

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Alexandre Almeida Oliveira

COMPLEXOS DE In(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS COMO
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS E
ANTIMICROBIANOS

Belo Horizonte

2017

UFMG / ICE_x / DQ. 1235^a

T. 560^a

Alexandre Almeida Oliveira

COMPLEXOS DE In(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS COMO
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS E
ANTIMICROBIANOS

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.

Belo Horizonte

2017

O482c
2017
T

Oliveira, Alexandre Almeida
Complexos de In(III) com tiossemicarbazonas como
candidatos a fármacos antineoplásicos e
antimicrobianos [manuscrito] / Alexandre Almeida
Oliveira. 2017.
[xiv], 103 + [54] f.: il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Índio (Química) -
Teses 3. Schiff, Bases de - Teses 4. Agentes
antineoplásicos - Teses 5. Complexos metálicos - Teses
6. Atividade antifúngica - Teses 7. Análise por
ativação nuclear - Teses 8. Índio (Química) - Isótopos
- Teses I. Beraldo, Heloisa de Oliveira, Orientadora
II. Título.

CDU 043

**"Complexos de In(III) com Tiossemicarbazonas como Candidatos a Fármacos
Antineoplásicos e Antimicrobianos"**

Alexandre Almeida Oliveira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



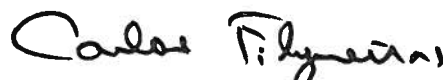
Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG



Profa. Maria Domingues Vargas
UFF



Prof. Julio Santos Rebouças
UFPB



Prof. Carlos Alberto Lombardi Filgueiras
UFMG



Profa. Cynthia Peres Demicheli
UFMG

Belo Horizonte, 24 de agosto de 2017.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Heloisa de Oliveira Beraldo.

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado à minha afilhada Júlia, que está dando os seus primeiros passos na vida! Também é dedicado aos meus pais, Raul e Vanilda, as pessoas que me ensinaram a andar e me permitiram alcançar essa conquista!

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por sempre me acompanhar, iluminando-me e mostrando-me o melhor caminho a seguir em minha vida.

Aos meus pais

Raul e Vanilda

Pela educação que me foi dada, pelo amor incondicional, pela preocupação, incentivos e dedicação em fazer o melhor para mim em todos os momentos.

Ao meu irmão e minha cunhada

Anderson e Dayana

Pela amizade, preocupação e torcida pelo meu sucesso.

A minha Amanda

Por toda torcida, companheirismo e amor.

A minha orientadora

Profa. Dra. Heloisa de Oliveira Beraldo

Pela orientação concedida, apoio e dedicação em me ajudar no desenvolvimento de todas as etapas desta jornada.

Aos colaboradores deste trabalho

Profa. Dra. Elaine Maria Souza-Fagundes, Dra. Raquel Gouvêa dos Santos, Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva e Prof. Dr. Willian Ricardo Rocha.

Pelo trabalho realizado em parceria.

Aos professores da pós-graduação e graduação

Pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Pela concessão da bolsa de estudo.

A UFMG e ao Departamento de Química

Pela oportunidade de realização deste treinamento.

Aos funcionários da UFMG

Pela colaboração no desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Química

Pelos agradáveis momentos compartilhados. Em especial aos colegas que mais se envolveram com meu trabalho, me ajudando e torcendo pelo meu sucesso: Camila, Luciana, Lucas, Sofia e Luana.

*“Se pude enxergar mais longe, foi por me ter
erguido sobre os ombros de gigantes.”*

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Metais em medicina: dos efeitos tóxicos aos efeitos farmacológicos	1
1.1.1. Efeitos tóxicos associados aos metais no organismo	1
1.1.2. O uso de metais com a finalidade medicinal	2
1.2. Câncer: conceito, dados estatísticos e principais tratamentos	4
1.2.1. Terapia radionuclídica baseada em emissores de elétrons Auger	5
1.3. Relevância de complexos de In(III) em Química Medicinal	7
1.3.1. Estudos envolvendo complexos de In(III) como agentes terapêuticos para neoplasias e infecções microbianas	7
1.3.2. Complexos de In(III) radioativos como agentes terapêuticos e de imagem	9
1.4. Desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos: o papel dos metalofármacos	11
1.5. Tiossemicarbazonas como ligantes de complexos de In(III) com aplicações em terapia e diagnóstico	13
1.6. Estudos de mecanismos de ação: interações com alvos biológicos	16
1.6.1. Interações não-covalentes com a albumina sérica humana	17
1.6.2. Interações não-covalentes com o ácido desoxirribonucleico	18
1.7. Objetivos do presente trabalho	20
CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
2.1. Reagentes e solventes	22
2.2. Instrumentação e técnicas experimentais	22
2.3. Sínteses de bases de Schiff e complexos metálicos	24
2.3.1. Tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H ₂ Ac ₄ Ph, H ₂ Ac ₄ <i>o</i> ClPh, H ₂ Ac ₄ <i>m</i> ClPh, H ₂ Ac ₄ <i>p</i> ClPh, H ₂ Ac ₄ <i>p</i> FPh e H ₂ Ac ₄ <i>p</i> IPh).....	24
2.3.2. Complexos de In(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (In1-In10)	25

2.4. Ativação neutrônica dos complexos de In(III)	26
2.4.1. Processo de irradiação	27
2.4.2. Controle de qualidade	27
2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	28
2.6. Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais.....	30
2.6.1. Linhagens celulares e condições de cultura.....	30
2.6.2. Avaliação da atividade citotóxica	30
2.6.3. Avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT	31
2.6.4. Análises morfológicas	31
2.6.5. Avaliação da geração de ROS	32
2.7. Estudos de interações não-covalentes com alvos biológicos	33
2.7.1. Interação com a albumina sérica humana.....	33
2.7.2. Interação com o ácido desoxirribonucleico.....	33
2.8. Cálculos teóricos	34
CAPÍTULO 3. COMPLEXOS BIOATIVOS DE In(III) COM 2-ACETILPIRIDINA- <i>N</i> (4)-FENIL TIOSSEMICARBAZONAS	36
3.1. Caracterização dos compostos.....	37
3.2. Resultados biológicos e discussões	59
3.2.1. Atividade antimicrobiana	59
3.2.2. Atividade citotóxica.....	62
3.2.3. Estudos de relação estrutura-atividade (SAR).....	65
3.2.4. Estudo das interações não-covalentes entre In1-In4 e alvos biológicos.....	70
3.2.4.1. Interação com albumina sérica humana (HSA)	70
3.2.4.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA)	77
3.3. Conclusões e perspectivas	80
CAPÍTULO 4. RADIOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA: POTENCIAL APLICAÇÃO DE COMPLEXOS DE ^{114m} In(III) COM 2-ACETILPIRIDINA- <i>N</i> (4)-FENIL TIOSSEMICARBAZONAS.....	84
4.1. Caracterização dos complexos radioativos de In(III)	84
4.2. Resultados biológicos e discussões	89
4.3. Conclusões e perspectivas	96
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES	99
ANEXO 1. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	102
ANEXO 2. ARTIGOS PUBLICADOS	103

RESUMO

COMPLEXOS DE In(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS E ANTIMICROBIANOS

A investigação de candidatos a metalofármacos de In(III) é uma área de pesquisa que ainda permanece praticamente não explorada. Com o objetivo de estudar o perfil farmacológico de complexos de In(III) com tiossemicarbazonas bioativas derivadas de 2-acetilpiridina, os complexos [In(2Ac4oCIPh)Cl₂(MeOH)] (**In1**), [In(2Ac4pCIPh)Cl₂(MeOH)] (**In2**), [In(2Ac4pFPh)Cl₂(MeOH)] (**In3**), [In(2Ac4pIPh)Cl₂(MeOH)] (**In4**), [In(2Ac4Ph)₂]NO₃·H₂O (**In5**), [In(2Ac4oCIPh)₂]NO₃ (**In6**), [In(2Ac4mCIPh)₂]NO₃·1.5H₂O (**In7**), [In(2Ac4pCIPh)₂]NO₃·2H₂O (**In8**), [In(2Ac4pFPh)₂]NO₃·1.5H₂O (**In9**) e [In(2Ac4pIPh)₂]NO₃·H₂O (**In10**) foram obtidos com 2-acetilpiridina-*N*(4)-feniltiossemicarbazona (H2Ac4Ph) e seus derivados *N*(4)-*orto*-clorofenil (H2Ac4oCIPh), *N*(4)-*meta*-clorofenil (H2Ac4mCIPh), *N*(4)-*para*-clorofenil (H2Ac4pCIPh), *N*(4)-*para*-fluorofenil (H2Ac4pFPh) e *N*(4)-*para*-iodofenil (H2Ac4pIPh). Em todos os complexos a tiossemicarbazona coordena-se ao centro metálico por meio do sistema quelante N_{py}-N_{imina}-S. Estruturas cristalográficas foram determinadas para os complexos **In1-In8**.

Os compostos foram avaliados quanto às suas atividades citotóxicas frente a células de leucemia humana (HL-60, Jurkat e THP-1), células de tumores sólidos (MDA-MB 231, MCF-7 e HCT-116) e contra células Vero, usadas como modelo de células saudáveis. A citotoxicidade e os índices de seletividade ($IS = CI_{50} \text{ Vero} / CI_{50} \text{ célula tumoral}$) aumentaram em vários casos para os complexos de In(III) em comparação com as tiossemicarbazonas livres. Alguns compostos foram ativos em doses nanomolares com índices de seletividade elevados, tais como **In3** ($CI_{50} = 137 \text{ nM}$, $IS = 373$), **In5** ($CI_{50} = 20 \text{ nM}$, $IS = 144$) e **In9** ($CI_{50} = 11 \text{ nM}$, $IS = 420$) contra células HCT-116.

A ação antimicrobiana de **In1-In10** e das tiossemicarbazonas precursoras foi avaliada frente a espécies de bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e cepas de leveduras do gênero *Candida*. Os complexos [In(L)Cl₂(MeOH)] (**In1-In4**) e suas tiossemicarbazonas precursoras (HL) apresentaram uma ação antifúngica consideravelmente superior se comparado à ação antibacteriana, com valores de CI_{50} inferiores a 3,80 $\mu\text{mol/L}$ frente às espécies *Candida lusitaniae* e *Candida dubliniensis*,

mostrando-se mais ativos que o antifúngico nistatina na maioria dos casos. Os compostos do tipo $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ (**In5-In10**) foram inativos.

Embora desprovidos de anéis aromáticos fundidos, os compostos $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ **In1-In4** interagem com ácido desoxirribonucleico (DNA), ao menos parcialmente, por um mecanismo de intercalação atípico. Observou-se também que forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio desempenham um papel principal nas interações entre **In1-In4** e albumina sérica humana (HSA), indicando que esses compostos poderiam ser transportados pela albumina no sangue.

Estudos teóricos sugeriram que a molécula de metanol coordenada em **In1-In4** pode ser facilmente substituída por DMSO utilizado na preparação de soluções estoque, com a formação de $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$. A substituição posterior de DMSO por água em solução aquosa é desfavorável, porém o deslocamento de um ou dois ligantes cloreto por água é extremamente favorável, sugerindo que as espécies $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})(\text{DMSO})]^+$ ou $[\text{In}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DMSO})]^{2+}$ podem ser as responsáveis pelas atividades biológicas dos complexos **In1-In4**.

Estudos de relação estrutura-atividade (SAR) foram realizados para identificar as propriedades físico-químicas que podem estar envolvidas na ação antifúngica, bem como no efeito citotóxico dos compostos **In1-In4** contra células HL-60. Em ambos os casos, as correlações entre a bioatividade e as propriedades físico-químicas não se alteraram sensivelmente quando os ligantes cloreto em $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ foram substituídos por moléculas de água. Em relação à atividade citotóxica, correlações razoáveis foram encontradas entre os valores de CI_{50} e os parâmetros energia de HOMO, momento de dipolo e volume molecular. Em relação à atividade antimicrobiana, observou-se que os parâmetros estereo-eletrônicos correlacionam de forma diferente para cada levedura do gênero *Candida*, de forma que diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos.

Os complexos **In1**, **In3**, **In6** e **In9** foram submetido a ativação neutrônica, sendo produzidos os análogos radioativos de $^{114\text{m}}\text{In}(\text{III})$ ***In1**, ***In3**, ***In6** e ***In9**. As atividades citotóxicas dos compostos foram investigadas em células de câncer de mama MCF-7, bem como contra células não-malignas de fibroblastos MRC-5. Embora os sais $\text{In}(\text{III})$ não radioativos e radioativos tenham sido inativos contra células MCF-7, os complexos radioativos foram de 10^2 a 10^4 vezes mais potentes do que os análogos não radioativos. Os índices de seletividade ($\text{IS} = \text{CI}_{50 \text{ MRC-5}} / \text{CI}_{50 \text{ MCF-7}}$) para os complexos radioativos foram $\text{IS} = 46 - 4716$, indicando que a irradiação representou uma estratégia interessante para aumentar a seletividade dos compostos. Os complexos radioativos induziram níveis mais

altos de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células MCF-7 em comparação aos compostos precursores, o que pode parcialmente explicar a ação citotóxica mais potente desses compostos. Além disso, alterações morfológicas da membrana celular e do núcleo de células MCF-7 tratadas com os compostos não radioativos e radioativos sugerem a ocorrência de morte celular por apoptose.

Palavras-chave: tiossemicarbazonas, complexos de índio(III), atividade antimicrobiana, atividade citotóxica, ativação neutrônica, ^{114m}In .

ABSTRACT

In(III) COMPLEXES WITH THIOSEMICARBAZONES AS CANDIDATES FOR ANTINEOPLASTIC AND ANTIMICROBIAL DRUGS

The investigation on indium-based drug candidates remains practically unexplored. In order to study the pharmacological profile of In(III) complexes with bioactive 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones, complexes [In(2Ac4oClPh)Cl₂(MeOH)] (**In1**), [In(2Ac4pClPh)Cl₂(MeOH)] (**In2**), [In(2Ac4pFPh)Cl₂(MeOH)] (**In3**), [In(2Ac4pIPh)Cl₂(MeOH)] (**In4**), [In(2Ac4Ph)₂]NO₃·H₂O (**In5**), [In(2Ac4oClPh)₂]NO₃ (**In6**), [In(2Ac4mClPh)₂]NO₃·1.5H₂O (**In7**), [In(2Ac4pClPh)₂]NO₃·2H₂O (**In8**), [In(2Ac4pFPh)₂]NO₃·1.5H₂O (**In9**) and [In(2Ac4pIPh)₂]NO₃·H₂O (**In10**) were obtained with 2-acetylpyridine-*N*(4)-phenylthiosemicarbazone (H₂Ac4Ph) and its *N*(4)-*ortho*-chlorophenyl (H₂Ac4oClPh), *N*(4)-*meta*-chlorophenyl (H₂Ac4mClPh), *N*(4)-*para*-chlorophenyl (H₂Ac4pClPh), *N*(4)-*para*-fluorophenyl (H₂Ac4pFPh) and *N*(4)-*para*-iodophenyl (H₂Ac4pIPh) derivatives (HL). In all complexes the thiosemicarbazone ligand coordinates to the metal center through the N_{py}-N_{imine}-S chelating system. Crystallographic structures were determined for **In1-In8**.

The compounds were evaluated for their ability to inhibit the viability of human leukemia (HL-60, Jurkat and THP-1) and solid tumor (MDA-MB 231, MCF-7 and HCT-116) cells, as well as against non-malignant Vero cells. The cytotoxicity and selectivity indexes (SI = IC₅₀ Vero / IC₅₀ tumor cell) increased in several cases for the In(III) complexes in comparison with the free thiosemicarbazones. Some compounds showed IC₅₀ values in the nanomolar range with high selectivity indexes, such as **In3** (IC₅₀ = 137 nM, SI = 373), **In5** (IC₅₀ = 20 nM, SI = 144) and **In9** (IC₅₀ = 11 nM, SI = 420) on HCT-116 cells.

The antimicrobial action of **In1-In10** and the parent thiosemicarbazones was evaluated against *Gram*-positive and *Gram*-negative bacterial species and against yeast strains of the genus *Candida*. Complexes [In(L)Cl₂(MeOH)] (**In1-In4**) and their precursor thiosemicarbazones presented a considerably superior antifungal action when compared to the antibacterial action. These compounds showed IC₅₀ values lower than 3.80 μmol/L against *Candida lusitanae* and *Candida dubliniensis*, being more active than the antifungal agent nystatin in most cases. The [InL₂]NO₃ compounds (**In5-In10**) were inactive.

Although devoid of fused aromatic rings, the [In(L)Cl₂(MeOH)] compounds (**In1-In4**) interact with deoxyribonucleic acid (DNA), at least partially, by an atypical

intercalation mechanism. It was also observed that Van der Waals forces and hydrogen bonds played a major role in the interactions between **In1-In4** and human serum albumin (HSA), indicating that these compounds could be transported in the blood.

Theoretical studies suggested that the coordinated methanol molecule in **In1-In4** can be easily replaced by DMSO used in the preparation of stock solutions, with the formation of $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$. The following substitution of DMSO by water in aqueous solution is unfavorable, but the displacement of one or two chloride ligands by water is extremely favorable, suggesting that the $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})(\text{DMSO})]^+$ or $[\text{In}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DMSO})]^{2+}$ species might be responsible for the biological activities of **In1-In4**.

Structure-activity relationship (SAR) studies were carried out to identify the physicochemical properties that might be involved in the antifungal action, as well as in the cytotoxic effect of **In1-In4** against HL-60 cells. In both cases, correlations between the bioactivity and physicochemical properties did not appreciably change when the chloride ligands in $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ were replaced by water molecules. In relation to the cytotoxic activity, reasonable correlations were found between the IC_{50} values and the HOMO energy, the dipole moment and the molecular volume. In relation to the antimicrobial activity, it was observed that the stereoelectronic parameters correlate differently for each yeast of the genus *Candida*, so that different mechanisms of action may be involved.

Neutron activation of complexes **In1**, **In3**, **In6** and **In9** was carried out producing the radioactive $^{114\text{m}}\text{In}$ analogs ***In1**, ***In3**, ***In6** and ***In9**. The cytotoxic activities of the compounds were investigated on MCF-7 breast cancer cells, as well as against non-malignant MRC-5 fibroblast cells. While both non-radioactive and radioactive In(III) salts were inactive against MCF-7 cells, the radioactive complexes proved to be 10^2 to 10^4 times more potent than the non-radioactive analogues against MCF-7 cells. The selectivity indexes ($\text{SI} = \text{IC}_{50} \text{MRC-5} / \text{IC}_{50} \text{MCF-7}$) for the radioactive In(III) complexes were $\text{SI} = 46 - 4716$, indicating that irradiation represented an interesting strategy for increasing selectivity. Radioactive complexes induced higher levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 cells in comparison to the parent compounds, which partially explains the more potent cytotoxic action of these compounds. In addition, morphological changes of the nucleus and cells membrane treated with the non-radioactive and radioactive compounds suggest occurrence of cell death by apoptosis.

Keywords: thiosemicarbazones, indium(III) complexes, antimicrobial activity, cytotoxic activity, neutron activation, ^{114m}In .

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 3.1	Rendimento, temperatura de fusão, análise elementar de CHN, análise termogravimétrica, massa molar, condutividade molar eletrolítica e dados de ESI-MS dos compostos In1-In10 .	38
Tabela 3.2	Número de onda (cm^{-1}) das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho das tiossemicarbazonas e dos compostos de In(III).	39
Tabela 3.3	Atribuições, número de hidrogênios (n), deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades e constantes de acoplamento (J / Hz) dos sinais de RMN de ^1H (acima), atribuições, deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades e constantes de acoplamento (J / Hz) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 (abaixo) dos compostos $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2\text{MeOH}]$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).	45
Tabela 3.4	Atribuições, número de hidrogênios (n), deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades e constantes de acoplamento (J / Hz) dos sinais de RMN de ^1H (acima), atribuições, deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades e constantes de acoplamento (J / Hz) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 (abaixo) dos compostos $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).	46
Tabela 3.5	Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento das estruturas de In1a, In2a, In3a e In4a .	50
Tabela 3.6	Comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) selecionados para In1a, In2a, In3a e In4a .	51
Tabela 3.7	Parâmetros para as ligações de hidrogênio [$\text{Å}, ^\circ$] presentes em In1a-In4a .	52
Tabela 3.8	Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento das estruturas de In5a, In6a, In7a e In8a .	55
Tabela 3.9	Comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) selecionados para In5a, In6a, In7a e In8a .	56

Tabela 3.10	Energia livre de Gibbs ($\Delta G_r(\text{sol})$) determinada para as reações de troca de ligantes em solução.	58
Tabela 3.11	Valores de CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$) para os compostos de In(III), tiossemicarbazonas, InCl_3 e antibióticos de referência frente a algumas bactérias de interesse medicinal.	60
Tabela 3.12	Valores de CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$) para os compostos de In(III), tiossemicarbazonas, InCl_3 e antifúngicos de referência frente a alguns fungos de interesse medicinal.	61
Tabela 3.13	Atividade citotóxica (CI_{50}) e índice de seletividade (IS) das tiossemicarbazonas, complexos In1-In10 e cisplatina nas linhagens celulares de leucemia (HL-60, Jurkat e THP-1) e na célula saudável Vero.	63
Tabela 3.14	Atividade citotóxica (CI_{50}) e índice de seletividade (IS) das tiossemicarbazonas, complexos In1-In10 e cisplatina nas linhagens celulares de tumor sólido (MDA-MB 231, MCF-7 e HCT-116) e na célula saudável Vero.	64
Tabela 3.15	Propriedades estéreo-eletrônicas calculadas para os complexos In1a-In4a e suas formas derivadas monoaquá ($[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})]^+$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})]^+$) e diaquá ($[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$).	66
Tabela 3.16	Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para as espécies de <i>Candida</i> e as propriedades estéreo-eletrônicas dos complexos In1a-In4a e de seus derivados diaquá $[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$.	69
Tabela 3.17	Constantes de supressão fotofísica da fluorescência (K_S), logaritmo das constantes de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e os complexos In1-In4 a diferentes temperaturas.	73
Tabela 3.18	Parâmetros termodinâmicos da interação entre os complexos In1-In4 e HSA a diferentes temperaturas.	76
Tabela 3.19	Constante de ligação intrínseca (K_b), concentração requerida para reduzir em 50% a fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constante de ligação aparente (K_{app}) de In1-In4 .	78

Tabela 4.1	Atividade citotóxica (CI_{50}) dos sais $In(NO_3)_3$, $InCl_3$ e dos complexos In1 , In3 , In6 , In9 nas formas não radioativa e radioativa frente às linhagens celulares MCF-7 e MRC-5.	91
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Exemplos de metalofármacos: (a) citrato de bismuto(III) ranitidina; (b) ^{153}Sm -EDTMP; (c) carboplatina; (d) auranofina; (e) nitroprussiato de sódio; (f) gluconato de antimônio(V) sódico.	4
Figura 1.2	(a) Estrutura genérica das tiossemicarbazonas; (b) 3-aminopiridina 2-carboxaldeído tiossemicarbazona; (c) 4-acetamido benzaldeído tiossemicarbazona; (d) <i>N</i> -metilisatina tiossemicarbazona; (e) diacetil <i>bis</i> (4-metil-3-tiossemicarbazonato)cobre(II) [^{64}Cu (ATSM)].	14
Figure 1.3	(a) Fitas antiparalelas da dupla hélice de DNA (PDB ID: 1BNA) mostrando o pareamento entre os pares de bases complementares (AT em vermelho, CG em verde) e as ligações de hidrogênio. (b) Estrutura de uma fita simples de DNA.	18
Figure 1.4	(a) 9-aminoacridina e (b) cátion etídio (intercaladores típicos); (c) clorfeniramina e (d) metapirileno (intercaladores atípicos); (e) distamicina A (ligante de sulco menor).	20
Figura 2.1	(a) Síntese da 2-acetilpiridina hidrazona. (b) Síntese das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina.	25
Figura 2.2	Síntese dos complexos $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ e $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ com 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas.	26
Figura 3.1	Estruturas químicas das tiossemicarbazonas ($\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$, $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oCIPh}$, $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{mCIPh}$, $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{pCIPh}$, $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{pFPh}$ e $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{pIPh}$) e dos compostos de In(III) derivados das tiossemicarbazonas (In1-In10)	36
Figura 3.2	Espectros vibracionais dos compostos $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (In1), $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})_2]\text{NO}_3$ (In6) e do ligante precursor $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oCIPh}$.	41
Figura 3.3	Numeração de (a) tiossemicarbazonas; (b) complexos do tipo $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ e (c) complexos do tipo $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ utilizada na atribuição dos sinais no RMN de ^1H e $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$.	42
Figura 3.4	Espectros de RMN de ^1H de (a) $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oCIPh}$; (b) $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (In1) e (c) $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})_2]\text{NO}_3$ (In6) ($\text{DMSO-}d_6$).	43

Figura 3.5	Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 de (a) $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oCIPh}$; (b) $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (In1) e (c) $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})_2]\text{NO}_3$ (In6) (DMSO- d_6).	44
Figura 3.6	Mapa de contornos COSY do composto In6 .	47
Figura 3.7	Mapa de contornos HMQC do composto In6 .	47
Figura 3.8	Mapa de contornos HMBC do composto In6 .	48
Figura 3.9	Diagramas moleculares dos complexos $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ (In1a), $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{pCIPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]\cdot\text{CH}_3\text{CN}$ (In2a), $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{pFPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]\cdot 0,22\text{DMSO}\cdot 0,78\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (In3a) e $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{pIPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]\cdot 0,41\text{DMSO}\cdot 0,59\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (In4a) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.	49
Figura 3.10	Diagramas moleculares dos cátions $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{Ph})_2]^+$, $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})_2]^+$, $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{mCIPh})_2]^+$ e $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{pCIPh})_2]^+$ presentes em $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{Ph})_2]\text{NO}_3\cdot\text{MeOH}$ (In5a), $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})_2]\text{NO}_3\cdot 2\text{MeOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (In6a), $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{mCIPh})_2]\text{NO}_3\cdot\text{EtOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (In7a) e $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{pCIPh})_2]\cdot\text{NO}_3$ (In8a), respectivamente, com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.	53
Figura 3.11	Estrutura otimizada do complexo In1 , com a molécula de metanol (a) fazendo uma fraca interação intermolecular e (b) coordenada ao átomo de índio. Os comprimentos de ligação são dados em Å e ângulos são expressos em graus.	57
Figura 3.12	Processo de troca de ligantes proposto para os complexos In1-In4 .	59
Figura 3.13	Espectro de emissão de HSA (1,92 μM) a 298K na ausência (- - -) e presença (—) de quantidades crescentes de In1 (0,24 – 2,34 μM). As setas indicam as mudanças espectrais.	71
Figura 3.14	Representação gráfica das relações de Stern–Volmer para a supressão de fluorescência de HSA por In1 em diferentes temperaturas.	73
Figura 3.15	Gráficos de $\log[(F_0-F)/F] \times \log[\text{complexo}]$ usados na determinação de K_b e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e In3 a diferentes temperaturas.	74
Figura 3.16	Diagrama de Van't Hoff ($\ln K$ vs $1/T$) para a interação entre HSA e In1-In4 .	76

Figura 3.17	(a) Espectro de absorção eletrônica de In1 (concentração inicial de 33 μM) na ausência (- - -) e presença (—) de quantidades crescentes de DNA (razões molares complexo: DNA variando de 10:1 a 1:1). As setas indicam as mudanças espectrais ocorridas. (b) Gráficos de $[\text{DNA}]$ vs. $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ para a interação entre os compostos de In(III) e DNA.	77
Figura 3.18	(a) Espectro de emissão do sistema BE (1,26 μM) - DNA (2,00 μM) na ausência (- - -) e presença (—) de quantidades crescentes de In1 (0 a 29 μM). A seta mostra a mudança espectral mediante o aumento da concentração de In1 e a linha vertical representa $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$. (b) Efeito da concentração dos complexos sobre a intensidade da fluorescência. A linha horizontal representa $F_0 / F = 2$.	79
Figura 4.1	Complexos de In(III) ativados neutronicamente. R = oCl (In1 e In6) ou pF (In3 e In9).	84
Figura 4.2	Espectro de raios γ do composto * In1 .	85
Figura 4.3	Possíveis processos de ativação neutrônica de $^{113}\text{In} / ^{115}\text{In}$ e processos de decaimento radioativo de $^{114\text{m}}\text{In} / ^{115\text{m}}\text{In}$.	87
Figura 4.4	% de sobrevivência das células MCF-7 em função da concentração dos complexos In1 e In9 avaliados nas formas não radioativa e radioativa.	90
Figura 4.5	Mudanças morfológicas nas células MCF-7 após 48 horas de tratamento com os sais de In(III) (100 μM) e com os complexos In1 e In9 ($10^{-4} \mu\text{M}$), nas formas não radioativa e radioativa. Aumento de 400x, escala de 20 μm .	93
Figura 4.6	Mudanças no DNA nuclear de células MCF-7 induzidas pelo tratamento com os complexos In1 , * In1 , In9 e * In9 . As células foram tratadas com $10^{-4} \mu\text{M}$ dos compostos por 48 horas e marcadas com DAPI. Aumento de 400x.	94
Figura 4.7	% de produção de ROS em células MCF-7 após tratamento por 24 horas com 0,1 μM dos complexos de In(III) nas formas não radioativa e radioativa e marcação com DCFH-DA. # estatisticamente diferente do análogo não radioativo; \#\#\# estatisticamente diferente do controle.	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CI ₅₀	Concentração inibitória do desenvolvimento de 50 % dos indivíduos
COSMO	<i>Conductor-like Screening Model</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DAPI	4',6-diamidina-2'-fenilindol
DCF	2',7'-Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Acetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i> (Teoria do Funcional de Densidade)
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EC	<i>Electron capture</i> (captura de elétrons)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPR	<i>Enhanced permeability and retention effect</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
HCT-116	Linhagem de células de carcinoma colo-retal humano
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica aguda
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HPGe	<i>High purity germanium detector</i>
HSA	<i>Human serum albumin</i> (albumina sérica humana)
IC	<i>Internal conversion</i> (conversão interna)
IS	Índice de seletividade
IV	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho
Jurkat	Linhagem de células de leucemia de linfócitos T
LET	<i>Linear energy transfer</i> (transferência linear de energia)
MCF-7	Linhagem de células de carcinoma de mama
MDA-MB 231	Linhagem de células de carcinoma de mama
MRC-5	Linhagem de células de fibroblasto de pulmão humano
MTT	3-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2il)-2,5-difenil-2H-3-tetrazólio

NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato)
PET	<i>Positron emission tomography</i> (tomografia por emissão de pósitrons)
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Resíduo de aminoácido fenilalanina
ppm	Partes por milhão
RBE	<i>Relative biological effectiveness</i> (efetividade biológica relativa)
RDR	Ribonucleosídeo difosfato redutase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNT	<i>Radionuclide therapy</i> (terapia radionuclídica)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RPMI	Meio de cultura “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
SBD	Caldo sabouraud dextrose
SPECT	<i>Single-photon emission computed tomography</i>
TG	Análise termogravimétrica
Trp	Resíduo de aminoácido triptofano
TZVP	<i>Triple zeta valence polarization</i>
Tyr	Resíduo de aminoácido tirosina
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta e Visível
ZORA	<i>Zeroth Order Regular Approximation</i>

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1. Metais em medicina: dos efeitos tóxicos aos efeitos farmacológicos

Quatro metais do grupo principal (Na, K, Mg e Ca) e oito metais de transição (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, V e Mo) possuem seus íons como sendo necessários para importantes funções biológicas nos seres humanos.¹ A deficiência ou o excesso desses íons no organismo pode resultar em efeitos tóxicos. De outra forma, efeitos farmacológicos podem resultar da administração de pequenas doses de compostos contendo metais essenciais ou não essenciais em sua composição.

