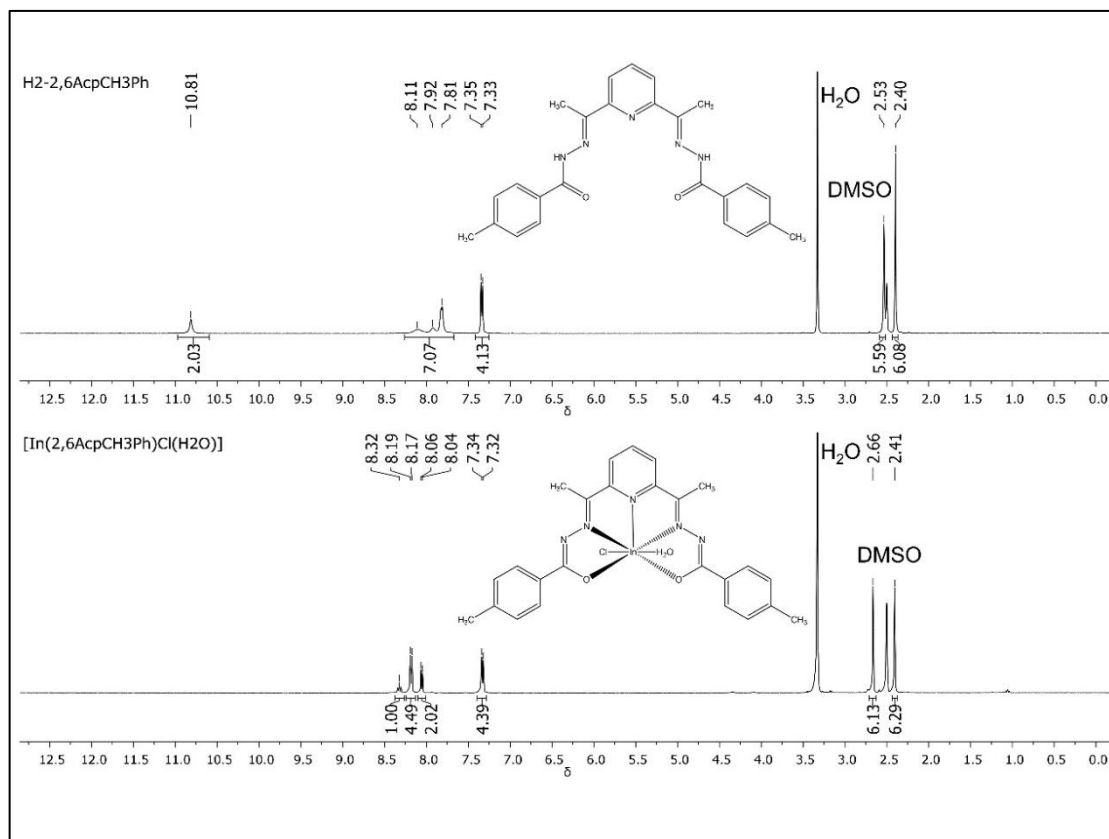


Figura A25. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcpCH}_3\text{Ph}$ e do complexo (3).

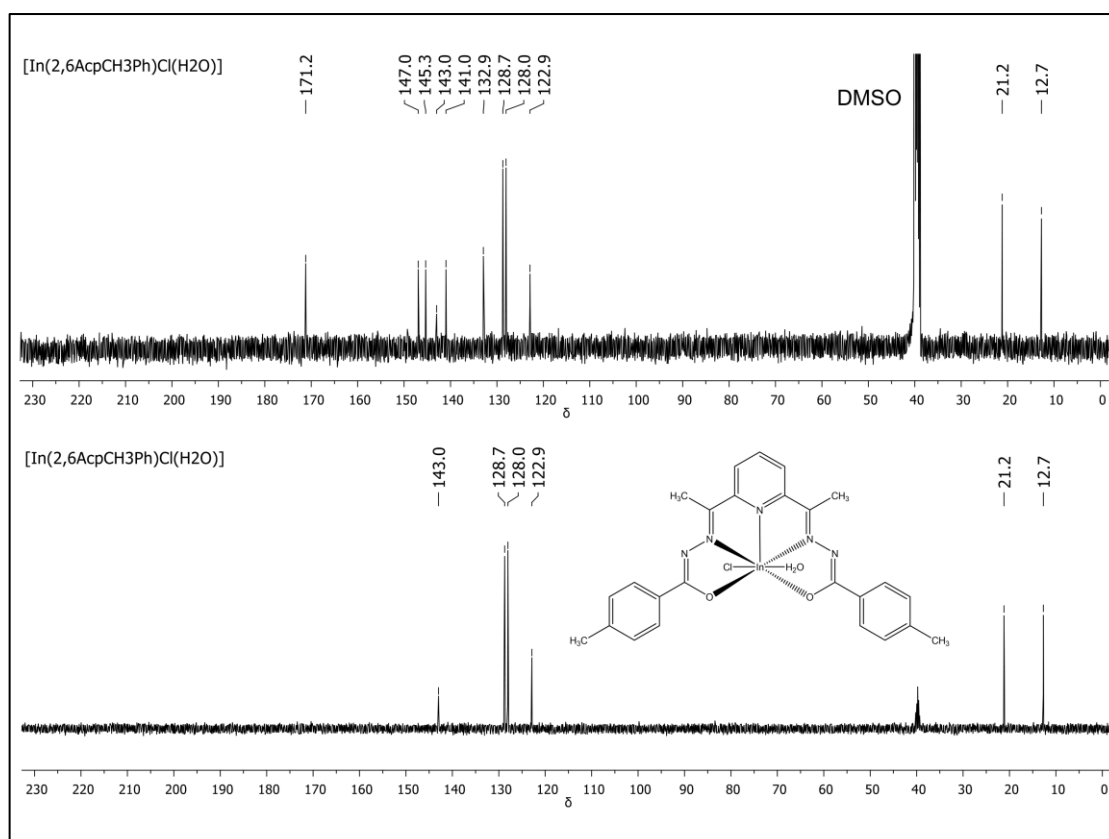


Figura A26. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (3).

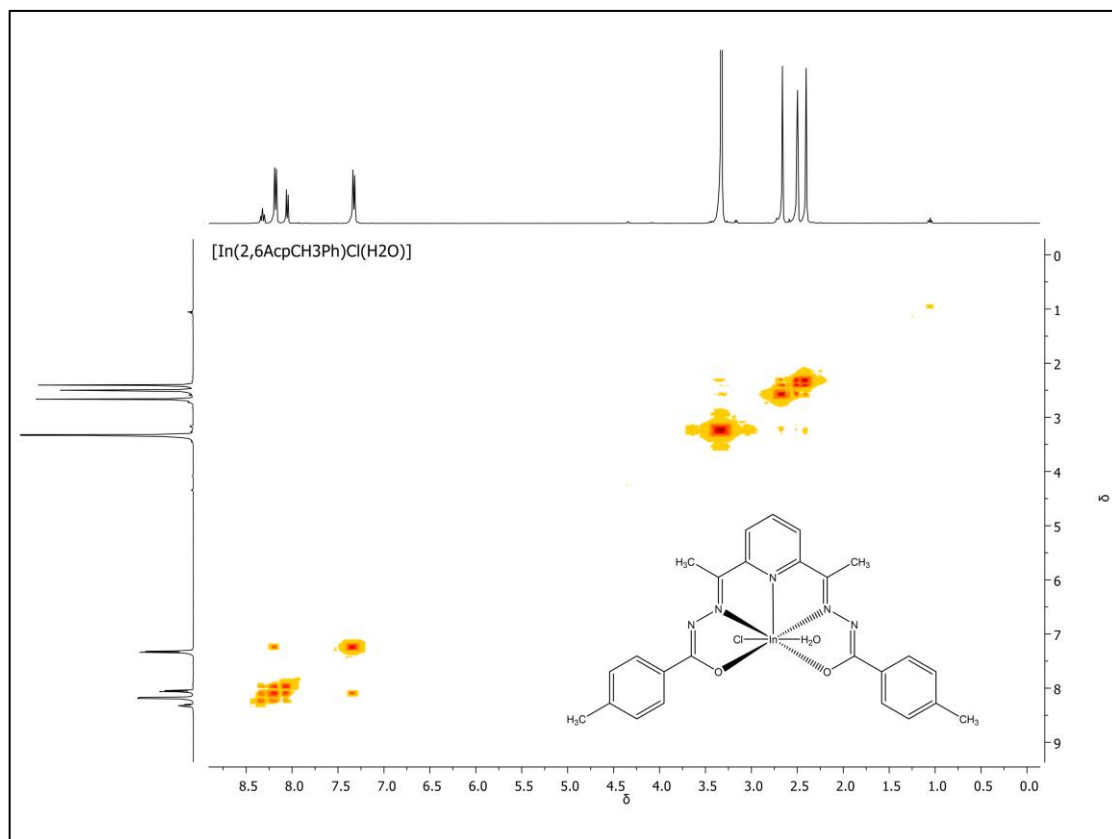


Figura A27. O espectro de RMN COSY do complexo (3).

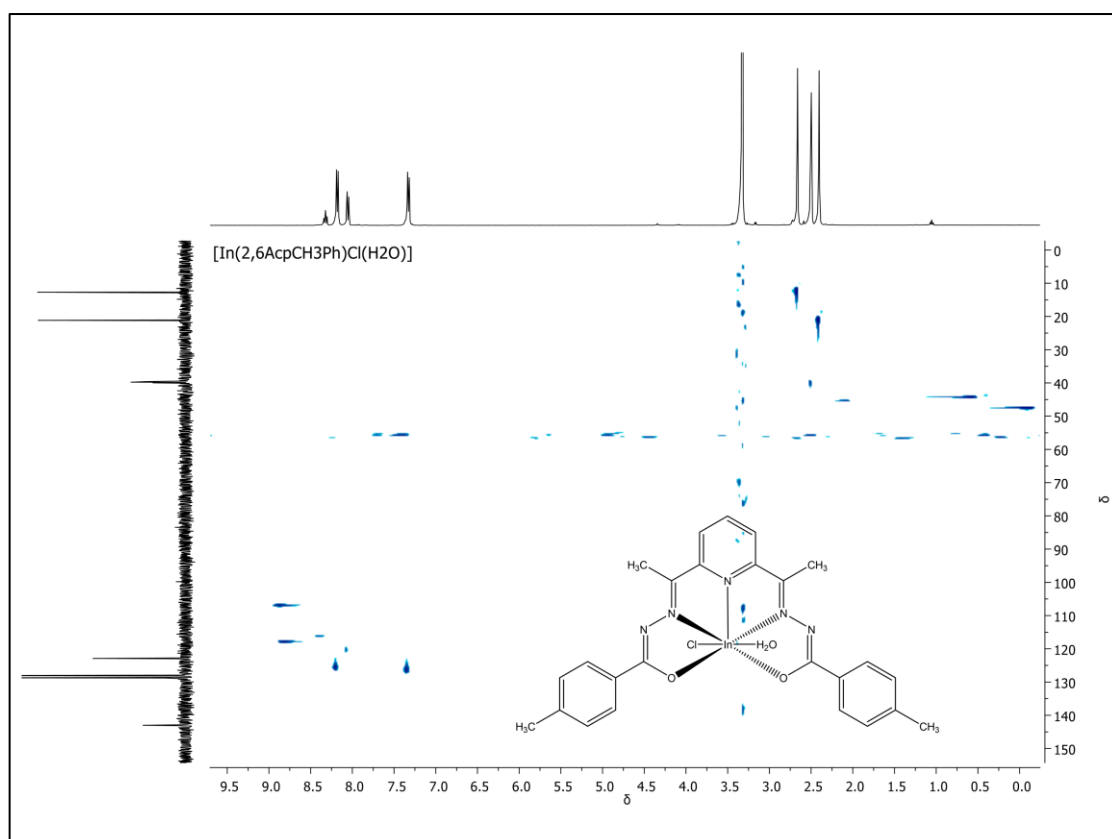


Figura A28. O espectro de RMN HMQC do complexo (3).

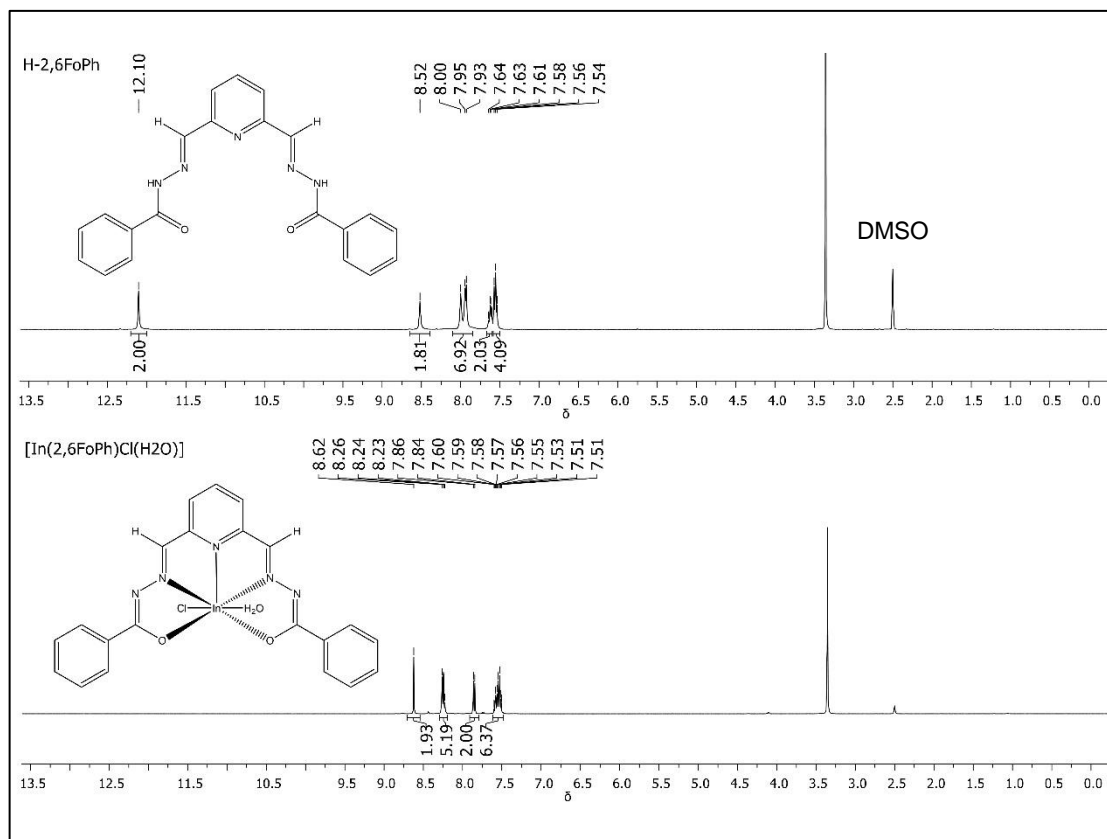


Figura A29. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2,6\text{FoPh}$ e do complexo (4).

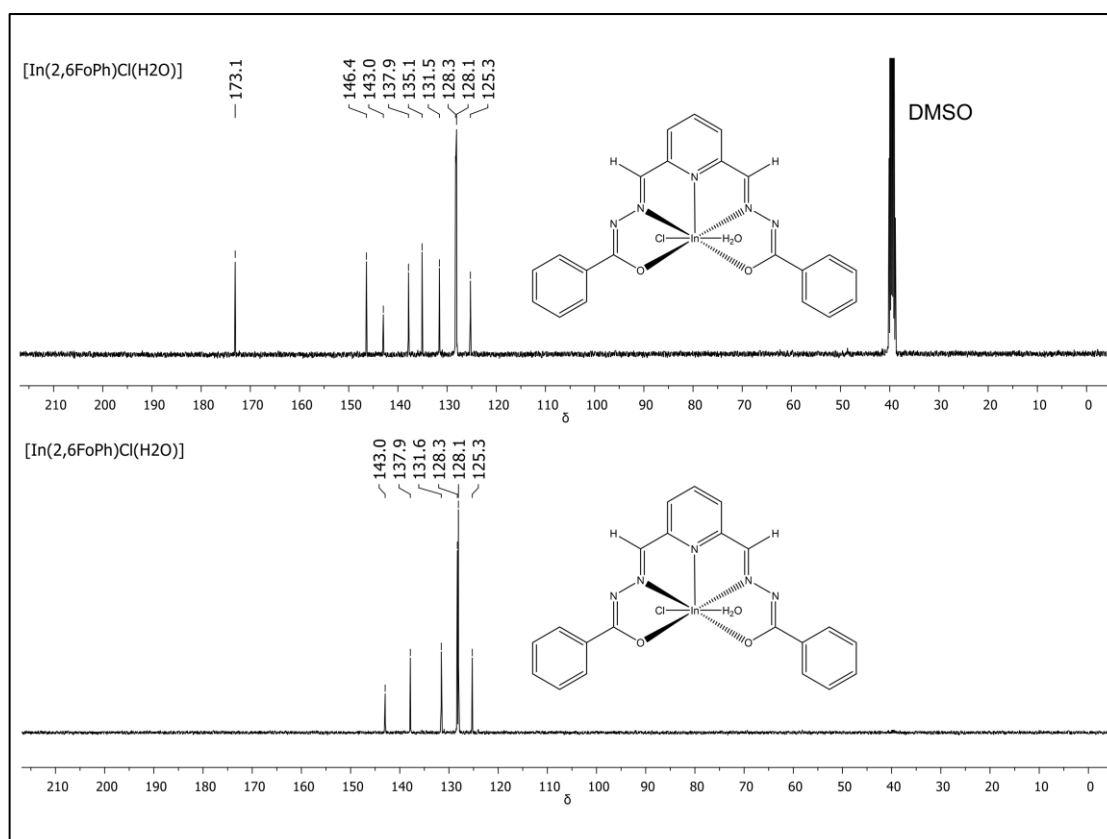


Figura A30. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (4).

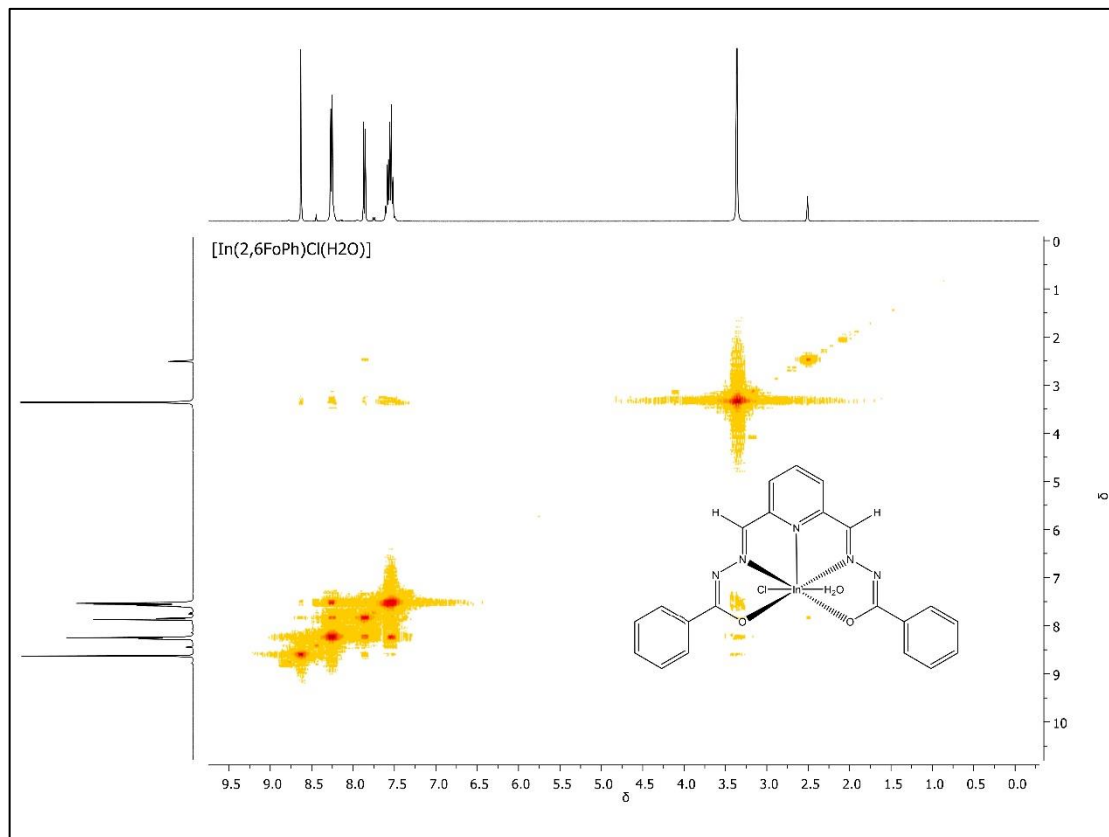


Figura A31. O espectro de RMN COSY do complexo (4).