1.1.1. Efeitos tóxicos associados aos metais no organismo

A deficiência de metais essenciais no organismo, seja resultado de problemas metabólicos ou de uma dieta inadequada, pode resultar no aparecimento de doenças. Por exemplo, cerca de 70% do ferro corporal está imobilizado na forma de hemoglobina e, em sua deficiência, os níveis sanguíneos da proteína diminuem e um suprimento insuficiente de oxigênio aos diversos tecidos do organismo passa a ocorrer, resultando em sintomas como fraqueza e dor de cabeça, característicos da anemia ferropênica. Outros casos conhecidos incluem o retardo no crescimento, atrofia testicular e lesões na pele como resultado de uma deficiência em zinco, bem como problemas cardíacos e doenças cerebrais em recém-nascidos devido a deficiência de cobre.²

A presença de quantidades excessivas de um metal essencial no organismo é tão prejudicial quanto a sua insuficiência. Por exemplo, a hemocromatose é uma doença que pode ser resultado de uma predisposição genética para a absorção excessiva de ferro na alimentação, bem como da digestão do ferro eventualmente fornecido por vasilhas usadas para cozinhar.³ Calcificação dos tecidos e cálculos renais podem ser devidos à incapacidade de os níveis de cálcio serem regulados pela vitamina D e hormônios da paratireóide. Problemas no fígado, danos neurológicos e anéis verdes na córnea (*Kayser-Fleischer ring*) são associados à doença de Wilson, resultado de uma desordem metabólica

¹ N.P.E. Barry, P.J. Sadler. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 5106-5131.

² S.J. Lippard. Metals in Medicine. In: I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard, J.S. Valentine (Eds.) *Bioinorganic Chemistry*. Mill Valley: University Science Books, **1994**. 505-583.

³ S. Potocki, M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, M. Pyrkosz, A. Szebesczyk, K. Krzywoszynska, H. Kozlowski. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 2738-2759.

genética em que cobre se acumula no organismo.⁴ Além disso, indiretamente o acúmulo de zinco é tóxico, pois pode levar à deficiência de metais essenciais no organismo, como a deficiência em cálcio, ferro e cobre. Diretamente, o acúmulo de íons Zn(II) e Cu(II) no cérebro tem sido associado à doença de Alzheimer.⁵

Metais não essenciais também estão associados com intoxicações. A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve o problema do arsênio em Bangladesh como sendo "o maior envenenamento em massa de uma população da história". Por mais de 30 anos, milhões de pessoas foram cronicamente expostas ao consumo de água contaminada, extraída de aquíferos em formações geológicas arseníferas.⁶ Outro caso famoso ocorreu no Japão, onde milhares de pessoas sofrem com problemas crônicos de envenenamento e centenas morreram após o consumo de peixes e crustáceos contaminados com mercúrio, o qual estava sendo despejado na baía de Minamata como rejeito industrial por duas décadas.⁷ Destacam-se ainda os efeitos carcinogênicos do cromo na forma de ânion cromato (CrO_4^{2-}) e problemas gastrointestinais, neurológicos e renais associados à exposição ao cádmio e chumbo.⁸

A propensão dos metais em perder elétrons formando íons com cargas positivas, aliada à grande disponibilidade nos seres humanos de biomoléculas ricas em elétrons, tais como DNA e proteínas, conduz a uma tendência de os íons metálicos interagirem com essas moléculas biológicas. Conforme mencionado, essas interações podem resultar na formação de compostos que ora desempenham importantes funções biológicas, o que está relacionado à essencialidade de alguns metais, ora são responsáveis pela expressão da toxicidade dos metais. Os compostos formados podem ainda ser usados com fins medicinais, sejam os metais utilizados para essa finalidade essenciais ou não essenciais.⁹

1.1.2. O uso de metais com a finalidade medicinal

Os estudos envolvendo quimioterápicos baseados em metais não são recentes. Não se sabe precisamente quando foi a introdução de metais na Medicina, mas a popularização ocorreu com Paracelsus no século XVI, que introduziu mercúrio, arsênio, estanho, chumbo

⁴ P. Delangle, E. Mintz. *Dalton Trans.* **2012**, 41(21), 6359-6370.

⁵ M.A. Telpoukhovskaia, C. Orvig. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 1836-1846.

⁶ M. Argos, T. Kalra, P.J. Rathouz, Y. Chen, B. Pierce, F. Parvez, T. Islam, A. Ahmed, M. Rakibuz-Zaman, R. Hasan, G. Sarwar, V. Slavkovich, A. van Geen, J. Graziano, H. Ahsan. *Lancet* **2010**, 376, 252-258.

⁷ J. McCurry. *Lancet* **2006**, 367, 99-100.

⁸ A.M.C. Benite, S.P. Machado, E.J. Barreiro. *Quim. Nova* **2007**, 30(8), 2062-2067.

⁹ S.J. Lippard. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 504-507.

e antimônio na *materia medica*. Seus trabalhos foram um grande avanço para a Medicina, que em sua época ainda era baseada no conceito dos quatro elementos canônicos (fogo, terra, ar e água) em equilíbrio com as quatro qualidades (quente, frio, úmido e seco), com os quatro humores (bilis negra, bilis amarela, fleuma e sangue) e com a astrologia.¹⁰

Em sua forma atual, a Química Inorgânica Medicinal teve suas origens nos trabalhos de Paul Ehrlich - considerado o fundador da quimioterapia moderna - por seus estudos com arsfenaminas no tratamento da sífilis.¹¹ Porém, o desenvolvimento de fármacos baseados em metais somente passou a ser consistente após a descoberta da ação antitumoral da cisplatina, *cis*-diaminodicloroplatina(II).¹² Este metalofármaco é ainda hoje utilizado para tratar alguns tipos de tumores sólidos, tais como tumores de testículo, ovário, cabeça, pescoço e de pulmão, com uma taxa de sobrevida elevada.¹³

Antes da descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina em 1965, a Química Medicinal se dedicava principalmente à investigação de compostos orgânicos e produtos naturais, o que é compreensível dada a importância que alguns fármacos naturais (insulina, morfina, quinina, penicilina G, estreptomicina, anfotericina B e hidrocortisona) e orgânicos sintéticos (ácido acetilsalicílico, prontosil, metilfenidato e fenobarbital) tinham no tratamento de enfermidades. Após a descoberta, pode-se dizer que foi aberta uma nova perspectiva com a inclusão de complexos metálicos como possíveis agentes terapêuticos.

Além dos fármacos baseados em Pt(II), usados em mais regimes quimioterápicos que qualquer outra classe de agentes antitumorais,¹⁴ é evidente o sucesso de outros derivados metálicos como quimioterápicos e agentes de diagnóstico (Figura 1.1). Destacam-se os compostos de Bi(III), como o citrato de bismuto ranitidina, no tratamento de distúrbios gastrointestinais e na erradicação da bactéria *Gram*-negativa *Helicobacter pylori*;¹⁵ complexos de ouro(I), como a auranofina, empregada no tratamento da artrite reumatóide; o nitroprussiato de sódio, um complexo de Fe(III) usado em emergências cirúrgicas como vasodilatador; o carbonato de lítio, utilizado no tratamento de distúrbio bipolar; o nitrato de gálio(III), utilizado para tratamentos de hipercalcemia relacionada ao câncer; fármacos antimoniais, como o gluconato de antimônio(V) sódico, usado para tratar leishmaniose; sulfato de bário, usado como agente de contraste em radiografia

¹⁰ C.S.W. Koehler. *Today's chemist at work*. **2001**, 10(1), 61-65.

¹¹ H. Beraldo. *Quím. Nova. Esc.* **2005**, 6, 4-6.

¹² (a) B. Rosenberg, L. VanCamp, T. Krigas. *Nature* **1965**, 205, 698-699; (b) B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour. *Nature* **1969**, 222, 385-386.

¹³ G.Y. Ho, N. Woodward, J.I.G. Coward, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, 102, 37-46.

¹⁴ T.W. Hambley. *Science* **2007**, 318, 1392-1393.

¹⁵ H. Li, H. Sun. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, 16, 74-83.

gastrointestinal; $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ ($^{153}\text{Sm-Lexidronam}$), usado no tratamento paliativo de dores ósseas resultantes de metástases e os complexos $^{111}\text{In-DPTA}$ (Pentetato de ^{111}In), $^{99\text{m}}\text{Tc-Cardiolite}$ e $^{67}\text{Ga-citrato}$ usados como agentes de contraste em cintilografia.¹⁶

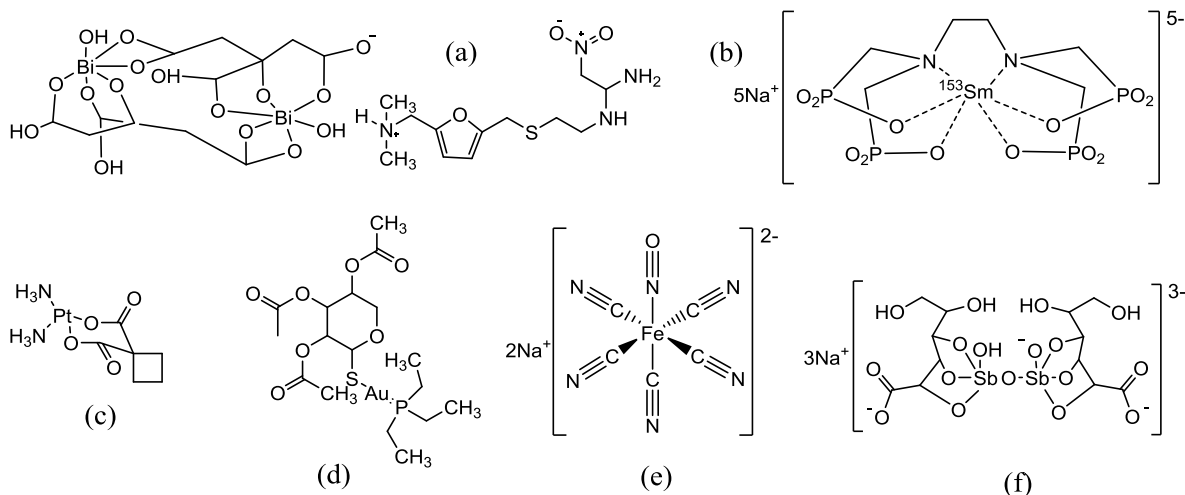


Figura 1.1. Exemplos de metalofármacos: (a) citrato de bismuto(III) ranitidina; (b) $^{153}\text{Sm-EDTMP}$; (c) carboplatina; (d) auranofina; (e) nitroprussiato de sódio; (f) gluconato de antimônio(V) sódico.

As aplicações de complexos metálicos como agentes antimicrobianos e antitumorais, como foi o objeto do presente trabalho, representam importante contribuição da Química Inorgânica à Medicina. Além dos complexos metálicos usados em diagnóstico, certamente a principal contribuição da Química Medicinal Inorgânica refere-se aos complexos de Pt(II) utilizados na quimioterapia do câncer.

1.2. Câncer: conceito, dados estatísticos e principais tratamentos

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo.¹⁷ Células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções. Assim, conforme essas passem a substituir as células normais, pode ocorrer a falência de órgãos ou, em casos mais graves, levar à morte do paciente.

De acordo com Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), as estimativas para o ano de 2017 são de um aumento de 600 mil novos casos de câncer no

¹⁶ (a) K.H. Thompson, C. Orvig. *Science* **2003**, 300, 936-939; (b) K.D. Mjos, C. Orvig. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4540-4563.

¹⁷ V.L. Almeida, A. Leitão, L.C.B. Reina, C.A. Montanari, C.L. Donnici. *Quim. Nova* **2005**, 28, 118-129.

Brasil, sendo o mais frequente o câncer de pele não-melanoma. Além deste tipo, câncer de próstata e câncer de mama são os de maior ocorrência em homens e mulheres, respectivamente. Essa carga global de câncer tende a crescer em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas.¹⁸

No contexto da prevenção, múltiplas abordagens são usadas para reduzir a incidência de diversos tipos de câncer. Por exemplo, ações para o controle do tabagismo na prevenção de cânceres de pulmão e esôfago; a conscientização para hábitos de alimentação saudável, para prevenir cânceres de estômago; ações de estímulo à proteção individual contra a luz solar, para prevenir a ocorrência de câncer de pele; conscientização para a prática de atividade física regular e manutenção do peso ideal, para prevenção do câncer de mama; campanhas de vacinação para Papilomavírus humano (HPV) e hepatite (tipos A e B) na prevenção de câncer de colo de útero e câncer de fígado, respectivamente.¹⁸

Em situações em que um indivíduo possui uma predisposição genética ao aparecimento de algum tipo de câncer, ou quando ocorrem falhas nas estratégias de profilaxia ou na detecção precoce de tumores, o progresso da doença deve ser evitado por meio do tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioterápico. Estes tratamentos podem ser utilizados de forma isolada ou combinada, dependendo do tipo celular do órgão de origem e do grau de invasão do tumor.^{17,19}

A terapia medicamentosa, quando aplicada, mostra-se eficaz em muitos casos. Porém, a resistência celular aos agentes quimioterapêuticos convencionais e o fato de a maioria desses agentes atuarem de forma não-específica permanecem como desafios para uma quimioterapia eficaz.¹⁹ Diante desta situação, é importante investigar os potenciais de novos compostos de coordenação para atuarem como agentes quimioterápicos antitumorais que possam ser mais seguros e eficientes.²⁰

1.2.1. Terapia radionuclídica baseada em emissores de elétrons Auger

Considerando a sua ação não-invasiva e uma maior especificidade em comparação com a radioterapia externa e com a quimioterapia convencional, a terapia radionuclídica

¹⁸ Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

¹⁹ H.M. Coley. *Cancer Treat. Rev.* **2008**, 34(4), 378-390.

²⁰ (a) I.R. Canelón, P.J. Sadler. *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 12276-12291; (b) C. Biot, W. Castro, C.Y. Botté, M. Navarro. *Dalton Trans.* **2012**, 41(21), 6335-6349; (c) R.W.Y. Sun, D.L. Ma, E.L.M. Wong, C.M. Che. *Dalton Trans.* **2007**, 43, 4884-4892.

(RNT - *Radionuclide therapy*) está se tornando uma área de grande interesse para o tratamento do câncer.²¹ A RNT consiste em danificar células tumorais seletivamente através da deposição de radiação ionizante, a qual é gerada por radionuclídeos que estão ligados a biomoléculas que são reconhecidas pelas células tumorais. A técnica possui a vantagem de entregar uma dose citotóxica localizada e concentrada de radiação sobre o tumor, causando um mínimo de danos aos tecidos normais circundantes.²²

Vários radionuclídeos, tais como fósforo-32 (³²P), estrôncio-89 (⁸⁹Sr), rádio-223 (²²³Ra), ítrio-90 (⁹⁰Y), iodo-131 (¹³¹I) e samário-153 (¹⁵³Sm) são usados no tratamento de alguns tipos de câncer.^{22,23} A escolha do radionuclídeo mais apropriado para o tratamento de um tumor depende das características do tumor. Por exemplo, radionuclídeos que emitem partículas β^- de alta energia fornecem radiação com alta penetração para o tratamento de tumores sólidos volumosos, ao passo que emissores de elétrons Auger são mais adequados, ao menos teoricamente, para o tratamento de tumores pequenos.^{22,23}

Recentemente, as investigações envolvendo radionuclídeos emissores de elétrons Auger têm mostrado resultados promissores.²⁴ Brevemente, quando radionuclídeos decaem por captura eletrônica (EC - *electron capture*) ou conversão interna (IC - *internal conversion*), uma vacância é formada em uma camada eletrônica interna do átomo. Essa vacância é posteriormente preenchida por um elétron de uma camada externa, tendo como resultado a liberação de energia. Embora a energia seja às vezes liberada na forma de um fóton, essa energia pode ser transferida a outro elétron de uma camada mais externa, que pode então ser ejetado do átomo. Este elétron emitido é denominado de elétron Auger.²⁵

Conceitualmente, o uso de emissores de elétrons Auger é relevante, pois a maioria dos elétrons emitidos possui energia muito baixa (algumas centenas de eV) e uma curta faixa de penetração em tecidos biológicos (nm - μ m). Estas características resultam em moderados valores de transferência linear de energia (LET - *linear energy transfer*), aproximadamente de 4 a 26 keV/ μ m, um parâmetro relacionado à energia ionizante depositada por unidade de distância percorrida no tecido.²⁶

²¹ K. Zukotynski, H. Jadvar, J. Capala, F. Fahey. *Biomarkers Cancer* **2016**, 8(S2), 35-38.

²² S.V. Gudkov, N.Y. Shilyagina, V.A. Vodeneev, A.V. Zvyagin. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17(1), 33-50.

²³ C.H. Yeong, M.H. Cheng, K.H. Ng. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **2014**, 15(10), 845-863.

²⁴ (a) C. Gao, J.V. Leyton, A.D. Schimmer, M. Minden, R.M. Reilly. *Appl. Radiat. Isot.* **2016**, 110, 1-7; (b) A.P. Kiess, I. Minn, Y. Chen, R. Hobbs, G. Sgouros, R.C. Mease, M. Pullambhatla, C.J. Shen, C.A. Foss, M.G. Pomper. *J. Nucl. Med.* **2015**, 56(9), 1401-1407; (c) S. Imstepf, V. Pierroz, P. Raposinho, M. Bauwens, M. Felber, T. Fox, A.B. Shapiro, R. Freudenberg, C. Fernandes, S. Gama, G. Gasser, F. Motthagy, I.R. Santos, R. Alberto. *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26(12), 2397-2407.

²⁵ F.F. (Russ) Knapp, A. Dash, Auger Electron-Based Radionuclide Therapy, in: *Radiopharmaceuticals for Therapy*, F.F. (Russ) Knapp, A. Dash (Eds.), Springer, India, 2016, pp. 57-67.

²⁶ A.I. Kassis. *Semin. Nucl. Med.* **2008**, 38(5), 358-366.

Emissores de elétrons Auger decaem por meio de um processo complexo, o qual resulta em uma grande densidade de elétrons de baixa energia no microambiente ao redor do local de decaimento. Considerando uma deposição energética dentro da célula tumoral, emissores de elétrons Auger podem alcançar um alto valor de efetividade biológica relativa (RBE - *relative biological effectiveness*) associado com danos no DNA ou com a morte celular.²⁵ Potencialmente, os valores de RBE alcançados podem ser maiores do que os valores observados para radiações eletromagnéticas (raios X e radiação γ), as quais são radiações de baixo LET devido à infrequência de ionizações produzidas ao longo do trajeto.²⁷

Estudos *in vitro* e *in vivo* com emissores de elétrons Auger ocorrem especialmente quando os radionuclídeos estão conjugados aos análogos de timidina (incorporados no DNA durante a fase de síntese do ciclo celular), octreotídeo (um análogo da somatostatina com receptores expressos em tumores neuroendócrinos), hormônios esteroidais, fatores de crescimento epidermal, intercaladores de DNA e anticorpos monoclonais com especificidade para antígenos associados a tumores.²⁸ Os radionuclídeos iodo-125 (¹²⁵I), iodo-123 (¹²³I), tecnécio-99m (^{99m}Tc), platina-193m (^{193m}Pt), platina-195m (^{195m}Pt) e índio-111 (¹¹¹In) são os emissores de elétrons Auger mais investigados.^{25,28}

1.3. Relevância de complexos de In(III) em Química Medicinal

Complexos de vários cátions metálicos, tais como Ru(II,III), Au(I,III), Ga(III), entre outros, têm sido investigados quanto à sua atividade antineoplásica, mas há poucos estudos sobre complexos de In(III) como candidatos a metalofármacos e radiometalofármacos antitumorais.

1.3.1. Estudos envolvendo complexos de In(III) como agentes terapêuticos para neoplasias e infecções microbianas

Para atender às finalidades da terapia medicamentosa, o primeiro estudo com In(III) foi realizado apenas no início da década de 1970 em experimentos com elementos do grupo 13 da tabela periódica (Al, Ga, In e Tl) que investigavam suas toxicidades e se seus

²⁷ J.F. Ward. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **1988**, 35, 95-125.

²⁸ F. Buchegger, F. Perillo-Adamer, Y.M. Dupertuis, A.B. Delaloye. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2006**, 33(11), 1352-1363.

sais tinham ação antiproliferativa sobre células tumorais. Embora capaz de inibir o crescimento de tumores sólidos *in vivo*, nitrato de In(III) exibiu alta toxicidade para os camundongos tratados, demonstrando não ser apropriado para o desenvolvimento clínico.²⁹

Esse estudo e os subsequentes demonstraram o efeito antitumoral de sais de Ga(III) e sua capacidade de atuarem contra a reabsorção óssea acelerada.³⁰ Como resultado, nitrato de Ga(III) foi aprovado para tratamentos de hipercalcemia relacionada ao câncer.³¹ Uma limitação em seu emprego deve-se à sua tendência em sofrer hidrólise no meio fisiológico, resultando na formação de hidróxidos não-solúveis. Para contornar esses problemas, complexos de Ga(III) têm sido desenvolvidos. Encontram-se em fase clínica os agentes antitumorais *tris*(8-quinolato)gálio(III) e *tris*(maltolato)gálio(III), cujo mecanismo de ação está relacionado à inativação da metaloenzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR) através da substituição de íons Fe(III) em sua estrutura por Ga(III).³²

Os elementos gálio e índio têm similaridades químicas, como pertencerem ao grupo 13 da tabela periódica, possuírem estado de oxidação +3 prevalente em solução e comportarem-se como ácidos de Lewis duros segundo a classificação de Pearson. Porém, apesar de as investigações envolvendo aplicações terapêuticas para complexos de Ga(III) fornecerem resultados promissores, os estudos com compostos de In(III) ainda são pouco explorados. Além do estudo inicial realizado em 1971,²⁹ foram encontradas apenas quatro publicações com compostos de In(III) até o ano de 2011. Esses trabalhos envolviam: (a) estudo da ação citotóxica de complexos de In(III) derivados de curcumina e diacetil curcumina frente a células de linfoma L1210;³³ (b) estudo da ação antimicrobiana desses mesmos complexos frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*;³⁴ (c) estudo do efeito de In(III) livre e complexado com o ácido 1,4,8,11-tetraazacicotetradecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA) frente a *Mycobacterium tuberculosis*;³⁵ e (d) estudo do efeito antibacteriano de complexos de In(III) com o sideróforo enteroquelina frente a *Klebsiella pneumoniae*.³⁶

²⁹ M.M. Hart, R.H. Adamson. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, 68(7), 1623-1626.

³⁰ R.P. Warrell, R.S. Bockman, C.J. Coonley, H. Staszewski. *J. Clin. Invest.* **1984**, 73(5), 1487-1490.

³¹ C.R. Chitambar. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, 7, 2337-2361.

³² C.R. Chitambar, W.E. Antholine. *Antioxid. Redox Sign.* **2013**, 18(8), 956-972.

³³ K. Mohammadi, K.H. Thompson, B.O. Patrick, T. Storr, C. Martins, E. Polishchuk, V.G. Yuen, J.H. McNeill, C. Orvig. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99 (11), 2217-2225.

³⁴ S. Tajbakhsh, K. Mohammadi, I. Deilami, K. Zandi, M. Fouladvand, E. Ramedani, G. Asayesh. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, 7(21), 3832-3835.

³⁵ S. David, V. Barros, C. Cruz, R. Delgado. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, 251, 119-124.

³⁶ H.J. Rogers, C. Synge, V.E. Woods. *Antimicrob. Agents Ch.* **1980**, 18(1), 63-68.

Desde 2011, vários trabalhos foram publicados, o que mostra um crescente interesse na investigação de compostos de In(III). Complexos contendo ftalocianinas como ligantes têm sido investigados como agentes fotossensibilizantes em terapia fotodinâmica (PDT - *photodynamic therapy*) de células de neuroblastoma³⁷ e em quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT - *photodynamic antimicrobial chemotherapy*) de *Escherichia coli*.³⁸ Nanopartículas de óxido de índio-estanho (ITO - *indium tin oxide*), amplamente utilizadas como componente das telas de cristal líquido, demonstraram capacidade de induzir danos ao DNA em células A549 de câncer de pulmão humano.³⁹ Além disso, complexos de In(III) com arilsulfonamidas conjugadas com porfirinas foram investigadas como inibidores da enzima transmembranar anidrase carbônica IX, considerada como sendo um marcador de tumor sólido em hipóxia e um potencial alvo quimioterapêutico.⁴⁰

Embora raros, estudos de complexos de In(III) que empregam bases de Schiff como ligantes também têm sido relatados. Arrowsmith e colaboradores (2011) verificaram que *bis*(tiossemicarbazonas) complexadas com In(III) eram ativas frente a linhagem celular HeLa de câncer cervical e investigaram a possibilidade de os complexos marcados com ¹¹¹In serem utilizadas na obtenção de imagens por SPECT.⁴¹ Tai e colaboradores (2006) demonstraram a ação antiproliferativa de complexos de In(III) contendo o ligante 2-benzoilpiridina *N*(4)-ciclohexiltiossemicabazona em células HepG2 de câncer de fígado humano.⁴²

1.3.2. Complexos de In(III) radioativos como agentes terapêuticos e de imagem

Ainda que a ação farmacológica de compostos de In(III) seja ainda pouco investigada, seus potenciais como agentes de imagem em Medicina Nuclear são bem reconhecidos. O uso de compostos de In(III) pode permitir a detecção não-invasiva, precisa e precoce, bem como o monitoramento do tratamento de uma variedade de doenças e

³⁷ M. Neagu, C. Constantin, M. Tampa, C. Matei, A. Lupu, E. Manole, R. Ion, C. Fenga, A.M. Tsatsakis. *Oncotarget* **2016**, 7(43), 69718-69732.

³⁸ O.L. Osifeko, I. Uddin, P.N. Mashazi, T. Nyokong. *New J. Chem.* **2016**, 40, 2710-2721.

³⁹ Y. Tabei, A. Sonoda, Y. Nakajima, V. Biju, Y. Makita, M. Horie. *Metallomics* **2015**, 7(5), 816-827

⁴⁰ J.R. Dilworth, S.I. Pascu, P.A. Waghorn, D. Vullo, S.R. Bayly, M. Christlieb, X. Sun, C.T. Supuran. *Dalton Trans.* **2015**, 44(11), 4859-4873.

⁴¹ 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. *Dalton Trans.* **2011**, 40(23), 6238-6252.

⁴² Y.X. Tai, Y.M. Ji, Y.L. Lu, M.X. Li, Y.Y. Wu, Q.X. Han. *Synth. Met.* **2016**, 219, 109-114.

condições, como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, elevando as possibilidades de cura ou sobrevida de pacientes.⁴³

Índio possui três radioisótopos que podem ser usados para imagem (^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$ e $^{114\text{m}}\text{In}$), sendo que ^{111}In é o mais usado. Este radioisótopo é empregado em cintilografia SPECT (*single photon emission computed tomography*), a qual requer um radiofármaco contendo um nuclídeo emissor de radiação γ . O radioisótopo ^{111}In , produzido por ciclotron, decai através da captura de elétrons e emite fótons γ de energia apropriada (171 e 245 keV) para cintilografia SPECT. De fato, a radiação γ abaixo de 80 keV pode ser absorvida nos tecidos e ser pouco útil na obtenção de imagens, enquanto que a radiação γ acima de 300 keV resulta em imagens de baixa qualidade. Além disso, o radioisótopo ^{111}In possui tempo de meia-vida de 68 h, suficiente para preparo do radiofármaco, administração ao paciente e obtenção da imagem.⁴⁴

Muitos agentes de imagem baseados em ^{111}In são usados atualmente. Por exemplo, ^{111}In -DTPA é usado para acompanhar mudanças de fluxo e rinorréia do líquido cefalorraquidiano. ^{111}In -pentetreotida (OctreoScan®) baseia-se em um fármaco chamado octreotida, similar a somastatina, que é marcado com ^{111}In e usado para imagiologia de tumores neuroendócrinos que têm receptores de somastatina. Biomoléculas tais como peptídeos e anticorpos marcados com ^{111}In também são usados para diagnóstico.⁴⁵ Exemplos são os radiofármacos baseados em anticorpos monoclonais, como ^{111}In -satumomabe pendetida (OncoScint CR/OV®), específico para tumor colo-retal e dos ovários; ^{111}In -capromabe pendetida (ProstaScint®), específico para tumor da próstata e ^{111}In -imciromabe pendetida (MyoScint®) que atua na detecção de áreas necrosadas no infarto do miocárdio.⁴⁶

Além de sua aplicação em agentes de imagem, o radionuclídeo ^{111}In pode ser usado na terapia do câncer através da emissão de elétrons Auger, o que potencialmente possibilita que seus complexos sejam agentes teragnósticos. Como discutido anteriormente, elétrons Auger possuem uma curta faixa de penetração em tecidos biológicos, de forma que para resultarem em danos ao DNA e eventual morte celular, é necessário que o emissor esteja

⁴³ (a) C.S. Cutler, H.M. Hennkens, N. Sisay, S.H. Markai, S.S. Jurisson. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 858-883; (b) M.L. James, S.S. Gambhir. *Physiol Rev.* **2012**, 92, 897-965.

⁴⁴ V. Carroll, D.W. Demoin, T.J. Hoffman, S.S. Jurisson. *Radiochim. Acta* **2012**, 100, 653-667.

⁴⁵ D.E. Reichert, J.S. Lewis, C.J. Anderson. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 3-66.

⁴⁶ (a) R. Oliveira, D. Santos, D. Ferreira, P. Coelho, F. Veiga. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2006**, 42(2), 151-165; (b) R.E. Weiner, M.L. Thakur. Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals. In: M.J. Welch, C.S. Redvanly (Eds.) *Handbook of radiopharmaceuticals*. West Sussex: John Wiley & Sons, **2005**. 363-399.

localizados no núcleo celular. Nessa perspectiva, diversos conjugados de ^{111}In com peptídeos e anticorpos monoclonais têm sido investigados em ensaios clínicos.⁴⁷

Índio-114m ($^{114\text{m}}\text{In}$) é outro radionuclídeo emissor de elétrons Auger. Embora esse radionuclídeo metaestável seja mais conhecido em função de ser uma impureza indesejável na produção de radiofármacos de ^{111}In ,⁴⁸ há um crescente interesse em avaliar a ação de compostos de $^{114\text{m}}\text{In}$ em terapia radionuclídica do câncer.⁴⁹ A eficácia terapêutica de ^{111}In e $^{114\text{m}}\text{In}$ em terapia radionuclídica, entretanto, ainda não foi alcançada.

1.4. Desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos: o papel dos metalofármacos

O uso de substâncias para combater as infecções causadas por fungos e bactérias passou a ocorrer antes mesmo de surgir o conceito de microrganismo. A descoberta de novos agentes antimicrobianos costumava ser uma questão casual e o empirismo reinou até a descoberta das bases microbiológicas usadas no tratamento das infecções: a penicilina G, antibiótico natural descoberto em 1928 pelo bacteriologista escocês Alexander Fleming; o Prontosil, uma sulfonamida sintética cuja atividade antibacteriana foi descoberta em 1935 pelo alemão Gerhard Domagk, e a anfotericina B, antibiótico natural que em 1965 tornou-se o primeiro antifúngico a ser aprovado pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*).⁵⁰

O sucesso desses fármacos na cura de doenças, algumas até então consideradas letais, revolucionou a terapêutica e provocou o desenvolvimento da indústria farmacêutica. De fato, as décadas de 1940, 1950 e 1960 foram marcadas por uma grande quantidade de compostos produzidos e rapidamente incorporados às práticas clínicas. Porém, nas décadas posteriores houve pouca inovação no que se refere à introdução de novas classes de antimicrobianos de uso clínico bem sucedido.⁵¹

⁴⁷ (a) J.R. Dilworth, S.I. Pascu, in: N. Long, W.T. Wong (Eds.), *The Chemistry of Molecular Imaging*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2014, pp. 165-178; (b) B. Piroozfar, B. Alirezapoor, F.M. Sedeh, A.R. Jalilian, M. Mirzaei, G. Raisali. *Iran J. Nucl. Med.* **2016**, 24(2), 107-114.

⁴⁸ S. Lahiri, M. Maiti, K. Ghosh. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, 297(3), 309-318.

⁴⁹ (a) A. Orlova, D. Rosik, M. Sandstrom, H. Lundqvist, L. Einarsson, V. Tolmachev. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, 51(4), 314-323; (b) R.A. Cowan, B. Murby, D. Gunton, S.E. Owens, K.P. Hoyes, H.L. Sharma, A. Smith, J. Chang, B. Van Kessel, P.M. Nuttall, D. Crowther. *Brit. J. Haematol.* **2002**, 119(2), 459-466; (c) H.L. Sharma, R.A. Cowan, B. Murby, S. Owens, P.M. Nuttall, D. Gunton, A.M. Smith, J. Chang, D. Crowther. *Anticancer Res.* **1997**, 17(3B), 1815-1821.

⁵⁰ (a) D.O. Guimarães, L.S. Momesso, M.T. Pupo. *Quim. Nova* **2010**, 33(3), 667-679; (b) F.B. Filippin, L.C. Souza. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2006**, 42(2), 167-194.

⁵¹ M.S. Butler, A.D. Buss. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 919-929.

Aliado a essa pouca inovação, os atuais antimicrobianos apresentam problemas que precisam ser superados, como elevada toxicidade, grande duração de tratamento e efeitos colaterais. Outro problema é a capacidade de algumas cepas de microrganismos não-sensíveis de se multiplicarem na presença de doses terapêuticas dos antimicrobianos.⁵² Essa resistência microbiana é um fenômeno natural, uma resposta evolutiva à presença de agentes antimicrobianos no ambiente (fitoalexinas, produtos de higiene e limpeza), a qual tem aumentado devido a fracassos no tratamento de doenças, seja por abandono, erros na prescrição ou uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos.

Algumas classes de bactérias causam processos infecciosos de alta letalidade e elevado custo de tratamento, constituindo fonte de extrema preocupação em saúde pública. Por exemplo, apesar de *Escherichia coli* ser geralmente inofensiva, sendo parte importante da flora intestinal, algumas cepas podem ser fatais, sobretudo em hospedeiros imunodeprimidos. As estirpes virulentas podem causar doenças como gastroenterite, infecções do trato urinário e septicemia.⁵³ *Staphylococcus aureus* também não é necessariamente patogênico, estando presente na pele e sistema respiratório de indivíduos saudáveis. Porém, cepas resistentes como MRSA e VRSA (*S. aureus* resistente a meticilina e vancomicina, respectivamente) são os principais patógenos em hospitais e centros de cuidado prolongado.⁵⁴

A incidência e a prevalência de infecções fúngicas também têm aumentado nos últimos anos. Além de causar micoses superficiais, algumas espécies comensais em pessoas saudáveis são capazes de desenvolver infecções sistêmicas, algumas vezes fatais em pacientes com sistema imunológico debilitado, como os idosos, os portadores da AIDS e pacientes submetidos a terapia de imunossupressão. Exemplo desses fungos oportunistas são as leveduras do gênero *Candida*, espécies que colonizam a pele e superfícies mucosas como a cavidade oral, o trato gastrointestinal e a vagina.⁵⁵ Cerca de 20 espécies de *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos em infecções humanas, sendo mais de 90% das infecções causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.⁵⁶

⁵² (a) G. Morace, F. Perdoni, E. Borghi. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2014**, 2, 254-259; (b) A.L. Demain, S. Sanchez. *J. Antibiot.* **2009**, 62, 5-16.

⁵³ J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L.T. Mobley. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 123-140.

⁵⁴ F.D. Lowy. *J. Clin. Invest.* **2003**, 111(9), 1265-1273.

⁵⁵ World Health Organization (WHO). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, **2014**. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.

⁵⁶ J.C.O. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, A.M. Fusco-Almeida. *J. Med. Microbiol.* **2013**, 62, 10-24.

Várias abordagens são empregadas para superar os desafios encontrados pelos atuais antimicrobianos: desenvolvimento de vacinas; implementação de medidas de controle de infecção hospitalar; programas educacionais para prevenir infecções e diminuir as transmissões; venda controlada de antibióticos e desenvolvimento de novos medicamentos.⁵⁷

Uma estratégia possível na concepção de novos fármacos é a de aliar propriedades biológicas dos ligantes àquelas dos metais. Além de alterar a lipofilicidade, que controla a taxa de entrada do composto na célula, a complexação pode resultar em compostos mais ativos que os precursores. Os complexos podem também exibir um perfil diferente de atividades biológicas ou novos mecanismos de ação, bem como podem apenas servir como um veículo para a ativação do ligante ou íon metálico como agente tóxico intracelular.

O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos envolvendo metais torna-se, portanto, uma estratégia interessante de aumento de ação através de efeitos sinérgicos metal-ligante, de reversão da resistência através da complexação de compostos orgânicos a cátions metálicos, e de mudanças de características tais como lipofilia por meio da coordenação a metais. Portanto, é de grande relevância desenvolver e investigar novos complexos metálicos como potenciais agentes antimicrobianos, conforme proposto no presente trabalho para complexos de In(III).

1.5. Tiossemicarbazonas como ligantes de complexos de In(III) com aplicações em terapia e diagnóstico

Tiossemicarbazonas são bases de Schiff com fórmula $RR_1C=N-NH-(C=S)-NR_2R_3$ (Figura 1.2a), geralmente obtidas pela condensação quimioseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas. As tiossemicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecida em função de seu amplo perfil farmacológico, atuando como agentes antitumorais, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos, dentre outros.⁵⁸

A ação antitumoral de tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas é uma das atividades biológicas mais exploradas dessa família em função de promissores resultados da 3-aminopiridina 2-carboxaldeído tiossemicarbazona, conhecida como triapina (Figura 1.2b), a qual se encontra em fase clínica II para tratamentos de câncer de vagina e do colo de

⁵⁷ G.P. Silveira, F. Nome, J.C.Gesser, M.M. Sá, H. Terenzi. *Quim. Nova* **2006**, 29, 844-855.

⁵⁸ (a) H. Beraldo, D. Gambino. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, 4, 31-39; (b) R.P. Tenório, A.S. Góes, J.G. Lima, A.R. Faria, A.J. Alves, T.M. Aquino. *Quim. Nova* **2005**, 28, 1030-1037.

útero.⁵⁹ A ação antituberculose manifesta-se principalmente em derivados de benzaldeídos *para*-substituídos. Como exemplo, 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, conhecida como tiacetazona (Figura 1.2c), é empregada em situações em que outras opções de tratamento da tuberculose estão comprometidas por resistência aos medicamentos de primeira escolha.⁶⁰ A ação antiviral está associada a algumas tiossemicarbazonas derivadas de piridina, isoquinolina, purina e isatina que têm uma cadeia lateral em posição α com relação ao anel heteroaromático. Como exemplo, *N*-metilisatina tiossemicarbazonas (Figura 1.2d), comercializada com o nome de Marboran, foi usada no tratamento e profilaxia da varíola, e tratamento de complicações resultantes da vacinação.⁶¹

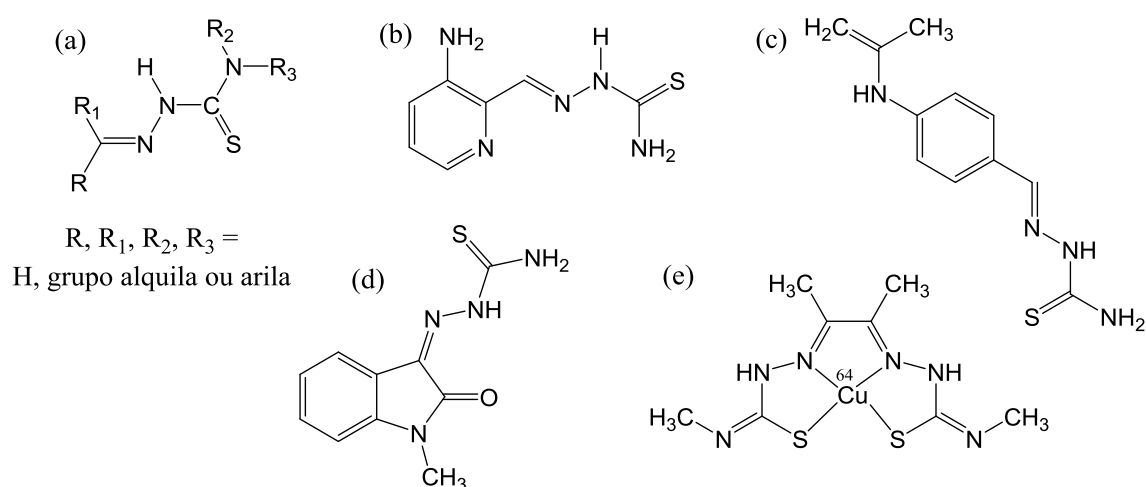


Figura 1.2. (a) Estrutura genérica das tiossemicarbazonas; (b) 3-aminopiridina 2-carboxaldeído tiossemicarbazona; (c) 4-acetamido benzaldeído tiossemicarbazona; (d) *N*-metilisatina tiossemicarbazona; (e) diacetil *bis*(4-metil-3-tiossemicarbazonato)cobre(II) [⁶⁴Cu(ATSM)].

O mecanismo de ação das tiossemicarbazonas é complexo e pode acontecer através da inibição de múltiplos alvos. Estudos sugerem que as propriedades biológicas das tiossemicarbazonas podem estar associadas à capacidade de formarem complexos com cátions metálicos *in vivo*. É aceito também que a ação antitumoral dos derivados $\alpha(N)$ -heterocíclicos relaciona-se à inibição do ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), enzima que catalisa a redução de ribonucleosídeos a desoxirribonucleosídeos, etapa crucial para a replicação e reparo do DNA. Outros possíveis alvos de sua ação antitumoral envolvem

⁵⁹ J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Silva, M.A. Soares, R.G. dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5671-5677.

⁶⁰ D. Falzon, G. Hill, S.N. Pal, W.E. Jaramilloa. *Bull. World Health Organ.* **2014**, 92, 918-919.

⁶¹ E.D. Clercq. *Viruses* **2010**, 2, 1322-1339.

inibição da topoisomerase II e inibição da síntese da glucoproteína P, o mais significativo transportador envolvido em resistência celular a múltiplas drogas.⁶²

Alguns trabalhos envolvendo tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina demonstraram as vantagens na complexação. Por exemplo, *N*(4)-toluol-2-acetilpiridina tiossemicarbazonas mostraram-se ativas contra as linhagens U-87 e T-98 de glioma humano e, pela coordenação aos íons Pt(II), Pt(IV) e Au(III), a citotoxicidade foi aumentada em alguns casos.⁶³ Nesse estudo, diferentes mecanismos de ação foram sugeridos de acordo com o íon metálico empregado: complexos de Au(III) parecem agir através da inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) e os derivados de Pt(II) e Pt(IV) parecem envolver ligação ao DNA. Em outro estudo, complexos de Pd(II), Pt(II), Bi(III), Sb(III), Au(III), Ga(III) e Sn(IV) derivados de *N*(4)-*o*-clorofenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona mostraram-se ativos contra os tumores MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon). Os complexos de Au(III) e Sb(III) funcionaram como inibidores de TrxR e glutatona redutase (GR), complexos de Pt(II), Pd(II) e Bi(III) atuaram na inibição apenas de TrxR, enquanto que os derivados de Sn(IV) e Ga(III) parecem apresentar outros modos de ação.⁶⁴

A complexação de α (*N*)-tiossemicarbazonas com o íon Ga(III) provou ainda ser eficiente para a melhoria das atividades antimicrobianas dos ligantes frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.⁶⁵ Melhorias nas atividades antifúngicas frente a *Candida spp.* foram observadas para complexos de Cu(II)⁶⁶ e Sn(IV).⁶⁷ Complexos de Bi(III) também mostraram atividades antimicrobianas interessantes frente as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*.⁶⁸

Em cintilografia, os estudos com tiossemicarbazonas marcadas com radionuclídeos também vem sendo realizados há mais de 35 anos. Os principais trabalhos referem-se aos derivados de 1,2-diona marcadas com ⁶⁴Cu. O exemplo mais promissor é o diacetil *bis*(4-

⁶² J.R. Dilworth, R. Hueting. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, 389, 3-15.

⁶³ K.S.O. Ferraz, J.G. da Silva, F.M. Costa, B.M. Mendes, B.L. Rodrigues, R.G. dos Santos, H. Beraldo. *Biometals* **2013**, 26, 677-691.

⁶⁴ G.L. Parrilha, K.S.O. Ferraz, J.A. Lessa, K.N. Oliveira, B.L. Rodrigues, J.P. Ramos, E.M. Souza-Fagundes, I. Ott, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 84, 537-544.

⁶⁵ (a) J.A. Lessa, M.A. Soares, R.G. dos Santos, I.C. Mendes, L.B. Salum, H.N. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, H. Beraldo. *Biometals* **2013**, 26, 151-165; (b) J.G. da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo. *Polyhedron* **2009**, 28, 2301-2305.

⁶⁶ I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, 17, 1571-1577.

⁶⁷ G.L. Parrilha, J.G. da Silva, L.F. Gouvêa, A.K. Gasparoto, R.P. Dias, W.R. Rocha, D.A. Santos, N.L. Speziali, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 1473-1482.

⁶⁸ J.A. Lessa, D.C. Reis, J.G. da Silva, L.T. Paradizzi, N.F. Silva, M.F.A. Carvalho, S.A. Siqueira, H. Beraldo. *Chem. Biodivers.* **2012**, 9, 1955-1966.

metil-3-tiossemicarbazonato)cobre(II) (Figura 1.2e), estudado como agente de imagem para regiões de hipóxia e como agente terapêutico *in vitro* e em modelos animais *in vivo*. Ensaio pré-clínicos têm sido realizados e sua aplicação como agente de imagem para tomografia por emissão de pósitrons (PET - *positron emission tomography*) encontra-se em fase clínica II em seres humanos.⁶⁹

Nesse sentido, e considerando-se a comprovada ação antineoplásica de tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas e de seus complexos metálicos, no presente trabalho foram obtidos complexos de In(III) derivados de 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus efeitos citotóxicos foram avaliados frente a diversas células tumorais. Da mesma forma, uma vez que tiossemicarbazonas apresentam ação antimicrobiana, os complexos foram investigados quanto a seus efeitos como agentes antibacterianos e antifúngicos.

1.6. Estudos de mecanismos de ação: interações com alvos biológicos

Por muito tempo acreditou-se que os fenômenos biológicos que ocorrem nos seres vivos eram decorrentes da formação e quebra de ligações covalentes. Ao contrário, as estruturas biológicas são geralmente feitas a partir de agregados frouxos que são mantidos unidos por interações não-covalentes.⁷⁰ Alguns dos importantes fenômenos biológicos são resultado dessas interações: (1) interações anticorpo-antígeno protegem nosso organismo da toxicidade do antígeno; (2) ligações de hidrogênio são fortes o suficiente para manter as fitas de DNA unidas, mas fracas o suficiente para permitir que essas se distanciem para o DNA replicar-se; (3) proteínas séricas devem formar interações fortes o suficiente para transportar os fármacos no plasma, porém a labilidade inerente aos complexos formados é essencial para a liberação do fármaco no alvo terapêutico.⁷¹

Em particular, a química supramolecular envolvendo as interações entre complexos metálicos bioativos com os alvos biológicos albumina sérica humana (HSA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) é de extremo interesse para serem estudados farmacocinética e os potenciais mecanismos de ação dos compostos.⁷²

⁶⁹ B.M. Paterson, P.S. Donnelly. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3005-3018.

⁷⁰ G.R. Desiraju. *Nature* **2001**, 412, 397-400.

⁷¹ E. Frieden. *J. Chem. Educ.* **1975**, 52(12), 754-761.

⁷² (a) P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 197-206; (b) S. Schmidt, D. Gonzalez, H. Derendorf. *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99(3), 1107-1122.

1.6.1. Interações não-covalentes com a albumina sérica humana

No processo de desenvolvimento racional de novos fármacos é importante investigar a interação desses com proteínas séricas. É aceito que a distribuição, o metabolismo, a eliminação e o alcance de fármacos aos tecidos-alvo estão relacionados com suas ligações reversíveis a essas proteínas, assim como a ação dos fármacos nos tecidos-alvo dependem de suas frações que se encontram não-ligadas às proteínas séricas.⁷³ Entre as proteínas a que os fármacos potencialmente se ligam, a albumina sérica humana (HSA – *human serum albumin*) tem grande importância. Trata-se da proteína extracelular mais abundante no plasma sanguíneo humano, a qual serve para o depósito e o transporte de vários materiais (fármacos, íons metálicos, ácidos graxos, hormônios e aminoácidos), bem como contribui para manter a pressão osmótica do sangue.⁷⁴

HSA tem sido estudada por mais de 40 anos. Sua estrutura primária é conhecida e sua estrutura terciária foi determinada por cristalografia de raios X.⁷⁵ Essa proteína globular consiste de uma única cadeia polipeptídica contendo 585 resíduos de aminoácidos, subdividida em três domínios estruturalmente semelhantes (I, II, e III), cada um contendo dois subdomínios (A e B).

Embora existam vários possíveis locais de ligação na HSA, o trabalho pioneiro de Sudlow e colaboradores (1975), baseado no deslocamento de sondas fluorescentes, revelou que muitos agentes quimioterapêuticos ligam-se a dois locais principais, denominados sítio I (localizado no subdomínio IIA) e sítio II (localizado no subdomínio IIIA).⁷⁶ Essas interações foram confirmadas por estudos cristalográficos e têm constantes de associação de $10^4 - 10^7 \text{ M}^{-1}$.⁷⁷ O principal sítio de ligação da HSA *in vivo* é o sítio I, em virtude de o subdomínio IIIA ser um forte local de ligação para ácidos graxos. Conforme será discutido no Capítulo 3, a interação de um composto com HSA no sítio I pode ser verificada *in vitro* investigando as propriedades fluorescentes do único resíduo triptofano (Trp-214) de HSA, presente nesse sítio de ligação.⁷⁸

⁷³ T. Bohnert, L.S. Gan. *J. Pharm. Sci.* **2013**, 102(9), 2953-2994.

⁷⁴ P. Ascenzi, G. Fanali, M. Fasano, V. Pallottini, V. Trezza. *J. Mol. Struct.* **2014**, 1077, 4-13.

⁷⁵ S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi. *Protein Eng.* **1999**, 112(6), 439-446.

⁷⁶ G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade. *Mol. Pharmacol.* **1975**, 11(6), 824-832.

⁷⁷ K. Yamasaki, V.T.G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1830, 5435-5443.

⁷⁸ F. Yang, Y. Zhang, H. Hiang. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15(3), 3580-3595.

1.6.2. Interações não-covalentes com o ácido desoxirribonucleico

A dupla fita de ácido desoxirribonucleico (DNA - *deoxyribonucleic acid*) é um biopolímero em forma de dupla hélice antiparalela, onde cada filamento é construído por nucleotídeos derivados de quatro bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina e citosina). Dentro de uma cadeia esses nucleotídeos estão ligados através de ligações fosfodiéster (a desoxirribose se junta por ambos os grupos 3'-hidroxil e 5'-hidroxil aos grupos fosfato) e as fitas são mantidas unidas principalmente por ligação de hidrogênio entre pares de bases complementares. A região onde as duas cadeias estão próximas é chamada de *sulco menor* e a região onde estão afastadas uma do outra é chamada de *sulco maior* (Figura 1.3).⁷⁹

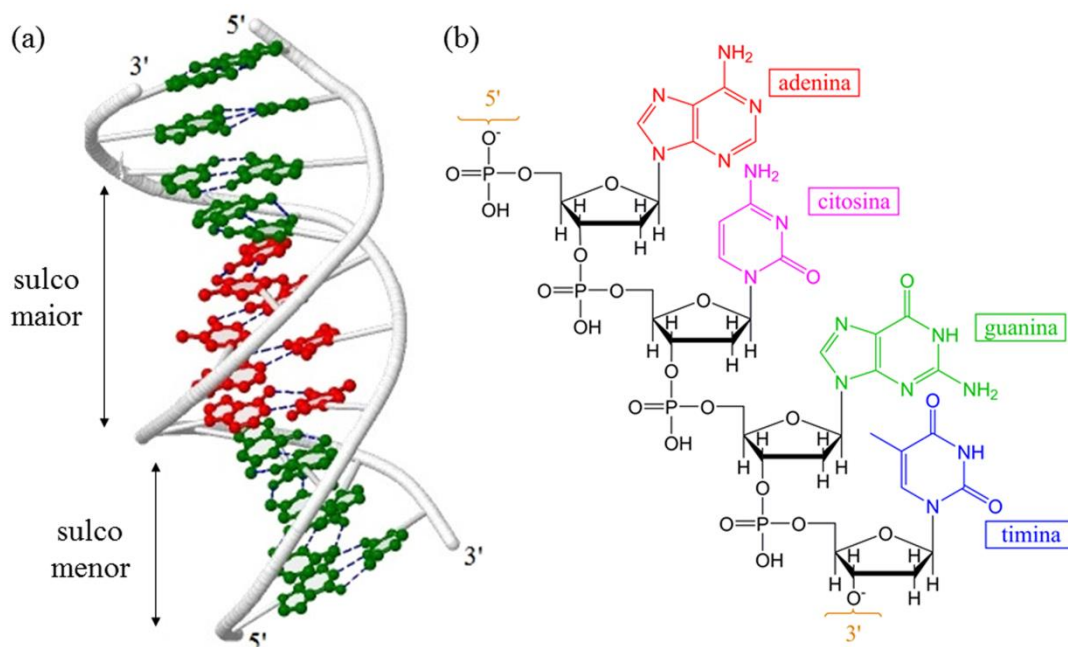


Figure 1.3. (a) Fitas antiparalelas da dupla hélice de DNA (PDB ID: 1BNA) mostrando o pareamento entre os pares de bases complementares (AT em vermelho, CG em verde) e as ligações de hidrogênio. (b) Estrutura de uma fita simples de DNA.

DNA é o alvo celular de muitos regimes quimioterapêuticos devido ao seu papel central na vida. Sua interação com moléculas bioativas pode afetar o processo de transcrição (expressão do gene e síntese de proteínas) e inibir a replicação (principal etapa no crescimento e divisão celular). Assim, compostos que se ligam ao DNA são

⁷⁹ B.A.D. Neto, A.A.M. Lapis. *Molecules* **2009**, 14, 1725-1746.

potencialmente úteis para inibir a proliferação de células tumorais ou o progresso de doenças microbianas.⁸⁰

Clorambucila e cisplatina são exemplos de fármacos antitumorais que interagem com o DNA através da formação de adutos covalentes via alquilação e ligação cruzada inter e/ou intra-fitas, respectivamente. Essas interações são irreversíveis e invariavelmente provocam a morte celular.⁸¹

A ligação de muitos compostos ao DNA também pode ocorrer através de ligações não covalentes.⁸² Esses processos são reversíveis e preferenciais em relação à formação de adutos covalentes ao considerarmos o metabolismo do agente terapêutico e seus efeitos tóxicos. Interações não covalentes podem ocorrer por três modos:

(1) Interação eletrostática - ocorre com espécies positivamente carregadas, como com alguns complexos polipiridínicos de Ru(II) que interagem com os grupos fosfatos negativamente carregados que estão presentes externamente à dupla hélice do DNA.⁸³

(2) Intercalação - algumas moléculas empilham-se perpendicularmente à estrutura do DNA entre as bases nitrogenadas adjacentes. Esse arranjo é estabilizado por uma significativa sobreposição de elétrons π , juntamente com outras interações (hidrofóbica, iônica, ligações de hidrogênio e Van der Waals). Estruturalmente, ocorre o alongamento e a diminuição na torção da dupla hélice do DNA.⁸⁴ Embora a intercalação seja tradicionalmente associada a moléculas contendo anéis fundidos, intercaladores atípicos com sistemas de anéis aromáticos não fundidos também são reconhecidos (Figura 1.4).⁸⁵

(3) Interação nos sulcos - compostos que se ligam nos sulcos não induzem grandes mudanças conformacionais do DNA. Esses compostos possuem uma estrutura alongada contendo anéis aromáticos conectados por ligações que possuem liberdade torcional, tornando possível a esses agentes assumirem uma forma complementar à do sulco, o que permite a formação de interações que estabilizam a estrutura.⁸⁶

⁸⁰ G. Bischoff, S. Hoffmann. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 321-348.

⁸¹ (a) S.R. Rajski, R.M. Williams. *Chem. Rev.* **1998**, 98(8), 2723-2795; (b) E.R. Jamieson, S.J. Lippard. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467-2498.

⁸² K.K. Liu, P.J. Sadler. *Accounts Chem. Res.* **2011**, 44(5), 349-359.

⁸³ J.M. Kelly, A.B. Tossi, D.J. McConnell, C. Ohuigin. *Nucleic Acids Res.* **1985**, 13(17), 6017-6034.

⁸⁴ M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah. *J. Photoch. Photobio. B.* **2013**, 124, 1-19.

⁸⁵ R.D. Snyder. *Mutat. Res.* **2007**, 623, 72-82.

⁸⁶ S.A. Shaikh, S.R. Ahmed, B.A. Jayaram. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 429, 81-99.

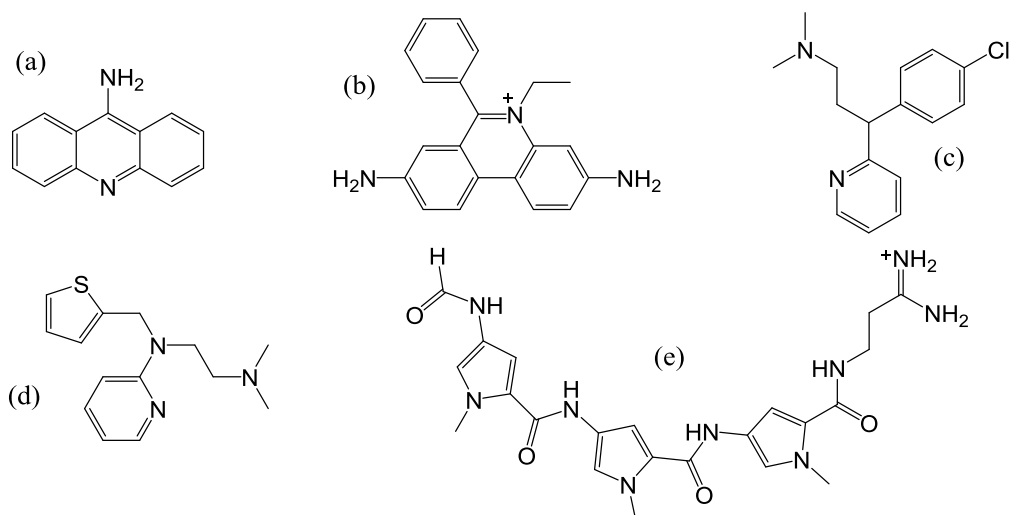


Figure 1.4. (a) 9-aminoacridina e (b) cátion etídio (intercaladores típicos); (c) clorfeniramina e (d) metapirileno (intercaladores atípicos); (e) distamicina A (ligante de sulco menor).

1.7. Objetivos do presente trabalho

A busca por novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais e antimicrobianos que sejam mais acessíveis, mais eficazes e menos tóxicos é uma área de grande interesse em Química Medicinal. As investigações envolvendo o estudo das propriedades medicinais de complexos metálicos têm sido extensivamente exploradas com essas finalidades.

Tiossemicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecida em função de seu amplo perfil farmacológico. A coordenação de tiossemicarbazonas a diversos íons metálicos pode resultar em efeitos antimicrobianos e citotóxicos mais potentes. Considerando que as investigações de candidatos a fármacos baseados em In(III) permanecem pouco exploradas, pareceu-nos interessante investigar as vantagens da complexação de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina com o íon In(III).

A obtenção de complexos de In(III) é ainda relevante, ao considerar-se que esses podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de análogos radioativos contendo os radionuclídeos ^{111}In e $^{114\text{m}}\text{In}$. Conforme mencionado, esses radionuclídeos têm potencial aplicação em terapia radionuclídica envolvendo a emissão de elétrons Auger. Considerando a possibilidade do uso do reator nuclear TRIGA MARK I IPR R-1, localizado no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), pareceu-nos interessante desenvolver e avaliar a ação citotóxica de análogos radioativos dos complexos de In(III) sintetizados.

Em vista do exposto, as hipóteses a serem verificadas na presente tese são:

1. Complexos de In(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina possuem propriedades promissoras para serem considerados como protótipos de fármacos antimicrobianos e antitumorais.

2. Complexos radioativos de $^{114m}\text{In(III)}$ com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina possuem propriedades promissoras para serem considerados como protótipos de radiofármacos para terapia radionuclídica do câncer de mama.

3. Complexos de In(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina interagem com os alvos biológicos DNA e HSA.

Para verificar essas hipóteses, os objetivos específicos do presente trabalho são:

(1) Sintetizar e caracterizar complexos de In(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina;

(2) Avaliar a atividade citotóxica dos ligantes e dos complexos em células Vero (células renais de macaco *Cercopithecus aethiops*; modelo de células saudáveis) e nas linhagens de células tumorais HL-60 (leucemia mielóide), Jurkat (leucemia de linfócitos T), THP-1 (leucemia monocítica), MDA-MB 231 e MCF-7 (carcinomas mamários) e HCT-116 (carcinoma colo-retal).

(3) Avaliar a atividade citotóxica dos ligantes e complexos frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sanguinis*), Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*) e fungos patogênicos do gênero *Candida* (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae* e *Candida parapsilosis*);

(4) Investigar as interações não-covalentes dos complexos com a HSA;

(5) Investigar as interações não-covalentes dos complexos com o DNA;

(6) Realizar estudos de relação estrutura-atividade (SAR) dos complexos;

(7) Produzir análogos radioativos de $^{114m}\text{In(III)}$ por ativação neutrônica a partir dos complexos não radioativos;

(8) Avaliar a atividade citotóxica dos compostos radioativos nas linhagens celulares MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) e MCF-7 (carcinoma mamário);

(9) Investigar o mecanismo de ação dos complexos não radioativos e radioativos de In(III) através de análises de morfologia da membrana celular, morfologia nuclear e investigação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células MCF-7.

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes empregados nas sínteses, processos de purificação e ensaios biológicos são de procedência das fontes comerciais Sigma-Aldrich, Vetec Química Fina e Alfa Aesar. Os reagentes são de alto grau de pureza, sendo usados sem purificação prévia. O solvente DMSO- d_6 foi adquirido da Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL).

2.2. Instrumentação e técnicas experimentais

Pesagens - as medidas de massa foram realizadas nas balanças Gehaka modelo AG 200 (sensibilidade de 0,0001 g) e Mettler AE 163 (sensibilidade de 0,00001g).

Temperaturas de fusão - as temperaturas das faixas de fusão ou a temperatura de decomposição dos compostos foram obtidas com o aparelho Mettler MQAPF-302.