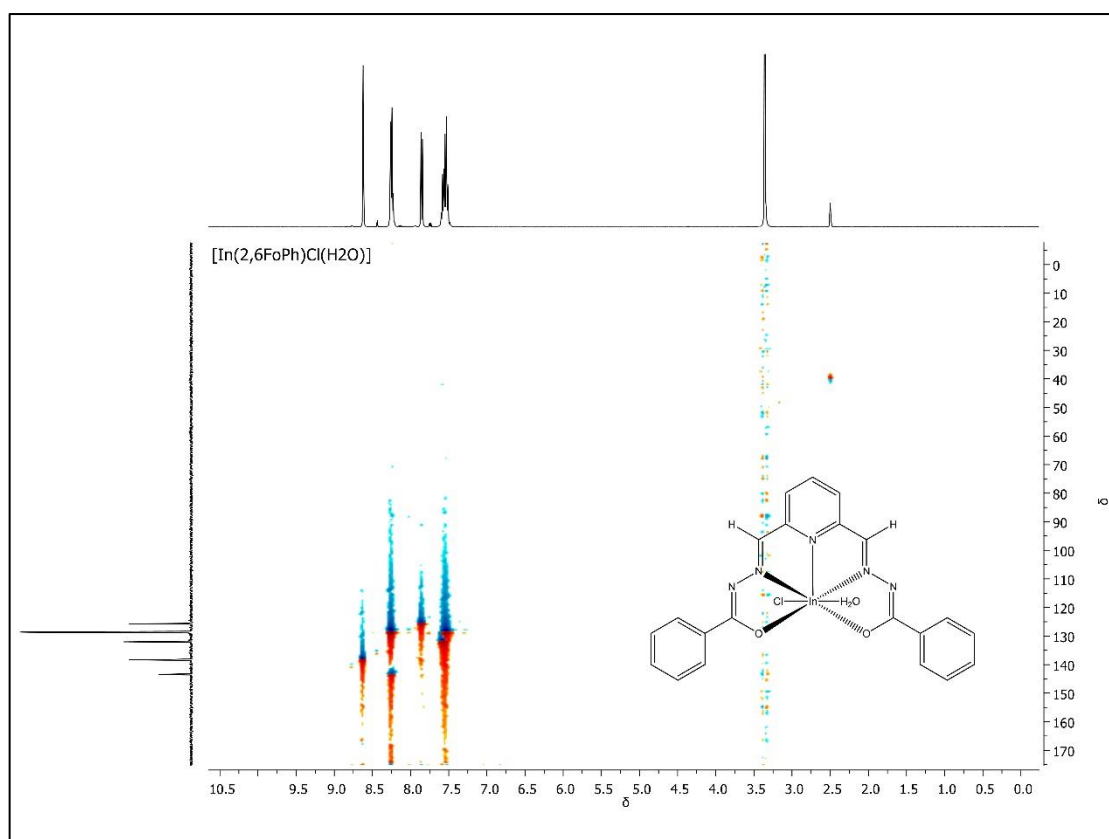


Figura A32. O espectro de RMN HMQC do complexo (4).

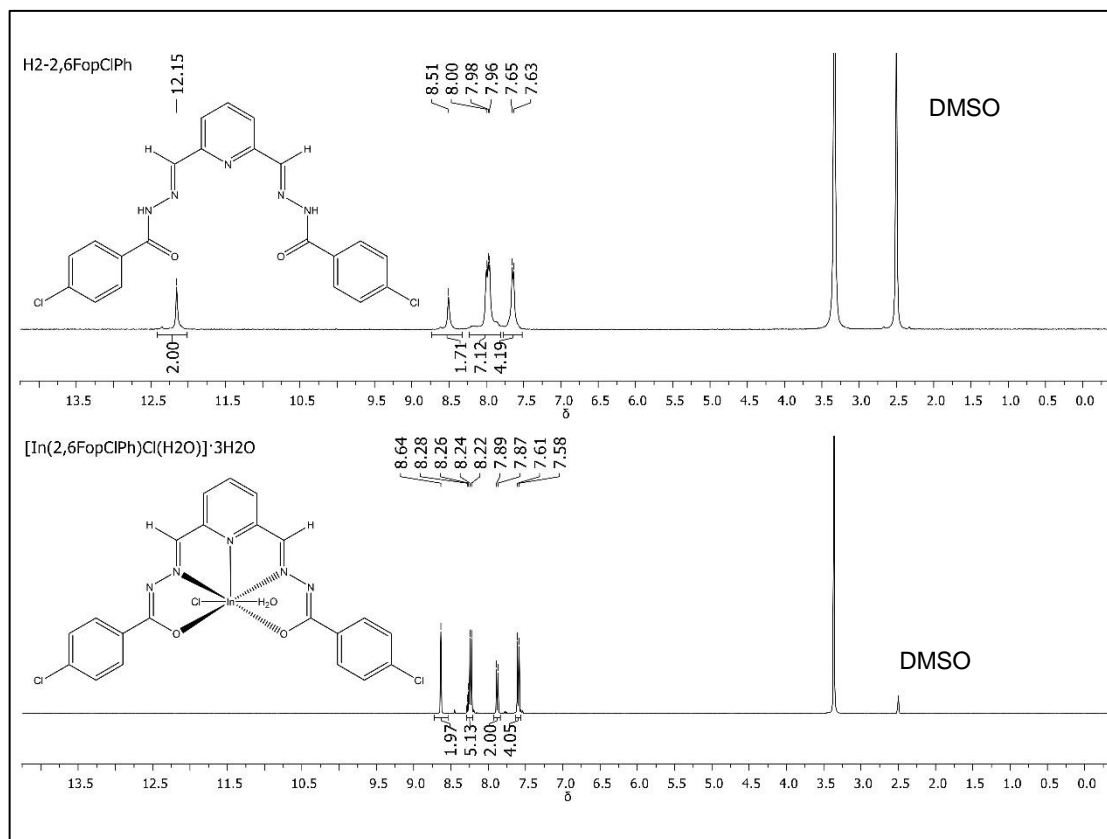


Figura A33. Espectro de RMN de ^1H do ligante H₂-2,6FopClPh e do complexo (5).

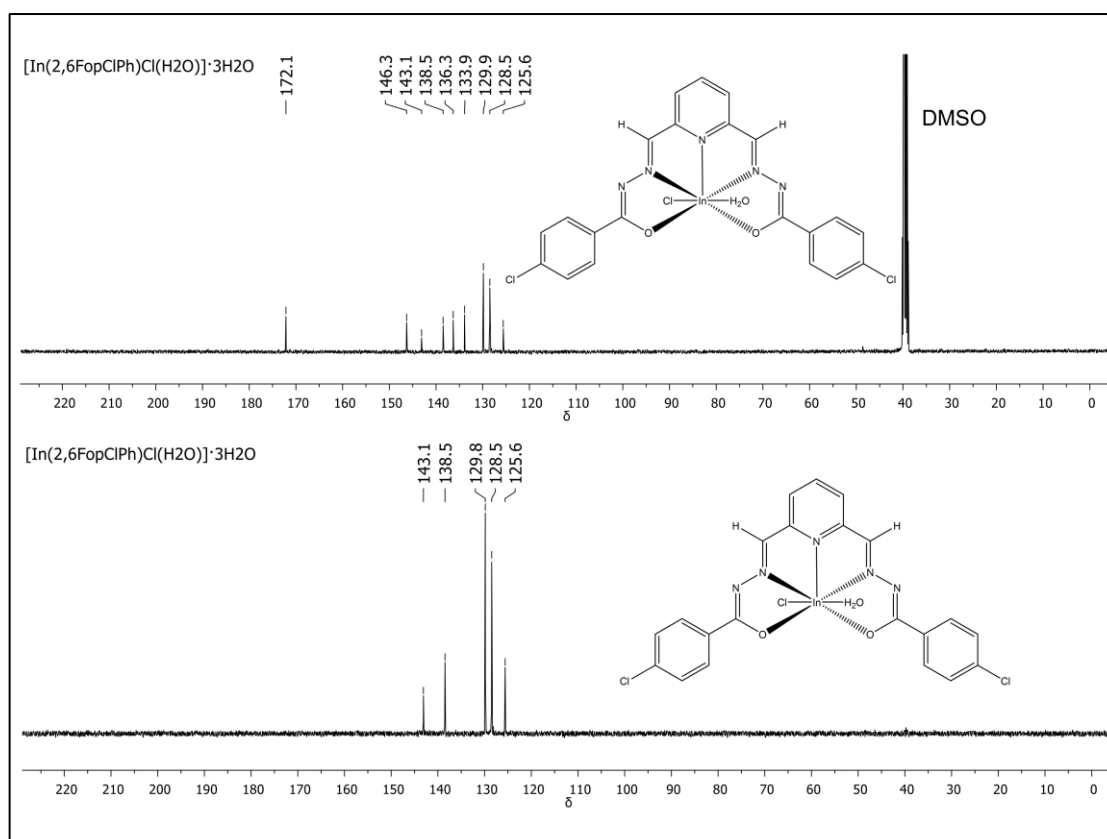


Figura A34. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (5).

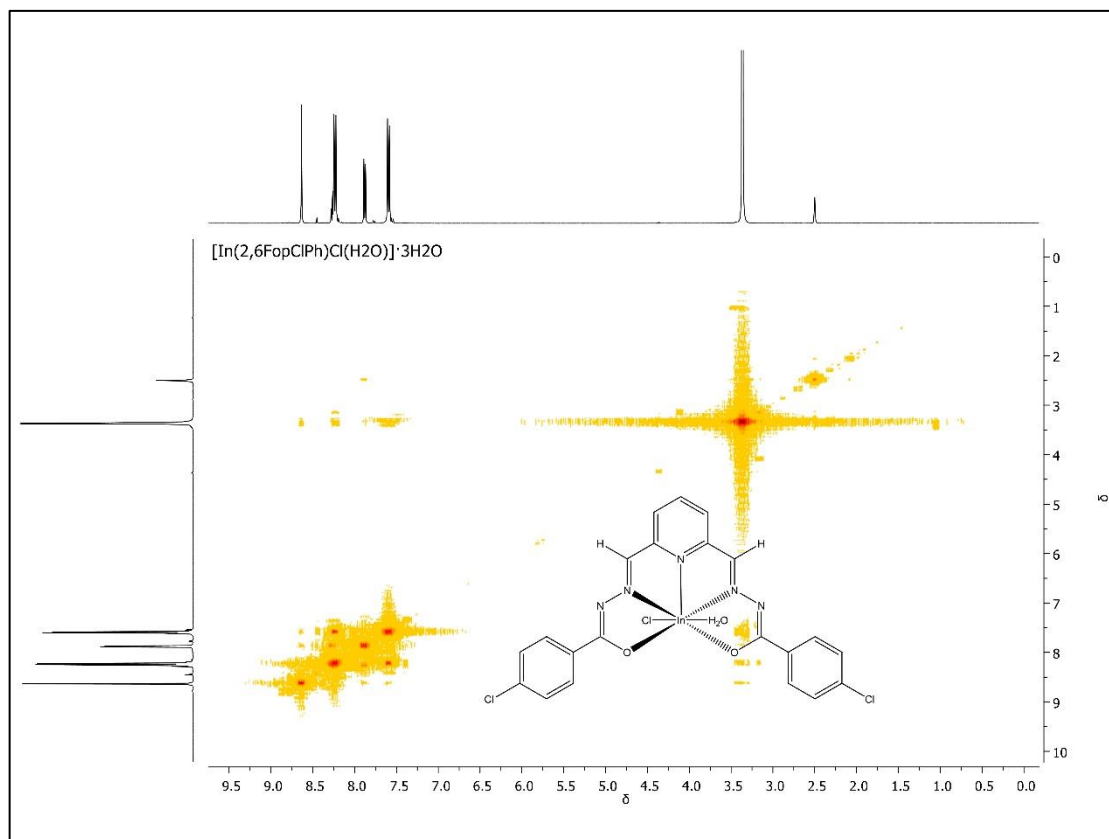


Figura A35. O espectro de RMN COSY do complexo (5).

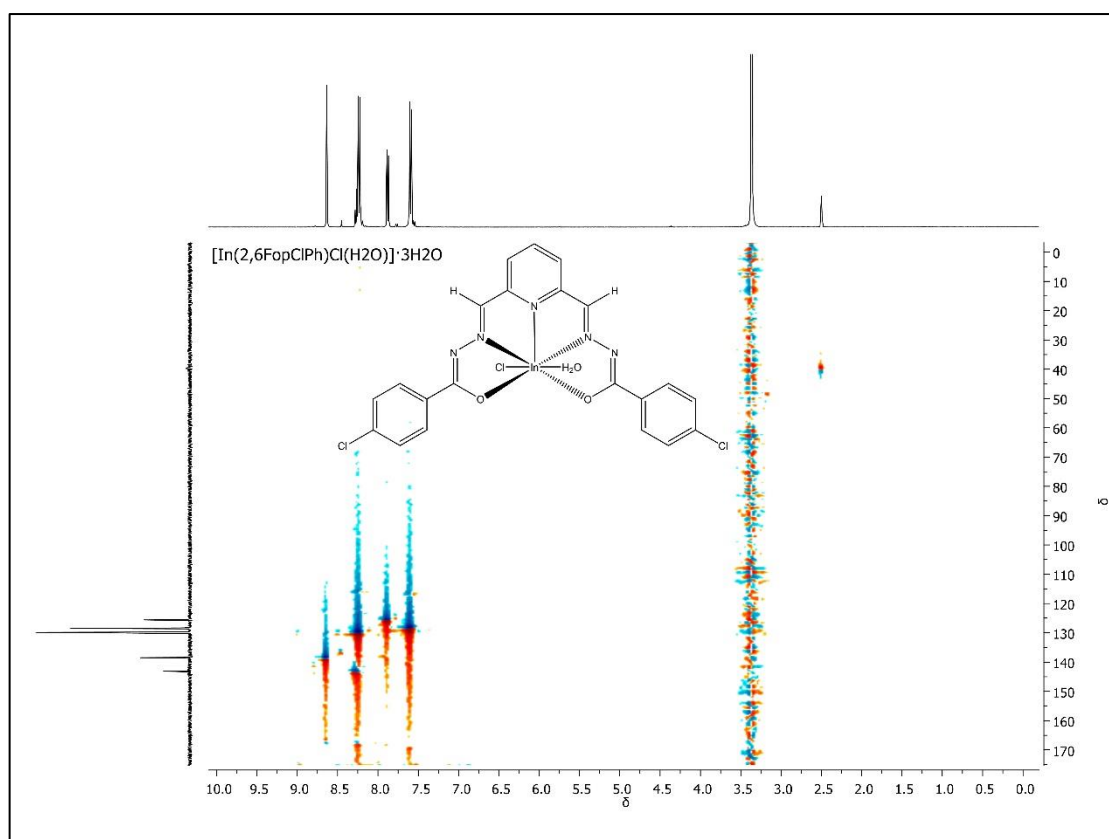


Figura A36. O espectro de RMN HMQC do complexo (5).

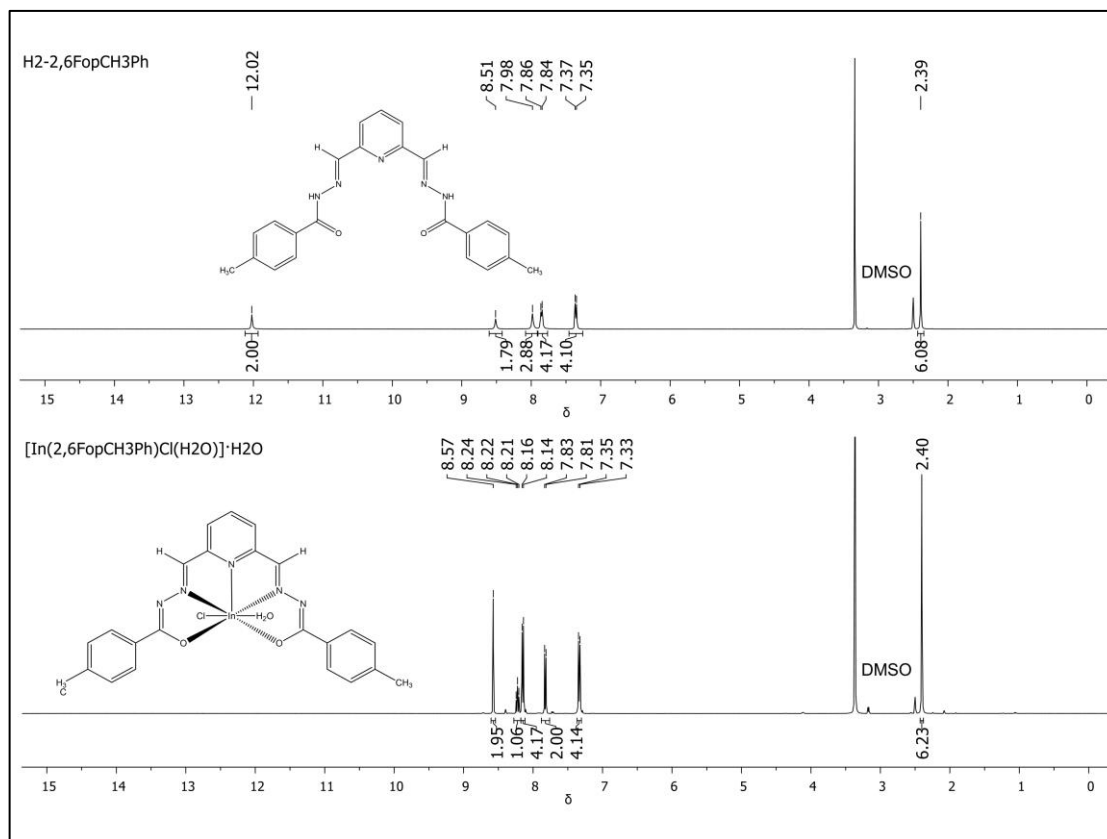


Figura A37. Espectro de RMN de ^1H do ligante H₂-2,6FopCH₃Ph e do complexo (6).