Espectroscopia vibracional - espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados no espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR GX, alocado no Departamento de Química da UFMG, empregando-se o método de transmitância e janela de KBr.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - os espectros de RMN, com tratamento de dados por transformada de Fourier, 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. Os experimentos foram realizados em soluções de DMSO- d_6 . 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. 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 de experimentos de HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

Espectroscopia eletrônica - os espectros de absorção nas regiões do UV-Vis foram obtidos nos espectrofotômetros UV-2401PC (Shimadzu) e Varian Cary 100 Bio (Agilent Technologies). Os espectros de fluorescência foram registrados no espectrofluorímetro

Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies). Em todos os casos, foram empregadas células de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Difração de raios X - as estruturas cristalográficas foram determinadas por difração de raios X de monocristal. As medidas foram realizadas pelo professor Jeferson Gomes da Silva (UFJF - campus Governador Valadares) no Laboratório de Cristalografia da UFMG. Os dados foram coletados à baixa temperatura (150 K) em um difratômetro Oxford GEMINI, no modo θ - 2θ , utilizando um tubo selado Mo K α ($\lambda = 0,71073\text{\AA}$) como fonte de radiação. As estruturas foram resolvidas por método direto e refinadas pelo método dos mínimos quadrados de matriz completa em F^2 , sendo usados os softwares SHELXS-2013/1,⁸⁷ SHELXL-2014/7⁸⁸ e WinGX.⁸⁹ Os gráficos moleculares foram plotados com o software PLATON.⁹⁰

Espectrometria de massas - as análises de ESI-MS (*Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*) foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da UFMG, utilizando um espectrômetro Shimadzu LCMS-IT-TOF. Os compostos foram dissolvidos em metanol grau HPLC e introduzidos no equipamento por injeção direta. A ionização foi realizada com fonte de *electrospray* (ESI) e acumulador íon trap (IT). O analisador de massas empregado foi *time of flight* (TOF). A aquisição dos espectros foi realizada nos modos positivo e negativo numa faixa de m/z 200-2000.

Análise elementar de CHN - as análises foram realizadas no Departamento de Química da UFMG e na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, usando-se o aparelho Perkin Elmer modelo CHN-2400.

Análise termogravimétrica (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 N₂, na faixa de temperatura de 25 a 400 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Análise condutimétrica - as medidas de condutividade molar eletrolítica (Λ_m) foram realizadas à temperatura ambiente em soluções de DMF (1 mM) empregando-se o aparelho YSI Conductivity Bridge, modelo 31, célula condutimétrica de 0,088 cm⁻¹. Os resultados foram analisados conforme dados reportados na literatura.⁹¹

⁸⁷ (a) G.M. Sheldrick. SHELXS-2013/1: Program for Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **2013**. (b) G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct.* **2015**, 71, 3-8.

⁸⁸ G.M. Sheldrick. SHELXL-2014/7: Program for the Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **2014**.

⁸⁹ L.J. Farrugia. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, 32, 837-838.

⁹⁰ A.L. Spek. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, 65, 148-155.

⁹¹ W.J. Geary. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, 7, 81-122.

Determinação do pH - as medidas foram realizadas utilizando-se o potenciômetro Marte MB-10, equipado com eletrodo de vidro combinado de Ag / AgCl, calibrado com tampões de pH 4,00 e pH 7,00.

2.3. Sínteses de bases de Schiff e complexos metálicos

2.3.1. Tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4Ph, H2Ac4oCIPh, H2Ac4mCIPh, H2Ac4pCIPh, H2Ac4pFPh e H2Ac4pIPh)

As tiossemicarbazonas foram preparadas conforme método descrito na literatura.⁹² Foram sintetizadas: *N*(4)-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph), *N*(4)-*o*-clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4oCIPh), *N*(4)-*m*-clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4mCIPh), *N*(4)-*p*-clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4pCIPh), *N*(4)-*p*-fluorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4pFPh) e *N*(4)-*p*-iodofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4pIPh).

Hidrazina monohidratada (13 mmols, 30% em excesso) foi adicionada a uma solução etanólica contendo 10 mmols de 2-acetilpiridina. A mistura foi mantida sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente (Figura 2.1a). Em seguida o meio reacional foi levado ao congelador por 1 dia. Formou-se um sólido branco (2-acetilpiridina hidrazona), o qual foi filtrado em papel de filtro sob vácuo, lavado com etanol gelado e com éter etílico, sendo posteriormente secado sob pressão reduzida. A hidrazona foi caracterizada por RMN de ¹H para confirmação de sua identidade e verificação de pureza.

O precursor 2-acetilpiridina hidrazona foi utilizado na preparação das tiossemicarbazonas. 3 mmols da 2-acetilpiridina hidrazona foram agitados sob refluxo por 6 horas com 3 mmols do isotiocianato apropriado em 15 mL de metanol (Figura 2.1b). Após o resfriamento da mistura até a temperatura ambiente, os sólidos foram filtrados, lavados com metanol e éter etílico, e secados sob pressão reduzida. A identidade das tiossemicarbazonas foi confirmada por comparação dos espectros vibracionais e espectros de RMN de ¹H e ¹H{¹³C} com dados presentes na literatura.^{92,93}

⁹² 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.I. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 3396-3409.

⁹³ (a) D.X. West, N.M. Kozub, G.A. Bain. *Transit. Metal Chem.* **1996**, 21, 52-57. (b) D.X. West, J.J. Ingram, N.M. Kozub, G.A. Bain, A.E. Liberta. *Transit. Metal Chem.* **1996**, 21, 213-218.

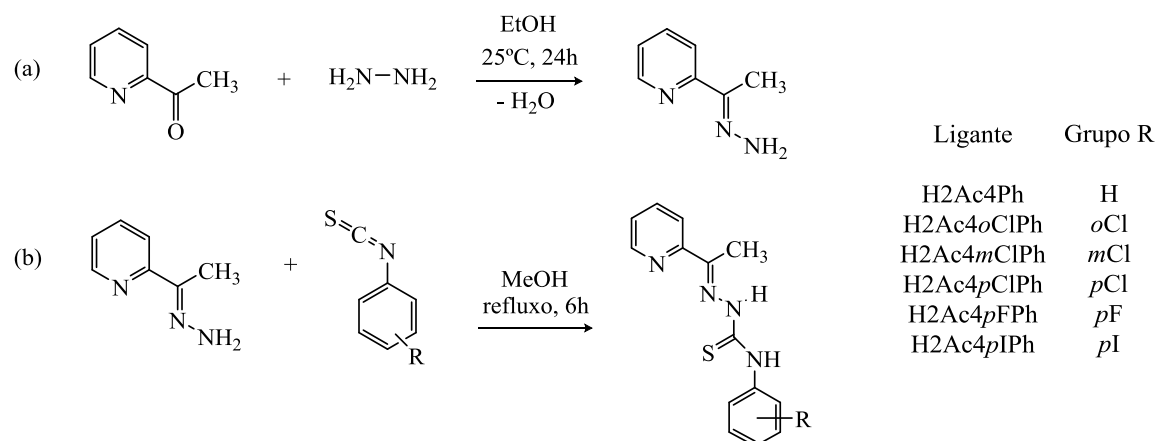


Figura 2.1. (a) Síntese da 2-acetilpiridina hidrazona. (b) Síntese das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina.

2.3.2. Complexos de In(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (In1-In10)

Foram sintetizados dez complexos de In(III):

In1 - [In(2Ac4oClPh)Cl₂(MeOH)]

(2-acetilpiridina-*orto*-cloro-feniltiossemicarbazonato)dicloro(metanol)índio(III).

In2 - [In(2Ac4pClPh)Cl₂(MeOH)]

(2-acetilpiridina-*para*-cloro-feniltiossemicarbazonato)dicloro(metanol)índio(III).

In3 - [In(2Ac4pFPh)Cl₂(MeOH)]

(2-acetilpiridina-*para*-fluoro-feniltiossemicarbazonato)dicloro(metanol)índio(III).

In4 - [In(2Ac4pIPh)Cl₂(MeOH)]

(2-acetilpiridina-*para*-iodo-feniltiossemicarbazonato)dicloro(metanol)índio(III).

In5 - [In(2Ac4Ph)₂]NO₃·H₂O

Nitrato de *bis*(2-acetilpiridina- feniltiossemicarbazonato)índio(III) monohidratado.

In6 - [In(2Ac4oClPh)₂]NO₃

Nitrato de *bis*(2-acetilpiridina-*orto*-cloro-feniltiossemicarbazonato)índio(III).

In7 - [In(2Ac4mClPh)₂]NO₃·1.5H₂O

Nitrato de *bis*(2-acetilpiridina-*meta*-cloro-feniltiossemicarbazonato)índio(III) sesquihidratado.

In8 - [In(2Ac4pClPh)₂]NO₃·2.0H₂O

Nitrato de *bis*(2-acetilpiridina-*para*-cloro-feniltiossemicarbazonato)índio(III) dihidratado.

In9 - $[\text{In}(\text{2Ac4pFPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$

Nitrato de *bis*(2-acetilpiridina-*para*-fluoro-feniltiossemicarbazonato)índio(III) sesquihidratado.

In10 - $[\text{In}(\text{2Ac4pIPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Nitrato de *bis*(2-acetilpiridina-*para*-iodo-feniltiossemicarbazonato)índio(III) monohidratado.

Os complexos neutros de In(III) do tipo $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ foram obtidos pela reação de 1,0 mmol da tiossemicarbazona apropriada com 1,1 mmol de InCl_3 em 15 mL de metanol. Os complexos de In(III) do tipo $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ foram obtidos pela reação de 2,0 mmols da tiossemicarbazona com 1,1 mmol de $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ em 15 mL de metanol (Figura 2.2). Em ambos os casos, a mistura reacional foi mantida em refluxo e sob agitação por 4 horas. Os sólidos cristalinos obtidos após a mistura ser mantida no freezer por 24 horas foram filtrados, lavados com metanol e éter etílico, e secados sob pressão reduzida.

Os complexos **In1-In10** foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar de CHN, medidas de condutividade molar eletrolítica, espectrometria de massas de alta resolução, espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho, RMN de ^1H e $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$, análise termogravimétrica e difração de raios X de monocristal. Os dados resultantes das análises estão apresentados no Capítulo 3.

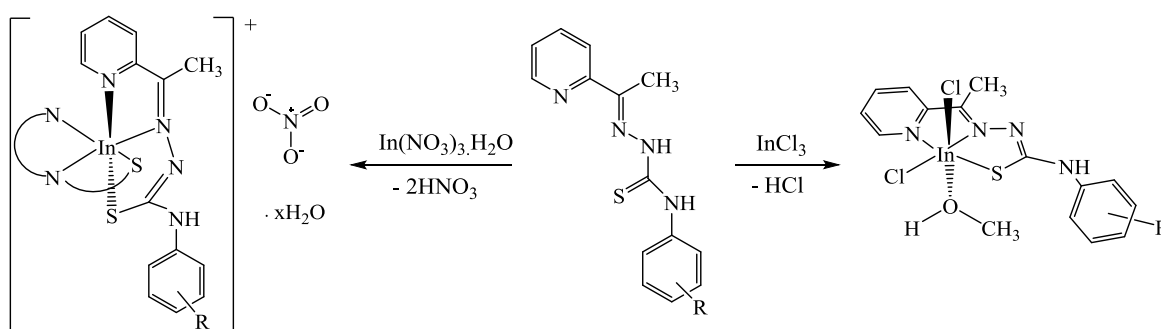


Figura 2.2. Síntese dos complexos $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ e $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ com 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas

2.4. Ativação neutrônica dos complexos de In(III)

Os complexos **In1**, **In3**, **In6** e **In9**, bem como os sais InCl_3 e $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ foram ativados neutrônicamente com a finalidade de serem obtidos os análogos radioativos ***In1**, ***In3**, ***In6**, ***In9**, $^*\text{InCl}_3$ e $^*\text{In}(\text{NO}_3)_3$. A manipulação das amostras radioativas foi

realizada exclusivamente dentro das dependências do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), conforme as orientações de segurança do Curso de Introdução à Proteção Radiológica fornecido pela instituição.

2.4.1. Processo de irradiação

As amostras dos compostos (aproximadamente 1,0 mg) foram acondicionadas em tubos de polietileno e irradiadas durante 4 horas no tubo central do reator TRIGA (*Training, Research, Isotopes, General Atomics*) MARK I IPR R-1, localizado no CDTN. O reator baseia-se na ocorrência de reações de fissão nuclear em cadeia. A fonte de nêutrons constitui-se de ^{235}U enriquecido a 20%, em que cada núcleo de ^{235}U sofre fissão produzindo 2 ou 3 nêutrons. Os nêutrons produzidos apresentam diferentes energias, o que depende do processo de termalização operado no reator, o qual possui hidreto de zircônio como moderador principal. O núcleo ainda é refrigerado por água desmineralizada, a qual serve como moderador adicional e como blindagem biológica.

As taxas médias de fluência de nêutrons térmicos e epitérmicos foram de $(28,0 \times 10^{11} \pm 4\%) \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $(26,0 \times 10^{10} \pm 4\%) \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, a 100 kW.⁹⁴ 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*). O software CANBERRA Gennie 2000 v2.0 foi utilizado para as análises espectrométricas e para o cálculo das radioatividades específicas induzidas nas amostras.

2.4.2. Controle de qualidade

As análises de pureza radioquímica de $^*\text{In}(\text{NO}_3)_3$ e dos complexos $^*\text{In6}$ e $^*\text{In9}$ foram realizadas por meio de cromatografia em papel empregando-se papel Whatman quantitativo como fase estacionária e uma solução 1% de trietilamina em metanol como fase móvel. Para as análises de $^*\text{InCl}_3$ e dos complexos $^*\text{In1}$ e $^*\text{In3}$, empregou-se cromatografia em camada delgada com sílica gel como fase estacionária e uma solução 1% de NaNO_2 em metanol como eluente. Uma gota de cada amostra foi aplicada a 1 cm da origem das tiras cromatográficas e, após a eluição, as tiras (10 cm x 2 cm) foram cortadas

⁹⁴ D.M. Zangirolami, A.H. Oliveira, A.V. Ferreira. *Braz. J. Phys.* **2010**, 40(1), 47-51.

em 10 segmentos de 1 cm cada. A radioatividade dos segmentos foi avaliada utilizando um espectrômetro de raios γ automático com cristal cintilador de NaI(Tl) (Perkin Elmer, modelo 2480). Os resultados são relatados em termos de fator de retenção (R_f).

2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

Utilizando o método de microdiluição em caldo, os ensaios biológicos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG. A metodologia empregada baseia-se nos procedimentos de referência NCCLS M27-A2 e NCCLS M7-A6, com adaptações nos meios de cultura e na concentração dos inóculos.⁹⁵

Foram usadas cepas das coleções ATCC (*American Type Culture Collection*) e CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*), sendo duas cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25923 e *Streptococcus sanguinis* - ATCC 49456); duas cepas Gram-negativas (*Escherichia coli* - ATCC 25723 e *Citrobacter freundii* - ATCC 8090); três cepas de leveduras do gênero *Candida* (*Candida albicans* - ATCC 18804; *Candida parapsilosis* - ATCC 22019 e *Candida lusitanae* - CBS 6936), bem como *Candida dubliniensis*, isolado clínico 28.

Todas as culturas foram cultivadas aerobiamente a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica (Tecnal, modelo TE-392/2). As culturas bacterianas foram crescidas em meio de cultura BHI (caldo infusão de cérebro e coração, Himedia[®]) e as leveduras foram crescidas em meio SBD (caldo sabouraud dextrose, Himedia[®]). Os meios foram preparados conforme as instruções do fabricante e autoclavados por 15 minutos sob a temperatura de 121 °C.

O preparo dos inóculos baseou-se no ajuste da concentração dos microrganismos empregando-se o espectrofotômetro SP22 (Biospectro). Para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios, a concentração de inóculo foi padronizada de forma a obter turbidez comparável à da solução padrão 0,5 da escala de McFarland, em comprimento de onda de 530 nm, o que forneceu o inóculo 2X usado no teste, sendo a suspensão de leveduras de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ UFC/mL (UFC = unidades formadoras de colônias) e a

⁹⁵ (a) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS document M7-A6, Pennsylvania, USA, 2003. (b) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. NCCLS document M27-A2, Pennsylvania, USA, 2002.

concentração bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As suspensões ajustadas foram usadas na inoculação final até 30 minutos após o preparo.

Realizou-se uma triagem inicial dos compostos na concentração de 250 µg/mL utilizando-se microplacas de 96 poços. Para isso, prepararam-se soluções trabalho dos compostos (500 µg de composto / mL de meio de cultura) diluindo-se 40 µL de soluções estoques dos compostos (12,5 mg de composto / mL de DMSO) em 960 µL de meio de cultura contendo 0,5% v/v de Tween 80%). De posse das soluções trabalho, meios de cultura, água estéril e inóculos 2X, as placas foram preparadas da seguinte forma:

(a) Placa de avaliação da atividade dos compostos (PAC):

Pipetou-se 100 µL de solução trabalho e 100 µL do inóculo 2X do microrganismo.

(b) Placa de controle dos compostos (PCC):

Pipetou-se 100 µL de solução trabalho e 100 µL de água destilada estéril.

(c) Placa do controle dos microrganismos (PCM):

Pipetou-se 100 µL do meio de cultura e 100 µL do inóculo 2X do microrganismo.

(d) Placa de controle do meio de cultura (PCMC):

Pipetou-se 100 µL do meio de cultura e 100 µL de água destilada estéril.

A concentração final de DMSO foi inferior a 2% em todos os testes para não interferir com o desenvolvimento dos microrganismos. As placas preparadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas. Uma vez que a turvação do meio é a resposta dada pelo microrganismo à presença ou ausência do agente antimicrobiano, a leitura espectrofotométrica das soluções contidas nas placas foi realizada com o auxílio de um leitor de microplacas (Thermoplate, modelo TP-READER) no comprimento de onda de 490 nm. A partir dos dados de absorbância coletados, as porcentagens de inibição foram calculadas pela seguinte relação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(A_{AC} - A_{CC}) * 100}{(A_{CM} - A_{CMC})} \quad (\text{Equação 2.1})$$

em que A_{AC} é a absorbância das soluções presentes em PAC, A_{CC} é a absorbância das soluções presentes em PCC, A_{CM} é a absorbância das soluções presentes em PCM e A_{CMC} é a absorbância das soluções presentes em PCMC.

Apenas os compostos que inibiram o crescimento microbiano em no mínimo 50% foram submetidos à determinação do parâmetro CI_{50} , expresso como sendo a concentração

do composto capaz de inibir em 50% o crescimento do microrganismo. Para a determinação de CI_{50} uma série de 12 concentrações do agente antimicrobiano (de 250 a 0,12 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliada. Os testes foram realizados em quadruplicatas e os valores de CI_{50} foram determinados graficamente através da obtenção de curvas dose-resposta. Os valores de CI_{50} foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ como a média aritmética \pm desvio padrão.

2.6. Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais

Os ensaios foram realizados no Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG em parceria com Profa. Dra. Elaine Maria de Souza-Fagundes e na Unidade de Radiobiologia do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) em colaboração com a Dra. Raquel Gouvêa dos Santos.

2.6.1. Linhagens celulares e condições de cultura

As linhagens de células tumorais avaliadas incluíram: HL-60 (leucemia mielóide), Jurkat (leucemia de linfócitos T), THP-1 (leucemia monocítica), MDA-MB 231 e MCF-7 (carcinoma mamário) e HCT-116 (carcinoma colo-retal). As linhagens celulares MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) e Vero (células renais de macaco *Cercopithecus aethiops*) foram usadas como modelos de células sadias. Todas as linhagens celulares foram mantidas em fase de crescimento logarítmico em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Gibco, NY), enriquecido com 2 mM de L-glutamina e soro fetal bovino (10% para células de leucemia, 5% para células aderentes). As culturas foram mantidas por 24 horas em uma incubadora a 37 °C sob uma atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de ar.

2.6.2. Avaliação da atividade citotóxica

As células foram inoculadas em placas de 96 poços em densidade de 50.000 células/poço para HL-60 e 100.000 células/poço para Jurkat e THP-1. Para as linhagens aderentes, foram utilizadas 10.000 células/poço. As placas foram pré-incubadas por 24 horas a 37 °C a fim de permitir a adaptação das células antes da adição dos compostos a serem testados. A triagem foi realizada com soluções dos compostos em concentração de 10 μM , contendo no máximo 0,5% de DMSO. Após a adição dos compostos, as placas

foram incubadas a 37 °C por 48 horas em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. A proliferação e a viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico empregando o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazol (MTT).

Os compostos que inibiram mais de 50% da viabilidade celular foram testados em uma série de microdiluições em concentrações variadas para a determinação do CI₅₀, parâmetro que representa a concentração do composto capaz de induzir 50% de citotoxicidade. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados baseiam-se na média de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de CI₅₀ foram determinados graficamente através da obtenção de curvas dose-resposta, sendo os resultados apresentados como a média geométrica mais o intervalo de confiança de 95%.

2.6.3. Avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT

O método MTT é um ensaio de padrão colorimétrico que mede tanto a proliferação quanto a viabilidade metabólica celular. MTT é um sal de coloração amarela que é reduzido por desidrogenases mitocondriais de células vivas, formando o formazan, um produto de coloração roxa insolúvel em água.⁹⁶ A metodologia utilizada foi descrita por Monks e colaboradores (1991)⁹⁷, com modificações.

Após 48 horas de incubação das células com os compostos, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL em solução salina) foram adicionados em cada poço. Após mais 4 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e 200 µL de uma solução 0,04 M de HCl em isopropanol foram adicionados para dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica das soluções resultantes foi medida em leitor de placas ELISA usando um comprimento de onda de 595 nm. Grupos de controle foram avaliados, incluindo testes usando DMSO (0,5% em DMEM) como controle negativo, cisplatina como controle positivo e meio de cultura na ausência de composto para avaliar sua esterilidade. Os resultados foram expressos em % de inibição celular, usando como comparação as leituras de densidade óptica na placa de controle negativo, arbitrariamente definidas como sendo 100% de viabilidade. A porcentagem de inibição celular foi calculada conforme a expressão:⁹⁸

⁹⁶ T. Mosmann. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65(2), 55-63.

⁹⁷ A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boy. *J. Natl. Cancer.* **1991**, 83, 757-766.

⁹⁸ C. Lin, L.T. Ng, F.F. Hsu, D. Shieh, L.C. Chiang. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2004**, 31, 65-69.

$$\text{inibição (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{teste}}}{A_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2.2})$$

2.6.4. Análises morfológicas

Alterações morfológicas na membrana celular foram analisadas após 48 horas de incubação por microscopia de contraste de fase (microscópio Zeiss Axionplan acoplado com câmera digital). Alterações no DNA foram detectadas mediante coloração com 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI, Sigma). DAPI é um corante fluorescente capaz de se ligar especificamente a dupla fita do DNA cromossomal.⁹⁹ Após 48 horas de incubação com o composto sob investigação, as células tumorais foram lavadas com tampão fosfato (PBS - *Phosphate buffered saline*) e fixadas em metanol 70% à temperatura ambiente por 30 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. As alterações no DNA foram observadas por microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse TS100, 385-410 nm).

2.6.5. Avaliação da geração de ROS

A geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) induzidas pelos compostos foi determinada pelo ensaio fluorimétrico empregando o reagente acetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, Sigma). DCFH-DA é um composto não-fluorescente que, após atravessar a membrana celular por difusão passiva, é hidrolisado por esterases formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Na presença de ROS, DCFH é oxidado resultando na formação da espécie fluorescente diclorofluoresceína (DCF).¹⁰⁰ Brevemente, após 24 horas de incubação com os compostos, as células foram lavadas duas vezes com 200 µL de PBS e incubadas com 10 µM de DCFH-DA em PBS, por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TS100) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente. As imagens foram analisadas usando o programa ImageJ e expressas como a porcentagem de fluorescência em relação ao controle.¹⁰¹

⁹⁹ Y. Kubota, K. Kubota, S. Tani. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2000**, 44(1), 53-54.

¹⁰⁰ A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, P.R. Costa, R.G. dos Santos, H. Beraldo. *Molecules* **2014**, 19(11), 17202-17220.

¹⁰¹ C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri. *Nat. Methods* **2012**, 9, 671-675.

2.7. Estudos de interações não-covalentes com alvos biológicos

2.7.1. Interação com a albumina sérica humana

Uma solução estoque contendo 1,92 μM de HSA (Sigma-Aldrich) foi preparada em solução tampão (5 mM Tris-HCl / 50 mM de NaCl, pH 7,2), armazenada à 0 - 4 °C e usada dentro de uma semana. A concentração de proteína foi determinada por medidas de densidade óptica, utilizando-se 35353 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ como sendo o valor do coeficiente de absorvidade molar em 280 nm.¹⁰²

Brevemente, um volume exato de 3,0 mL da solução de HSA foi titulada com adições sucessivas do composto investigado (100 μM , solução estoque em DMSO). A cada adição, a solução foi agitada e deixada em repouso por 5 minutos à correspondente temperatura experimental (293K, 298K e 308K). Em seguida, as intensidades de fluorescência foram medidas utilizando-se 295 nm como comprimento de onda de excitação e a emissão foi registrada na faixa de 310-550 nm. A intensidade da emissão a 340 nm foi utilizada para calcular a constante de ligação (K_b). A concentração final típica dos compostos em solução foi de 2,5 μM .

Em todos os experimentos, a quantidade de DMSO foi mantida menor que 3% (em volume). Nas condições experimentais adotadas, as absorbâncias em 340 nm das soluções de HSA e dos compostos avaliados são baixas ($< 0,02$). Além disso, os compostos avaliados não apresentam fluorescência abaixo de 400 nm. Dessa forma, os efeitos de filtro interno puderam ser negligenciados.¹⁰³

2.7.2. Interação com o ácido desoxirribonucleico

Solução estoque de 100 μM de DNA extraído do timo de vitelo (Sigma-Aldrich) foi preparada em solução tampão (5 mM Tris-HCl / 50 mM de NaCl, pH 7,2), sendo a concentração de nucleotídeos determinada a partir de medidas de densidade óptica, utilizando-se 6600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ como sendo o valor do coeficiente de absorvidade molar em 260 nm.¹⁰⁴ Solução estoque contendo 10 μM de brometo de etídio (BE, Sigma-Aldrich) foi preparada em água deionizada e armazenada a 0 - 4 °C no escuro.

¹⁰² A. Ray, B.K. Seth, U. Pal, S. Basu. *Spectrochim. Acta A* **2012**, 92, 164-174.

¹⁰³ M. Kubista, R. Sjoback, S. Ericksson, B. Albinsson. *Analyst* **1994**, 119, 417-419.

¹⁰⁴ M.E. Reichmann, S.A. Rice, C.A.P. Doty. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76(11), 3047-3053.

Experimentos de titulação espectrofotométrica foram realizados à temperatura ambiente e registrados na faixa de 240-500 nm. Uma porção de 2,0 mL da solução do composto a ser avaliado (30 μ M, solução contendo 3% de DMSO em tampão Tris-HCl) foi titulada por adições sucessivas da solução de DNA até a proporção molar final de 1:1 entre as concentrações de composto e nucleotídeos. A cada adição, a solução foi agitada e mantida em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente antes de ser obtido o espectro.

Experimentos de intercalação competitiva foram realizados a 293K empregando-se brometo de etídio (BE). Uma solução trabalho contendo 2 μ M de DNA e 1,26 μ M de BE foi preparada em solução tampão (5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl, pH = 7,2). Durante o experimento, um volume de 2,0 mL da solução DNA-BE foi titulado com repetidas alíquotas do composto a ser avaliado (2,0 mM, solução estoque em DMSO) e após 5 minutos as leituras da fluorescência foram registradas. A intensidade de fluorescência em 595 nm (excitação em 546 nm) foi medida em função da concentração do composto.¹⁰⁵ O experimento foi realizado até a fluorescência atingir 20 - 40% da intensidade inicial.

2.8. Cálculos teóricos

Os cálculos computacionais foram realizados pelo professor Dr. William Ricardo Rocha, do Departamento de Química da UFMG. As energias estruturais mínimas dos complexos **In1-In4** foram obtidas por meio da Teoria do Funcional de Densidade (DFT - *Density Functional Theory*),¹⁰⁶ empregando o funcional híbrido B3LYP¹⁰⁷ e usando a base de Ahlrich conhecida como *all-eletron* 3- ζ de polarização de valência (TZVP – *triple zeta valence polarization*).¹⁰⁸ Efeitos relativísticos escalares foram tratados usando o formalismo da aproximação regular de ordem zero (ZORA - *Zeroth Order Regular Approximation*).¹⁰⁹ Para acelerar os cálculos foi utilizada a resolução da identidade para a Coulomb¹¹⁰ e a abordagem cadeia de esfera¹¹¹ para a parte de troca da matriz Fock. Para

¹⁰⁵ T.C. Jenkins. Optical absorbance and fluorescence techniques for measuring DNA-drug interactions. In: Fox, K.R.(Ed.). *Drug-DNA interaction protocols*. Vol.90. Totowa: Humana Press, 1997. p. 195-218.

¹⁰⁶ R.G. Parr, W. Yang. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecule*. Oxford University Press: Oxford, 1989.

¹⁰⁷ (a) A.D. Becke. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98(7), 5648-5652; (b) C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr. *Phys. Rev. B* **1988**, 37(2), 785-789.

¹⁰⁸ F. Weigend, R. Ahlrichs. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7(18), 3297-3305.

¹⁰⁹ (a) E. van Lenthe, E.J. Baerends, J.G. Snijders. *J. Chem. Phys.* **1993**, 99(6), 4597-4610; (b) E. van Lenthe, E.J. Baerends, J.G. Snijders. *J. Chem. Phys.* **1994**, 101(11), 9783-9792; (c) E. van Lenthe, R. van Leeuwen, E.J. Baerends, J.G. Snijders, *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, 57(3), 281-293.

¹¹⁰ F. Neese, *J. Comput. Chem.* **2003**, 24(11), 1740-1747.

¹¹¹ F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, U. Becker. *Chem. Phys.* **2009**, 356(3), 98-109.

ambas as abordagens, o conjunto de bases auxiliares TZVP/J foi usado.¹¹² As estruturas cristalinas foram utilizadas como estruturas iniciais para as otimizações de geometria.

A energia livre de Gibbs ($\Delta G_{r(solv)}$) envolvida nas reações de troca de ligantes em solução foram calculadas conforme a Equação 2.3:

$$\Delta G_{r(solv)} = \Delta E_{r(g)} + \Delta \Delta G_{solv} \quad (\text{Equação 2.3})$$

em que $\Delta E_{r(g)}$ é a diferença de energia interna calculada em fase gasosa no nível de teoria B3LYP/TZVP e $\Delta \Delta G_{solv}$ é a diferença de energia livre de Gibbs de solvatação obtida com o modelo SMD,¹¹³ conforme implementado no programa ORCA,¹¹⁴ em que a contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação é obtida usando o modelo teórico COSMO (*Conductor-like Screening Model*) de Klamt.¹¹⁵

As energias dos orbitais moleculares de fronteira HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) e os momentos de dipolo molecular foram obtidos após uma completa otimização das geometrias dos compostos e foram usados como descritores para estudos de SAR (*Structure Activity Relationship*). Todos os cálculos de mecânica quântica foram realizados com o programa ORCA.¹¹⁴ As áreas superficiais e os volumes moleculares usados como descritores nas análises de SAR foram obtidos com a rotina *spacefill* do programa Tinker,¹¹⁶ empregando os parâmetros de campo de força MM2.¹¹⁷ Os coeficientes de partição octanol-água (log P) foram obtidos com o programa ALOGPS.¹¹⁸

¹¹² F. Weigend, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8(9), 1057-1065.

¹¹³ A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113(18), 6378-6396.

¹¹⁴ F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* **2012**, 2(1), 73-78.

¹¹⁵ A. Klamt, G. Schuurmann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2.* **1993**, 5, 799-805.

¹¹⁶ TINKER - Software Tools for Molecular Design, 7.1; Jay Ponder Laboratory, Department of Chemistry, Washington University: St. Louis, **2015**.

¹¹⁷ N.L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99(25), 8127-8134.

¹¹⁸ (a) I. V. Tetko, *Drug Discovery Today*, **2005**, 10(22), 1497-1500; (b) I.V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V.A. Palyulin, E.V. Radchenko, A.S. Makarenko, V.Y. Tanchuk, V.V. Prokopenko, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2005**, 19(6), 453-463; (c) VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>, acessado em agosto de 2016.

CAPÍTULO 3. COMPLEXOS BIOATIVOS DE In(III) COM
2-ACETILPIRIDINA-N(4)-FENIL TIOSSEMICARBAZONAS

Neste capítulo foram estudados dez novos compostos de In(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, sendo quatro complexos neutros do tipo $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**In1-In4**) e seis sais do tipo $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ (**In5-In10**). As estruturas propostas são apresentadas na Figura 3.1.

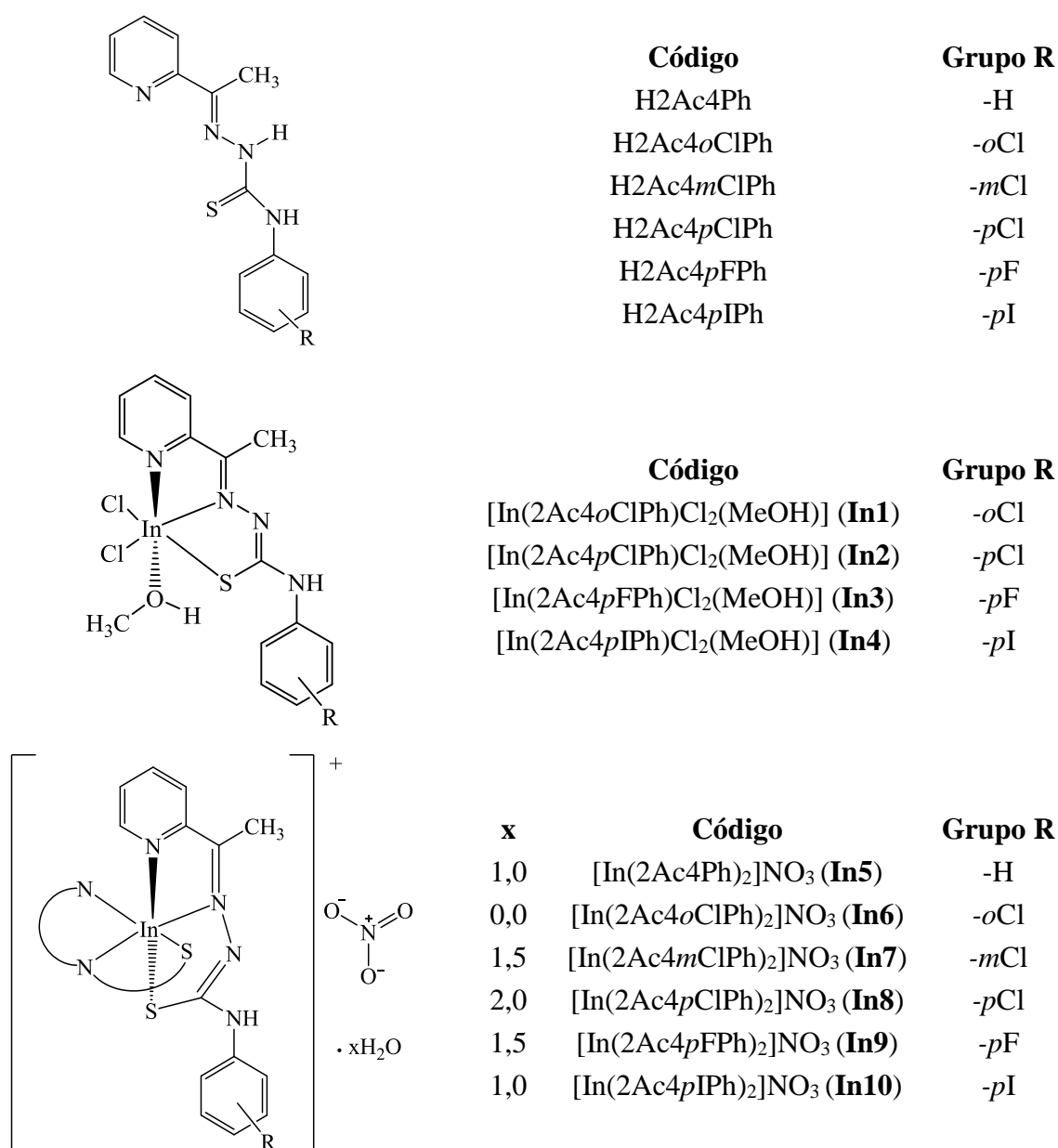


Figura 3.1. Estruturas químicas das tiossemicarbazonas (H2Ac4Ph, H2Ac4oClPh, H2Ac4mClPh, H2Ac4pClPh, H2Ac4pFPh e H2Ac4pIPh) e dos compostos de In(III) derivados das tiossemicarbazonas (**In1-In10**)

Todos os compostos sintetizados, incluindo as tiosemicarbazonas precursoras, que não são inéditas, tiveram a atividade citotóxica avaliada frente a algumas células de leucemia e tumores sólidos. Adicionalmente, para os complexos **In1-In4**, foram realizados ensaios de avaliação da ação antimicrobiana, ensaios de interação não covalente com alvos biológicos (HSA e DNA), estudos de relação estrutura-atividade biológica, bem como cálculos teóricos que permitiram a indubitável caracterização estrutural.

3.1. Caracterização dos compostos

Os compostos de In(III) são sólidos amarelos, estáveis quando armazenado à temperatura ambiente (verificado no período de 1 ano), estáveis em soluções aquosas. Conforme apresentado na Tabela 3.1, para os compostos $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**In1-In4**), os baixos valores de condutividade molar eletrolítica (Λ_M) e as análises elementares de CHN sugerem a formação de espécies neutras contendo um átomo de índio, uma molécula de tiosemicarbazona na forma desprotonada, dois ligantes cloreto e uma molécula de metanol.

Para os compostos $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ (**In5-In10**), os valores de condutividade molar eletrolítica (Λ_M) sugerem a existência de eletrólitos do tipo 1:1. As microanálises concordam com a formação de espécies contendo um átomo de índio, duas moléculas de ligante em sua forma aniônica e um íon nitrato, o qual estaria presente como contra íon. A formação de espécies catiônicas $[\text{InL}_2]^+$ foi confirmada com análises de espectrometria de massas de alta resolução, em que foram observados picos com valores de m/z no modo positivo com erros relativos inferiores a 4 ppm em relação ao valor esperado. Exceto para o composto **In6**, curvas termogravimétricas apontam a existência de moléculas de água de hidratação.

Tabela 3.1. Rendimento, temperatura de fusão, análise elementar de CHN, análise termogravimétrica, massa molar, condutividade molar eletrolítica e dados de ESI-MS dos compostos **In1-In10**.

Composto	Rendimento (%)	Temperatura de fusão (°C)	Análise elementar ^a			TG (%) ^{a,b}	MM (g mol ⁻¹)	Λ_M (S mol ⁻¹ cm ²)	ESI-MS (m/z) ^a
			% C	% H	% N				
[In(2Ac4 <i>o</i> ClPh)Cl ₂ (MeOH)] (In1)	90,1	231,4 – 232,5	34,50 (34,54)	2,95 (3,09)	10,93 (10,74)	-	521,56	6,16	-
[In(2Ac4 <i>p</i> ClPh)Cl ₂ (MeOH)] (In2)	88,3	264,8 – 265,7	34,77 (34,54)	3,11 (3,09)	10,82 (10,74)	-	521,56	7,04	-
[In(2Ac4 <i>p</i> FPh)Cl ₂ (MeOH)] (In3)	87,6	250,5 – 252,0	35,66 (35,67)	3,12 (3,19)	11,27 (11,09)	-	505,10	6,60	-
[In(2Ac4 <i>p</i> IPh)Cl ₂ (MeOH)] (In4)	92,8	254,1 – 254,7	29,07 (29,39)	2,55 (2,63)	9,17 (9,14)	-	613,01	6,20	-
[In(2Ac4Ph) ₂]NO ₃ (In5)	80,5	202,5 – 204,2	45,22 (45,85)	3,99 (3,85)	17,33 (17,19)	2,59 (2,46)	733,53	68,20	653,0751 (653,0761)
[In(2Ac4 <i>o</i> ClPh) ₂]NO ₃ (In6)	87,2	166,8 – 168,3	42,57 (42,87)	3,06 (3,08)	16,11 (16,07)	-	784,40	71,72	721,0008 (720,9981)
[In(2Ac4 <i>m</i> ClPh) ₂]NO ₃ (In7)	79,9	177,6 decomposição	41,94 (41,45)	3,39 (3,35)	15,58 (15,54)	3,66 (3,33)	811,43	67,32	720,9988 (720,9981)
[In(2Ac4 <i>p</i> ClPh) ₂]NO ₃ (In8)	76,4	189,0 decomposição	40,80 (40,99)	3,55 (3,44)	15,54 (15,37)	4,32 (4,39)	820,43	67,40	720,9994 (720,9981)
[In(2Ac4 <i>p</i> FPh) ₂]NO ₃ (In9)	72,7	184,9 – 186,1	42,63 (43,20)	3,52 (3,50)	16,22 (16,19)	3,70 (3,47)	778,52	69,08	689,0599 (689,0572)
[In(2Ac4 <i>p</i> IPh) ₂]NO ₃ (In10)	81,8	261,8 – 263,6	34,13 (34,13)	2,67 (2,66)	12,96 (12,79)	1,72 (1,83)	985,32	69,96	904,8712 (904,8693)

^a Valores teóricos entre parêntesis.

^b As análises termogravimétricas indicam a perda de moléculas de água de hidratação. Para os compostos **In1-In4** a análise não foi realizada, ao passo que para o composto **In6** nenhuma perda de água foi verificada.

Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho

Conforme apresentado na Tabela 3.2, os espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas apresentam três importantes características: o modo vibracional $\nu(\text{C}=\text{N})$ é observado próximo a 1582 cm^{-1} ; entre $3218\text{-}3320\text{ cm}^{-1}$ são observadas duas bandas correspondentes a $\nu(\text{N3-H})$ e $\nu(\text{N4-H})$; o modo vibracional $\nu(\text{C}=\text{S})$ é observado entre $783\text{-}826\text{ cm}^{-1}$.

Após a coordenação da tiossemicarbazona ao metal observou-se o deslocamento da banda referente a $\nu(\text{C}=\text{S})$ para menor energia, um indício da coordenação do ligante ao metal na forma de tiolato.¹¹⁹ Essa proposta concorda com o desaparecimento do modo vibracional $\nu(\text{N3-H})$ em todos os espectros. Adicionalmente, o estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ desloca-se com a complexação para maiores energias ($1586\text{-}1602\text{ cm}^{-1}$), sugerindo a coordenação do metal pelo nitrogênio imínico. Observa-se ainda o deslocamento da banda correspondente ao modo de deformação do anel piridínico no plano situada entre $620\text{-}622\text{ cm}^{-1}$ nos ligantes livres para $643\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, o que está de acordo com a participação do nitrogênio piridínico na ligação. Portanto, as alterações sugerem que as tiossemicarbazonas coordenam-se ao centro metálico de forma tridentada, através do sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imina}}\text{-S}$.

Tabela 3.2. Número de onda (cm^{-1}) das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho das tiossemicarbazonas e dos compostos de In(III) ^a

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{NO}_3^-)$	$\nu(\text{O-H})$
H2Ac4Ph	3300, 3240	1588	800	620	-	-
H2Ac4oClPh	3320, 3310	1582	808	620	-	-
H2Ac4mClPh	3292, 3218	1581	826	620	-	-
H2Ac4pClPh	3292, 3230	1582	802	620	-	-
H2Ac4pFPh	3300, 3247	1582	825	622	-	-
H2Ac4pIPh	3294, 3232	1581	783	621	-	-
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)] In1	3380	1592	774	648	-	3390
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)] In1	3365	1594	770	646	-	3342
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)] In3	3365	1601	777	648	-	3329
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)] In4	3358	1586	771	648	-	3367
[In(2Ac4Ph) ₂]NO ₃ In5	3246	1600	766	644	1384	3300 - 3550
[In(2Ac4oClPh) ₂]NO ₃ In6	3369	1591	781	646	1384	-
[In(2Ac4mClPh) ₂]NO ₃ In7	3253	1596	771	646	1384	3320 - 3600
[In(2Ac4pClPh) ₂]NO ₃ In8	3265	1596	778	650	1387	3350 - 3550
[In(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ In9	3254	1602	781	643	1384	3350 - 3600
[In(2Ac4pIPh) ₂]NO ₃ In10	3250	1600	771	647	1385	3300 - 3600

^a Método de transmitância e janela de KBr

¹¹⁹ T.S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 977-1055.

Para os compostos **In1-In4** a presença do modo vibracional $\nu(\text{O-H})$ indica que o metanol encontra-se na forma protonada. Similar aos compostos sintetizados, tiossemicarbazonas de In(III) com fórmulas estruturais $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ ou $[\text{In}(\text{L})\text{Br}_2(\text{MeOH})]$ encontram-se relatadas na literatura, sendo que a formação de um complexo neutro hexa-coordenado de In(III) contendo uma molécula de metanol coordenada foi confirmada por dados espectroscópicos e cristalográficos.¹²⁰

Nos compostos $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$, exceto para **In6**, uma absorção larga na região de 3300-3600 cm^{-1} foi atribuída à vibração $\nu(\text{O-H})$, referente à presença de moléculas de água de hidratação, o que foi confirmado pela perda de água na análise termogravimétrica na faixa de temperaturas de 30 °C - 100 °C. Além disso, para esses compostos a presença de nitrato na forma de contra íon foi confirmada pela observação do modo vibracional $\nu(\text{NO}_3^-)$ na região de 1384-1387 cm^{-1} .¹²¹

Para exemplificar as alterações espectrais discutidas, na Figura 3.2 são apresentados os espectros dos complexos $[\text{In}(\text{2Ac4oCIPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**In1**) e $[\text{In}(\text{2Ac4oCIPh})_2]\text{NO}_3$ (**In6**) em comparação ao espectro da tiossemicarbazona precursora $\text{H}_2\text{Ac4oCIPh}$.

¹²⁰ (a) S. Abram, C. Mossmer-Maichle, U. Abram. *Polyhedron* **1998**, 17(1), 131-143; (b) J. Chan, A.L. Thompson, M.W. Jones, J.M. Peach. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, 363(6), 1140-1149; (c) A. Molter, F. Mohr. *Dalton Trans.* **2011**, 40(14), 3754-3758.

¹²¹ K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., **2009**.

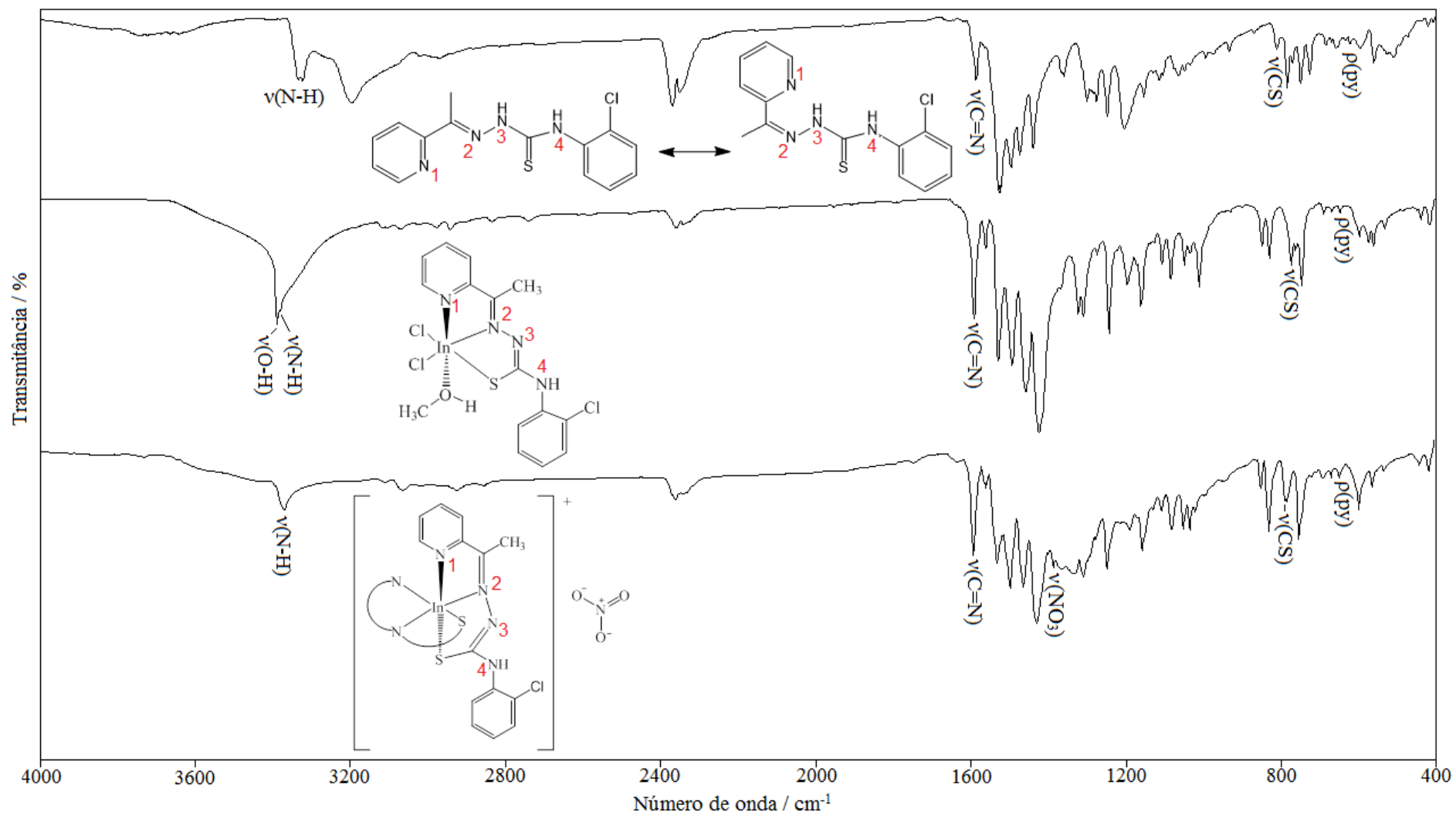


Figura 3.2. Espectros vibracionais dos compostos [In(2Ac₄oClPh)Cl₂(MeOH)] (**In1**), [In(2Ac₄oClPh)₂]NO₃ (**In6**) e do ligante precursor H₂Ac₄oClPh.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

São representados abaixo os esquemas de numeração das tiossemicarbazonas e dos compostos de In(III) empregados nas atribuições dos sinais.

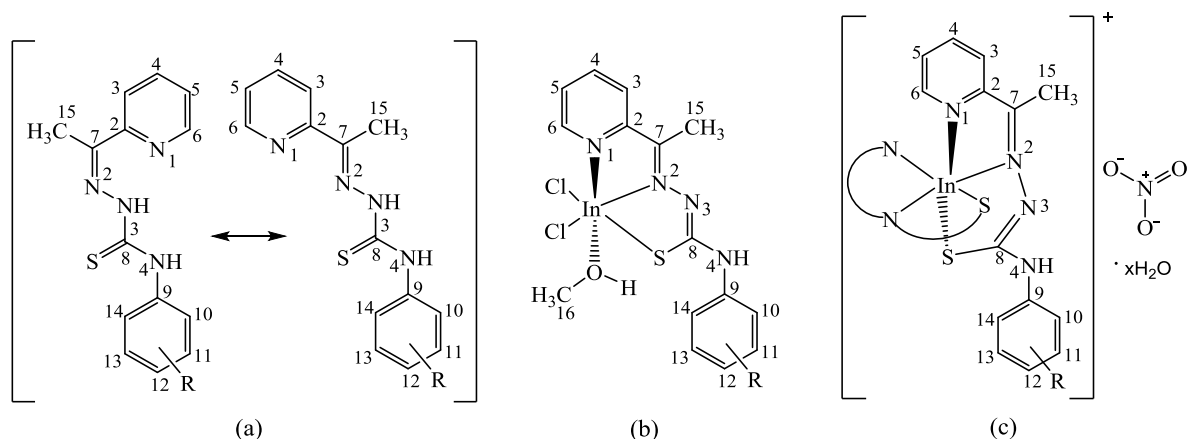


Figura 3.3. Numeração de (a) tiossemicarbazonas; (b) complexos do tipo $[In(L)Cl_2(MeOH)]$ e (c) complexos do tipo $[InL_2]NO_3$ utilizada na atribuição dos sinais no RMN de 1H e $^1H\{^{13}C\}$.

Nos espectros de RMN de 1H das tiossemicarbazonas foram observados sinais duplicados, o que corresponde à mistura dos estereoisômeros *E* (89-96 %) e *Z* (11-4 %). Para N3-H são observados sinais próximos a 11 e 13 ppm: o primeiro é característico da configuração *E*, em que N3-H forma ligação de hidrogênio com o solvente, ao passo que o segundo corresponde a configuração *Z*, em que N3-H forma ligação de hidrogênio com o nitrogênio piridínico.¹²² Nos espectros de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ os sinais não aparecem duplicados devido à baixa concentração do isômero *Z* em solução.

Nos espectros de RMN de 1H e $^{13}C\{^1H\}$ dos compostos **In1-In10** somente um sinal foi observado para cada núcleo magneticamente diferente. A ausência do sinal N3-H no RMN de 1H indica a coordenação da tiossemicarbazona na forma aniônica. Conforme apresentado na Figura 3.4, os sinais de todos os hidrogênios tiveram significantes deslocamentos em relação à posição nos ligandos livres.

¹²² (a) J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Silva, M.A. Soares, R.G. dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45(12), 5671–5677; (b) 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.I. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20(11), 3396–3409.

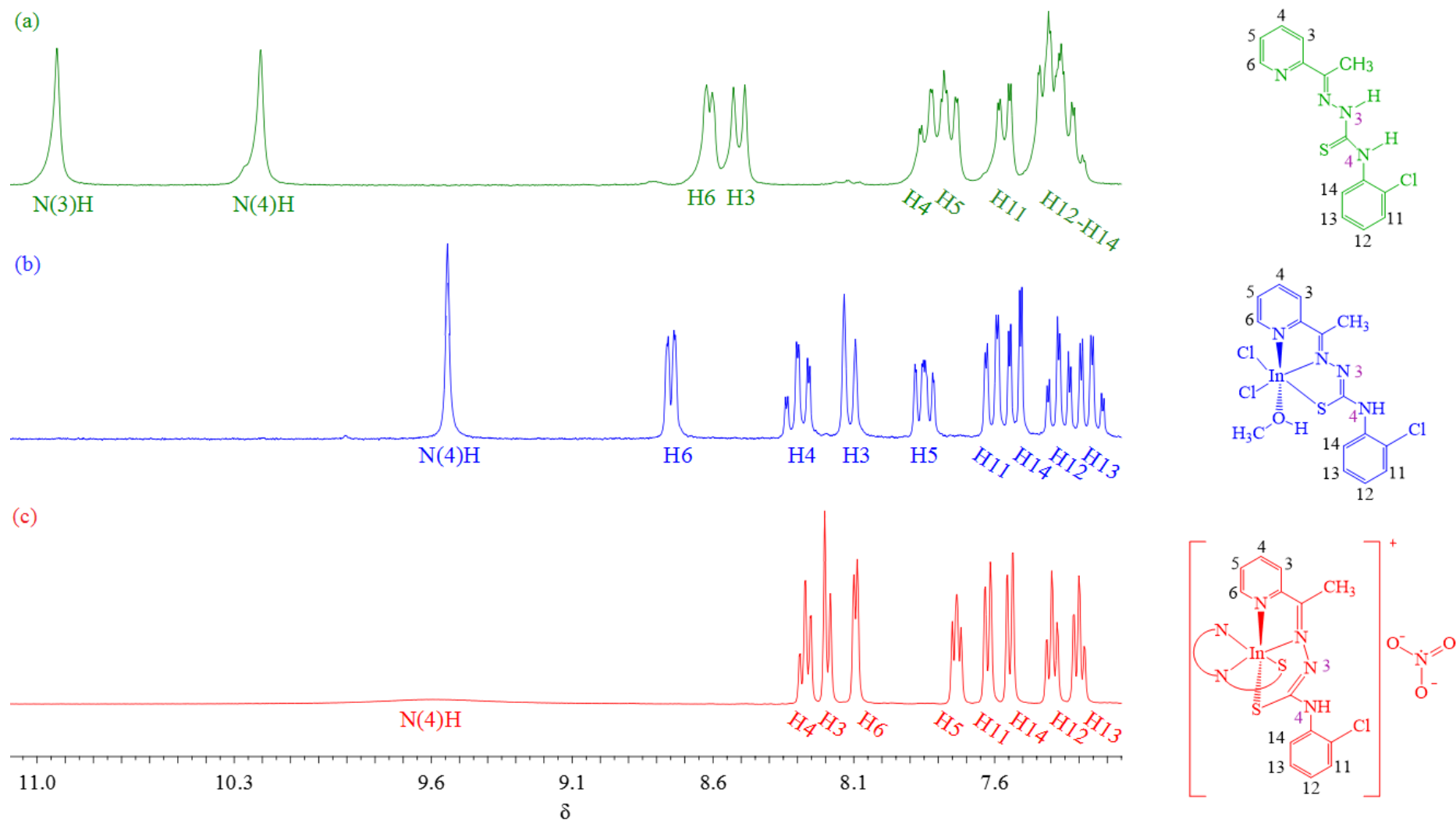


Figura 3.4. Espectros de RMN de ^1H de (a) $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$; (b) $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**In1**) e (c) $[\text{In}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})_2]\text{NO}_3$ (**In6**) ($\text{DMSO}-d_6$).

De forma similar, conforme apresentado na Figura 3.5, os sinais correspondentes a C=N (C7), C=S (C8) e aos núcleos de carbono do anel piridínico tiveram significantes deslocamentos, indicando a coordenação das tiossemicarbazonas através de um sistema quelante N_{py}-N_{imina}-S em que os ligantes adotam uma configuração *EE* em torno das ligações C7=N e C8=N. Adicionalmente, a presença de uma molécula de metanol nos complexos **In1-In4** é suportada pela presença de um duplete em δ 3,17 ppm e um quarteto em δ 4,11 ppm para **In1** (singletos para **In2-In4**) no espectro de RMN de ^1H e uma ressonância em δ 48,6 ppm no espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$.

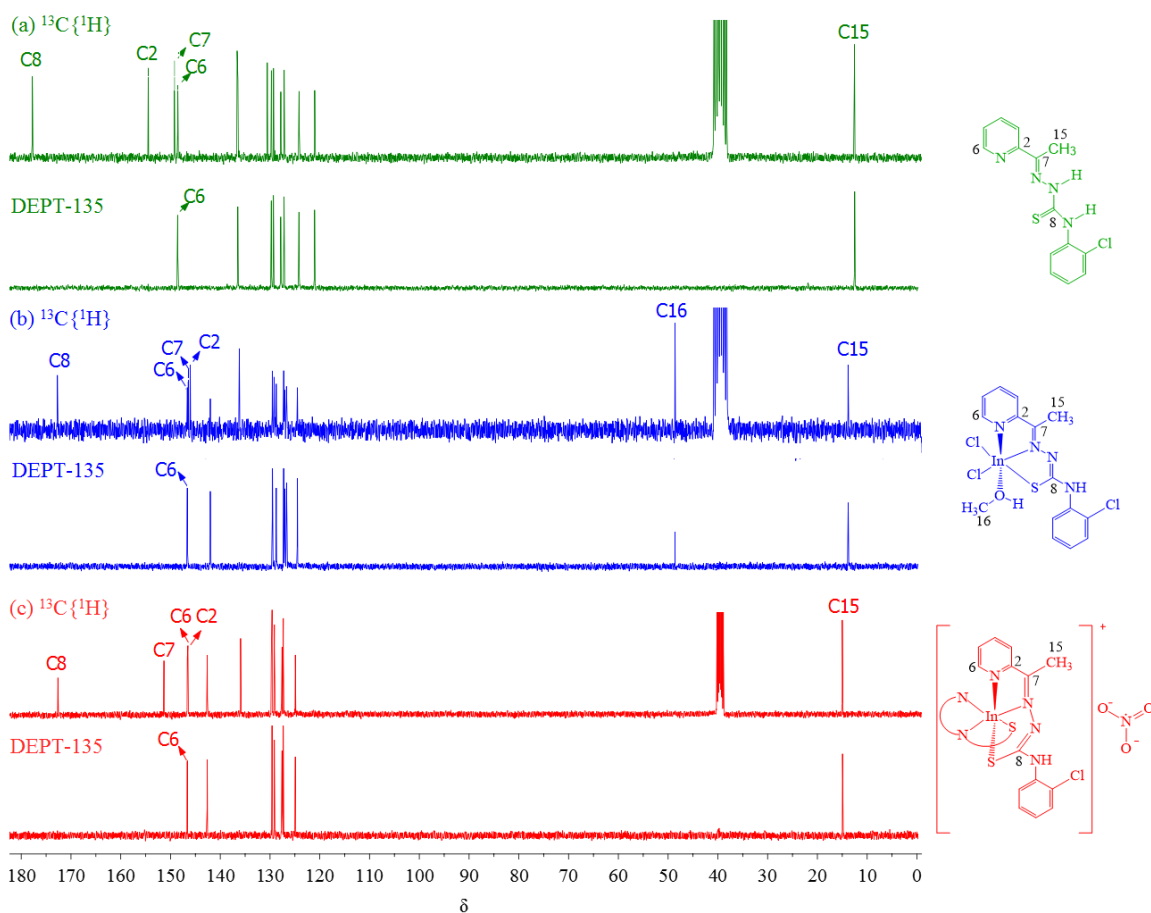


Figura 3.5. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135 de (a) H2Ac4oClPh; (b) [In(2Ac4oClPh)Cl₂(MeOH)] (**In1**) e (c) [In(2Ac4oClPh)₂]NO₃ (**In6**) (DMSO-*d*₆).

A seguir são mostradas as atribuições de todos os sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos compostos **In1-In4** (Tabela 3.3) e **In5-In10** (Tabela 3.4). Essas atribuições são corroboradas pela observação de correlações homonucleares $^3J_{\text{H-H}}$ e heteronucleares $^1J_{\text{H-}^{13}\text{C}}$ nos mapas de contornos COSY e HMQC, respectivamente, conforme os exemplos mostrados nas Figuras 3.6 e 3.7 para o composto **In6**.

Tabela 3.3. Atribuições, número de hidrogênios (n), deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades ^a e constantes de acoplamento (*J* / Hz) dos sinais de RMN de ¹H (acima), atribuições, deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades e constantes de acoplamento (*J* / Hz) dos sinais de RMN de ¹³C{¹H} e DEPT 135 (abaixo) dos compostos [In(L)Cl₂MeOH] (400 MHz, DMSO-*d*₆).