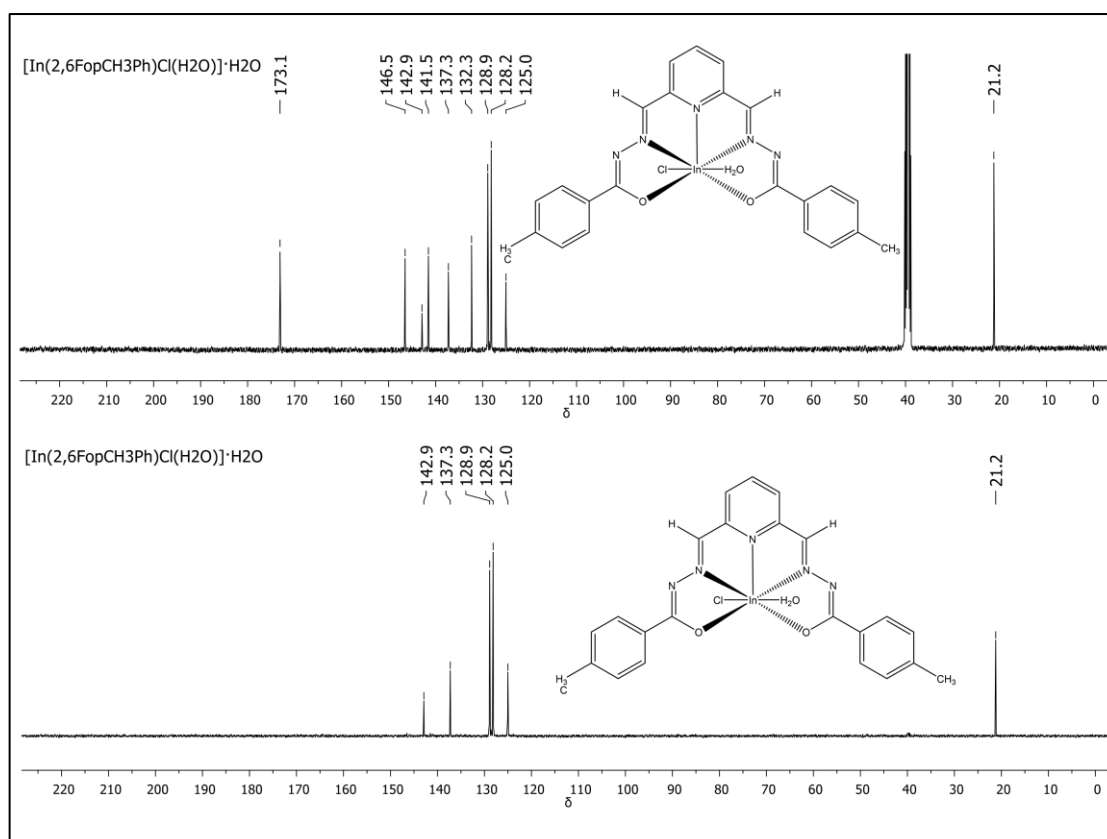


Figura A38. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (6).

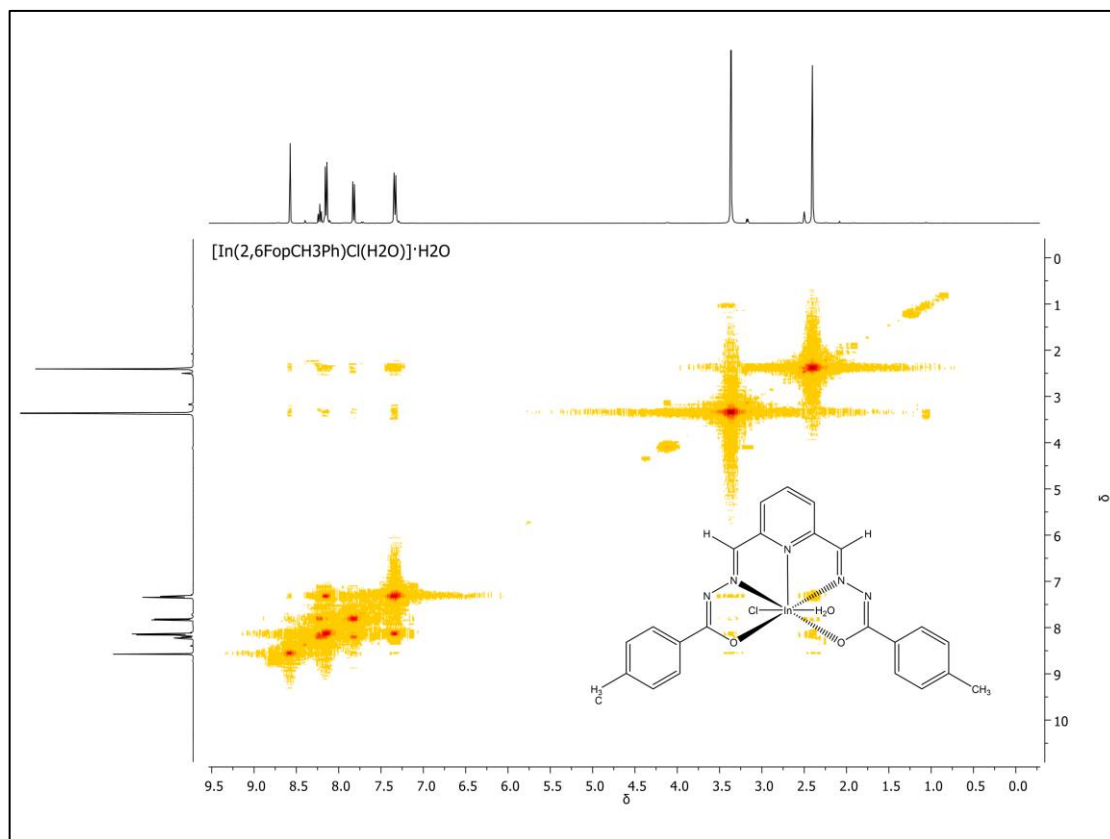


Figura A39. O espectro de RMN COSY do complexo (6).

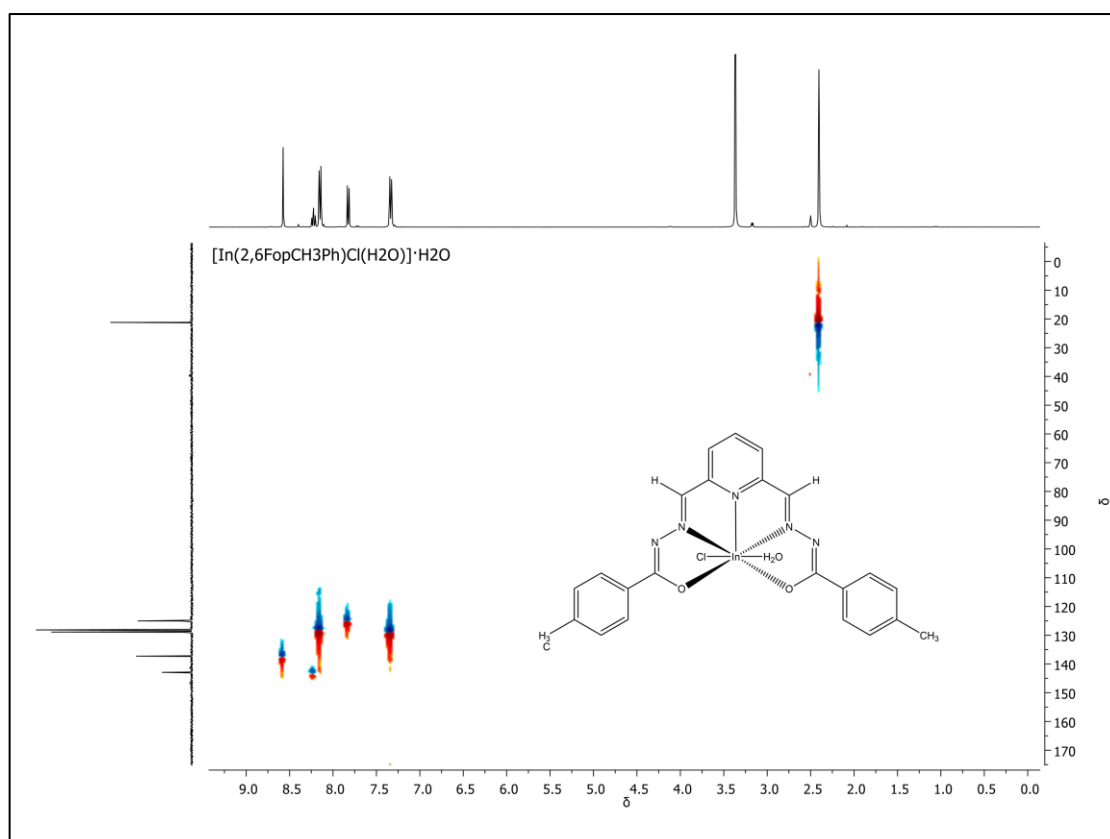


Figura A40. O espectro de RMN HMQC do complexo (6).

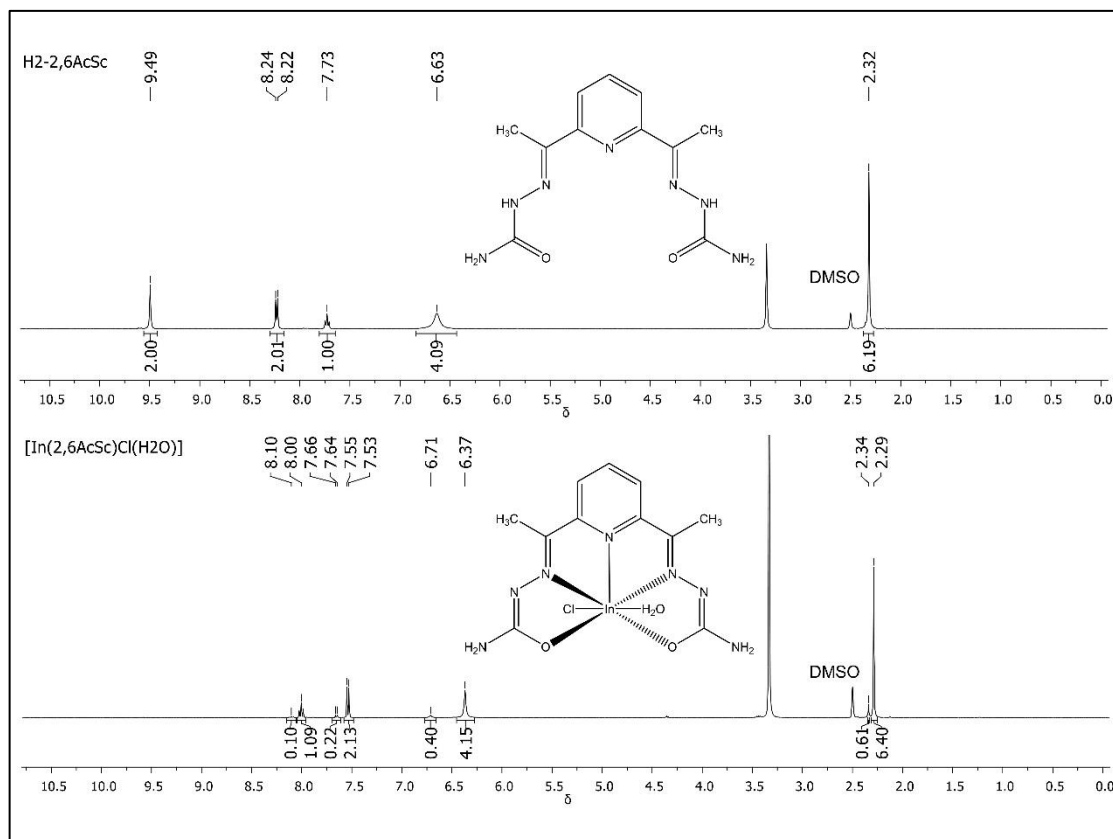


Figura A41. Espectro de RMN de ^1H do ligante H₂-2,6AcSc e do complexo (7).

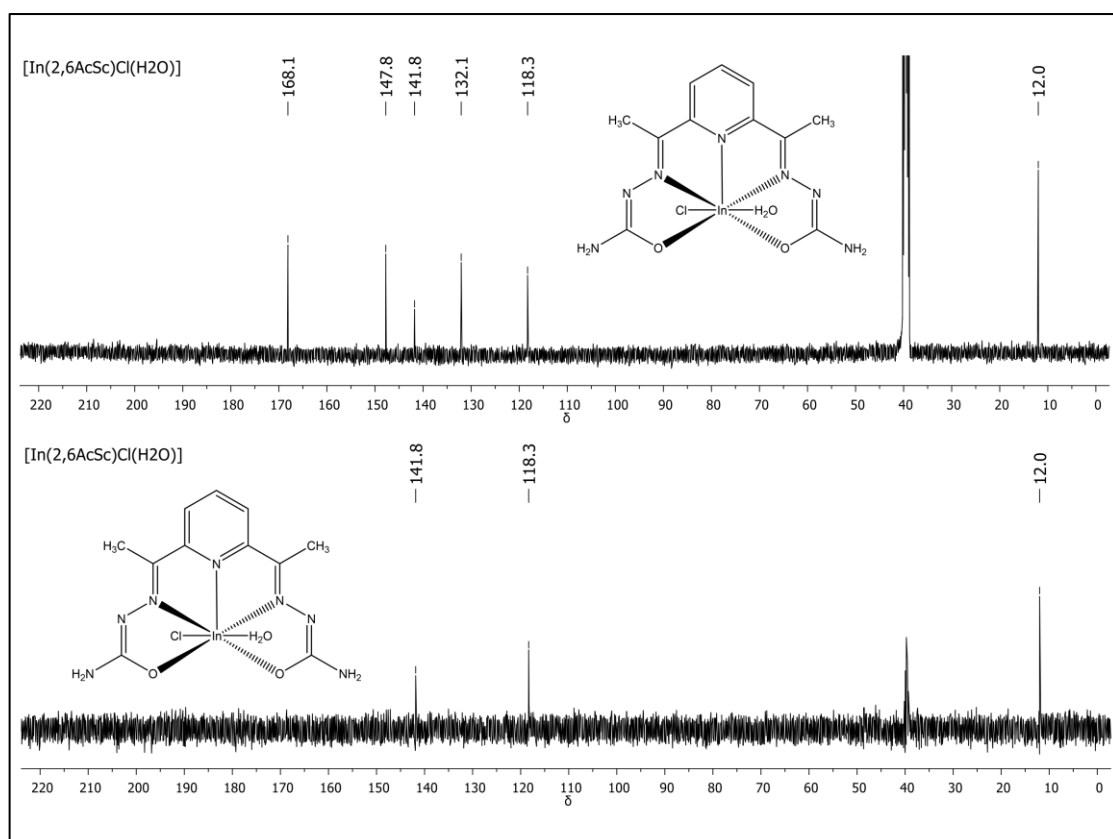


Figura A42. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (7).

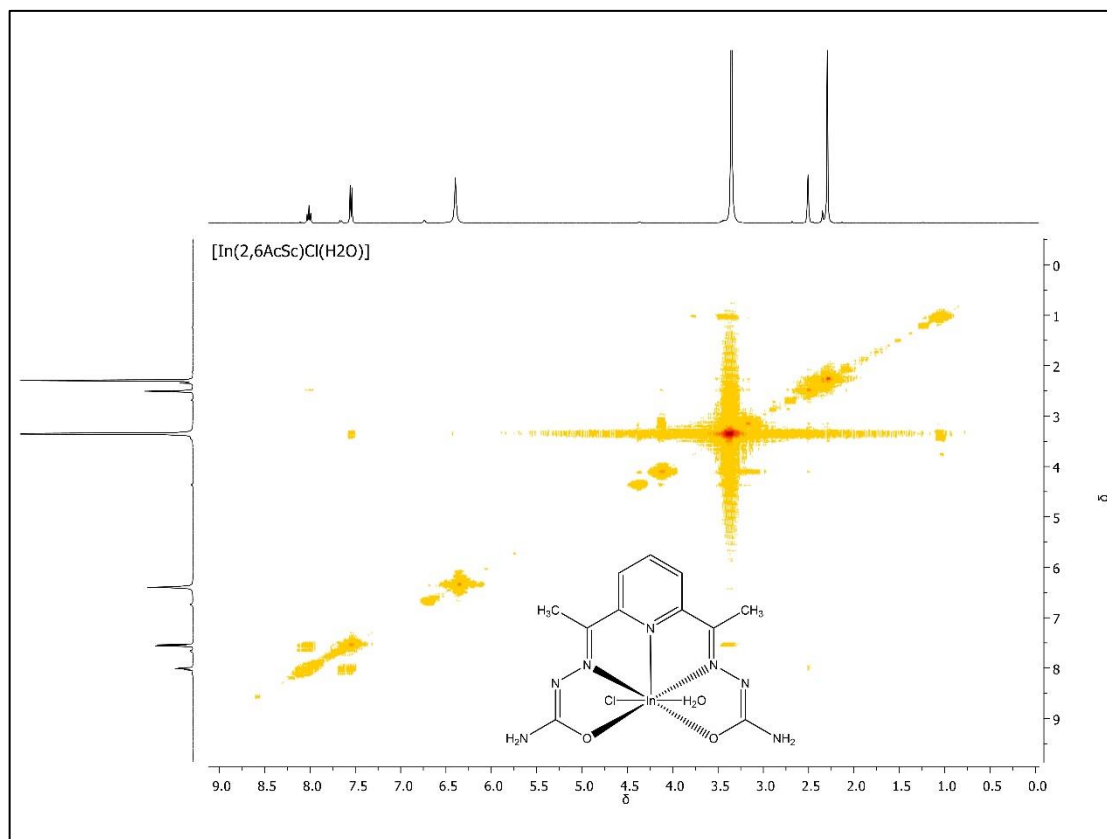


Figura A43. O espectro de RMN COSY do complexo (7).

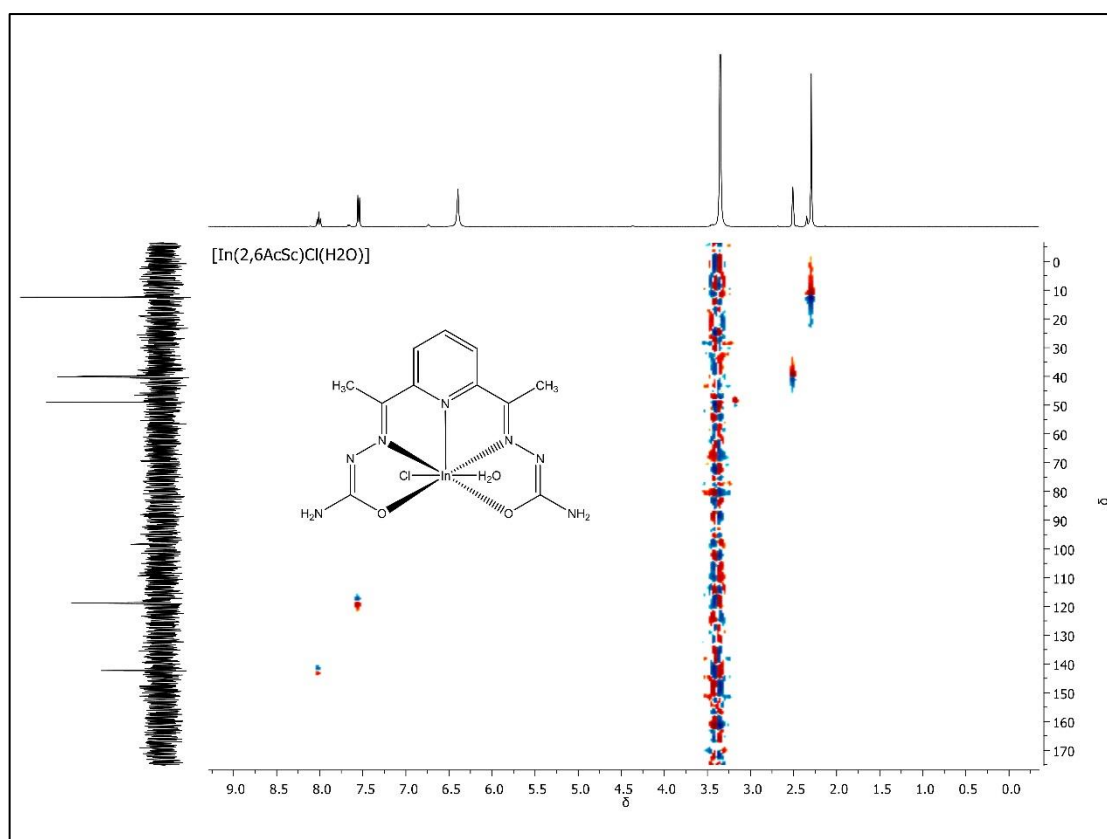


Figura A44. O espectro de RMN HMQC do complexo (7).

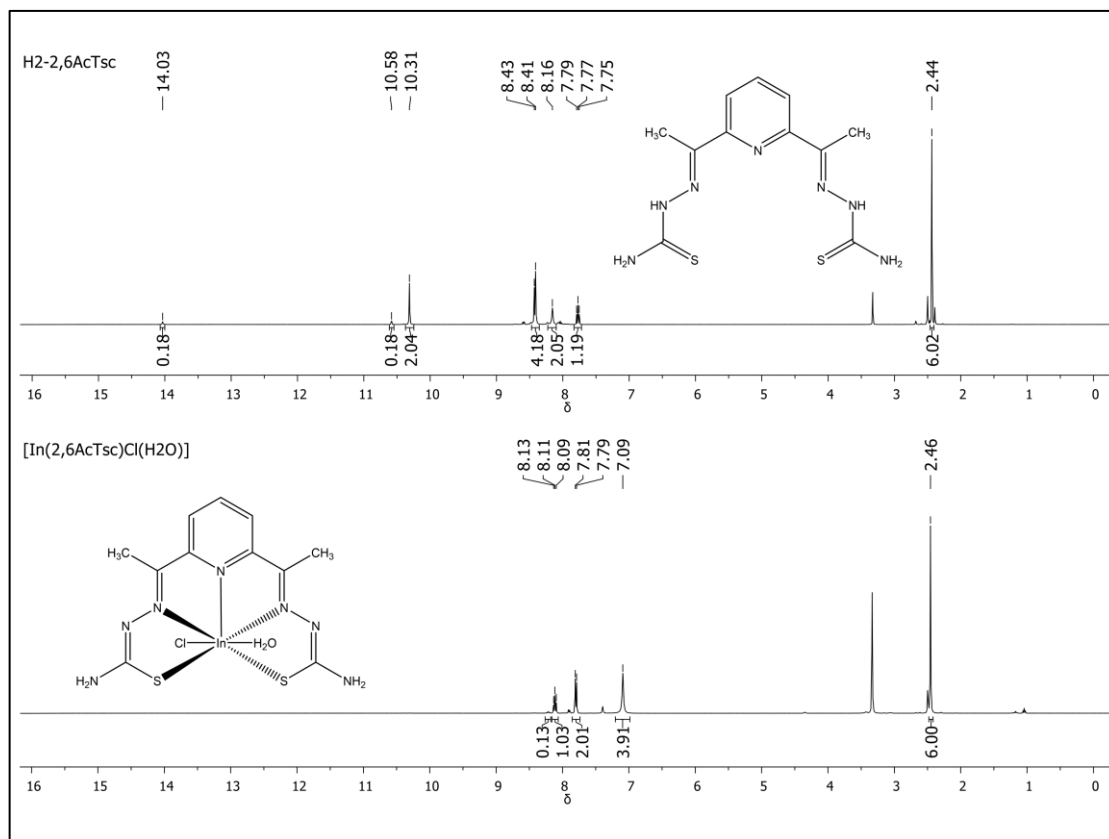


Figura A45. Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{-2,6AcTsc}$ e do complexo (**8**).

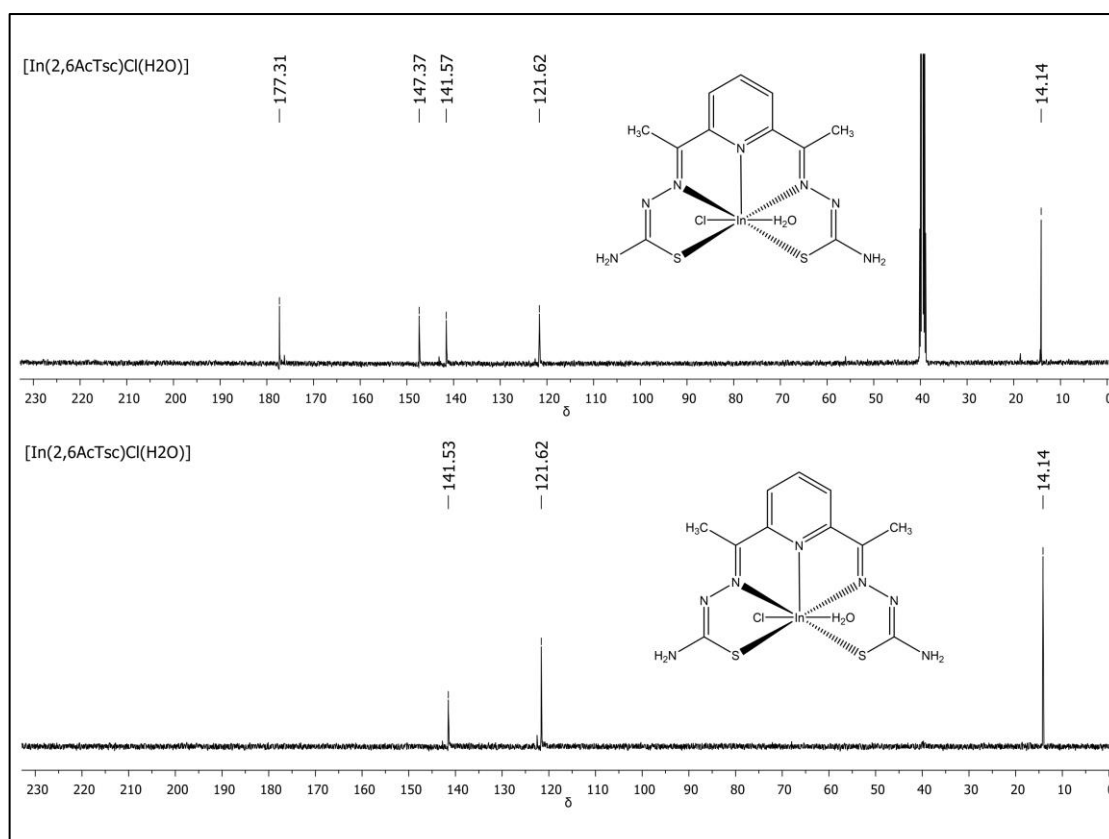


Figura A46. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 do complexo (**8**).

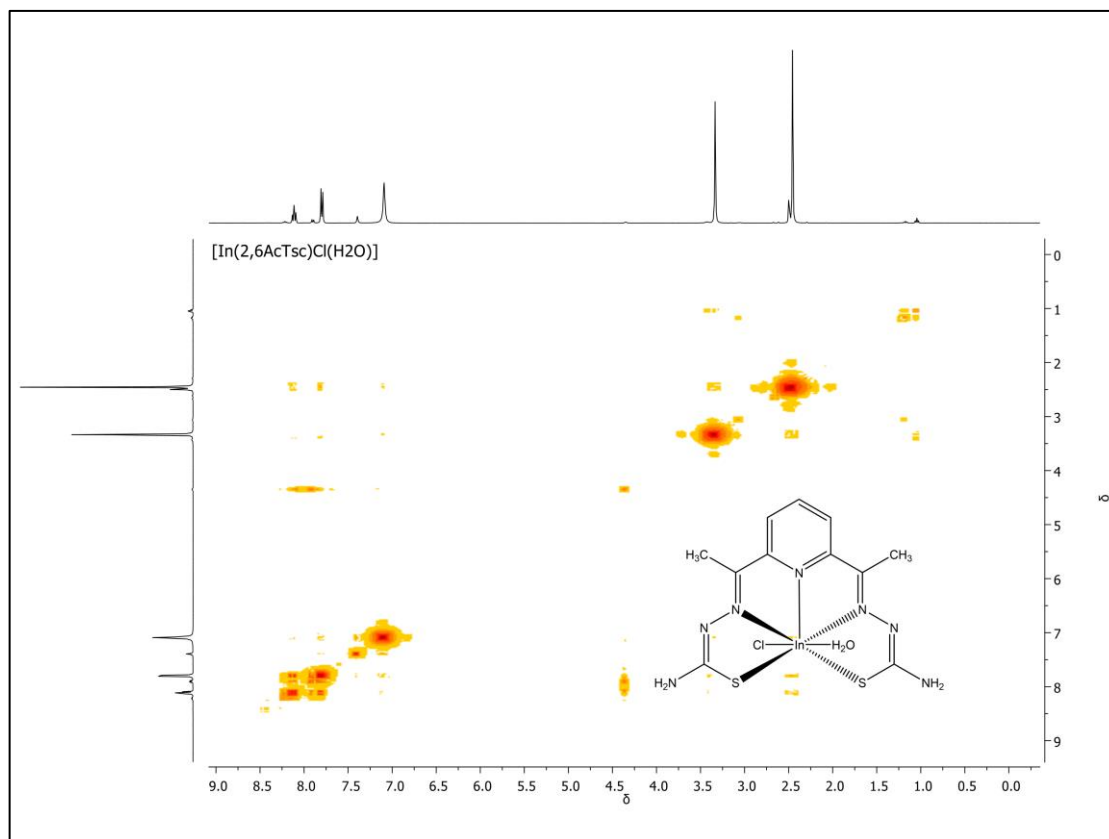


Figura A47. O espectro de RMN COSY do complexo (8).

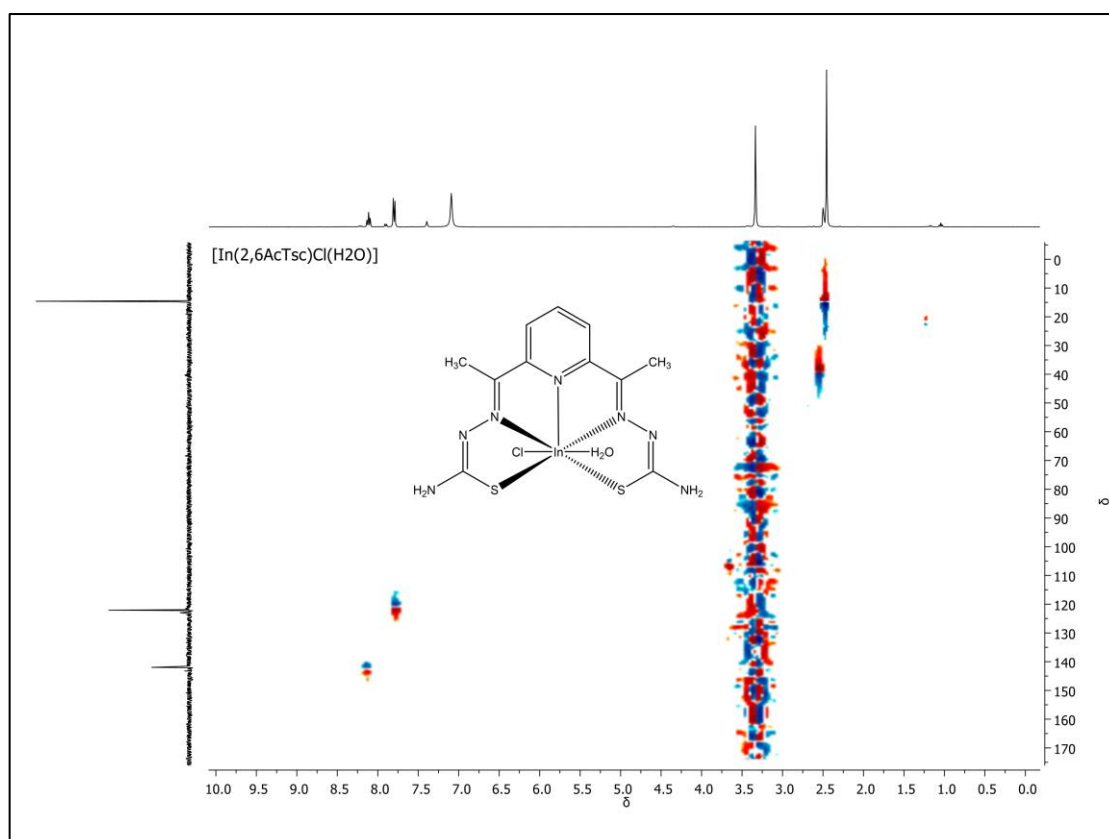


Figura A48. O espectro de RMN HMQC do complexo (8).

Espectros de excitação e de emissão dos complexos (1-6)

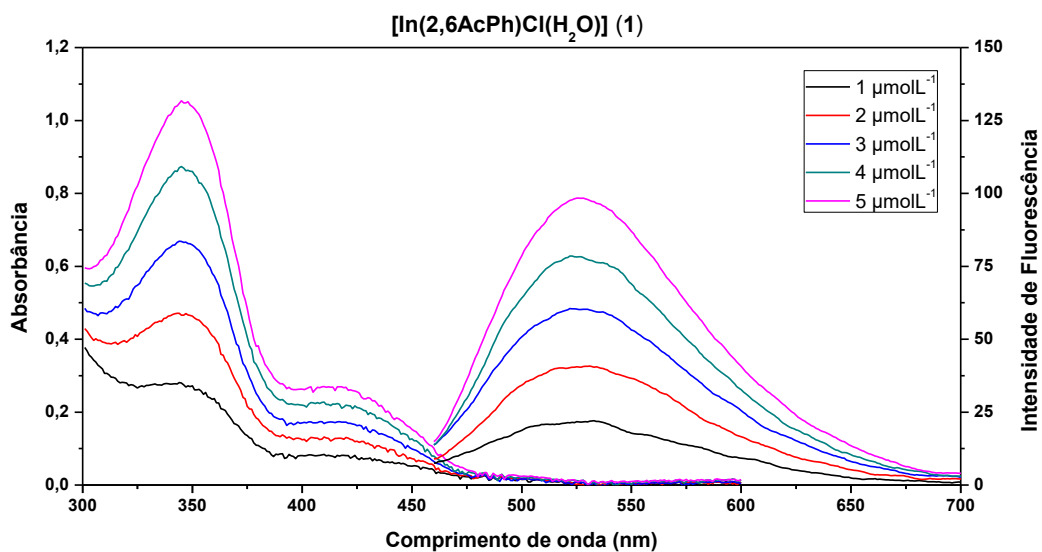


Figura A49. Espectros de excitação e de emissão do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1) em DMSO.

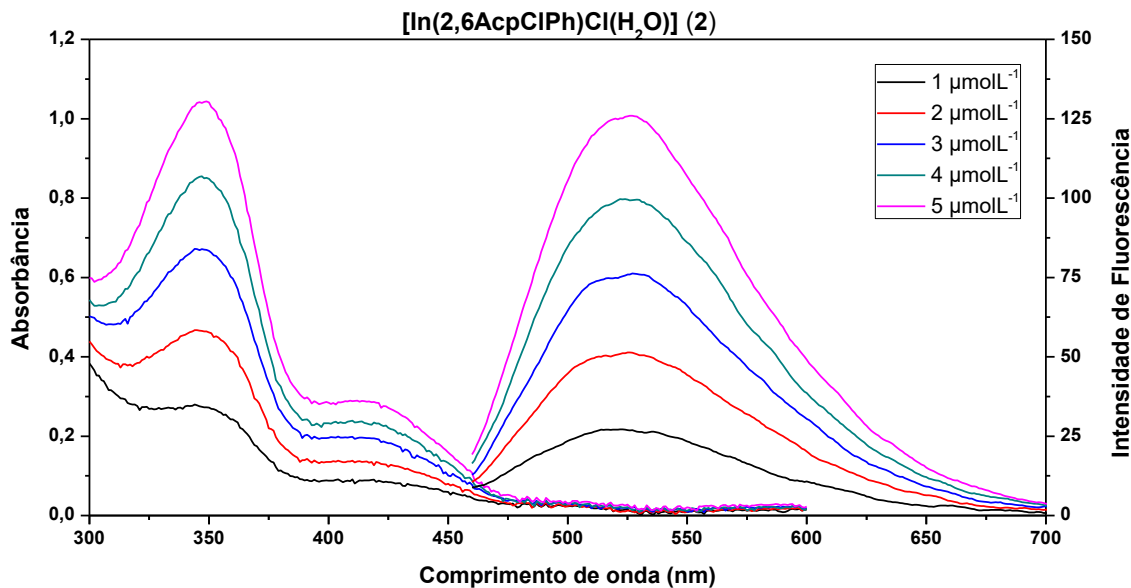


Figura A50. Espectros de excitação e de emissão do complexo $[\text{In}(2,6\text{AcPclPh})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) em DMSO.

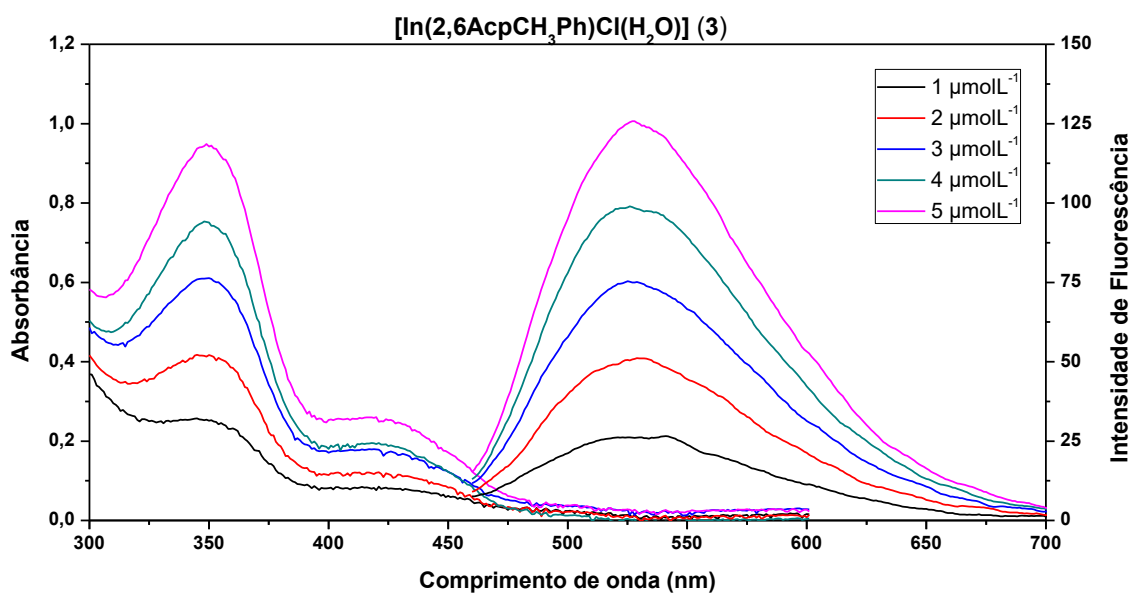


Figura A51. Espectros de excitação e de emissão do complexo [In(2,6AcpCH₃Ph)Cl(H₂O)] (3) em DMSO.

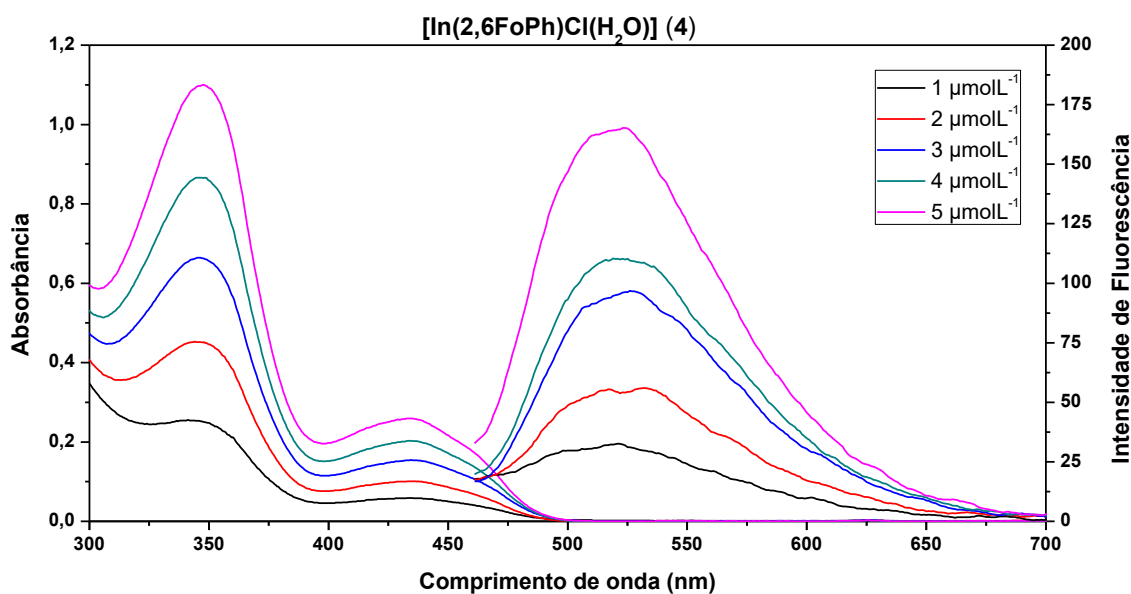


Figura A52. Espectros de excitação e de emissão do complexo [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (4) em DMSO.