Atribuição	n	In1	In2	In3	In4
H3	1	8,11 (d, <i>J</i> = 7,9)	8,24 (d, <i>J</i> = 8,0)	8,21 (d, <i>J</i> = 8,0)	8,23 (d, <i>J</i> = 8,0)
H4	1	8,29 (td, <i>J</i> = 7,9; 1,6)	8,34 (td, <i>J</i> = 7,9; 1,4)	8,32 (td, <i>J</i> = 7,9; 1,6)	8,33 (td, <i>J</i> = 7,9; 1,4)
H5	1	7,85 (ddd, <i>J</i> = 7,4; 5,2; 0,9)	7,89 (dd, <i>J</i> = 7,0; 5,7)	7,88 (ddd, <i>J</i> = 7,5; 5,2; 0,9)	7,89 (dd, <i>J</i> = 6,9; 5,7)
H6	1	8,75 (dd, <i>J</i> = 5,1; 0,9)	8,79 (d, <i>J</i> = 5,0)	8,79 (dd, <i>J</i> = 5,1; 0,9)	8,79 (d, <i>J</i> = 4,4)
H10	1	---	7,39 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,77 – 7,81 (m)	7,63 (d, <i>J</i> = 8,9)
H11	1	7,61 (dd, <i>J</i> = 7,9; 1,6)	7,82 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,16 – 7,20 (m)	7,67 (d, <i>J</i> = 8,9)
H12	1	7,37 (td, <i>J</i> = 7,6; 1,7)	---	---	---
H13	1	7,26 (td, <i>J</i> = 7,6; 1,7)	7,82 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,16 – 7,20 (m)	7,67 (d, <i>J</i> = 8,9)
H14	1	7,53 (dd, <i>J</i> = 7,8; 1,5)	7,39 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,77 – 7,81 (m)	7,63 (d, <i>J</i> = 8,9)
H15	3	2,47 (s)	2,66 (s)	2,65 (s)	2,66 (s)
H16	3	3,17 (d, <i>J</i> = 5,3)	3,17 (s)	3,17 (s)	3,17 (s)
-OH	1	4,11 (q, <i>J</i> = 5,3)	4,11 (s)	4,11 (s)	4,11 (s)
N(4)H	1	9,55 (s)	10,12 (s)	10,04 (s)	10,08 (s)
Atribuição	DEPT ^{b,c}				
C2	-	146,0	145,8	145,9	145,8
C3	↑	124,5	124,8	124,7	124,8
C4	↑	141,9	142,0	142,0	142,0
C5	↑	126,6	126,9	126,8	126,9
C6	↑	146,6	146,7	146,6	146,7
C7	-	146,4	147,8	147,1	147,8
C8	-	172,7	170,3	170,4	170,3
C9	-	136,1	139,0	136,5 (d, <i>J</i> = 2,3)	139,9
C10	↑	129,1	128,4	122,8 (d, <i>J</i> = 7,7)	123,1
C11	↑	128,7	122,4	115,1 (d, <i>J</i> = 22,2)	137,2
C12	↑	127,2	126,3	157,8 (d, <i>J</i> = 240,2)	86,2
C13	↑	127,0	122,4	115,1 (d, <i>J</i> = 22,2)	137,2
C14	↑	129,5	128,4	122,8 (d, <i>J</i> = 7,7)	123,1
C15	↑	13,8	14,6	14,5	14,6
C16	↑	48,6	48,6	48,6	Não observado

^a s = simpleto; d = duplete; q = quarteto; dd = duplo duplete; ddd = duplo duplo duplete; td = triplo duplete; m = multiplete.

^b Não há sinal no DEPT para C10 em **In1** e para C12 em **In2**, **In3** e **In4**.

^c ↑ representa o símbolo convenção no DEPT 135 para CH e CH₃.

Tabela 3.4. Atribuições, número de hidrogênios (n), deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades ^a e constantes de acoplamento (*J* / Hz) dos sinais de RMN de ¹H (acima), atribuições, deslocamentos químicos (ppm), multiplicidades e constantes de acoplamento (*J* / Hz) dos sinais de RMN de ¹³C{¹H} e DEPT 135 (abaixo) dos compostos [InL₂]NO₃ (400 MHz, DMSO-*d*₆).

Atribuição	n	In5	In6	In7	In8	In9	In10
H3	1	8,26 – 8,31 (m)	8,19 (d, <i>J</i> = 8,0)	8,29 – 8,35 (m)	8,27 – 8,34 (m)	8,26 – 8,32 (m)	8,27 – 8,33 (m)
H4	1	8,26 – 8,31 (m)	8,27 (td, <i>J</i> = 7,9; 1,2)	8,29 – 8,35 (m)	8,27 – 8,34 (m)	8,26 – 8,32 (m)	8,27 – 8,33 (m)
H5	1	7,71 – 7,74 (m)	7,73 (dd, <i>J</i> = 6,4; 5,9)	7,73 – 7,76 (m)	7,71 – 7,74 (m)	7,71 – 7,74 (m)	7,71 – 7,73 (m)
H6	1	8,14 (d, <i>J</i> = 5,0)	8,09 (d, <i>J</i> = 4,7)	8,17 (d, <i>J</i> = 5,1)	8,14 (d, <i>J</i> = 5,0)	8,13 (d, <i>J</i> = 5,1)	8,14 (d, <i>J</i> = 4,9)
H10	1	7,82 (d, <i>J</i> = 8,0)	---	8,15 (s)	7,44 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,81 – 7,85 (m)	7,66 (d, <i>J</i> = 8,7)
H11	1	7,38 (app t, <i>J</i> = 7,9)	7,62 (dd, <i>J</i> = 7,8; 1,0)	---	7,85 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,21 – 7,26 (m)	7,72 (d, <i>J</i> = 8,7)
H12	1	7,09 (t, <i>J</i> = 7,4)	7,40 (td, <i>J</i> = 7,6; 1,2)	7,68 (d, <i>J</i> = 8,0)	---	---	---
H13	1	7,38 (app t, <i>J</i> = 7,9)	7,30 (td, <i>J</i> = 7,9; 1,4)	7,40 (t, <i>J</i> = 8,1)	7,85 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,21 – 7,26 (m)	7,72 (d, <i>J</i> = 8,7)
H14	1	7,82 (d, <i>J</i> = 8,0)	7,55 (dd, <i>J</i> = 7,9; 1,0)	7,13 – 7,16 (m)	7,44 (d, <i>J</i> = 8,9)	7,81 – 7,85 (m)	7,66 (d, <i>J</i> = 8,7)
H15	3	2,87 (s)	2,66 (s)	2,89 (s)	2,86 (s)	2,85 (s)	2,87 (s)
N(4)H	1	10,22 (s)	9,61 (s)	10,38 (s)	10,32 (s)	10,22 (s)	10,22 (s)
Atribuição	DEPT ^{b,c}						
C2	-	146,4	146,5	146,3	146,3	146,4	146,3
C3	↑	125,1	124,9	125,4	125,3	125,2	125,3
C4	↑	142,6	142,6	142,7	142,7	142,7	142,7
C5	↑	127,9	127,7	128,2	128,1	128,0	128,0
C6	↑	146,8	146,6	147,0	146,9	146,8	146,8
C7	-	152,2	151,3	153,5	152,8	152,3	153,0
C8	-	169,8	172,6	169,8	169,7	169,8	169,6
C9	-	139,8	135,9	141,2	138,7	136,2 (d, <i>J</i> = 2,7)	139,6
C10	↑	121,4	129,7	120,8	128,5	123,2 (d, <i>J</i> = 7,7)	123,4
C11	↑	128,6	129,1	132,9	122,8	115,2 (d, <i>J</i> = 22,2)	137,3
C12	↑	123,3	127,3	119,3	126,8	158,1 (d, <i>J</i> = 241,3)	86,9
C13	↑	128,6	127,6	130,3	122,8	115,2 (d, <i>J</i> = 22,2)	137,3
C14	↑	121,4	129,6	122,7	128,5	123,2 (d, <i>J</i> = 7,7)	123,4
C15	↑	15,8	15,0	15,9	15,9	15,8	15,9

^a s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; dd = duplo duplete; td = triplo duplete; m = multiplete; app t = duplo duplete com aparência de tripleto.

^b Não há sinal no DEPT para C10 em **In6**, para C11 em **In7** e para C12 em **In8**, **In9** e **In10**.

^c ↑ representa o símbolo convenção no DEPT 135 para CH e CH₃.

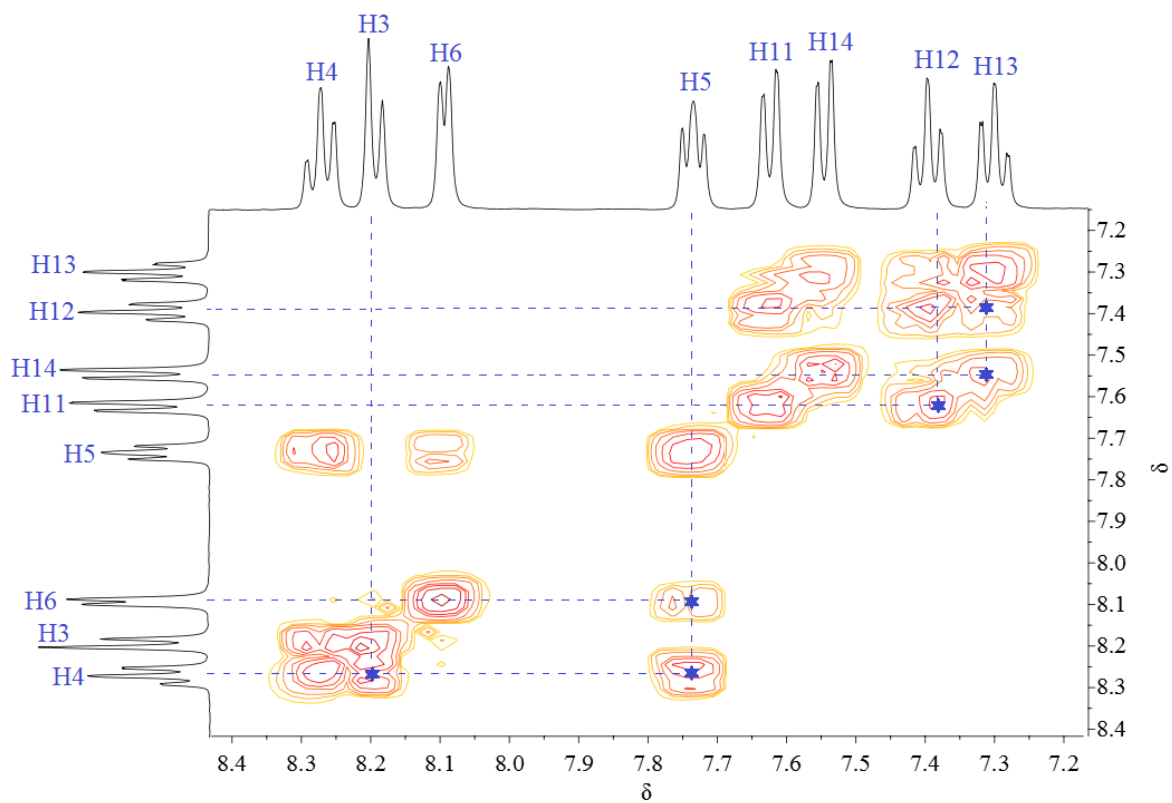


Figura 3.6. Mapa de contornos COSY do composto **In6**

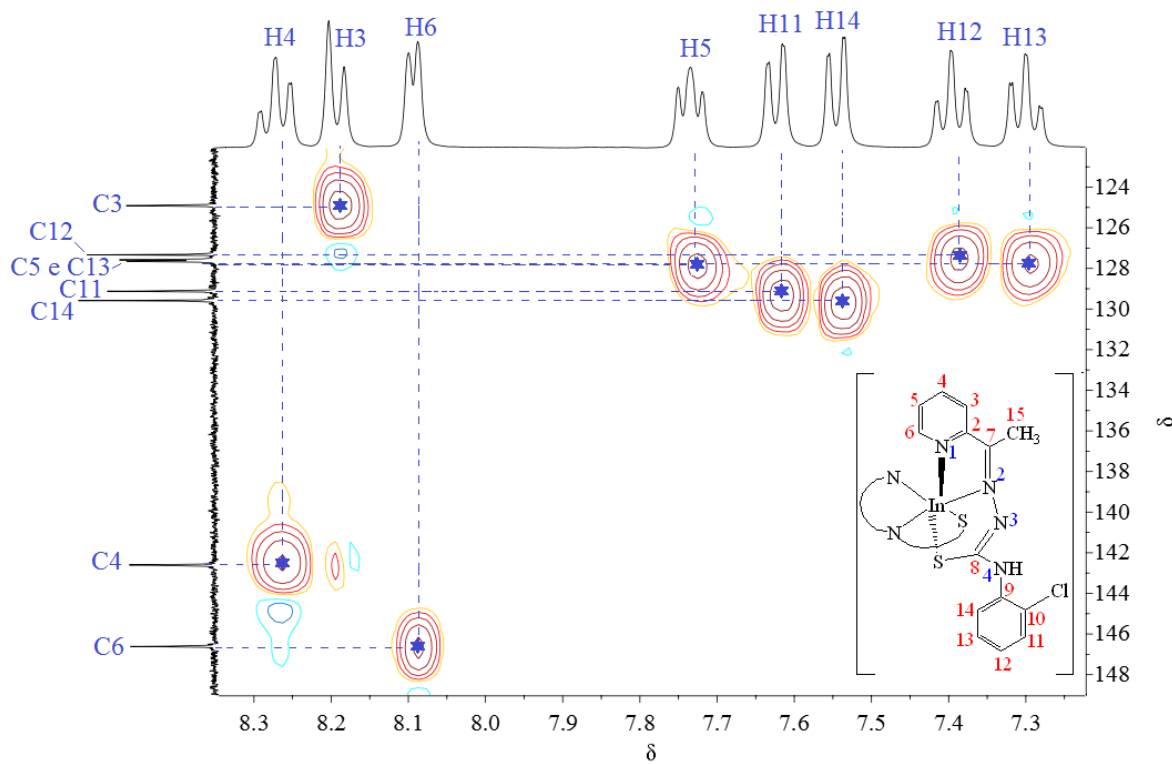


Figura 3.7. Mapa de contornos HMQC do composto **In6**

A atribuição dos carbonos não hidrogenados foi realizada por experimentos de HMBC. Como exemplo, na Figura 3.8 é apresentado o mapa de contornos de **In6**. Através da observação de correlações heteronucleares ${}^3J_{\text{H3-C7}}$ e ${}^2J_{\text{H15-C7}}$ identificou-se o átomo C7 e através das correlações ${}^2J_{\text{H3-C2}}$, ${}^3J_{\text{H4-C2}}$, ${}^4J_{\text{H5-C2}}$, ${}^3J_{\text{H6-C2}}$ e ${}^3J_{\text{H15-C2}}$ identificou-se C2. Ambos os átomos C9 e C10 apresentaram correlações com os hidrogênios aromáticos H11-H14. A distinção desses núcleos foi baseada na simulação do RMN de ${}^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ realizada com o software ChemDraw Ultra 11.0. Embora esperada, a correlação ${}^2J_{\text{N(4)H-C8}}$ não foi observada, de forma que a atribuição de C8 baseou-se no experimento DEPT-135 e novamente na simulação espectral.

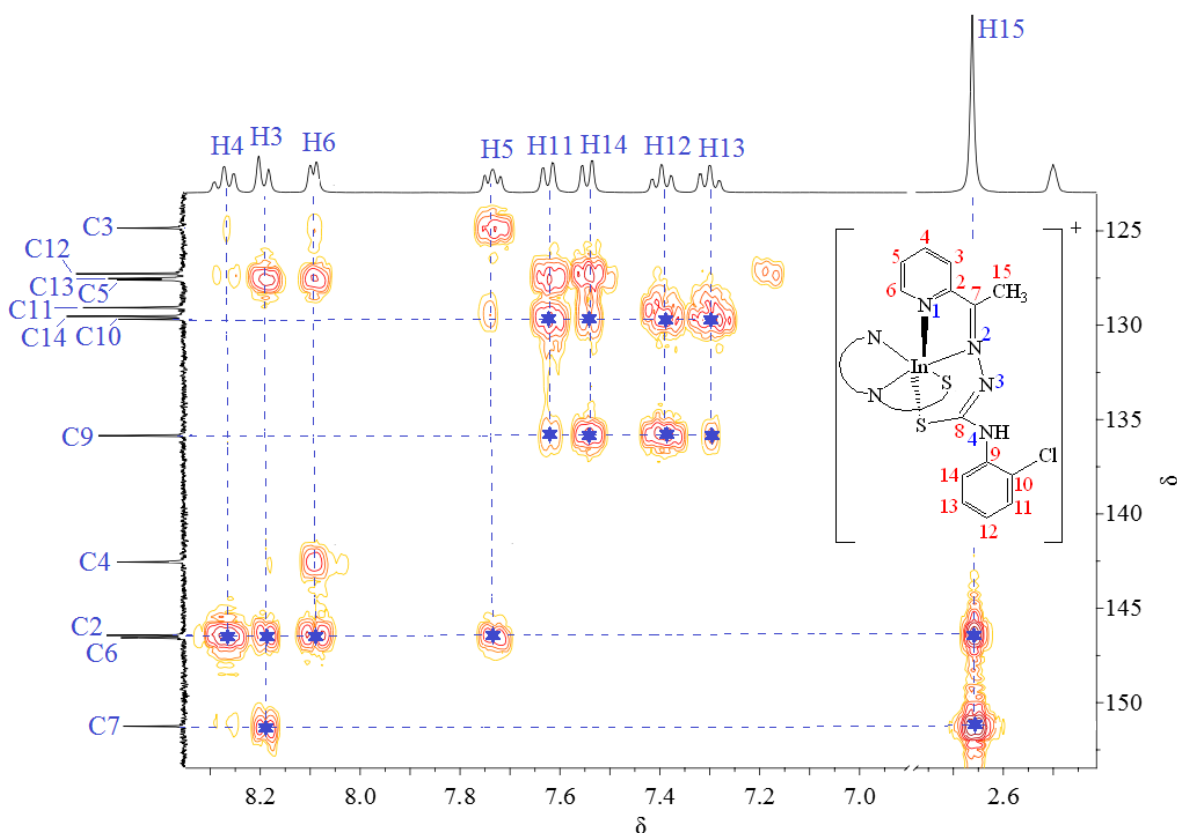


Figura 3.8. Mapa de contornos HMBC do composto **In6**

Estruturas cristalográficas

Cristais de $[\text{In}(\text{2Ac4}o\text{ClPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ (**In1a**) e $[\text{In}(\text{2Ac4}p\text{ClPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]\cdot\text{CH}_3\text{CN}$ (**In2a**) foram obtidos a partir da evaporação lenta a temperatura ambiente de soluções 3:1 acetonitrila / DMSO de **In1** e **In2**. Os cristais de $[\text{In}(\text{2Ac4}p\text{FPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]\cdot 0,22\text{DMSO}\cdot 0,78\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (**In3a**) e $[\text{In}(\text{2Ac4}p\text{IPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]\cdot 0,41\text{DMSO}\cdot 0,59\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (**In4a**) foram obtidos de modo similar a partir de soluções 9:1 acetona / DMSO de **In3** e **In4**, respectivamente. Cristais de

[In(2Ac4Ph)₂]NO₃·MeOH (**In5a**), [In(2Ac4oClPh)₂]NO₃·2MeOH·H₂O (**In6a**) e [In(2Ac4pClPh)₂]·NO₃ (**In8a**) foram obtidos à temperatura ambiente a partir da evaporação lenta da solução-mãe das sínteses dos compostos **In5**, **In6** e **In8**, respectivamente. O cristal [In(2Ac4mClPh)₂]NO₃·EtOH·H₂O (**In7a**) foi obtido pelo mesmo processo a partir de uma solução 4:1 etanol / DMSO de **In7**.

As estruturas determinadas para os compostos e a numeração utilizada na identificação dos átomos são mostrados nas Figuras 3.9 e 3.10. Os resumos das coleções de dados cristalográficos e dos refinamentos estão dispostos nas Tabelas 3.5 e 3.8. Comprimentos e ângulos de ligação são apresentados nas Tabelas 3.6 e 3.9 juntamente com dados dos ligantes.¹²³

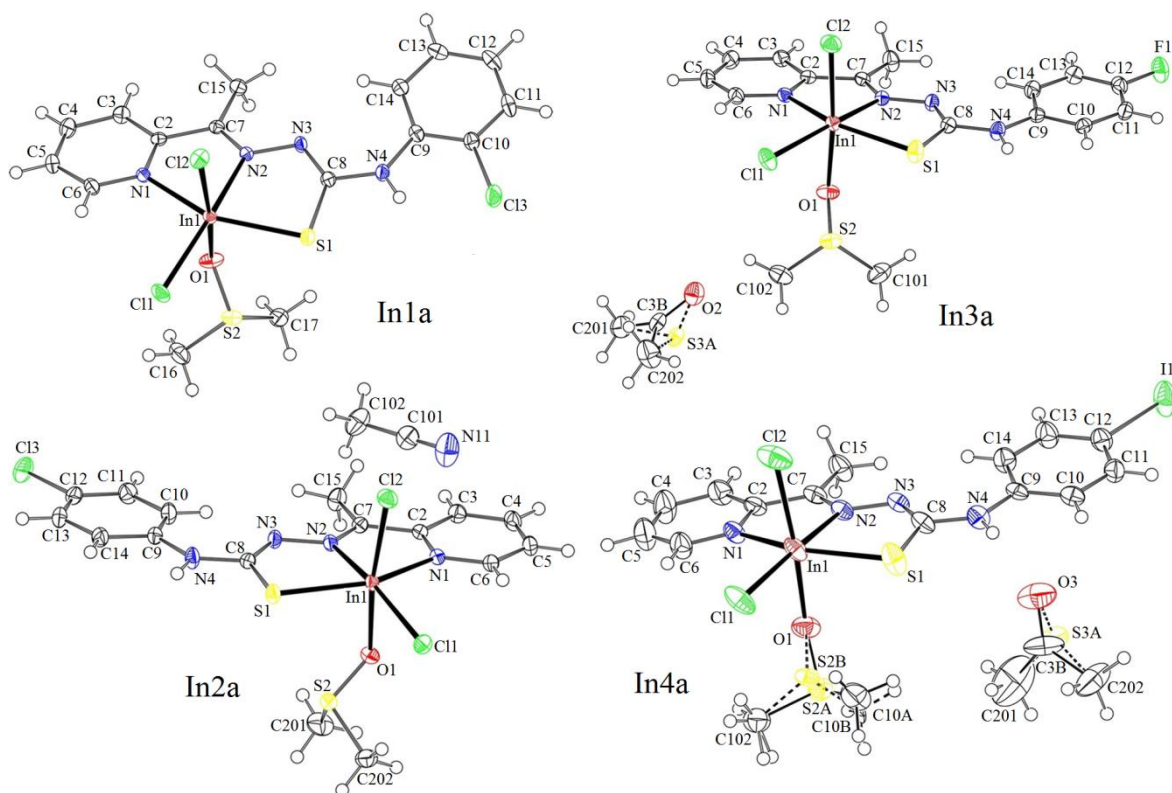


Figura 3.9. Diagramas moleculares dos complexos [In(2Ac4oClPh)Cl₂(DMSO)] (**In1a**), [In(2Ac4pClPh)Cl₂(DMSO)]·CH₃CN (**In2a**), [In(2Ac4pFPh)Cl₂(DMSO)]·0,22DMSO·0,78C₃H₆O (**In3a**) e [In(2Ac4pIPh)Cl₂(DMSO)]·0,41DMSO·0,59C₃H₆O (**In4a**) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.

¹²³ (a) J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Silva, M.A. Soares, R.G. dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45(12), 5671-5677; (b) 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.I. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20(11), 3396-3409; (c) E. Bermejo, A. Castineiras, R. Dominguez, R. Carballo, C. Maichle-Moessmer, J. Straehle, D.X. West. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1999**, 625, 961-968.

Tabela 3.5. Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento das estruturas de **In1a**, **In2a**, **In3a** e **In4a**

Parâmetros	In1a	In2a	In3a	In4a	
Fórmula empírica	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₃ InN ₄ OS ₂	C ₁₈ H ₂₁ Cl ₃ InN ₅ OS ₂	C _{18,78} H ₂₄ Cl ₂ FInN ₄ O ₂ S _{2,22}	C _{18,59} H ₂₇ Cl ₂ IInN ₄ O ₂ S _{2,41}	
Massa molar (g mol ⁻¹)	567,63	608,69	613,70	728,29	
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	
Grupo espacial	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 _{1/n}	<i>P</i> 2 _{1/n}	
Radiação; λ (Å)	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	
Temperatura (K)	150(2)	150(2)	150(2)	150(2)	
Parâmetros da célula unitária	a (Å)	8,7685(2)	8,8806(2)	12,5903(2)	12,6115(5)
	b (Å)	9,6898(3)	11,5497(2)	12,9279(2)	13,0330(5)
	c (Å)	12,5738(3)	13,0644(3)	15,5193(3)	15,7258(7)
	α (°)	88,014(2)	110,300(2)	90	90
	β (°)	79,523(2)	90,297(2)	103,090(2)	100,906(4)
	γ (°)	87,683(2)	105,723(2)	90	90
V (Å ³)	1049,26(5)	1202,41(4)	2460,38(7)	2538,10(18)	
Z	2	2	4	4	
Densidade calculada (g cm ⁻³)	1,797	1,681	1,657	1,898	
F(000)	564	608	1233	1416	
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	1,722	1,510	1,397	2,580	
Faixa de índices de Miller	-10 ≤ h ≤ 10	-11 ≤ h ≤ 11	-15 ≤ h ≤ 15	-15 ≤ h ≤ 15	
	-12 ≤ k ≤ 12	-14 ≤ k ≤ 14	-16 ≤ k ≤ 16	-16 ≤ k ≤ 16	
	-15 ≤ l ≤ 15	-16 ≤ l ≤ 16	-19 ≤ l ≤ 19	-17 ≤ l ≤ 19	
Faixa de θ usada na coleta dos dados (°)	2,10 a 26,37	1,96 a 26,37	1,89 a 26,37	1,90 e 26,37	
Reflexões coletadas	34020	49071	48916	22210	
Reflexões únicas [R _{int}]	4291[0,0384]	4927[0,0391]	5035[0,0340]	5203[0,0453]	
Completeza a $\theta = 26,37^\circ$ (%)	100	100	100	100	
Dados/ restrições/ parâmetros	4291/1/250	4927/ 3/ 277	5035/ 3/ 296	5203/ 0/ 310	
Índices de R final [I>2 σ (I)]	R ₁ = 0,0174; wR ₂ = 0,0422	R ₁ = 0,0167; wR ₂ = 0,0394	R ₁ = 0,0182; wR ₂ = 0,0430	R ₁ = 0,0488; wR ₂ = 0,1077	
Índices de R (para todos os dados)	R ₁ = 0,0193; wR ₂ = 0,0432	R ₁ = 0,0193; wR ₂ = 0,0409	R ₁ = 0,0223; wR ₂ = 0,0454	R ₁ = 0,0606; wR ₂ = 0,1159	
S	1,058	1,061	1,071	1,084	
$\Delta\rho_{\text{máx.}}$ e $\Delta\rho_{\text{min.}}$	0,312 e -0,511	0,315 e -0,362	0,318 e -0,401	1,946 e -1,913	

Tabela 3.6. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para **In1a**, **In2a**, **In3a** e **In4a**

Ligação	^a H2Ac4oCIPh	In1a	H2Ac4pCIPh	In2a	H2Ac4pFPh	In3a	H2Ac4pIPh	In4a
S1–C8	1,654(3)/1,654(3)	1,7516(17)	1,671(2)	1,7584(16)	1,672(2)	1,7640(17)	1,670(3)	1,764(6)
N2–C7	1,281(3)/1,278(3)	1,287(2)	1,283(2)	1,290(2)	1,280(2)	1,294(2)	1,285(4)	1,287(7)
N2–N3	1,362(3)/1,361(3)	1,3784(19)	1,374(2)	1,3700(18)	1,377(2)	1,3689(19)	1,376(3)	1,369(6)
N3–C8	1,359(3)/1,351(3)	1,308(2)	1,352(2)	1,312(2)	1,349(2)	1,316(2)	1,352(4)	1,315(7)
In1–N1	-	2,2574(14)	-	2,2431(13)	-	2,2540(14)	-	2,252(5)
In1–N2	-	2,2410(14)	-	2,2540(13)	-	2,2581(13)	-	2,258(4)
In1–S1	-	2,5121(4)	-	2,5010(4)	-	2,5004(5)	-	2,4998(17)
In1–Cl1	-	2,4099(4)	-	2,4251(4)	-	2,4157(5)	-	2,4031(14)
In1–Cl2	-	2,4472(4)	-	2,4549(4)	-	2,4676(5)	-	2,4688(17)
In1–O1	-	2,2970(13)	-	2,2979(12)	-	2,2830(12)	-	2,297(4)
Ângulo	H2Ac4oCIPh	In1a	H2Ac4pCIPh	In2a	H2Ac4pFPh	In3a	H2Ac4pIPh	In4a
C7–N2–N3	119,1(2)/118,7(2)	118,56(14)	118,86(15)	118,32(13)	118,91(13)	118,39(13)	118,1(2)	118,5(4)
N2–N3–C8	118,2(2)/118,9(2)	113,78(14)	118,66(15)	114,33(13)	119,18(14)	114,49(13)	118,7(2)	114,7(4)
N3–C8–S1	121,0(2)/121,5(2)	130,53(13)	119,99(15)	129,26(12)	120,19(12)	128,97(13)	120,2(2)	128,7(4)
N1–In1–N2	-	72,04(5)	-	72,41(5)	-	71,92(5)	-	72,32(16)
N1–In1–Cl1	-	98,78(4)	-	100,89(4)	-	96,25(4)	-	101,55(12)
N1–In1–Cl2	-	92,23(4)	-	89,70(3)	-	92,10(4)	-	89,52(13)
N1–In1–O1	-	78,46(5)	-	79,86(5)	-	71,91(5)	-	79,11(17)
N1–In1–S1	-	149,04(4)	-	150,01(4)	-	148,83(4)	-	148,93(13)
N2–In1–Cl1	-	163,69(7)	-	164,05(4)	-	164,29(4)	-	170,95(12)
N2–In1–Cl2	-	94,96(4)	-	96,97(4)	-	95,84(4)	-	91,44(12)
N2–In1–O1	-	79,39(5)	-	80,11(5)	-	82,32(5)	-	82,32(16)
N2–In1–S1	-	78,15(4)	-	77,76(3)	-	77,85(4)	-	77,78(12)
Cl1–In1–Cl2	-	98,916(17)	-	97,456(16)	-	94,869(18)	-	95,19(6)
Cl1–In1–O1	-	85,63(4)	-	84,49(3)	-	85,56(4)	-	90,05(12)
Cl1–In1–S1	-	107,980(15)	-	107,099(14)	-	111,867(16)	-	107,05(6)
Cl2–In1–O1	-	170,21(3)	-	169,56(3)	-	172,46(4)	-	168,28(12)
Cl2–In1–S1	-	98,568(16)	-	97,039(14)	-	98,383(17)	-	107,05(6)
O1–In1–S1	-	88,16(4)	-	92,15(3)	-	88,40(4)	-	88,89(12)

^a As duas medidas dos comprimentos e ângulos de ligação da tiossemicarbazona H2Ac4oCIPh referem-se as duas moléculas existentes por unidade assimétrica.

Os complexos **In1a** e **In2a** cristalizam-se no sistema triclínico, grupo espacial $P\bar{1}$, com uma molécula do complexo por unidade assimétrica, enquanto que os complexos **In3a** e **In4a** cristalizam no sistema monoclínico, grupo espacial $P2_1/n$, com uma molécula do complexo por unidade assimétrica. Em **In2a**, **In3a** e **In4a**, moléculas dos solventes utilizados na recristalização foram incorporadas nos cristais como moléculas de solvatação. Além disso, a presença de DMSO como solvente nos sistemas de recristalização, aliada à sua capacidade de coordenação, justifica a troca de metanol por DMSO na esfera de coordenação dos compostos.