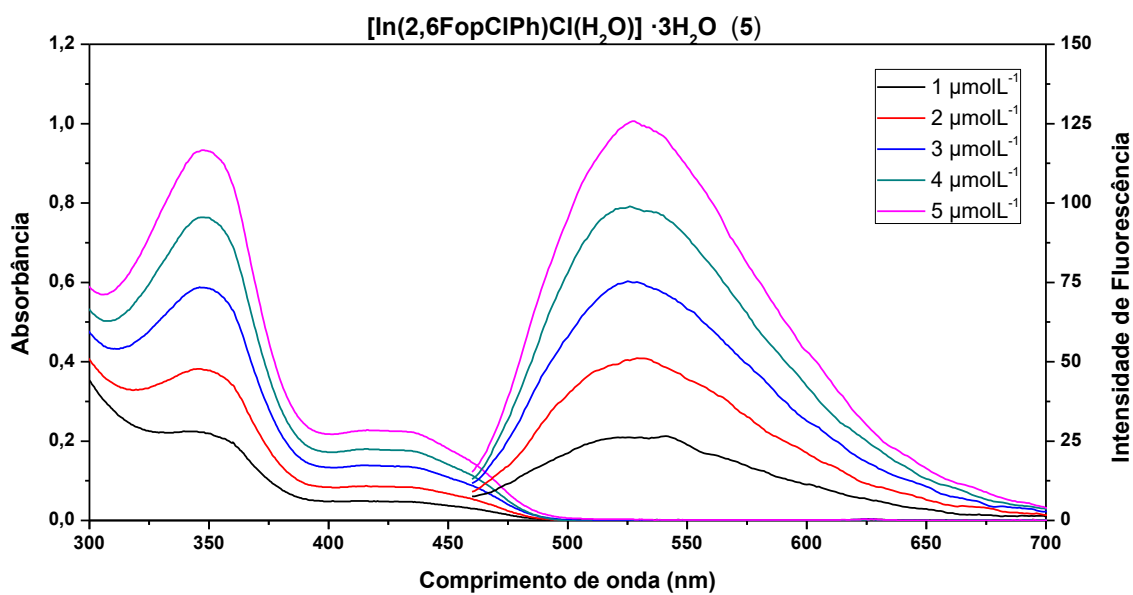


Figura A53. Espectros de excitação e de emissão do complexo
[In(2,6FopClPh)Cl(H₂O)] · 3H₂O (5) em DMSO.

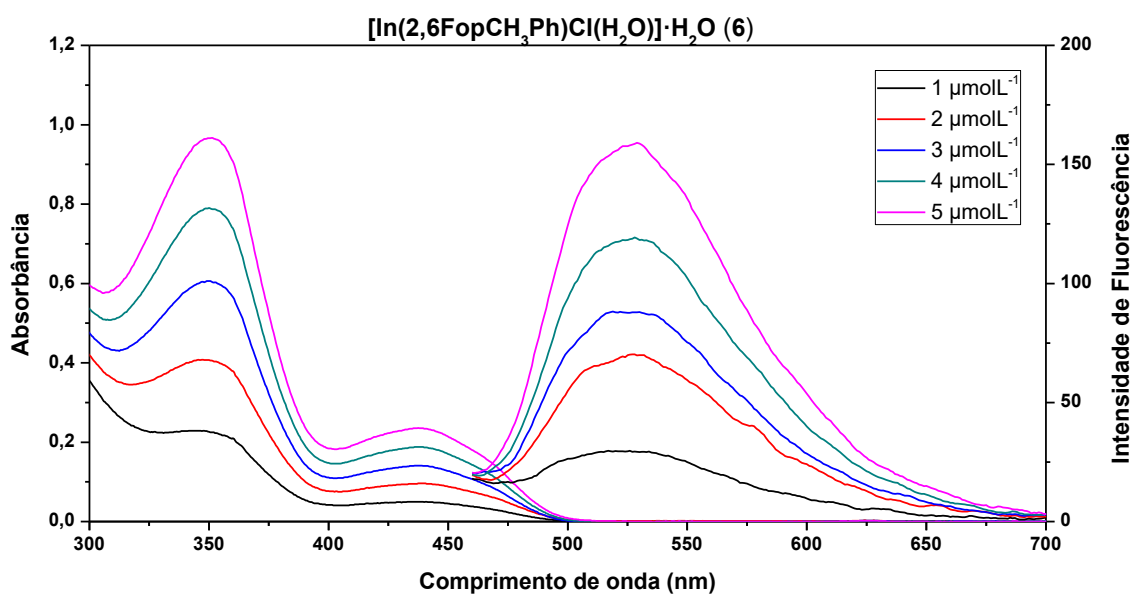
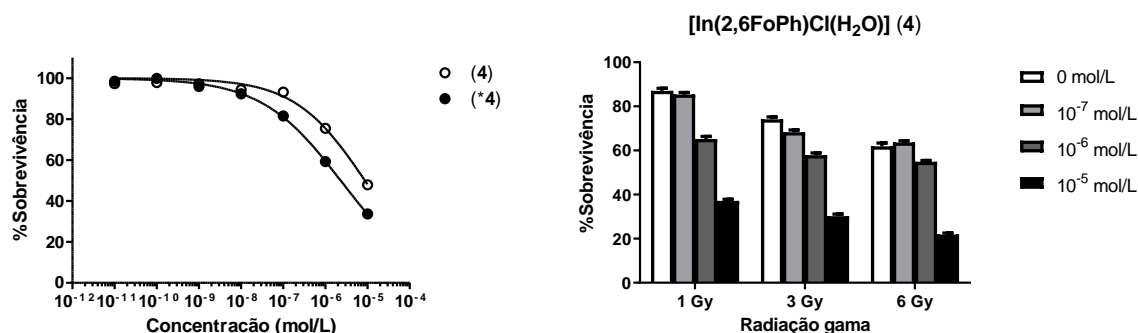


Figura A54. Espectros de excitação e de emissão do complexo
[In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)] · H₂O (6) em DMSO.

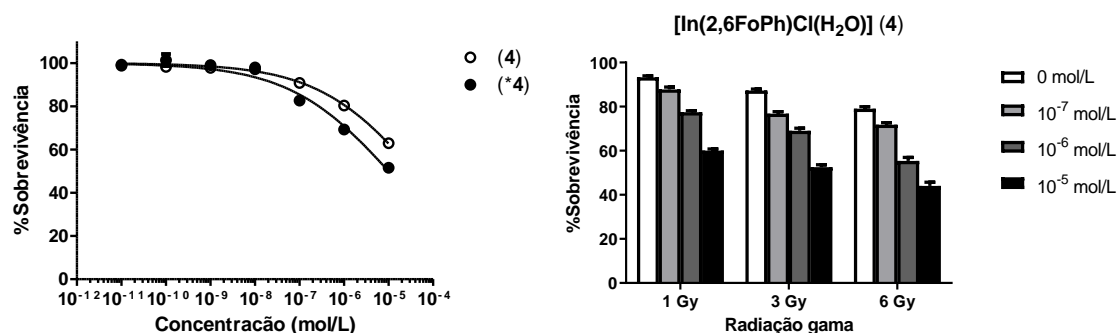
APÊNDICE B

Avaliação das atividades citotóxicas dos complexos de In(III)

MCF-7



MDA-MB-231



MRC-5

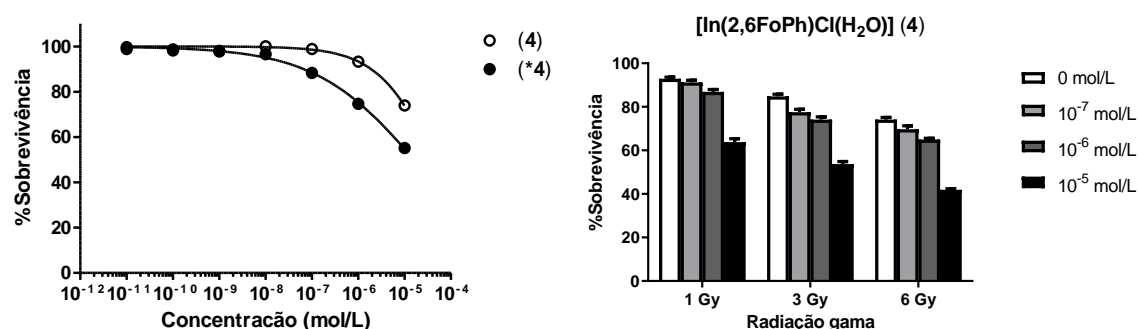
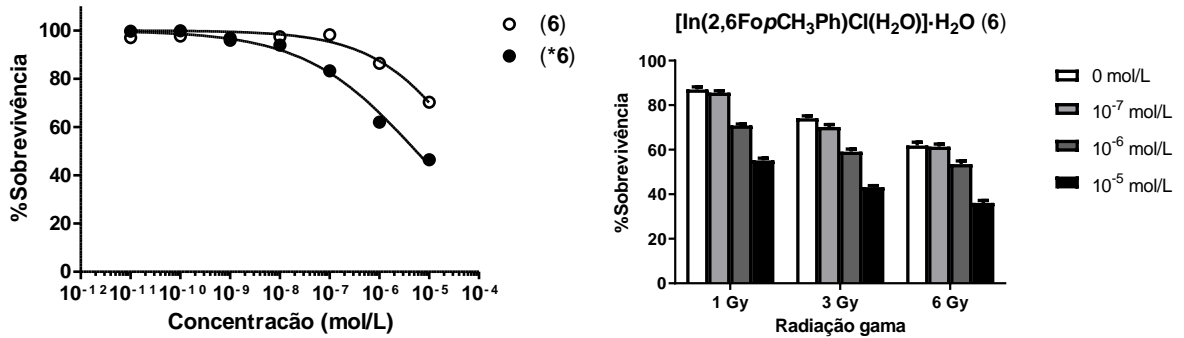
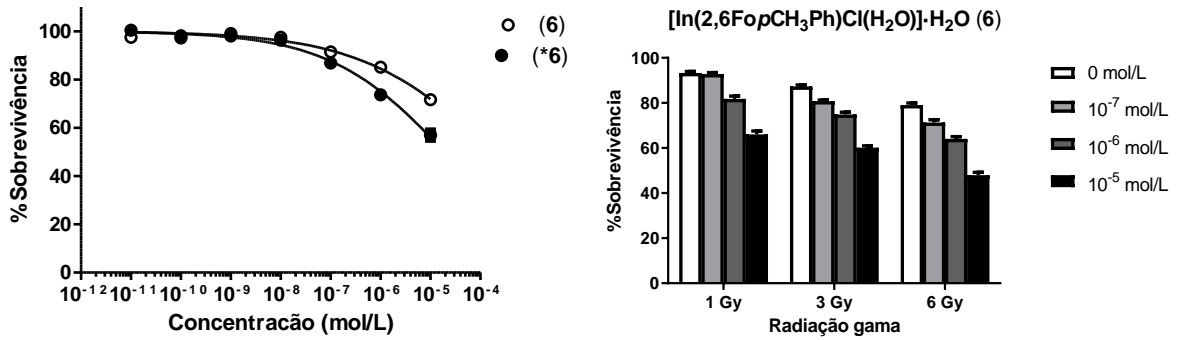


Figura B1. Porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração e doses de radiação do complexo [In(2,6FoPh)Cl(H₂O)] (4). Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC₅₀.

MCF-7



MDA-MB-231



MRC-5

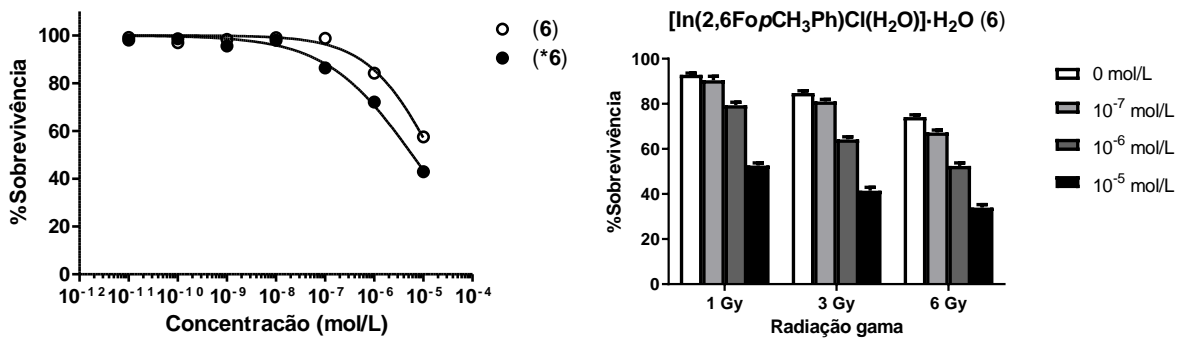
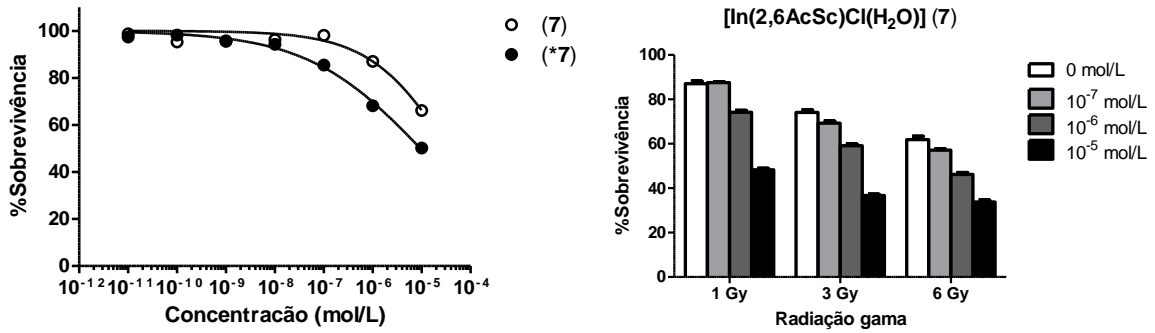
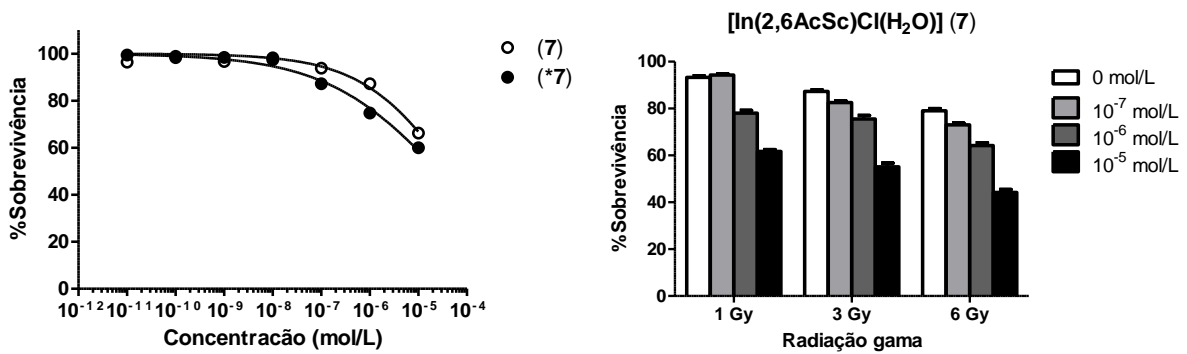


Figura B2. Porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração e doses de radiação do complexo [In(2,6FopCH₃Ph)Cl(H₂O)]·H₂O (6). Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC₅₀.

MCF-7



MDA-MB-231



MRC-5

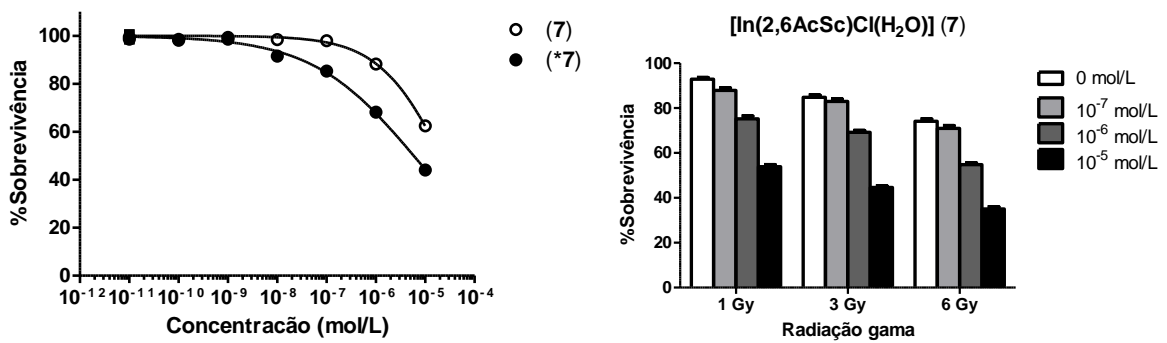
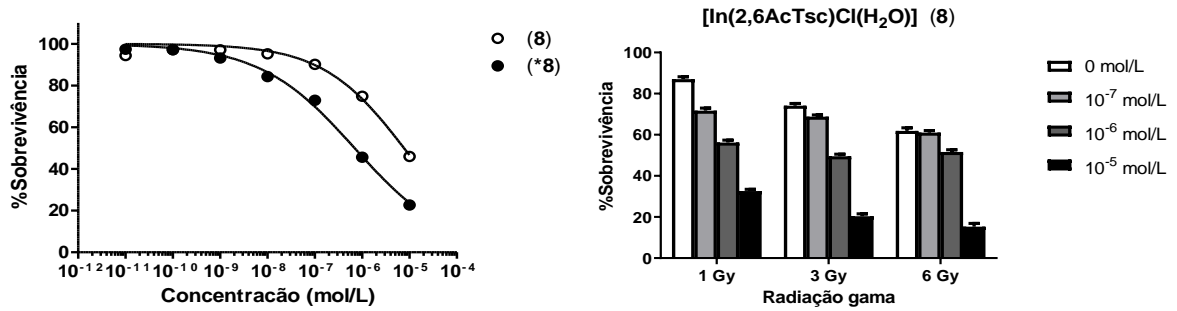
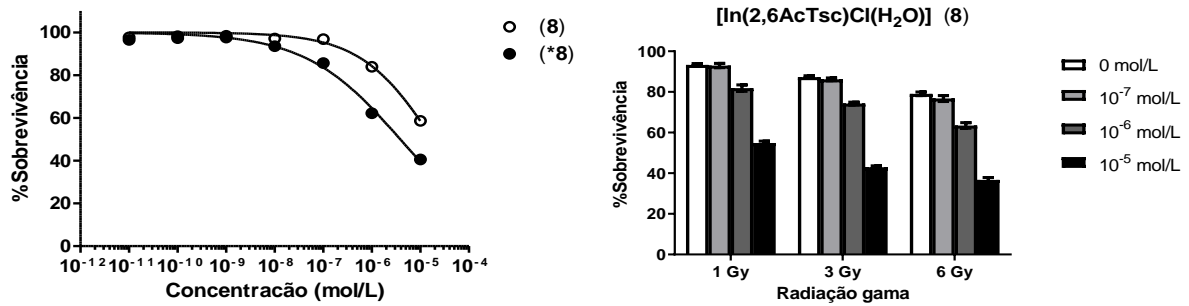


Figura B3. Porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração e doses de radiação do complexo [In(2,6AcSc)Cl(H₂O)] (7). Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC₅₀.

MCF-7



MDA-MB-231



MRC-5

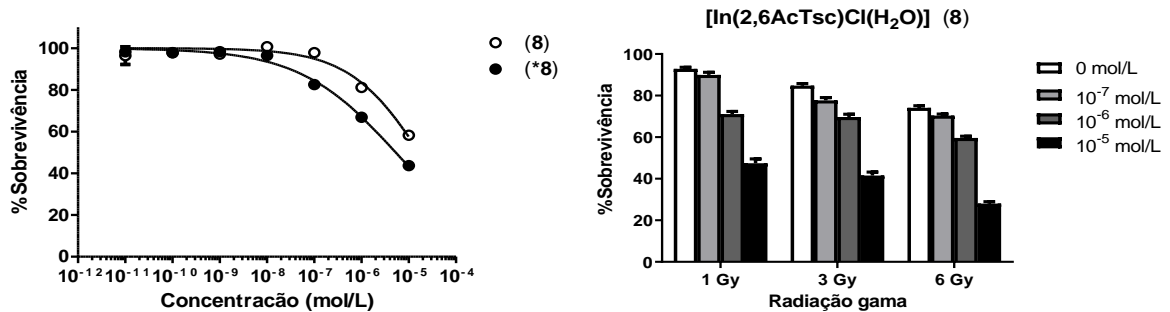


Figura B4. Porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração e doses de radiação do complexo [In(2,6AcTsc)Cl(H₂O)] (8). Pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias o ajuste teórico da curva Concentração-Resposta para determinação do valor de IC₅₀.

APÊNDICE C

Rejeitos Radioativos

Os rejeitos gerados, sólidos (compactáveis e não compactáveis) e líquidos, foram separados e armazenados em sacos plásticos, lixeiras blindadas e bombonas de polipropileno e isolados até o decaimento abaixo dos níveis de dispensa recomendado na norma CNEN NE 8.01. Pela norma o Nível de dispensa de rejeitos líquidos para o radionuclídeo Índio-114m é de $9,3 \times 10^4$ (Bq/m³).

Dos rejeitos líquidos gerados, alíquotas de 50µL foram medidas por espectrometria gama (NaI), e posteriormente foi calculado o tempo de decaimento necessário para que o rejeito esteja abaixo dos níveis de dispensa recomendado na norma.

Amostras	Alíquota L	Bq em 50uL	Estoque (Bq/L)	Estoque (Bq/m ³)	volume L	Bq	Dias necessários para decair abaixo do nível de dispensa
*InCl ₃	5E-05	218,459	4,37E+06	4,37E+09	0,0010	4,37E+03	776
(*4)	5E-05	259,532	5,19E+06	5,19E+09	0,0010	5,19E+03	788
(*6)	5E-05	310,477	6,21E+06	6,21E+09	0,0010	6,21E+03	801
(*7)	5E-05	260,136	5,20E+06	5,20E+09	0,0010	5,20E+03	788
(*8)	5E-05	275,177	5,50E+06	5,50E+09	0,0010	5,50E+03	792
*InCl ₃	5E-05	166,794	3,34E+06	3,34E+09	0,0010	3,34E+03	756
(*4)	5E-05	195,508	3,91E+06	3,91E+09	0,0010	3,91E+03	768
(*6)	5E-05	223,357	4,47E+06	4,47E+09	0,0010	4,47E+03	777
(*7)	5E-05	176,174	3,52E+06	3,52E+09	0,0010	3,52E+03	760
(*8)	5E-05	208,061	4,16E+06	4,16E+09	0,0010	4,16E+03	772
1	5E-05	5,058	1,01E+05	1,01E+08	0,4500	4,55E+04	504
2	5E-05	4,296	8,59E+04	8,59E+07	0,0800	6,87E+03	492
3	5E-05	7,618	1,52E+05	1,52E+08	0,0100	1,52E+03	534
4	5E-05	1,742	3,48E+04	3,48E+07	0,0100	3,48E+02	427
5	5E-05	1,864	3,73E+04	3,73E+07	0,0015	5,59E+01	432
6	5E-05	3,340	6,68E+04	6,68E+07	0,0015	1,00E+02	474
7	5E-05	8,801	1,76E+05	1,76E+08	0,0020	3,52E+02	544
Bombona	5E-05	2,246	4,49E+04	4,49E+07	2,5000	1,12E+05	445
Total			6,95E+04	6,95E+07	3,0650	2,13E+05	458

Todos os rejeitos líquidos foram adicionados na bombona e serão armazenados por 458 dias. Após esse tempo serão novamente monitorados e se o resultado da medição estiver abaixo do nível de dispensa, indicada pela norma, os rejeitos serão descartados.

Conforme recomendações da CNEN, considera-se que cerca de 10% da atividade radioativa que entrou em contato com os frascos, eppendorf, ponteiras e placa é considerado como resíduo contaminante. Os rejeitos sólidos gerados foram classificados por compactáveis (papel toalha e luvas) e não compactáveis (ponteiras, eppendorf, placas de cultivo e placas de tratamento). Os rejeitos sólidos foram monitorados e foi confirmando que estavam insentos.

CDTN	GUIA DE CONTROLE DE REJEITOS RADIOATIVOS - GUIARR	FIS SEGRE 01 Rev. 05
-------------	--	--------------------------------

Utilize as "SETAS" ou a tecla "TAB" para mudar de campo durante a edição e clique em "F1" para ativar a ajuda do campo

IDENTIFICAÇÃO DO REJEITO: (Consta na etiqueta)

Prédio	BO/CO	Setor Gerador	N° Ordem
28	CO	UR5	2023

SEGRE 05	N° GUIARR (no Banco de dados do Rejeito):	
	Data:	
	Nome:	
	Assinatura:	

IDENTIFICAÇÃO DA INSTALAÇÃO: Unidade de Radiobiologia - UR / Prédio 28 Outra: _____

OPERAÇÃO GERADORA: Escolher um item. Descarte **Outra:** de Amostras Código: _____

Descrição (da operação geradora): meio de cultivo celular

Volume de Rejeito (m³): 3×10^{-3} **Massa de Rejeito (kg):** 3,5 **Rejeito Combustível:** Sim Não

EMBALAGENS UTILIZADAS: **Massa da embalagem vazia (kg):** 0,5 **Volume interno da embalagem (m³):** 5×10^{-3}

Escolher um item. bombona Escolher um item.

Escolher um item. _____ Escolher um item.

PREENCHER SOMENTE PARA REJEITO SÓLIDO:

MATERIAIS COMPACTÁVEIS **MATERIAIS NÃO COMPACTÁVEIS**

Escolher um item. _____ Escolher um item.

Escolher um item. _____ Escolher um item.

Escolher um item. _____ Escolher um item.

PREENCHER SOMENTE PARA REJEITO LÍQUIDO:

Aquosa **Orgânica** **Lama** **Gel** **Outro**

pH: 7,2 **Composição química:** meio de cultivo DMEM

PREENCHER PARA TODOS OS TIPOS DE REJEITO (SÓLIDO EM KBq/kg E LÍQUIDO EM Bq/m³):

Radionuclídeos: Indio - 114m $6,95 \times 10^7$ Bq/m³

Concentração de (): α Estimada Analisada Certificado N°: _____ Data: _____

Atividade: β / γ Estimada Analisada Certificado N°: _____ Data: 05/06/2023

Observações: Medido no espectrometro gama NAT. Radiobiologia

Responsável pela informação e preenchimento (Setor Gerador): Andree Aguiar

Supervisor de Radioproteção da Instalação geradora: _____

Ass.: [Assinatura] **Data:** 12/07/23

CLASSIFICAÇÃO DO REJEITO E MONITORAÇÃO:

Classificação do Rejeito: **Radioativo** **Isento**

Monitoração da superfície dos embalados de rejeito radioativo: **Atinge o nível de dispensa em:** _____

Taxa de contagem **Unidade de Medida:** _____ **Valores medidos no:** _____ **Identificação do monitor:** _____

(no esfregão): () **Rejeito:** _____ **Background (BG):** _____

Monitoração das taxas de dose para os rejeitos sólidos e líquidos:

Taxa de dose: **Unidade de Medida:** _____ **Valores medidos:** _____ **Identificação do monitor:** _____

(): **Na superfície:** _____ **A 1 m de distância:** _____

Observações: Bombona de vidro de 1 litro com 458 dias até 5/09/24 depósito UR sala 12

Autorização para Transporte: **Supervisor da DISER Resp. pela classificação do rejeito:** _____ **Data:** 12/07/23

Sim **Ass.:** [Assinatura] **Membro da DISER Resp. por acompanhar e monitorar os rejeitos durante a coleta e transporte:** _____

Não **Ass.:** _____ **Data:** _____

RECEBIMENTO DO REJEITO:

Observações: _____

Situação do Rejeito: _____ **Técnico do SEGRE responsável pela coleta:** _____

Local de Armazenamento (Prédio): _____ **Ass.:** _____ **Data:** _____

Localização / Bancada: _____

OBS pós recebimento: _____ **GUIARR N°:** _____ **Resp. pela informação:** _____ **Data:** _____

CDTN	GUIA DE CONTROLE DE REJEITOS RADIOATIVOS - GUIARR	FIS SEGRE 01 Rev. 05
-------------	--	---------------------------------

Utilize as "SETAS" ou a tecla "TAB" para mudar de campo durante a edição e clique em "F1" para ativar a ajuda, do campo

IDENTIFICAÇÃO DO REJEITO: (Consta na etiqueta)

Prédio	BO/CO	Setor Gerador	N° Ordem		
28	CO	UR 6	2023		

SEGRE	N° GUIARR (no Banco de dados do Rejeito)	BDR/CDTN
	Data	
	Nome	
	Assinatura	

IDENTIFICAÇÃO DA INSTALAÇÃO: Unidade de Radiobiologia - UR / Prédio 28 Outra: _____

OPERAÇÃO GERADORA: Escolher um item. Outra: _____ Código: _____

Descrição (da operação geradora): Descarte de materiais.

Volume de Rejeito (m³): _____ **Massa de Rejeito (kg):** 0.4 **Rejeito Combustível:** Sim Não

EMBALAGENS UTILIZADAS: **Massa da embalagem vazia (kg):** _____ **Volume interno da embalagem (m³):** _____

Escolher um item. ponteiros, ependorf Escolher um item. _____

Escolher um item. saco plastico. Escolher um item. _____

PREENCHER SOMENTE PARA REJEITO SÓLIDO:

MATERIAIS COMPACTÁVEIS **MATERIAIS NÃO COMPACTÁVEIS**

Escolher um item. _____ Escolher um item. ponteiros

Escolher um item. _____ Escolher um item. ependorf

Escolher um item. _____ Escolher um item. _____

PREENCHER SOMENTE PARA REJEITO LÍQUIDO:

Aquosa Orgânica Lama Gel Outro _____

pH: _____ Composição química: _____

PREENCHER PARA TODOS OS TIPOS DE REJEITO (SÓLIDO EM KBq/kg E LÍQUIDO EM Bq/m³):

Radionuclídeos: I-114m

Concentração de (): α Estimada Analisada Certificado N°: _____ Data: _____

Atividade: (x) β e γ Estimada Analisada Certificado N°: _____ Data: 05/06/2023

Observações: Monitorado no Cronos-Lafis **Responsável pela informação e preenchimento (Setor Gerador):** Andrea Aguiar

0 Bq/g **Supervisor de Radioproteção da Instalação geradora:** _____

Ass.: _____ Data: _____

CLASSIFICAÇÃO DO REJEITO E MONITORAÇÃO:

Classificação do Rejeito: Radioativo Isento

Monitoração da superfície dos embalados de rejeito radioativo: Atinge o nível de dispensa em: _____

Taxa de contagem **Unidade de Medida:** _____ **Valores medidos no:** _____ **Identificação do monitor:** _____

(no estrefação): () Rejeito: _____ Background (BG): _____

Monitoração das taxas de dose para os rejeitos sólidos e líquidos:

Taxa de dose: **Unidade de Medida:** _____ **Valores medidos:** _____ **Identificação do monitor:** _____

(): _____ Na superfície: _____ A 1 m de distância: _____

Observações: Descartado em **Autorização para Transporte:** **Supervisor da DISER Resp. pela classificação do rejeito:** _____

20/7/23 Sim Ass.: [Assinatura] Data: 05/06/23

_____ Não **Membro da DISER Resp. por acompanhar e monitorar os rejeitos durante a coleta e transporte:** _____

Ass.: _____ Data: _____

RECEBIMENTO DO REJEITO:

Observações: _____ **Situação do Rejeito:** _____ **Técnico do SEGRE responsável pela coleta:** _____

_____ **Local de Armazenamento (Prédio):** _____ Ass.: _____ Data: _____

_____ **Localização / Bancada:** _____ Ass.: _____ Data: _____

OBS pós recebimento: _____ **GUIART N°:** _____ **Resp. pela informação:** _____ Data: _____

Referência:
OI SEGRE 01 - Gerência de Rejeitos Radioativos e Fontes Fora de Uso no CDTN
PIS SEGRE 01 - Segregação e Coleta de Rejeitos Líquidos Radioativos
PIS SEGRE 02 - Segregação e Coleta de Rejeitos Sólidos Radioativos
PIO SEGRE 03 - Recebimento de Fontes Fora de Uso e Rejeitos Radioativos Externos
PIO SEGRE 07 - Recebimento de Para-raios e Detectores de Fumaça Radioativos
PIO SEGRE 14 - Atividades Internas Operacionais da Gerência de Rejeitos Radioativos no CDTN e outros



CDTN - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE

Andrea Roxana Aguirre Manga

Participou do **Curso Online de Introdução à Proteção Radiológica**, disponibilizado no site Internet <http://moodle.com.br>, com carga horária de 3 (três) horas.

Pablo Andrade Grossi
Chefe do Serviço de Proteção Radiológica

Belo Horizonte, 10 janeiro 2020.

Getúlio de Azevedo Ramos Junior
Chefe do Serviço de Gestão de Pessoas



CNEN
Comissão Nacional
de Energia Nuclear

Ministério da
**Ciência, Tecnologia
e Inovação**



GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

APÊNDICE E



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE

Andrea Roxana Aguirre Manga

participou do **Curso de Radioproteção para o Preparo, Uso e Manuseio de Fontes Radioativas**, disponibilizado no site moodle.cdtm.br, com carga horária de 40 (quarenta) horas.

Belo Horizonte, 16 agosto 2022.

Pablo Andrade Grossi

Chefe da Divisão da Segurança Nuclear e Radiologia

Carga-horária: 40

Maximiliano Delany Martins

Chefe da Divisão de Formação Especializada



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES



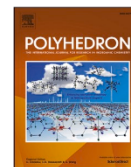
APÊNDICE F

Polyhedron 228 (2022) 116159



Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/polyStructural and spectral studies on indium(III) complexes with 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazones)

Andrea R. Aguirre, Renata Diniz, Tiago A.S. Brandão, Heloisa Beraldo*

Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31.270-901, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

indium(III) complexes
bis(benzoylhydrazones)
crystal structures
spectral properties
luminescence

ABSTRACT

Complexes [In(L1)Cl(H₂O)] (1), [In(L2)Cl(H₂O)] (2) and [In(L3)Cl(H₂O)] (3) were obtained with 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazone) (H₂L1) and its 2,6-diacetylpyridine *bis*(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H₂L2) and 2,6-diacetylpyridine *bis*(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H₂L3) derivatives. The crystal structures of complexes (1) and (2) were determined, revealing a pentagonal bipyramidal arrangement around the indium(III) center. The spectral properties of complexes (1–3) were investigated. The complexes show fluorescence in DMSO solution resulting from increased conjugation and rigidity of the ligand, and a significant fluorescence brightness due to the strong light absorption in the near UV region. From the fluorescence spectra of 1–3 quantum yields in the 0.5 – 0.7 % range were determined using quinine hemisulfate monohydrate in H₂SO₄ 0.5 M ($\Phi_F = 0.546$) as standard.

1. Introduction

Thiosemicarbazones [1,2], *bis*(thiosemicarbazones), hydrazones [3,4] and *bis*(hydrazones) and their metal complexes are versatile Schiff base-derived compounds which exhibit a wide range of bioactivities [5]. Indium(III) complexes with thiosemicarbazones proved to present antimicrobial properties and to be cytotoxic to human leukemia and solid tumor cells [6,7]. We demonstrated that upon neutron activation of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine thiosemicarbazones the ^{114m}In(III) analogues were produced and that these complexes were highly cytotoxic to MCF-7 breast cancer cells [8].

Radiometal complexes with thiosemicarbazones and *bis*(thiosemicarbazones) have been investigated for their applications in diagnostic and therapeutic nuclear medicine. ⁶⁴Cu(ATSM), H₂ATSM = diacetyl-*bis*(*N*4-methylthiosemicarbazone) acts as a hypoxia-selective PET imaging agent. Metal complexes with *mono*- and *bis*(thiosemicarbazones) have also been synthesized with ^{67/68}Ga, ^{111/114m}In and ^{99m}Tc. Some of these compounds revealed to be promising as potential radiopharmaceuticals with applications in diagnosis and therapy [9].

In previous works by some of us we demonstrated that a family of 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazones) were inactive against several bacterial and fungi strains and were poorly cytotoxic to leukemia and solid tumor cells. However, upon coordination to antimony(III) and

bismuth(III) the antimicrobial effects were observed as well as the cytotoxic activity [10]. Similarly, upon coordination of these *bis*(benzoylhydrazones) to silver(I) potent antimicrobial activity was verified [11].

In the present work indium(III) complexes were obtained with 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazone) (H₂L1) and its 2,6-diacetylpyridine *bis*(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H₂L2) and 2,6-diacetylpyridine *bis*(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H₂L3) derivatives (Fig. 1) aiming to evaluate their bioactivities. Studies on the applicability of radioactive *bis*(hydrazones) complexes with ¹¹¹In(III) and ^{114m}In(III) in nuclear medicine would also be of utmost relevance considering that complexes of ¹¹¹In(III) with a variety of ligands have been extensively investigated due to their numerous applications in imaging for Diagnostic Nuclear Medicine [12,13,14,15].

2. Experimental

2.1. Chemistry

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.

* Corresponding author.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).<https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.116159>

Received 12 August 2022; Accepted 29 September 2022

Available online 5 October 2022

0277-5387/© 2022 Published by Elsevier Ltd.

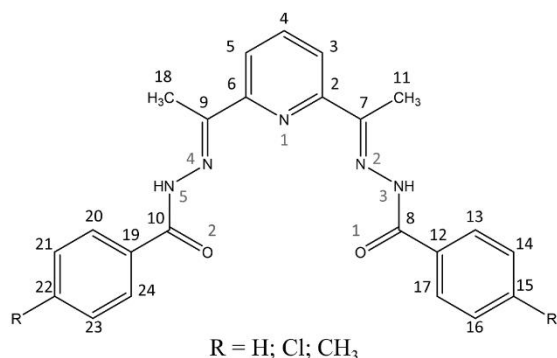


Fig. 1. Structural representation of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) (H₂L1) R = H and its 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H₂L2) R = Cl and 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H₂L3) R = CH₃ derivatives.