Conforme mostrado na Figura 3.9, os complexos neutros apresentam número de coordenação 6 e geometria octaédrica distorcida em torno do In(III). Um ligante tiossemicarbazonato está coordenado ao In(III) através dos átomos N1, N2 e S1, juntamente com dois cloretos e uma molécula de DMSO, coordenada através do oxigênio. A distorção de um arranjo octaédrico ideal ocorre principalmente devido aos pequenos ângulos de ligação N1-In1-N2 e N2-In1-S1 que são inferiores a 79°. Os átomos de cloro estão em posição *cis* com ângulos Cl1-In1-Cl2 entre 95° e 99°. O mesmo comportamento foi observado para complexos semelhantes de In(III).¹²⁴

Em **In3a** e **In4a** ocorre desordem substitucional entre os átomos de enxofre e carbono. Essa desordem refere-se a uma situação em que diferentes elementos com propriedades similares ocupam uma mesma posição cristalográfica em diferentes células unitárias. Em $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})] \cdot 0,41\text{DMSO} \cdot 0,59\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (**In4a**), por exemplo, a desordem substitucional significa dizer que 41% das células unitária contêm uma molécula de DMSO e 59% dessas contêm uma molécula de acetona. Conforme apresentado na Tabela 3.7, a ligação de hidrogênio entre oxigênio e N4-H não se altera significativamente em **In3a** e **In4a**, sendo essa a força responsável por estabilizar a molécula do solvente nessas estruturas.

Tabela 3.7. Parâmetros para as ligações de hidrogênio [$\text{\AA},^\circ$] presentes em **In1a-In4a**

	D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
In1a	N4-H4A...Cl3	0,854	2,371(18)	2,9062(15)	121,2(16)
In2a	N4-H4A...S1 ⁱⁱ	0,8481(14)	2,682(16)	3,4459(15)	145,7(16)
In3a	N4-H4A...O2 ⁱ	0,890(14)	2,061(15)	2,935(2)	166,7(10)
In4a	N4-H4A...O3	0,88	2,15	2,965(8)	154,0

Transformações de simetria para gerar átomos equivalentes: i = -x+3,-y-1/2,-z+3/2; ii = -x+1,-y+2,-z+1

¹²⁴ (a) S. Abram, C. Mossmer-Maichle, U. Abram. *Polyhedron* **1998**, 17(1), 131-143; (b) J. Chan, A.L. Thompson, M.W. Jones, J.M. Peach. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, 363(6), 1140-1149; (c) A. Molter, F. Mohr. *Dalton Trans.* **2011**, 40(14), 3754-3758.

Os diagramas moleculares dos complexos catiônicos de **In5a-In8a** são apresentados na Figura 3.10. O complexo **In6a** cristaliza-se no sistema triclinico, grupo especial $P\bar{1}$, possuindo uma molécula do complexo por unidade assimétrica. Os complexos **In5a**, **In7a** e **In8a** cristalizam-se no sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/n$.

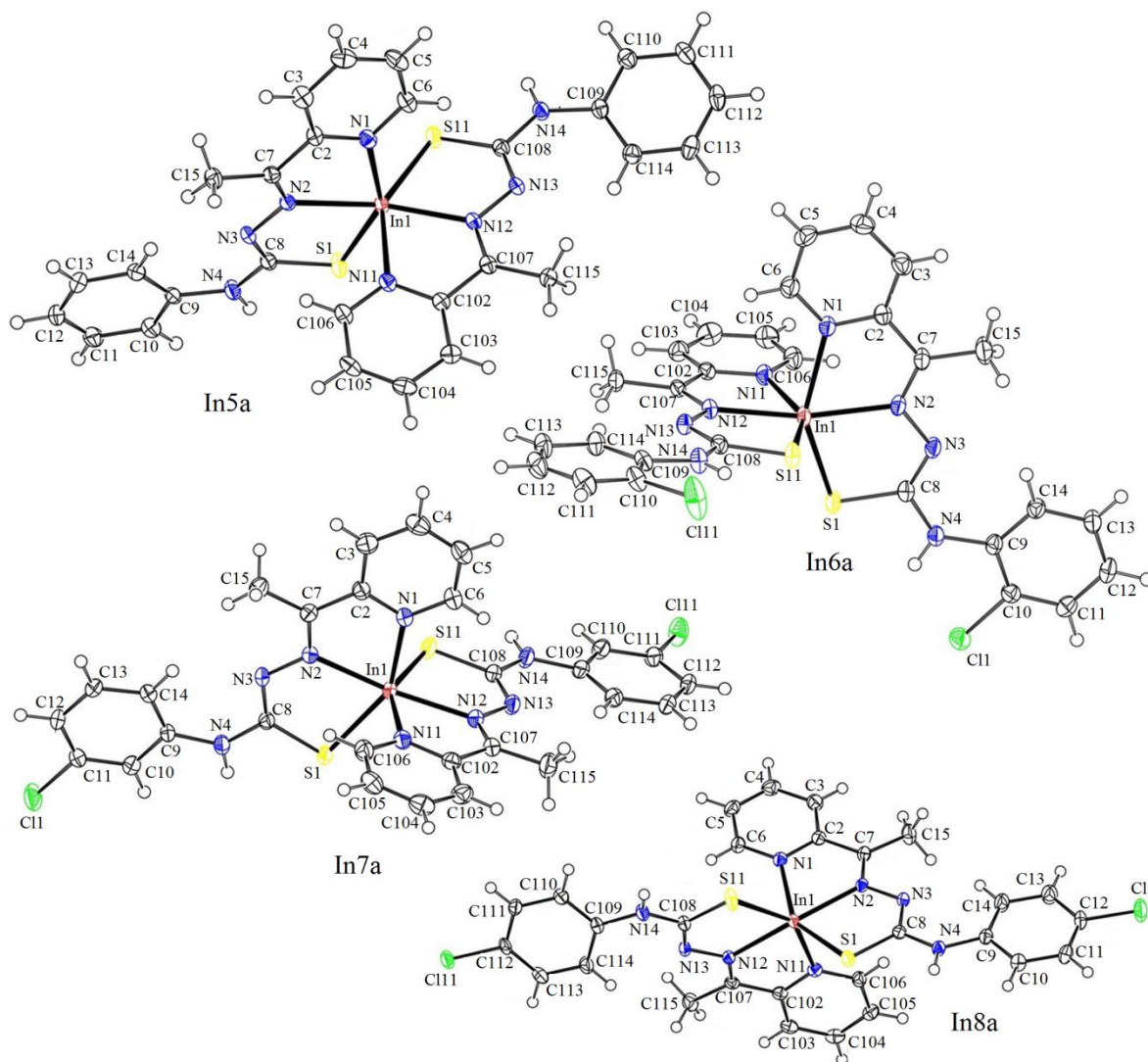


Figura 3.10. Diagramas moleculares dos cátions $[\text{In}(\text{2Ac4Ph})_2]^+$, $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]^+$, $[\text{In}(\text{2Ac4mClPh})_2]^+$ e $[\text{In}(\text{2Ac4pClPh})_2]^+$ presentes em $[\text{In}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{MeOH}$ (**In5a**), $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**In6a**), $[\text{In}(\text{2Ac4mClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**In7a**) e $[\text{In}(\text{2Ac4pClPh})_2] \cdot \text{NO}_3$ (**In8a**), respectivamente, com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.

Nas estruturas cristalinas de **In5a-In8a** observou-se um número de coordenação 6 com uma geometria octaédrica distorcida em torno do centro de In(III), em que há duas tiossemicarbazonas coordenadas ao metal sob a forma aniônica, através dos átomos N1, N2

e S1. A formação dos anéis de cinco membros é presumidamente a razão de a geometria em **In5a-In8a** ser distorcida, uma vez que os ângulos intraligantes N1-In1-N2, N11-In1-N12, N2-In1-S1 e N12-In1-S11 são menores do que 78°. A presença de um íon nitrato por cátion complexo em cada cada unidade assimétrica foi também observada, sendo os íons nitratos omitidos na Figura 3.10 para maior clareza da estrutura do complexo.

Conforme apresentado nas Tabelas 3.6 e 3.9, a desprotonação das tiossemicarbazonas em N3 durante a complexação resultou em três importantes mudanças estruturais ao comparar as estruturas cristalinas dos complexos e dos ligantes precursores:

(1) aumento no comprimento das ligações C8-S1, o que está associado a diminuição do caráter de dupla ligação pela coordenação. Os comprimentos das ligações C8-S1 nos complexos (cerca de 1,76 Å) são menores que típicos comprimentos de ligação simples C-S (cerca de 1,82 Å), mas maiores que ligações duplas C-S (cerca de 1,67 Å).¹²⁵

(2) diminuição no comprimento das ligações C8-N3 (em cerca de 0,04 Å), as quais passam a ter um maior caráter de dupla ligação com a coordenação. Essa alteração, assim como aquela relacionada a ligação C8-S1, concordam com os dados espectroscópicos de absorção no infravermelho, segundo os quais após a complexação há deslocamento de $\nu(\text{C}=\text{S})$ para menor energia e $\nu(\text{C}=\text{N})$ para maior energia.

(3) Em **In5a-In8a** os dois ligantes tiossemicarbazonatos encontram-se coordenados na configuração *EZ* em relação às ligações C7-N2 e C8-N3 (ligante 1) e C107-N12 e C108-N13 (ligante 2). A configuração *EZ* também é observada em relação às ligações C7-N2 e C8-N3 em **In1a-In4a**. Por sua vez, as tiossemicarbazonas livres cristalizam-se na conformação *EE*. Essa mudança de conformação em relação a ligação C8-N3 é uma necessidade estrutural para as tiossemicarbazonas se coordenarem a centros metálicos de forma tridentada através do sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imina}}\text{-S}$.

¹²⁵ F.H. Allen, O. Kennard, D.G. Watson, L. Brammer, A.G. Orpen, R. Taylor. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. **1987**, S1–S19.

Tabela 3.8. Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento das estruturas de **In5a**, **In6a**, **In7a** e **In8a**

Parâmetros	In5a	In6a	In7a	In8a	
Fórmula empírica	C ₂₉ H ₃₀ InN ₉ O ₄ S ₂	C ₃₀ H ₃₄ Cl ₂ InN ₉ O ₆ S ₂	C ₃₀ H ₃₂ Cl ₂ InN ₉ O ₅ S ₂	C ₂₈ H ₂₄ Cl ₂ InN ₉ O ₃ S ₂	
Massa molar (g mol ⁻¹)	747,56	866,50	848,48	784,40	
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	
Grupo espacial	<i>P</i> 2 _{1/n}	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 _{1/c}	<i>P</i> 2 _{1/n}	
Radiação; λ (Å)	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	Mo <i>K</i> α ; 0,71073	
Temperatura (K)	150(2)	150(2)	150(2)	150(2)	
Parâmetros da célula unitária	a (Å)	12,6962(3)	10,6000(2)	10,9997(3)	10,7997(2)
	b (Å)	14,5589(4)	12,5286(3)	20,8178(8)	15,3736(3)
	c (Å)	17,0149(4)	14,5861(3)	14,8520(4)	18,5999(4)
	α (°)	90	65,447(2)	90	90
	β (°)	100,426(2)	78,817(2)	90,329(2)	97,799(2)
	γ (°)	90	76,648(2)	90	90
V (Å ³)	3093,15(14)	1703,76(7)	3400,90(18)	3059,58(11)	
Z	4	2	4	4	
Densidade calculada (g cm ⁻³)	1,605	1,689	1,657	1,703	
F(000)	1520	880	1720	1576	
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,951	1,032	1,030	1,132	
	-15 ≤ h ≤ 15	-13 ≤ h ≤ 13	-13 ≤ h ≤ 13	-13 ≤ h ≤ 13	
	-18 ≤ k ≤ 18	-15 ≤ k ≤ 15	-26 ≤ k ≤ 26	-19 ≤ k ≤ 19	
Faixa de índices de Miller	-21 ≤ l ≤ 21	-18 ≤ l ≤ 18	-18 ≤ l ≤ 18	-23 ≤ l ≤ 23	
	1,850 a 26,371	1,813 a 26,372	1,851 a 26,372	2,067 e 26,372	
	Reflexões coletadas	61873	69994	68807	61147
Reflexões únicas [R _{int}]	6329[0,0559]	6976[0,0546]	6953[0,0570]	6262[0,0483]	
Completeza a $\theta = 26,37^\circ$ (%)	100	100	100	100	
Dados; restrições; parâmetros	6329/ 0 / 410	6976/0/455	6953/0/441	6262/0/408	
Índices de R final [I>2 σ (I)]	R ₁ = 0,0264; wR ₂ = 0,0560	R ₁ = 0,0404; wR ₂ = 0,1005	R ₁ = 0,0390; wR ₂ = 0,0902	R ₁ = 0,0241; wR ₂ = 0,0512	
Índices de R (para todos os dados)	R ₁ = 0,0381; wR ₂ = 0,0622	R ₁ = 0,0470; wR ₂ = 0,1056	R ₁ = 0,0552; wR ₂ = 0,1014	R ₁ = 0,0337; wR ₂ = 0,0569	
S	1,097	1,151	1,084	1,087	
$\Delta\rho_{\text{máx.}}$ e $\Delta\rho_{\text{min.}}$	0,611 e -0,422	1,624 e -1,105	1,636 e -0,792	0,586 e -0,417	

Tabela 3.9. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para **In5a**, **In6a**, **In7a** e **In8a**

Ligação	H2Ac4Ph	^a In5a	^a H2Ac4oClPh	^a In6a	H2Ac4mClPh	^a In7a	H2Ac4pClPh	^a In8a
S1–C8	1,677(2)	1,751(2)/1,749(2)	1,654(3)/1,654(3)	1,755(4)/1,756(4)	1,669(3)	1,760(3)/1,760(3)	1,671(2)	1,759(2)/1,748(2)
N2–C7	1,284(3)	1,293(3)/1,296(3)	1,281(3)/1,278(3)	1,292(5)/1,292(4)	1,290(3)	1,291(4)/1,290(4)	1,283(2)	1,292(3)/1,293(3)
N2–N3	1,376(2)	1,373(3)/1,374(3)	1,362(3)/1,361(3)	1,376(4)/1,381(4)	1,378(3)	1,375(4)/1,373(4)	1,374(2)	1,369(2)/1,372(3)
N3–C8	1,358(3)	1,319(3)/1,312(3)	1,359(3)/1,351(3)	1,309(5)/1,315(5)	1,354(3)	1,312(4)/1,320(4)	1,352(2)	1,315(3)/1,318(3)
In1–N1	-	2,274(2)	-	2,287(3)	-	2,272(3)	-	2,3026(19)
In1–N2	-	2,2774(18)	-	2,264(3)	-	2,268(3)	-	2,2539(18)
In1–S1	-	2,4729(6)	-	2,5028(10)	-	2,4884(9)	-	2,5074(6)
In1–N11	-	2,3320(19)	-	2,274(3)	-	2,293(3)	-	2,3235(19)
In1–N12	-	2,2514(18)	-	2,264(3)	-	2,270(3)	-	2,2979(18)
In1–S11	-	2,5085(6)	-	2,5020(10)	-	2,4946(9)	-	2,4790(6)
Ângulo	H2Ac4Ph	In5a	H2Ac4oClPh	In6a	H2Ac4mClPh	In7a	H2Ac4pClPh	In8a
C7–N2–N3	118,8(2)	118,47(19)/116,73(19)	119,1(2)/118,7(2)	117,6(3)/117,7(3)	118,7(2)	117,9(3)/117,9(3)	118,86(15)	117,24(18)/117,61(18)
N2–N3–C8	118,9(2)	113,77(18)/114,39(18)	118,2(2)/118,9(2)	114,1(3)/114,7(3)	119,0(2)	114,4(3)/114,4(3)	118,66(15)	114,89(18)/114,35(18)
N3–C8–S1	119,7(1)	128,60(18)/128,16(18)	121,0(2)/121,5(2)	128,9(3)/128,5(3)	121,2(2)	128,8(3)/128,2(3)	119,99(15)	128,31(17)/128,16(17)
N1–In1–N2	-	71,18(7)	-	71,01(11)	-	71,19(10)	-	71,14(6)
N1–In1–S1	-	147,37(5)	-	145,76(8)	-	148,49(7)	-	147,08(5)
N1–In1–N11	-	95,66(7)	-	97,13(8)	-	86,63(10)	-	91,98(6)
N1–In1–N12	-	95,87(7)	-	97,22(10)	-	94,57(10)	-	88,75(6)
N1–In1–S11	-	94,06(5)	-	97,13(8)	-	93,19(8)	-	94,95(5)
N2–In1–S1	-	77,32(5)	-	77,04(8)	-	74,08(8)	-	77,45(5)
N2–In1–N11	-	86,32(7)	-	106,74(10)	-	96,50(10)	-	84,14(6)
N2–In1–N12	-	152,72(7)	-	168,25(11)	-	162,03(11)	-	146,87(7)
N2–In1–S11	-	126,74(5)	-	103,42(8)	-	113,24(7)	-	129,61(5)
S1–In1–N11	-	90,51(5)	-	93,02(8)	-	93,08(8)	-	94,45(5)
S1–In1–S11	-	98,07(2)	-	102,02(4)	-	102,86(3)	-	97,54(2)
N11–In1–N12	-	70,79(7)	-	71,30(10)	-	71,30(10)	-	70,14(6)
N11–In1–S11	-	146,89(5)	-	148,62(7)	-	148,52(7)	-	145,91(5)
N12–In1–S11	-	76,77(5)	-	77,40(8)	-	77,41(8)	-	76,68(5)

^a As duas medidas dos comprimentos e ângulos de ligação presentes nas estruturas de **In5a–In8a** referem-se aos dois ligantes tiossemicarbonatos coordenados ao centro metálico. Em H2Ac4oClPh as duas medidas referem-se às duas moléculas existentes por unidade assimétrica.

Cálculos teóricos

Conforme mencionado anteriormente, os complexos **In1-In4** foram obtidos em reações empregando-se metanol como solvente. A presença da molécula de metanol nesses complexos é confirmada pela observação do modo vibracional $\nu(\text{O-H})$ nos espectros de absorção no infravermelho e pela observação dos sinais característicos do metanol nos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$. No entanto, os dados espectrais são insuficientes para confirmar se a molécula de metanol está coordenada ao centro metálico ou se está presente como molécula de cristalização. A grande massa reduzida envolvida em um estiramento $\nu(\text{In-O})$ impôs uma limitação para a sua detecção por espectroscopia de absorção no infravermelho em experimentos que utilizavam pastilhas de KBr. Portanto, é útil uma abordagem teórica para investigar a capacidade de coordenação da molécula de metanol.

O complexo **In1** foi escolhido como modelo e sua geometria foi otimizada considerando a molécula de metanol coordenada ao centro metálico ou fazendo uma ligação de hidrogênio intermolecular, mantendo os ligantes cloretos coordenados. As estruturas otimizadas no nível B3LYP/TZVP, em solução de metanol, são mostrados na Figura 3.11.

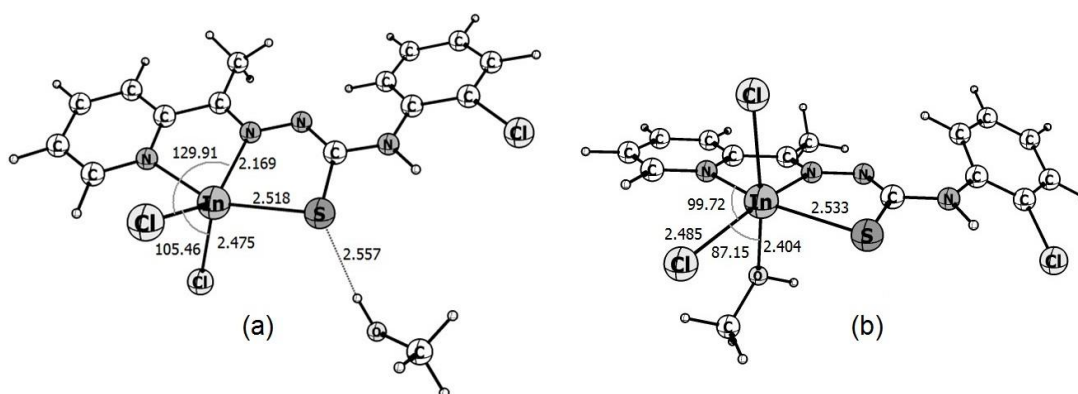


Figura 3.11. Estruturas otimizadas do complexo **In1**, com a molécula de metanol (a) fazendo uma fraca interação intermolecular e (b) coordenada ao átomo de índio. Os comprimentos de ligação são dados em Å e ângulos são expressos em graus.

Na estrutura otimizada de **In1** com a molécula de metanol fazendo uma fraca interação intermolecular, a molécula de metanol interage fracamente com o átomo de enxofre coordenado com uma distância de 2,557 Å. Esse composto exibe uma estrutura trigonal bipiramidal distorcida com os dois ligantes cloretos ocupando a posição equatorial.

O complexo contendo a molécula de metanol coordenada possui uma geometria octaédrica, com o metanol coordenado na posição axial, com um comprimento de ligação de 2,404 Å.

Apesar das estruturas otimizadas resultarem em diferentes geometrias, a diferença da energia livre de Gibbs dessas duas espécies em solução de metanol é de apenas 1,94 kcal/mol em favor da espécie octaédrica. A partir da relação $\Delta G = -RT \ln K_{eq}$, temos que $K_{eq} = 26,43$ a 298,15 K, o que sugere um possível equilíbrio envolvendo essas duas espécies, deslocado em favor do complexo hexa-coordenado, sendo esta conclusão extensiva aos compostos **In2-In4**.

Entretanto, a molécula de metanol coordenada pode ser facilmente substituída por DMSO, como pode ser visto na Tabela 3.10. A energia livre de Gibbs para o deslocamento de metanol por DMSO para todos os complexos é negativa, mostrando ser esse um processo espontâneo em solução de DMSO. Essa substituição de ligante foi evidenciada experimentalmente ao serem obtidos os monocristais **In1a-In4a** em soluções de DMSO, bem como evidenciada na obtenção dos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **In1-In4**, em que os sinais atribuídos ao metanol possuem deslocamentos químicos característicos de metanol livre em solução de DMSO.¹²⁶ Essa substituição de ligante metanol por DMSO provavelmente ocorre durante os ensaios biológicos, uma vez que são preparadas soluções estoques dos complexos em DMSO anteriormente à diluição com o meio de cultura.

Tabela 3.10. Energia livre de Gibbs ($\Delta G_r(\text{sol})$) determinada para as reações de troca de ligantes em solução *

	Reação	$\Delta G_r(\text{sol})$ (kcal/mol)
Solução de DMSO	In1 + DMSO \rightarrow In1a + CH ₃ OH	-8,30
	In2 + DMSO \rightarrow In2a + CH ₃ OH	-9,81
	In3 + DMSO \rightarrow In3a + CH ₃ OH	-10,42
	In4 + DMSO \rightarrow In4a + CH ₃ OH	-4,37
Solução aquosa	In1a + H ₂ O \rightarrow In1a -(H ₂ O) + DMSO	+1,52
	In1a + H ₂ O \rightarrow [In1a -(H ₂ O) _{ax.}] ⁺ + Cl ⁻	-78,96
	In1a + H ₂ O \rightarrow [In1a -(H ₂ O) _{eq.}] ⁺ + Cl ⁻	-85,50
	In2a + H ₂ O \rightarrow [In2a -(H ₂ O) _{ax.}] ⁺ + Cl ⁻	-80,66
	In3a + H ₂ O \rightarrow [In3a -(H ₂ O) _{ax.}] ⁺ + Cl ⁻	-77,26
	In4a + H ₂ O \rightarrow [In4a -(H ₂ O) _{ax.}] ⁺ + Cl ⁻	-79,74
	In1a + 2H ₂ O \rightarrow [In1a -(H ₂ O) ₂] ²⁺ + 2Cl ⁻	-245,52
	In2a + 2H ₂ O \rightarrow [In2a -(H ₂ O) ₂] ²⁺ + 2Cl ⁻	-258,54
	In3a + 2H ₂ O \rightarrow [In3a -(H ₂ O) ₂] ²⁺ + 2Cl ⁻	-241,82
	In4a + 2H ₂ O \rightarrow [In4a -(H ₂ O) ₂] ²⁺ + 2Cl ⁻	-247,51

* Os subscritos ax. e eq. significam substituição nas posições axial e equatorial, respectivamente.

¹²⁶ H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.

É conhecido que os cloretos dos metalofármacos cisplatina e NAMI-A são substituídos por água no ambiente biológico.¹²⁷ Com base nessa observação, foram calculados os valores da variação da energia livre de Gibbs ($\Delta G_{r(sol)}$) associada às reações de troca dos ligantes cloreto e DMSO dos complexos **In1a-In4a** por água, em solução aquosa. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.10. Verificou-se que a substituição de DMSO por água é desfavorável por 1,52 kcal/mol. No entanto, o deslocamento de um ligante cloreto por água é favorável para todos os complexos, com a variação da energia livre de Gibbs da reação em torno de -80 kcal/mol. A segunda substituição (dupla aquação) é ainda mais favorável, com valores de $\Delta G_{r(sol)}$ na faixa de -240 a -260 kcal/mol.

Esses resultados mostram que, em solução aquosa e eventualmente, no ambiente biológico, os cloretos podem ser substituídos por água, ao passo que o ligante DMSO deve permanecer na esfera de coordenação do metal. Dessa forma, através de dados termodinâmicos nós podemos inferir que os complexos $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeOH})]$ (**In1-In4**) podem atuar como pró-fármacos gerando as espécies catiônicas como $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})(\text{DMSO})]^+$ ou $[\text{In}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DMSO})]^{2+}$ (L = ligante tiossemicarbazonato) como possíveis espécies ativas. Na Figura 3.12 é apresentado um esquema desse possível processo de troca de ligantes.

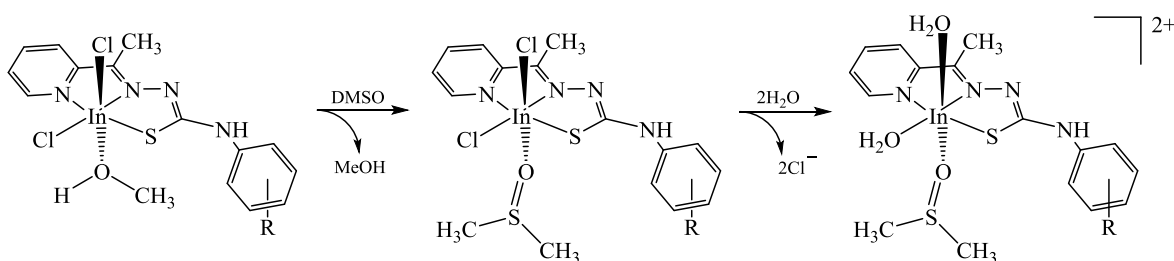


Figura 3.12. Processo de troca de ligantes proposto para os complexos **In1-In4**

3.2. Resultados biológicos e discussões

Independente da fonte do composto sob investigação, a triagem a nível celular é importante para a definição da atividade biológica. Para a estimativa dessa atividade, seja frente a culturas microbianas ou células tumorais, nesse trabalho determinou-se o parâmetro CI_{50} , definido como sendo a concentração do composto capaz de inibir o desenvolvimento de 50 % dos indivíduos testados. Nos testes de atividade antimicrobiana,

¹²⁷ J. Chen, L. Chen, S. Liao, K. Zheng, L. Ji. *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 7862-7869.

a obtenção dos valores de CI_{50} baseou-se na turbidez dos meios de cultura sob a ação e ausência dos compostos sob análise. Para a análise da atividade antitumoral, a viabilidade metabólica celular foi verificada empregando-se o método colorimétrico com o reagente MTT.

3.2.1. Atividade antimicrobiana

Um teste preliminar com os complexos de In(III), tiossemicarbazonas precursoras e o sal $InCl_3$ foi realizado para avaliar quais os compostos seriam submetidos ao processo de diluição seriada para obtenção do parâmetro CI_{50} . No processo de triagem, os compostos tiveram a sua atividade biológica avaliada na concentração de 250 $\mu g/mL$ e apenas aqueles com inibição do crescimento microbiano superior a 50% foram considerados satisfatórios para o estudo subsequente. Na Tabela 3.11 são apresentados os valores de CI_{50} exibidos pelos compostos investigados frente as cepas bacterianas.

Tabela 3.11. Valores de CI_{50} ($\mu mol/L$) para os compostos de In(III), tiossemicarbazonas, $InCl_3$ e antibióticos de referência frente a algumas bactérias de interesse medicinal

Compostos	CI_{50} ($\mu mol/L$)			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>
H2Ac4oClPh	> 820,22	> 820,22	546,80 \pm 19,66	> 820,22
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In1 97,04 \pm 1,62	62,36 \pm 5,85	109,58 \pm 5,20	7,51 \pm 2,63
H2Ac4pClPh	635,38 \pm 35,24	> 820,22	252,40 \pm 10,08	> 820,22
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In2 93,58 \pm 4,70	53,92 \pm 4,59	207,92 \pm 22,21	69,81 \pm 4,78
H2Ac4pFPh	> 867,02	663,49 \pm 16,34	227,82 \pm 13,15	538,51 \pm 27,75
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)]	In3 70,33 \pm 7,87	54,48 \pm 4,22	100,14 \pm 3,69	65,78 \pm 1,93
H2Ac4pIPh	> 630,92	> 630,92	> 630,92	> 630,92
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)]	In4 107,28 \pm 4,17	87,00 \pm 4,53	626,32 \pm 17,19	43,21 \pm 6,04
$InCl_3$	> 1130,30	> 1130,30	> 1130,30	> 1130,30
Ciprofloxacina	8,67 \pm 0,49	4,12 \pm 0,60	0,39 \pm 0,04	4,57 \pm 0,38
Tetraciclina	0,92 \pm 0,18	1,10 \pm 0,09	1,18 \pm 0,04	0,65 \pm 0,09

Conforme pode ser observado na Tabela 3.11, somente em alguns casos o parâmetro CI_{50} das tiossemicarbazonas precursoras foi investigado, uma vez que na etapa de triagem foram observadas atividades biológicas pouco significativas. Além disso, as bactérias investigadas também mostraram-se pouco sensíveis ao sal $InCl_3$. Por outro lado, os complexos **In1-In4** mostraram-se ativos e com valores de CI_{50} inferiores aos exibidos pelas tiossemicarbazonas. A ação antimicrobiana de maior destaque foi de **In1** frente a bactéria *C. freundii* ($CI_{50} = 7,51 \pm 2,63 \mu mol/L$). Nos demais casos, a incorporação de

In(III) provou não ser interessante, pois foram verificados valores de CI_{50} muito superiores aos exibidos pelos antibióticos de referência avaliados para comparação.

Na Tabela 3.12 são apresentados os valores de CI_{50} exibidos pelos compostos frente a alguns fungos investigados. Todas as leveduras foram sensíveis ao sal $InCl_3$ e às tiossemicarbazonas precursoras. Em vários casos, a complexação resultou em um aumento substancial da atividade antifúngica, o que nos permite sugerir que a complexação foi uma estratégia interessante para a redução da dose necessária para inibir o crescimento fúngico. Em destaque, os complexos **In1-In4** mostraram-se bastante ativos frente às espécies *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*. Por exemplo, contra *C. lusitaniae* o complexo **In1** ($CI_{50} = 1,35 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$) foi tão ativo quanto a nistatina ($CI_{50} = 1,95 \pm 0,30 \mu\text{mol/L}$) e 100 vezes mais ativo que o ligante precursor ($CI_{50} = 137,60 \pm 0,61 \mu\text{mol/L}$).