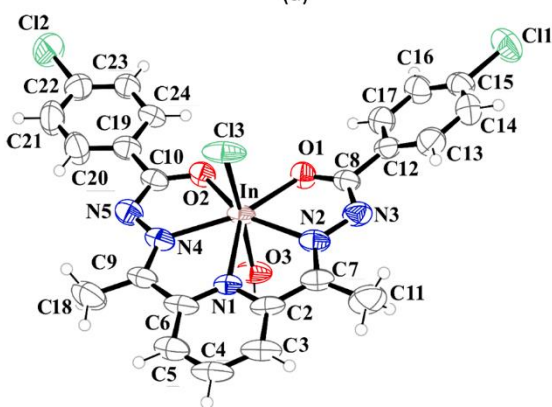
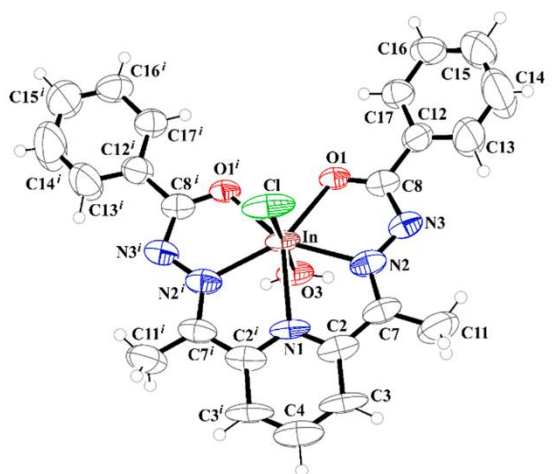


Fig. 2. Molecular plots of a) [In(L1)Cl(H₂O)] (1) and b) [In(L2)Cl(H₂O)] (2) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level. Symmetry code for (1): $i = x, y, 1-z$.

Table 1

Crystal data and structure refinement results for complexes (1) and (2).

Crystal	Crystal (1)	Crystal (2)
Formula	C ₂₃ H ₂₁ ClInN ₅ O ₃	C ₂₃ H ₁₉ Cl ₃ InN ₅ O ₃
MM/g/mol	564.71	634.6
Crystal system	Tetragonal	Monoclinic
Space group	P4 ₂ /mbc	P2 ₁ /c
a/Å	13.5205(2)	14.3293(10)
b/Å	13.5205(2)	13.6261(6)
c/Å	26.1243(13)	13.4033(8)
α/°	90.00	90.00
β/°	90.00	106.229(7)
γ/°	90.00	90.00
V/Å ³	4775.6(3)	2512.7(3)
Temperature/K	298(2)	298(2)
Z	8	4
D _{calc} /g cm ⁻³	1.571	1.677
Crystal size/mm	0.12 × 0.38 × 0.43	0.10 × 0.31 × 0.65
μ(Mo Kα)/cm ⁻¹	1.136	1.295
Measured reflections	47092	10073
R _{int}	0.0931	0.0919
Observed reflections [I _o ² > 2σ(F _o ²)]	3738	5948
Refined parameters	318	318
R _{obs} [F _o > 2σ(F _o)]	0.0843	0.0556
R _{all}	0.1329	0.0993
wR _{obs} [F _o ² > 2σ(F _o ²)]	0.1644	0.1596
wR _{all}	0.1791	0.1785
S	1.194	0.936
RMS/e Å ⁻³	0.126	0.159

2.2. Physical measurements

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Molar conductivity measurements were performed on an YSI model 31 conductivity bridge. Melting points were determined using a Mettler MQAPF-302 apparatus. Thermogravimetric curves were obtained with a Shimadzu-TGA50H thermobalance under dynamic N₂ atmosphere in the 30 °C – 600 °C temperature range at a heating rate of 10 °C min⁻¹.

A Perkin Elmer FT – IR Spectrum GX spectrometer was employed to record infrared spectra (4000–400 cm⁻¹) using KBr plates. NMR spectra were recorded on a Bruker DPX – 400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as solvent. The ¹H resonances were assigned based on chemical shifts, multiplicities and by using 2D homonuclear ¹H–¹H correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH) was determined using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT – 135) experiments and the assignments were made using 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) NMR spectra.

2.3. X-ray crystallography

Crystal data for complexes (1) and (2) were collected in an Oxford-Rigaku Gemini A-Ultra diffractometer at room temperature (298 K) using MoKα radiation (λ = 0.74073 Å). Data collection and reduction, and cell refinement were performed with the CrysAlis software [16]. The crystal structures were solved by the SIR2014 program [17] and refined using SHELX-2018-3 [18]. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters, and H atoms connected to carbon were placed in idealized positions and treated by a rigid model, with U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(C) for aromatic CH and U_{iso}(H) = 1.5U_{eq}(C) for the methyl group. H atoms from the water molecule were obtained directly by difference maps at fixed positions, using U_{iso}(H) = 1.5U_{eq}(O). The measured crystal of complex (2) presented twinning effect. Two components were observed, and the twinning refinement indicates that 29.3 % of X-ray reflections were indexed as component one, 22.0 % as component two, 10.4 % as overlapping reflections and 38.3 % were non-indexed. The figures were drawn using ORTEP-3 for Windows [19], Mercury [20] and ToposPro [21].

Table 2
Selected bond distances and angles in complexes (1) and (2).

Bond distances/Å				
	(1)	(2)	(1)	(2)
In-Cl(3)	2.440(3)	2.446(2)	C7-N2	1.307 (9)
In-O1	2.193(5)	2.165(4)	N2-N3	1.369 (10)
In-O2	–	2.179(4)	C8-N3	1.329 (10)
In-O3	2.275(7)	2.227(4)	C8-O1	1.278 (10)
In-N1	2.315(8)	2.303(4)	C10-N5	–
In-N2	2.275(7)	2.267(6)	N5-N4	–
In-N4	–	2.270(6)	C9-N4	–
			C10-O2	–
				1.323(8)
				1.373(8)
				1.291(8)
				1.301(8)
Bond angles/°				
	(1)	(2)	(1)	(2)
Cl(3)-In-O3	178.5(2)	176.67 (13)	O2-In-N1	–
Cl(3)-In-O1	95.32 (16)	96.43 (14)	O2-In-N2	–
Cl(3)-In-O2	–	95.72 (13)	O2-In-N4	–
Cl(3)-In-N1	96.61 (18)	94.40 (11)	N1-In-N2	69.09 (18)
Cl(3)-In-N2	94.16 (17)	92.90 (15)	N1-In-N4	–
Cl(3)-In-N4	–	92.40 (14)	N2-In- N2'(N4)	138.0 (4)
O3-In-O1	85.8(2)	86.66 (18)	O1-C8-N3	125.9 (8)
O3-In-O2	–	85.71 (18)	C8-N3-N2	108.9 (7)
O3-In-N1	81.9(3)	82.55 (15)	C8-O1-In	116.2 (5)
O3-In-N2	85.31 (18)	82.32 (16)	N3-N2-In	118.4 (5)
O3-In-N4	–	85.26 (19)	N3-N2-C7	120.0 (8)
O1-In- O1'(O2)	82.0(3)	80.70 (16)	O2-C10-N5	–
O1-In-N1	137.17 (15)	138.20 (19)	C10-N5-N4	–
O1-In-N2	69.1(2)	70.53 (18)	N5-N4-C9	–
O1-In- N2'(N4)	150.3(2)	150.00 (19)	N5-N4-In	–
			C10-O2-In	–
				116.5(4)

Symmetry code: *i* x, *y*, 1-*z*.

2.4. Steady-state optical measurements

UV/Vis and fluorescence spectra were recorded on a Cary 60 Bio spectrophotometer and a Cary Eclipse fluorometer, respectively. Quartz cuvettes of 5 cm and 1 cm pathlengths were used to acquire the absorption and emission spectra, respectively. Excitation was at 393 nm using excitation and emission slits of 10 nm, and an average time of 0.1 s. Quantum yields (Φ_x) for complexes (1–3) in DMSO were estimated using Eq. (1). The slope (*m*) was obtained from the plot of the integrated fluorescence intensity vs absorbance and η is the refractive index of the solvent. The standard reference was quinine hemisulfate monohydrate ($\Phi_{st} = 0.546$) [22] in 0.5 M aqueous H₂SO₄.

$$\Phi_x = \Phi_{st}(m_x/m_{st})(\eta_x^2/\eta_{st}^2) \quad (1)$$

2.5. Syntheses of the bis(benzoylhydrazones)

2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) (H₂L1) and its 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H₂L2) and 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H₂L3) derivatives were

prepared as previously described [10,11].

2.6. Syntheses of the indium(III) complexes (1–3)

The indium(III) complexes were obtained by stirring an ethanol solution (15 mL) of the desired bis(benzoylhydrazones) (1.0 mmol) with InCl₃ (1.1 mmol) and triethylamine (2.0 mmol). The reaction mixture was kept under reflux for four hours. The obtained solids were vacuum filtered, washed with ethanol, and then dried under reduced pressure. Crystals of [In(L1)Cl(H₂O)] (1) and [In(L2)Cl(H₂O)] (2) were obtained upon recrystallization of the compounds in ethanol.

2.6.1. [In(L1)Cl(H₂O)] (1)

Yellow solid. Anal. Calc. for C₂₃H₂₁N₅ClInO₃ (FW = 565.73 g mol⁻¹): C, 48.83 %; H, 3.74 %; N, 12.38 %. Found: C, 49.24 %; H, 3.52 %; N, 12.54 %. Thermogravimetry: calculated weight loss of water (30–200 °C range): 3.18 %. Found: 3.40 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 0.53 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(OH) 3448, ν(CN) 1497, ν(CO) 1371. δ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.35 [t, 1H, H4], 8.09 [d, 2H, H3 and H5], 2.68 [s, 6H, H11 and H18], 8.29 [d, 4H, H13, H17, H20 and H24], 7.66–7.44 [m, 6H, H14, H15, H16, H21, H22 and H23]. δ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 145.9 (C2 and C6), 123.1 (C3 and C5), 143.1 (C4), 146.9 (C7 and C9), 171.2 (C8 and C10), 12.8 (C11 and C18), 135.7 (C12 and C19), 128.1 (C13, C17, C20 and C24), 128.0 (C14, C16, C21 and C23), 131.1 (C15 and C22). Melting point: >300 °C. Yield: 78 %.

2.6.2. [In(L2)Cl(H₂O)] (2)

Yellow solid. Anal. Calc. for C₂₃H₁₉N₅Cl₃InO₃ (FW = 634.62 g mol⁻¹): C, 43.53 %; H, 3.02 %; N, 11.04 %. Found: C, 44.08 %; H, 2.92 %; N, 11.19 %. Thermogravimetry: calculated weight loss of water (30–200 °C range): 2.84 %. Found: 2.92 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 2.80 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(OH) 3436, ν(CN) 1493, ν(CO) 1370. δ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.35 [t, 1H, H4], 8.10 [d, 2H, H3 and H5], 2.68 [s, 6H, H11 and H18], 8.28 [d, 4H, H13, H17, H20 and H24], 7.59 [d, 4H, H14, H16, H21 and H23]. δ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 146.6 (C2 and C6), 123.4 (C3 and C5), 143.2 (C4), 146.8 (C7 and C9), 170.3 (C8 and C10), 12.8 (C11 and C18), 135.9 (C12 and C19), 129.7 (C13, C17, C20 and C24), 128.3 (C14, C16, C21 and C23), 134.5 (C15 and C22). Melting point: >300 °C. Yield: 86 %.

2.6.3. [In(L3)Cl(H₂O)] (3)

Yellow solid. Anal. Calc. for C₂₅H₂₅N₅ClInO₃ (FW = 593.78 g mol⁻¹): C, 50.57 %; H, 4.24 %; N, 11.79 %. Found: C, 50.60 %; H, 4.30 %; N, 11.90 %. Thermogravimetry: calculated weight loss of water (30–200 °C range): 3.03 %. Found: 2.95 %. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 1.74 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(OH) 3433, ν(CN) 1492, ν(CO) 1372. δ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8.32 [t, 1H, H4], 8.05 [d, 2H, H3 and H5], 2.69 [s, 6H, H11 and H18], 8.18 [d, 4H, H13, H17, H20 and H24], 7.33 [d, 4H, H14, H16, H21 and H23], 2.41 [s, 6H, H25 and H26]. δ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 145.3 (C2 and C6), 122.9 (C3 and C5), 143.0 (C4), 147.0 (C7 and C9), 171.2 (C8 and C10), 12.7 (C11 and C18), 141.0 (C12 and C19), 128.7 (C13, C17, C20 and C24), 128.0 (C14, C16, C21 and C23), 132.9 (C15 and C22), 21.2 (C25 and C26). Melting point: >300 °C. Yield: 85 %.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of [In(L1)Cl(H₂O)] (1), [In(L2)Cl(H₂O)] (2) and [In(L3)Cl(H₂O)] (3), in which a dianionic bis(benzoylhydrazone) and a chloride ion are attached to the metal center together with a coordination water molecule, as confirmed by the thermogravimetric curves of 1–3 and the crystal structures of complexes (1) and (2). Coordination water might

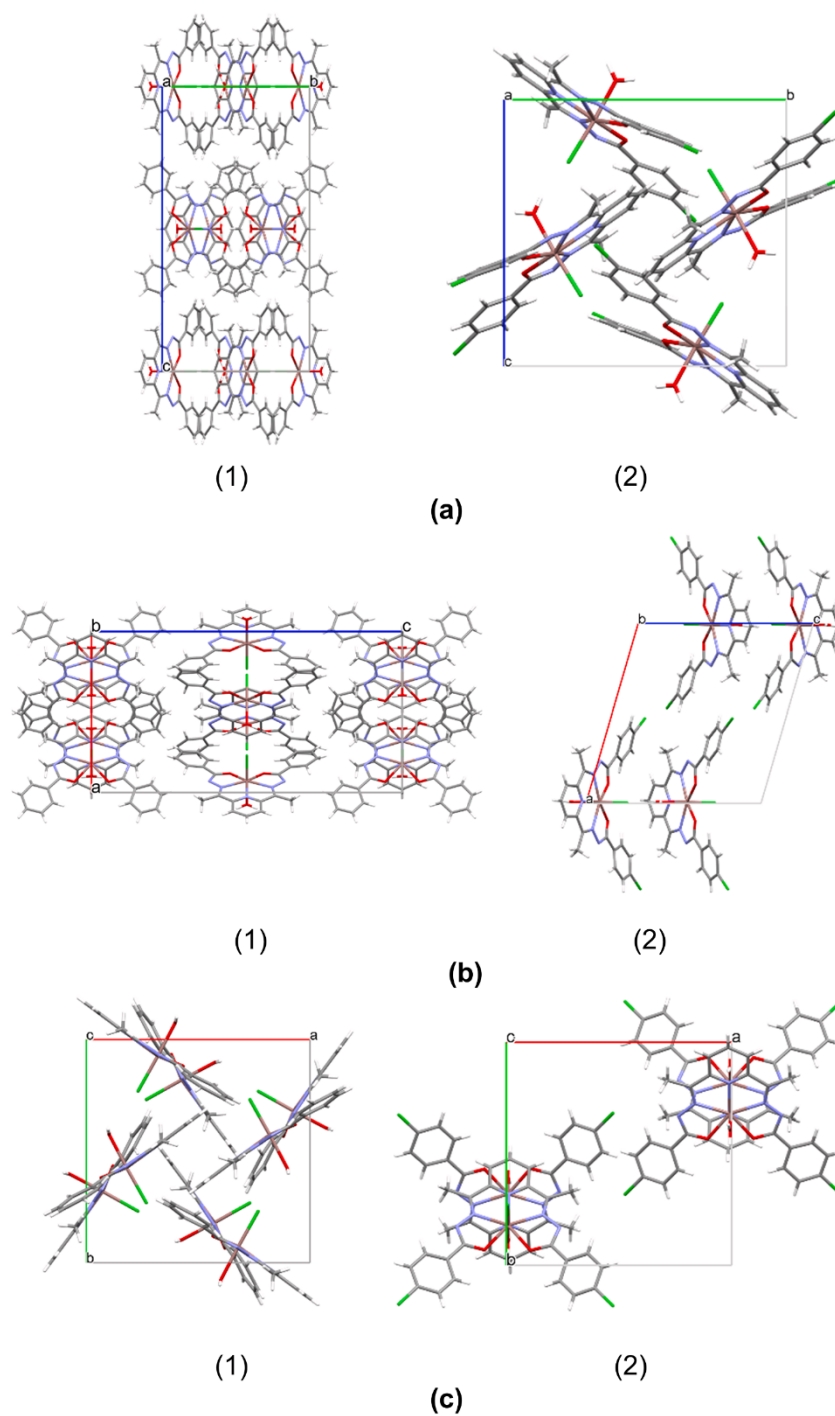


Fig. 3.1. Unit cell in the crystal structures of complexes (1) and (2) along the *a*, *b* and *c* axes.

have arisen from the solvent or from highly hygroscopic InCl_3 .

3.2. Spectroscopic characterization

The signals of N3-H and N5-H observed in the ^1H NMR spectra of the uncomplexed bis(benzoylhydrazones) are absent in the spectra of 1–3,

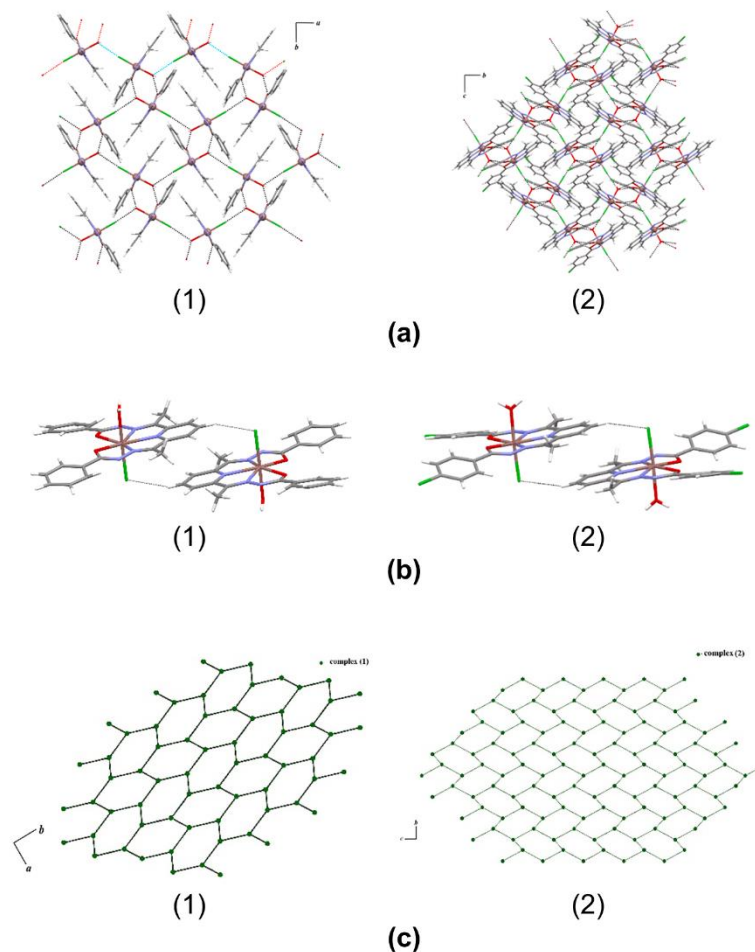


Fig. 3.2. a) OH...O and OH...Cl hydrogen bonds, b) CH...Cl non-conventional hydrogen bonds and c) hydrogen bonds simplified nets in the crystal packing of complexes (1) and (2).

according to the coordination of a dianionic ligand in 1–3. In addition, the signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free *bis*(benzoylhydrazones). The signals of the pyridine carbons, C=O and C=N in the ^{13}C NMR spectra of complexes (1–3) exhibit significant shifts in relation to their positions in the uncomplexed *bis*(benzoylhydrazones), according to coordination through the O–N–N_{py}–N–O pentadentate chelating system (See Figs. S1–S12, Supplementary Information).

In the infrared spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) the vibrations attributed to $\nu(\text{N3-H})$ and $\nu(\text{N5-H})$ were observed at $3280\text{--}3202\text{ cm}^{-1}$. These vibrations disappear in the spectra of complexes (1–3), indicating the coordination of dianionic ligands. The $\nu(\text{C=N})$ vibration at $1537\text{--}1526\text{ cm}^{-1}$ in the infrared spectra of the free ligands shifts to $1497\text{--}1492\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of complexes (1–3), according to coordination through the imine nitrogen. The $\nu(\text{C=O})$ absorption observed at $1672\text{--}1654\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of the free *bis*(hydrazones) shifts to $1372\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of complexes (1–3), indicating coordination through the oxygen. Additionally, the presence of coordination water was corroborated by the existence of the $\nu(\text{O-H})$ vibrational mode at $3448\text{--}3433\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of the complexes (See Figs. S13–S15, Supplementary Information).

3.3. X-ray crystallography

Single crystals of $[\text{In}(\text{L1})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (1) and $[\text{In}(\text{L2})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]$ (2) were obtained by slow evaporation of an ethanol solution at room temperature. The molecular plots of complexes (1) and (2) are shown in Fig. 2. As can be noted, the crystal structures are very similar. Table 1 contains crystal data and refinement results and Table 2 reports selected bond distances and angles for both complexes.

In both crystal structures one *bis*(hydrazone) ligand is attached to the indium(III) center through the O–N–N_{py}–N–O chelating system together with a chloride ion and a water molecule, forming a pentagonal bipyramidal arrangement as shown in Fig. S27, Supplementary Information.

The angles between the aromatic rings in the *bis*(hydrazone) ligand are $19.1(4)^\circ$ and $28.9(2)^\circ$ (between the two chlorophenyl rings) for (1) and (2), respectively, and the angles between the pyridyl ring and the chlorophenyl rings containing Cl1 and Cl2, respectively, are $12.0(4)^\circ$ in (1), and $23.7(2)^\circ$ and $12.7(3)^\circ$ in (2). Fig. 3.1 shows the unit cell along the *a*, *b* and *c* axes for both complexes.

Both solids are stabilized by OH...O and OH...Cl hydrogen bonds (see Table S1, Supplementary Information) between water molecules and O and Cl atoms from the *bis*(hydrazone) ligand. These hydrogen bonds

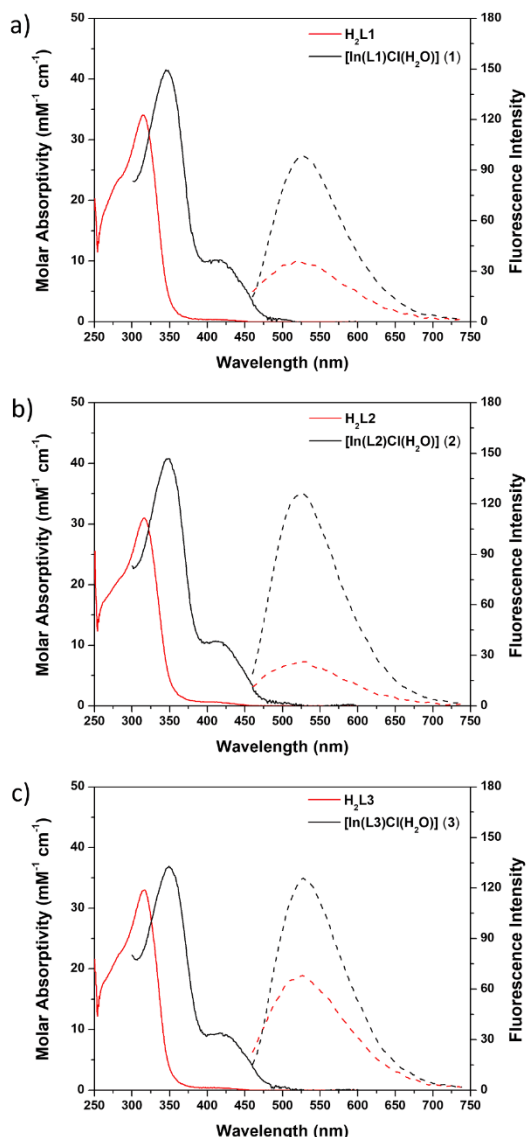


Fig. 4. Absorption (solid line) and emission (broken line) spectra in DMSO at 25 °C for complexes and the corresponding ligands. Black lines correspond to the spectra of a) [In(L1)Cl(H₂O)] (1), b) [In(L2)Cl(H₂O)] (2), and c) [In(L3)Cl(H₂O)] (3) whereas the spectra of the corresponding ligands H₂L1, H₂L2 and H₂L3 are shown in red.

form a bidimensional (2D) network along the *ab* (complex (1)) and *bc* (complex (2)) planes (Fig. 3.2a). The O3...Cl3 bond distance is 3.167(9) Å and 3.127(4) Å for (1) and (2), respectively. The O3...O1 bond distance is 2.776(9) Å in (1), and O3...O1 and O3...O2 bond distances in (2) are 2.913(6) and 2.758(6) Å, respectively. Non-conventional CH...Cl hydrogen bonds form a dimer (Fig. 3.2b) with C...Cl bond distance of 3.603(14) and 3.656(7) Å for (1) and (2), respectively. No π interactions were observed in the crystal packing of the compounds. The geometrical parameters for the hydrogen bonds are listed in Table S1, Supplementary Information. Considering the hydrogen bonds as valence interactions, and selecting the molecule as a node, the 2D-networks were simplified using the ToposPro program [21]. For both compounds the

Table 3

Maximum absorption and emission wavelengths, and quantum yields (Φ) for complexes [In(L1)Cl(H₂O)] (1), [In(L2)Cl(H₂O)] (2), and [In(L3)Cl(H₂O)] (3) in DMSO at 25 °C.

Complex	λ_{\max} (abs) (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ²)	λ_{\max} (em) ^a (nm)	Φ (%)
(1)	346	41,330	525	0.54
	412	10,180		
(2)	348	40,770	526	0.64
	411	10,650		
(3)	349	36,920	528	0.70
	418	9,390		

^a Excitation at 393 nm.

simplified nets (Fig. 3.2c) are similar and should be classified as uninoctal, (3)-connected systems, which can be described by the [6²] point symbol, the net being of *hcb* type with *p6mm* symmetry [23].

3.4. Absorption and fluorescence studies

3.4.1. Absorption and fluorescence spectra

The absorption and fluorescence spectra of the bis(hydrazone) ligands and their indium(III) complexes in DMSO are depicted in Fig. 4. Key spectroscopic parameters are provided in Table 3. The absorption spectra of the ligands show intense bands typical of $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions centered at 315 nm. Complexation with indium(III) along with deprotonation is accompanied by hyperchromic and bathochromic shifts of the absorption maxima (λ_{\max}) to about 350 nm, which is greater than the absorption maximum of the zinc(II) complex with H₂L1 (λ_{\max} = 330 nm) reported previously in the literature [24]. Complexation is also accompanied by the appearance of a new strong absorption band at 425 nm. A similar behavior had been observed for the zinc(II) complex with H₂L1 (λ_{\max} ca. 400 nm) [24]. The ligands spectra show weak absorption tails (refer to 375–450 nm) in these regions.

The emission spectra following excitation at 393 nm were recorded in DMSO at room temperature using the same settings for the ligands and indium(III) complexes (Fig. 4). The emission maxima of the complexes are similar (525–528 nm) and were observed in the same region of emission as that of the ligands. The most considerable difference in relation to the ligands resides in the greater fluorescence emission of the complexes. Taken together with the low absorptivity of the ligands, the result is a strong fluorescence brightness of the complexes, which is appealing as observed in Fig. 5 for the exposure of the DMSO solutions of the ligands and complexes to a regular ~ 365 nm UV-A lamp.

These findings are consistent with increased conjugation and rigidity of the ligands in the complexes, resulting in significant luminescence. Strong evidence for this conclusion is the observation of similar emission bands for complexes and ligands with higher intensities for the complexes, due to excitation of more intense absorption bands. Excitation spectra for complexes and ligands provide comparable maximum wavelengths for emission at 525 nm (Fig. S16, Supplementary Information). However, in the complexes a more suitable ligand conformation for $S_1 \rightarrow S_0$ transitions associated with fluorescence prevails.

Table 3 reports the quantum yields (Φ) of complexes (1–3) in DMSO using quinine hemisulfate monohydrate ($\Phi = 0.546$) in 0.5 M H₂SO₄ as standard [22]. Absorption and emission spectra are in Figs. S17–S20 (Supplementary Information). The plots of integrated fluorescence intensity vs absorbance used to estimate the slope (*m*) in Eq. (1) are in Figs. S21–S24 (Supplementary Information).

The quantum yields for the indium(III) complexes reported herein are between 0.54 and 0.70 % (Table 3), which, although being small, afford significant fluorescence brightness due to the strong light absorption in the near UV region. These complexes provide new examples of compounds derived from 2,6-diacetylpyridine with broad emission from 450 nm to 700 nm. A zinc(II) complex with 2,6-diacetylpyridine bis (benzoylhydrazone), H₂L1, showed fluorescence emission in the

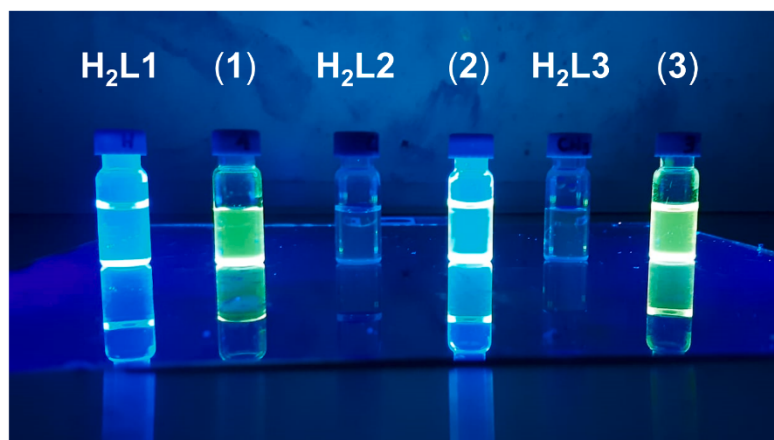


Fig. 5. Emission behavior of 2 mmol L⁻¹ solutions of the bis(hydrazone) ligands and complexes (1–3) in DMSO under a benchtop ~365 nm UV-A lamp apparatus.

400–550 nm range and quantum yield of about 0.5 % in DMF [24].

The present work adds to the few number of reports about luminescent indium(III) complexes. The complexes under study notably exhibit broader emission patterns than those observed for other indium(III) complexes with related ligands. For instance, indium(III) complexes with 1,8-naphthyl-derived bis(thiosemicarbazones) exhibit emission in the 475–600 nm range and quantum yields of about 0.25 % in DMSO [25]. Indium(III) complexes with N₂O₂ or N₂O₄ dipyrin-based ligands show emission in the 600–750 nm range and quantum yields from 1.5 to 67 % [26]. An indium(III) complex with tris(dipyrrinato) shows emission in the 550–700 nm range with quantum yield of 0.41 in toluene [27].

3.4.2. Long-term stability of absorption and fluorescence spectral properties

The electronic spectra of complexes (1–3) at 5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ were recorded as a function of time in DMSO solution as well as in Tris-HCl buffer (NaCl 50 mmol L⁻¹/Tris-HCl 5 mmol L⁻¹, pH 7.2) 5 % DMSO. The spectra of the bis(benzoylhydrazones) in DMSO show an absorption at 314–315 nm. The spectra of 1–3 exhibit a maximum at 346–349 nm and a shoulder at 425–430 nm. These spectra do not alter with time up to 48 h after dissolution.

The long-term fluorescence emission of complexes (1–3) was monitored in DMSO with time and at different temperatures. The emission spectra, formally more sensitive to structural changes than the absorption spectra, show broad bands centered at 522–530 nm under excitation at 393 nm. The emission intensities show minor changes after two months in DMSO (Fig. S25, Supplementary Information), while incubation at up to 60 °C is accompanied by the expected quenching of fluorescence under the same temperature, yet with complete restoration upon cooling to room temperature (Fig. S26, Supplementary Information). Overall, these data are consistent with the long-term stability of the spectral properties in DMSO.

Unfortunately, dilution of DMSO solutions in aqueous buffer (Tris-HCl 5 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, pH 7.2) up to 5 % DMSO (5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ of the complexes) is accompanied by precipitation after 20 min, precluding the evaluation of the long-term spectral properties and ultimately the bioactivities of these complexes in aqueous media.

4. Conclusions

Reaction of indium chloride with the 2,6-diacetylpyridine-derived bis(benzoylhydrazones) (H₂L1–H₂L3) in ethanol in the presence of triethylamine lead to the formation of [In(L)Cl(H₂O)] complexes. The complexes show fluorescence in DMSO solution resulting from increased

conjugation and rigidity of the ligand, and a significant fluorescence brightness due to strong light absorption in the near UV region. The complexes under study were unsuitable to undergo biological assays aiming to investigate their pharmacological profile because of their low water solubility. However, these compounds constitute a valuable platform for the design of novel fluorescent complexes with bis(hydrazones) derivatives presenting improved solubility in aqueous media which might have applications in nuclear medicine.

CRediT authorship contribution statement

Andrea R. Aguirre: Investigation, Data curation, Formal analysis. **Renata Diniz:** Investigation, Formal analysis. **Tiago A.S. Brandão:** Formal analysis, Investigation, Data curation. **Helôisa Beraldo:** Conceptualization, Formal analysis, Project administration, Resources, Supervision.

Declaration of Competing Interest

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

Data availability

Experimental data are in Supplementary Information

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge CNPq, CAPES, INCT-Catalysis and FAPEMIG for financial support and students' grants.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.116159>.

References

- [1] H. Beraldo, D. Gambino, The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes, Mini-Reviews, Med. Chem. 4 (2005) 31–39, <https://doi.org/10.2174/1389557043487484>.
- [2] J. Shim, N.R. Jyothi, N.A.M. Farook, Biological Applications of Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes, Asian J. Chem. 25 (2013) 5838–5840, <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.OH105>.

- [3] G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman, M. Akhtar, M.R. Ali, M.M. Alam, A review exploring biological activities of hydrazones, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 6 (2014) 69–80, <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129170>.
- [4] P. Świątek, J. Sączko, N. Rembialkowska, J. Kulbacka, Synthesis of New Hydrazone Derivatives and Evaluation of their Efficacy as Proliferation Inhibitors in Human Cancer Cells, *Med. Chem. (Los Angeles)*. 15 (2019) 903–910, <https://doi.org/10.2174/1573406415666190128100524>.
- [5] H. Beraldo, The Role of Metal Coordination in the Antineoplastic Effects of Schiff-Base-Derived Compounds, *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.* (2021) 1–18, <https://doi.org/10.1002/9781119951438.EIBC2790>.
- [6] A.A. Oliveira, G.M.C. Perdigão, L.E. Rodrigues, J.G. Da Silva, E.M. Souza-Fagundes, J.A. Takahashi, W.R. Rocha, H. Beraldo, Cytotoxic and antimicrobial effects of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones, *Dalton Trans.* 46 (2017) 918–932, <https://doi.org/10.1039/c6dt03657k>.
- [7] A.R. Aguirre, G.L. Parrilha, R. Diniz, B.C. Ribeiro, R.G.D. Santos, H. Beraldo, Cytotoxic effects of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-N(4)-ortho-fluorophenylthiosemicarbazone and their radioactive 114m In analogues against human glioma cells, *Polyhedron*. 164 (2019) 219–227, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.02.055>.
- [8] A.A. Oliveira, L.L. Franco, R.G. Dos Santos, G.M.C. Perdigão, J.G. Da Silva, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Neutron activation of In(III) complexes with thiosemicarbazones leads to the production of potential radiopharmaceuticals for the treatment of breast cancer, *New J. Chem.* 41 (2017) 9041–9050, <https://doi.org/10.1039/c7nj01547j>.
- [9] G.L. Parrilha, R.G. dos Santos, H. Beraldo, Applications of radiocomplexes with thiosemicarbazones and bis(thiosemicarbazones) in diagnostic and therapeutic nuclear medicine, *Coord. Chem. Rev.* 458 (2022), 214418, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214418>.
- [10] K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. Da Silva, L.F. De Miranda, C.F.D. Romeiro, E. M. Souza-Fagundes, I.C. Mendes, H. Beraldo, Investigation on the pharmacological profile of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) derivatives and their antimony(III) and bismuth(III) complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 53 (2012) 98–106, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.040>.
- [11] A.F. Santos, I.P. Ferreira, C.B. Pinheiro, J.A. Takahashi, L.R. Teixeira, H. Beraldo, Silver(I) complexes with 2,6-diacetylpyridine-bis(benzoylhydrazones): Antifungal activity and interaction with DNA, *Polyhedron*. 138 (2017) 270–276, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.09.019>.
- [12] P.J. Blower, A nuclear chocolate box : the periodic table of nuclear medicine, *Dalton Trans.* 44 (2015) 4819–4844, <https://doi.org/10.1039/c4dt02846e>.
- [13] A.M. Peters, S.H. Saverymuttu, H.J. Reavy, H.J. Danpure, S. Osman, J.P. Lavender, Imaging of inflammation with indium-111 tropolonate labeled leukocytes, *J. Nucl. Med.* 24 (1983) 39–44.
- [14] F.L. Datz, S. Lake, S. Lake, I n d i u m - 1 1 1 - L a b e l e d Leukocytes for the Detection of Infection: Current Status, *Semin. Nucl. Med.* 24 (1994) 92–109.
- [15] B. Fisher, B.S. Packard, E.J. Read, J.A. Carrasquillo, C.S. Carter, S.L. Topalian, J. C. Yang, P. Volles, S.M. Larson, S.A. Rosenberg, Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma, *J. Clin. Oncol.* 7 (1989) 250–261, <https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.2.250>.
- [16] R.O. Diffraction, Rigaku Oxford Diffraction. Rigaku Corporation, Japan.tle, CrysAlis Pro. Rigaku Cor (2015) Japan.
- [17] M.C. Burla, R. Caliandro, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, C. Cuocci, C. Giacovazzo, M. Mallamo, A. Mazzzone, G. Polidori, Crystal structure determination and refinement via SIR2014, *J. Appl. Crystallogr.* 48 (2015) 306–309, <https://doi.org/10.1107/S1600576715001132>.
- [18] G.M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL, *Acta Crystallogr. Sect. C, Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8, <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- [19] L.J. Farrugia, ORTEP-3 for windows - A version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565, <https://doi.org/10.1107/S0021889897003117>.
- [20] 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, Van De Streek, P.A. Wood, Mercury CSD 2.0 - New features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2) (2008) 466–470.
- [21] V.A. Blatov, A.P. Shevchenko, ToposPro 5.3.0.4. Topos Expert., (2018). <https://doi.org/http://topospro.com>.
- [22] A.M. Brouwer, Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.* 83 (2011) 2213–2228, <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- [23] M. O'Keefe, M.A. Peskov, S.J. Ramsden, O.M. Yaghi, The Reticular Chemistry Structure Resource (RCSR) Database of, and Symbols for, Crystal Nets, *Acc. Chem. Res.* 41 (12) (2008) 1782–1789.
- [24] X.S. Gao, C.C. Ni, X.M. Ren, Syntheses, crystal structures, photoluminescent and magnetic properties of complexes of zinc(II) and copper(II) with Schiff-base ligands derived from 2,6-diacetylpyridine, *Polyhedron*. 138 (2017) 225–231, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.09.039>.
- [25] R.L. Arrowsmith, P.A. Waghorn, M.W. Jones, A. Bauman, S.K. Brayshaw, Z. Hu, G. Kociok-Kohn, T.L. Mindt, R.M. Tyrrell, S.W. Botchway, J.R. Dilworth, S.I. Pascu, Fluorescent gallium and indium bis(thiosemicarbazones) and their radiolabelled analogues: Synthesis, structures and cellular confocal fluorescence imaging investigations, *Dalton Trans.* 40 (2011) 6238–6252, <https://doi.org/10.1039/c1dt10126a>.
- [26] A. Sumiyoshi, Y. Chiba, R. Matsuoka, T. Noda, T. Nabeshima, Efficient luminescent properties and cation recognition ability of heavy group 13 element complexes of N2O2- and N2O4-type dipyrins, *Dalton Trans.* 48 (2019) 13169–13175, <https://doi.org/10.1039/c9dt02403d>.
- [27] S. Kusaka, R. Sakamoto, H. Nishihara, Luminescent Heteroleptic Tris(dipyrrinato) indium(III) Complexes, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 3275–3277, <https://doi.org/10.1021/ic500326u>.