Tabela 3.12. Valores de CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$) para os compostos de In(III), tiossemicarbazonas, $InCl_3$ e antifúngicos de referência frente a alguns fungos de interesse medicinal

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. dubliniensis</i>
H2Ac4oCIPh	59,77 \pm 1,50	257,04 \pm 18,02	137,60 \pm 0,61	130,86 \pm 8,38
[In(2Ac4oCIPh)Cl ₂ (MeOH)] In1	23,47 \pm 0,83	8,90 \pm 1,92	1,35 \pm 0,06	1,47 \pm 0,05
H2Ac4pCIPh	19,30 \pm 3,89	22,37 \pm 4,50	44,39 \pm 3,60	20,77 \pm 2,82
[In(2Ac4pCIPh)Cl ₂ (MeOH)] In2	37,85 \pm 4,16	10,61 \pm 0,50	1,47 \pm 0,16	2,24 \pm 0,08
H2Ac4pFPh	17,20 \pm 1,39	18,88 \pm 2,71	12,20 \pm 1,29	9,19 \pm 0,32
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)] In3	21,98 \pm 1,99	2,84 \pm 0,56	1,50 \pm 0,10	3,76 \pm 0,44
H2Ac4pIPh	192,86 \pm 2,82	294,44 \pm 25,12	58,02 \pm 5,25	99,84 \pm 8,21
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)] In4	15,85 \pm 1,16	12,68 \pm 2,02	2,03 \pm 0,25	1,99 \pm 0,15
$InCl_3$	118,66 \pm 6,07	262,64 \pm 7,21	98,17 \pm 4,60	102,51 \pm 3,54
Nitrato de miconazol	14,34 \pm 2,10	1,43 \pm 0,21	0,20 \pm 0,01	0,17 \pm 0,05
Nistatina	6,03 \pm 1,22	5,12 \pm 0,41	1,95 \pm 0,30	2,29 \pm 0,25

De forma geral, ao ser investigada a ação antimicrobiana exibida pelos complexos **In1-In4**, não foi observada uma influência significativa da natureza do haleto substituinte ou de sua posição no anel aromático da tiossemicarbazona. Embora bactérias *Gram*-positivas, *Gram*-negativas e leveduras sejam morfologicamente diferentes, também não foi identificada uma ação antimicrobiana seletiva dos compostos. Porém, tanto os complexos de In(III) quanto as tiossemicarbazonas precursoras apresentaram uma ação antifúngica superior se comparado à ação antibacteriana.

Em relação aos sais $[InL_2]NO_3$ (**In5-In10**), a determinação dos valores de CI_{50} não foi realizada devido a inibição inferior a 50% na etapa de triagem. Essa menor ação antimicrobiana pode ser explicada pela menor solubilidade desses compostos em solução aquosa, o que pode resultar em uma menor capacidade de entrada nas células microbianas.

3.2.2. Atividade citotóxica

Os complexos **In1-In10**, as tiossemicarbazonas e os sais de In(III) foram testados na concentração de 10 µM quanto a seus potenciais antitumorais através da avaliação de suas capacidades em inibirem a viabilidade de células de tumores sólidos e leucemias. Foram avaliadas as linhagens celulares de tumores sólidos (HCT-116, MDA-MB 231 e MCF-7), de leucemias (THP-1, HL-60 e Jurkat), bem como células Vero como modelo de células saudáveis.

Observou-se que, na concentração de 10 µM, os sais InCl₃ e In(NO₃)₃ apresentaram inibição do crescimento celular inferior a 10%. Essa observação está de acordo com estudos reportados na literatura que demonstram que sais de In(III) não foram citotóxicos em fibroblastos de rato Balb/c 3T3 em concentrações abaixo de 435 µM.¹²⁸

Em contraste, as tiossemicarbazonas e os complexos **In1-In10** mostraram uma atividade citotóxica potente (inibição superior a 50%), sendo o parâmetro CI₅₀ determinado para esses compostos. Os índices de seletividade (IS) foram expressos como a citotoxicidade do composto na célula tumoral em comparação à citotoxicidade na célula Vero, conforme apresentado na Equação 3.1. Os resultados de CI₅₀ e IS são apresentados nas Tabelas 3.13 e 3.14.

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ Vero}}{CI_{50} \text{ célula tumoral}} \quad (\text{Equação 3.1})$$

¹²⁸ J.C. Wataha, C.T. Hanks, R.G. Craig. *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, 25(9), 1133-1149.

Tabela 3.13. Atividade citotóxica (CI₅₀)^a e índice de seletividade (IS)^b das tiossemicarbazonas, complexos **In1-In10** e cisplatina nas linhagens celulares de leucemia (HL-60, Jurkat e THP-1) e na célula saudável Vero

		CI ₅₀ (µM) e índice de seletividade (IS)						
		HL-60	IS	Jurkat	IS	THP-1	IS	Vero
H2Ac4Ph		0,14 (0,03 – 0,59)	ND	1,42 (0,76 – 2,64)	ND	1,24 (0,40 – 3,86)	ND	ND
[In(2Ac4Ph) ₂]NO ₃	In5	0,04 (0,02 – 0,08)	72	0,53 (0,23 – 1,23)	5	0,90 (0,41 – 1,99)	3	2,87 (1,02 – 8,11)
H2Ac4oClPh		1,00 (0,25 – 3,96)	ND	3,16 (0,93 – 10,80)	ND	0,41 (0,16 – 1,01)	ND	ND
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In1	0,05 (0,02 – 0,11)	209	0,35 (0,15 – 0,85)	27	0,74 (0,43 – 1,26)	13	9,39 (3,86 – 22,87)
[In(2Ac4oClPh) ₂]NO ₃	In6	0,05 (0,02 – 0,14)	47	1,25 (0,69 – 2,25)	2	1,64 (0,66 – 4,08)	1	2,15 (0,79 – 5,85)
H2Ac4mClPh		0,50 (0,09 – 2,89)	14	0,71 (0,37 – 1,34)	10	0,70 (0,30 – 1,61)	10	6,93 (4,30 – 11,16)
[In(2Ac4mClPh) ₂]NO ₃	In7	0,10 (0,02 – 0,34)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H2Ac4pClPh		0,19 (0,02 – 2,04)	16	1,78 (0,75 – 4,19)	2	0,84 (0,18 – 3,87)	4	2,99 (0,49 – 18,45)
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In2	0,20 (0,06 – 0,73)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
[In(2Ac4pClPh) ₂]NO ₃	In8	0,34 (0,14 – 0,79)	ND	0,90 (0,44 – 1,85)	ND	ND	ND	ND
H2Ac4pFPh		0,28 (0,13 – 0,59)	11	2,27 (1,31 – 3,93)	1	3,26 (1,22 – 8,70)	1	2,94 (1,69 – 5,18)
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)]	In3	0,10 (0,05 – 0,23)	501	1,94 (0,57 – 6,60)	26	1,31 (0,51 – 3,36)	39	51,09 (11,62 – 224,50)
[In(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃	In9	0,07 (0,03 – 0,17)	66	5,46 (1,76 – 16,95)	< 1	0,62 (0,32 – 1,20)	8	4,62 (1,87 – 11,43)
H2Ac4pIPh		0,86 (0,46 – 1,63)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)]	In4	0,40 (0,22 – 0,71)	8	9,81 (8,34 – 11,53)	< 1	1,50 (0,89 – 2,52)	2	3,24 (1,67 – 6,29)
[In(2Ac4pIPh) ₂]NO ₃	In10	0,88 (0,23 – 3,38)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cisplatina		0,49 (0,09 – 2,86)	21	20,89 (11,18 – 39,04)	< 1	9,68 (9,42 – 9,96)	1	10,05 (4,67 – 21,61)

^a Atividade citotóxica expressa como valor médio (µM) e intervalo de confiança a 95%.

^b Índice de seletividade (IS) = CI₅₀ Vero / CI₅₀ célula tumoral

ND = não determinado devido à precipitação em concentrações maiores que 10 µM nas condições do ensaio, enquanto que a 1 µM a inibição é inferior a 50%.

Tabela 3.14. Atividade citotóxica (CI₅₀)^a e índice de seletividade (IS)^b das tiossemicarbazonas, complexos **In1-In10** e cisplatina nas linhagens celulares de tumor sólido (MDA-MB 231, MCF-7 e HCT-116) e na célula saudável Vero

		CI ₅₀ (µM) e índice de seletividade (IS)						Vero
		MDA-MB 231	IS	MCF-7	IS	HCT-116	IS	
H2Ac4Ph		2,86 (0,76 – 11,10)	ND	0,34 (0,04 – 2,65)	ND	0,60 (0,12 – 1,87)	ND	ND
[In(2Ac4Ph) ₂] ₂ NO ₃	In5	0,16 (0,05 – 0,50)	18	0,54 (0,06 – 5,32)	5	0,02 (0,01 – 0,06)	144	2,87 (1,02 – 8,11)
H2Ac4oClPh		0,21 (0,06 – 0,80)	ND	0,93 (0,18 – 4,76)	ND	0,48 (0,06 – 3,88)	ND	ND
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In1	0,36 (0,09 – 1,51)	26	0,44 (0,05 – 4,26)	21	0,12 (0,05 – 0,30)	81	9,39 (3,86 – 22,87)
[In(2Ac4oClPh) ₂] ₂ NO ₃	In6	0,42 (0,15 – 1,19)	5	0,22 (0,06 – 0,80)	10	0,10 (0,03 – 0,31)	22	2,15 (0,79 – 5,85)
H2Ac4mClPh		0,17 (0,06 – 0,46)	41	0,16 (0,04 – 0,71)	43	0,70 (0,25 – 1,97)	10	6,93 (4,30 – 11,16)
[In(2Ac4mClPh) ₂] ₂ NO ₃	In7	0,11 (0,04 – 0,31)	ND	ND	ND	0,04 (0,02 – 0,09)	ND	ND
H2Ac4pClPh		0,08 (0,03 – 0,20)	37	0,03 (0,01 – 0,24)	100	0,55 (0,18 – 1,69)	5	2,99 (0,49 – 18,45)
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In2	ND	ND	ND	ND	0,40 (0,09 – 1,75)	ND	ND
[In(2Ac4pClPh) ₂] ₂ NO ₃	In8	ND	ND	ND	ND	0,19 (0,01 – 3,41)	ND	ND
H2Ac4pFPh		0,35 (0,20 – 0,63)	8	1,86 (0,17 – 20,57)	2	0,05 (0,01 – 0,29)	59	2,94 (1,69 – 5,18)
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)]	In3	0,18 (0,04 – 0,88)	285	0,19 (0,06 – 0,60)	276	0,14 (0,04 – 0,52)	373	51,09 (11,62 – 224,50)
[In(2Ac4pFPh) ₂] ₂ NO ₃	In9	0,11 (0,04 – 0,29)	42	0,11 (0,01 – 0,91)	43	0,01 (0,01 – 0,04)	420	4,62 (1,87 – 11,43)
H2Ac4pIPh		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)]	In4	0,37 (0,11 – 1,23)	9	4,95 (1,50 – 16,28)	< 1	0,65 (0,08 – 5,25)	5	3,24 (1,67 – 6,29)
[In(2Ac4pIPh) ₂] ₂ NO ₃	In10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cisplatina		51,50 (30,35 – 87,39)	< 1	37,66 (18,12 – 78,27)	< 1	12,95 (7,86 – 21,32)	< 1	10,05 (4,67 – 21,61)

^a Atividade citotóxica expressa como valor médio (µM) e intervalo de confiança a 95%.

^b Índice de seletividade (IS) = CI₅₀ Vero / CI₅₀ célula tumoral

ND = não determinado devido à precipitação em concentrações maiores que 10 µM nas condições do ensaio, enquanto que a 1 µM a inibição é inferior a 50%.

Embora os sais de In(III) tenham sido inativos, observou-se que a citotoxicidade das tiossemicarbazonas contra as células tumorais aumentou em diversos casos pela coordenação ao In(III). Em destaque, os complexos de In(III) exibiram valores de CI_{50} que correspondem a doses sub-micromolares e índices de seletividade bastante elevados contra as células de leucemia HL-60. Os complexos derivados de H2Ac4oCIPh provaram ser bastante ativos, **In1** ($CI_{50} = 45$ nM, IS = 209) e **In6** ($CI_{50} = 46$ nM, IS = 47). Esses complexos são 22 vezes mais ativos que o ligante precursor e 10 vezes mais ativos que a cisplatina. Em relação às linhagens celulares de tumores sólidos, os resultados mais expressivos foram observados em testes com as células de carcinoma colo-retal HCT-116. Destacam-se os complexos **In5** ($CI_{50} = 20$ nM, IS = 144) e **In9** ($CI_{50} = 11$ nM, IS = 420), os quais foram consideravelmente mais ativos que a cisplatina ($CI_{50} = 12,95$ μ M).

Além dos complexos de In(III) serem mais ativos que os ligantes precursores em vários casos, a complexação também mostrou ser uma estratégia interessante para aumentar os índices de seletividade. Em destaque, o complexo **In3** exibe SI = 501 para a linhagem HL-60, o qual é 45 vezes superior ao índice de seletividade exibido pelo ligante precursor.

De forma geral, não foi possível observar uma seletividade preferencial dos complexos $[In(L)Cl_2(MeOH)]$ (**In1-In4**) ou $[InL_2]NO_3$ (**In5-In10**) em relação a células de leucemia ou de tumor sólido. Todos os compostos mostraram-se bastante ativos frente a todas as células e apresentaram índices de seletividade elevados em diversos casos. De forma similar, recentemente também foi reportado que o complexo $[InL_2]NO_3$ (HL = 2-benzoilpiridina *N*(4)-ciclohexiltiossemicarbazona) exibe atividade antiproliferativa contra a linhagem HepG2 de câncer de fígado, com $CI_{50} = 2,02 \pm 0,14$ μ M e toxicidade 5 vezes menor em hepatócitos normais do tipo QSG7701.¹²⁹

3.2.3. Estudos de relação estrutura-atividade (SAR)

Estudos de relação estrutura atividade (SAR) foram realizados para identificar as propriedades físico-químicas que podem estar relacionadas com o mecanismo de ação citotóxico e antifúngico dos compostos **In1-In4**. As propriedades de interesse calculadas foram a energia do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO - *Highest occupied molecular orbital*), a energia do orbital molecular não ocupado de menor energia

¹²⁹ Y.X. Tai, Y.M. Ji, Y.L. Lu, M.X. Li, Y.Y. Wu, Q.X. Han, *Synth. Met.* **2016**, 219, 109-114.

(LUMO - *Lowest unoccupied molecular orbital*), momento dipolo (μ), área superficial (AS), volume molecular (V) e coeficiente de partição octanol-água (log P).

A área superficial e o volume molecular fornecem informações sobre características espaciais necessárias para interação molécula-receptor. Valores de log P e momento de dipolo fornecem informações sobre a lipofilia e polaridade dos compostos. As energias dos orbitais HOMO e LUMO estão relacionadas com o potencial de ionização e a afinidade eletrônica dos compostos, respectivamente. Esses orbitais de fronteira estão associados com a reatividade das moléculas: as energias de HOMO e LUMO relacionam-se com a susceptibilidade a ataques eletrofílicos e nucleofílicos, respectivamente.¹³⁰

Baseado nos cálculos termodinâmicos das reações de substituição de ligantes, os estudos de SAR foram conduzidos para os complexos não-substituídos (**In1a-In4a**) e suas formas derivadas monoaquá ($[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})]^+$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})]^+$) e diaquá ($[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$). Na Tabela 3.15 estão apresentados os valores das propriedades moleculares calculadas para todas essas espécies. As propriedades calculadas para os ligantes encontram-se reportadas na literatura.¹³¹

Tabela 3.15. Propriedades estéreo-eletrônicas calculadas para os complexos **In1a-In4a** e suas formas monoaquá ($[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})]^+$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})]^+$) e diaquá ($[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$)

Composto	E _{HOMO} (eV)	E _{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	AS (Å ²)	V (Å ³)	log P
In1a	-6,018	-2,456	3,562	21,954	508,98	407,68	4,20
In2a	-5,884	-2,427	3,457	20,613	500,11	397,38	3,78
In3a	-5,960	-2,414	3,546	20,830	516,70	409,22	4,16
In4a	-5,757	-2,417	3,340	18,034	520,49	419,81	4,25
$[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_{\text{ax}}]^+$	-6,075	-2,595	3,479	15,767	495,73	398,72	3,38
$[\text{In2a}-(\text{H}_2\text{O})_{\text{ax}}]^+$	-5,969	-2,558	3,411	13,013	489,14	388,70	2,95
$[\text{In3a}-(\text{H}_2\text{O})_{\text{ax}}]^+$	-5,966	-2,584	3,382	13,406	504,34	400,02	3,34
$[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_{\text{ax}}]^+$	-5,837	-2,560	3,278	15,891	510,52	411,35	3,48
$[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	-6,180	-2,741	3,439	24,934	491,90	391,18	2,59
$[\text{In2a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	-6,060	-2,742	3,318	23,647	478,17	380,14	2,22
$[\text{In3a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	-6,051	-2,746	3,305	26,368	490,29	391,13	2,57
$[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	-5,924	-2,748	3,176	36,783	499,92	402,69	2,68

Os dados claramente mostram que a substituição de ligante cloreto por água diminui o carácter lipofílico dos complexos e diminui tanto a área superficial quanto o volume molecular. Por exemplo, para o complexo **In1a**, o valor de log P diminui de 4,20 em **In1a** para 3,38 em $[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})]^+$ e 2,59 em $[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, ao passo que o volume

¹³⁰ A.A. Oliveira, G.M.C. Perdigo, L.E. Rodrigues, J.G. da Silva, E.M. Souza-Fagundes, J.A. Takahashi, W.R. Rocha, H. Beraldo. *Dalton Trans.* **2017**, 46, 918-932.

¹³¹ 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.I. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 3396-3409.

molecular também diminui 407,68 para 398,72 e 391,18 Å³ na mesma sequência de substituição. Para todos os complexos, a diferença de energia entre HOMO e LUMO também diminui com a substituição de cloreto por água.

Para o estudo de SAR, as propriedades calculadas foram correlacionadas, mediante matrizes de correlação linear simples, com os valores de CI₅₀ para a atividade antifúngica e citotóxica. O estudo de SAR foi possível para as quatro espécies de leveduras investigadas. Porém, em relação à atividade citotóxica, a determinação de CI₅₀ para alguns complexos e ligantes não foi possível devido a problemas de solubilidade. Portanto, as análises de SAR foram conduzidas somente para células HL-60, em que foi possível a obtenção do CI₅₀ para todos os compostos.

A atividade citotóxica dos ligantes não mostrou correlações significativas com as propriedades moleculares calculadas. As melhores correlações foram encontradas para o log P (R = 0,58) e para o momento de dipolo molecular (R = 0,73). No entanto, correlações razoáveis foram encontradas para os complexos. Por exemplo, uma boa correlação da energia HOMO com o CI₅₀ é encontrada para os complexos **In1a-In4a** (R = 0,85), para os derivados monoaqua (R = 0,95) e os derivados diaqua (R = 0,94). O momento de dipolo dos complexos não substituídos (R = 0,95) e dos derivados diaqua (R = 0,94) também se correlaciona bem com a atividade, bem como os volumes moleculares que apresentam correlações razoáveis, com R = 0,81 (**In1a-In4a**), R = 0,82 (derivados monoaqua) e R = 0,79 (derivados diaqua). O carácter lipofílico não desempenha um papel importante na atividade citotóxica, desde que nenhuma correlação foi encontrada com o parâmetro log P.

Em conclusão, observou-se que os valores de CI₅₀ correlacionam-se razoavelmente com a energia de HOMO, o que sugere que um ataque eletrofílico externo nesses compostos ou uma doação de elétrons desses compostos para um receptor podem estar envolvidos no mecanismo de ação. Além disso, os resultados também indicam que a polaridade e o volume molecular dos complexos podem estar envolvidos no mecanismo.

Em relação à atividade antimicrobiana, observou-se que os parâmetros estéreo-eletrônicos correlacionam de forma diferente para cada levedura e, portanto, não permitem uma conclusão geral. A atividade contra *C. albicans* não se correlaciona bem com qualquer uma das propriedades calculadas. No entanto, boas correlações são encontradas para *C. parapsilosis* envolvendo a área da superfície (R > 0,90), volume molecular (R > 0,90) e log P (R > 0,90). Esses resultados sugerem que o transporte dos complexos através da área reativa desempenha um papel importante no mecanismo de ação. Para *C. Lusitaniae*, boas

correlações são encontradas para a energia do HOMO ($R > 0,90$). Portanto, diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos na atividade antifúngica dos complexos.

Vale a pena notar que não há uma mudança significativa nas correlações quando os ligantes cloretos são substituídos por água. Como exemplo, na Tabela 3.16 são apresentadas as matrizes de correlação envolvendo os parâmetros estereo-eletrônicos dos complexos **In1a-In4a** e de seus derivados diaqua $[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ - $[\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ e os valores de CI_{50} encontrados frente as espécies de *Candida*.

Tabela 3.16. Matrizes de correlação entre os valores de CI₅₀ obtidos para as espécies de *Candida* e as propriedades estéreo-eletrônicas dos complexos **In1a-In4a** e de seus derivados diaqua $[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} - [\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$

Complexos In1a - In4a											
	<i>C. Albicans</i>	<i>C. Parapsilosis</i>	<i>C. Lusitaniae</i>	<i>C. Dubliniensis</i>	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	AS (Å ²)	V (Å ³)	Log P
<i>C. Albicans</i>	1										
<i>C. Parapsilosis</i>	0,04703	1									
<i>C. Lusitaniae</i>	-0,58444	0,52147	1								
<i>C. Dubliniensis</i>	-0,03706	-0,80652	-0,06815	1							
HOMO (eV)	-0,62131	0,23511	0,94885	0,24586	1						
LUMO (eV)	0,22495	0,23782	0,55918	0,36851	0,61921	1					
ΔE (eV)	0,72880	-0,21527	-0,94384	-0,20265	-0,98911	-0,49692	1				
μ (D)	0,52105	-0,45228	-0,98927	-0,05309	-0,97191	-0,66178	0,95009	1			
AS (Å ²)	0,09064	0,97665	0,60745	-0,66343	0,35626	0,44092	-0,31109	-0,56610	1		
V (Å ³)	-0,23182	0,95461	0,73205	-0,70541	0,48057	0,27149	-0,48023	-0,65963	0,94293	1	
log P	0,03495	0,95478	0,32658	-0,94573	0,01164	-0,05658	-0,02347	-0,22699	0,86962	0,88166	1

Complexos $[\text{In1a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} - [\text{In4a}-(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$											
	<i>C. Albicans</i>	<i>C. Parapsilosis</i>	<i>C. Lusitaniae</i>	<i>C. Dubliniensis</i>	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	AS (Å ²)	V (Å ³)	Log P
<i>C. Albicans</i>	1										
<i>C. Parapsilosis</i>	0,04703	1									
<i>C. Lusitaniae</i>	-0,58444	0,52147	1								
<i>C. Dubliniensis</i>	-0,03706	-0,80652	-0,06815	1							
HOMO (eV)	-0,32023	0,40076	0,92396	0,17959	1						
LUMO (eV)	0,00163	-0,78387	-0,80224	0,26586	-0,85460	1					
ΔE (eV)	0,31126	-0,41517	-0,92424	-0,16581	-0,99986	0,86332	1				
μ (D)	-0,49821	0,74362	0,95356	-0,36217	0,82184	-0,85300	-0,82665	1			
AS (Å ²)	-0,21562	0,96110	0,60663	-0,82859	0,39721	-0,70766	-0,40922	0,81783	1		
V (Å ³)	-0,28178	0,94327	0,72696	-0,72537	0,54021	-0,78938	-0,55087	0,90001	0,98640	1	
log P	-0,00475	0,97386	0,40649	-0,91640	0,21903	-0,62811	-0,23345	0,66204	0,96913	0,92177	1

3.2.4. Estudo das interações não-covalentes entre **In1-In4** e alvos biológicos

A capacidade dos complexos [In(L)Cl₂(MeOH)] (**In1-In4**) interagirem com HSA e DNA foi avaliada a partir de titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas. As mesmas investigações com os compostos [InL₂]NO₃ (**In5-In10**) não foram realizadas, pois esses não apresentam uma solubilidade adequada em meio aquoso.

3.2.4.1. Interação com albumina sérica humana (HSA)

A aplicação de medidas de fluorescência para o estudo da interação entre HSA e os complexos de In(III) origina-se de trabalhos que demonstraram que a fluorescência das proteínas é devida a três aminoácidos: triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe).¹³² Quando os três resíduos estão presentes na mesma proteína, como em HSA, o comprimento de onda de máxima excitação ocorre próximo de 280 nm, sendo que somente os resíduos de Trp e Tyr contribuem para o espectro de emissão.¹³³ Espectros de fluorescência obtidos utilizando $\lambda_{\text{ex}} \geq 295$ nm devem-se totalmente ao resíduo Trp-214.¹³⁴

A interação de uma molécula com HSA pode produzir modificações na orientação do resíduo Trp-214, alterando sua exposição ao solvente. Conforme exemplificado na Figura 3.13 para o composto **In1**, HSA apresenta forte emissão em 340 nm empregando-se 295 nm como comprimento de onda de excitação. Sob o aumento da concentração de **In1**, observou-se um deslocamento hipsocrômico (de 340 nm para 331 nm), o qual nos permite sugerir que se tornou mais hidrofóbico o microambiente ao redor do resíduo Trp-214 mediante a interação com **In1**. De fato, o resíduo Trp-214 é sensível à polaridade local. Em dois casos extremos, o resíduo Trp-25 do glucagon é totalmente acessível ao solvente aquoso ($\lambda_{\text{max}} = 355$ nm), enquanto que na proteína azurina o resíduo Trp-48 está localizado na parte interior, em uma região não-polar ($\lambda_{\text{max}} = 308$ nm).¹³⁵ Estudos de difração de raios X mostram que o resíduo Trp-214 de HSA está em uma cavidade que limita parcialmente a acessibilidade do solvente.¹³⁶

¹³² Ross, J.B.A.; Laws, W.R.; Shea, M.A. Intrinsic fluorescence in protein. In: Uversky, V.N.; Permyakov, E.A. (Eds.). *Methods in protein structure and stability analysis*. New York: Nova Science, Inc., 2007.

¹³³ J.R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Springer, 2006.

¹³⁴ S. Bobone, M. Van de Weert, L. Stella. *J. Mol. Struct.* **2014**, 1077, 68-76.

¹³⁵ S. D'Auria, M. Staiano, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov. The combined use of fluorescence spectroscopy and x-ray crystallography greatly contributes to elucidating structure and dynamics of proteins. In: Geddes, C.D.; Lakowicz, J.R. (Eds.). *Reviews in fluorescence 2005*. New York: Springer, 2005, 25-61.

¹³⁶ D.C. Carter, J.X. Ho. *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45, 153-203.

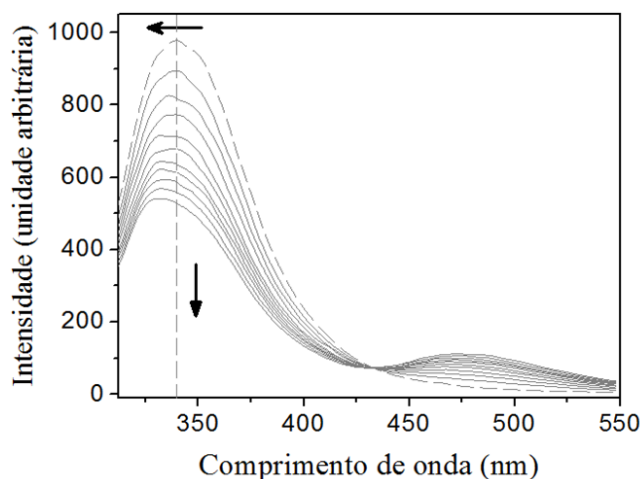


Figura 3.13. Espectro de emissão de HSA (1,92 μM) a 298K na ausência (- -) e presença (—) de quantidades crescentes de **In1** (0,24 – 2,34 μM). As setas indicam as mudanças espectrais. Condição: $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$.

(a) Estudo do mecanismo de supressão da fluorescência

Conforme mostrado na Figura 3.13, um máximo de intensidade da fluorescência pode ser observado na solução de HSA na ausência de **In1**. Na presença, há uma contínua desativação da emissão fluorescente, o que nos permite estudar o tipo de interação que existe entre o fluoróforo e o agente supressor de fluorescência.¹³⁷

Existem diferentes formas de supressão da fluorescência, entre as quais podemos citar as reações de estado excitado, como a doação de elétrons a partir de um agente supressor e o estado excitado pode ser o aceptor; rearranjos moleculares; transferência de energia fluorescente ressonante (FRET – *fluorescence resonance energy transfer*); supressão dinâmica, no qual o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton durante uma colisão com um supressor, dentro do tempo de vida do estado excitado; supressão estática, em que o supressor forma um complexo não fluorescente com o fluoróforo no estado fundamental.¹³⁸ Nesse trabalho os mecanismos dinâmico e estático de supressão da fluorescência do resíduo Trp-214 foram avaliados.

No mecanismo de supressão dinâmica, a redução da intensidade da fluorescência na presença de um agente supressor (Q) é descrita pela equação de Stern-Volmer:

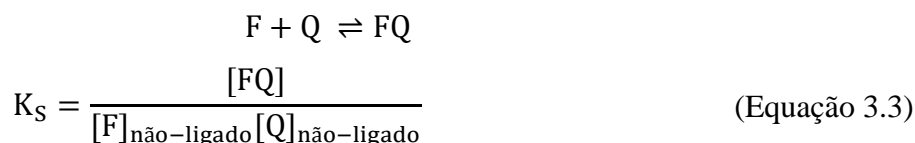
$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] \quad (\text{Equação 3.2})$$

¹³⁷ B. Valeur. *Molecular Fluorescence: Principles and applications*. New York: Wiley-VCH, 2001.

¹³⁸ C.D. Geddes. *Meas. Sci. Technol.* **2001**, 12, R53–R88.

em que F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, K_{SV} é a constante de supressão dinâmica (unidade: M^{-1}). Fisicamente, $(K_{SV})^{-1}$ refere-se à concentração do agente supressor necessária para reduzir em 50% a fluorescência inicial.

No caso mais simples do mecanismo de supressão estática, ocorre uma interação do tipo 1:1 entre o fluoróforo (F) e o agente supressor de fluorescência (Q), resultando na formação de um complexo não fluorescente (FQ):



A constante de ligação K_S , denominada de constante de supressão estática, é também determinada a partir da dependência linear entre F_0 / F em $[Q]$.

$$F_0/F = 1 + K_S[Q] \quad (\text{Equação 3.4})$$

Embora a equação de Stern-Volmer descreva ambos os processos de supressão, por meio de medidas do tempo de vida fluorescente (τ) é possível discernir qual processo ocorre. No mecanismo estático não ocorre perturbação do fluoróforo no estado excitado, seu tempo de vida τ_0 é constante. No mecanismo de supressão dinâmica, há uma diminuição da população do estado excitado em razão da supressão por colisões, resultando em $F_0 / F = \tau_0 / \tau$. Esses mecanismos também são distinguíveis examinando suas dependências com a temperatura. Maiores temperaturas resultam em processos mais rápidos de difusão e, assim, a constante de supressão colisional (K_{SV}) aumenta com a temperatura. Ao contrário, o processo de supressão estático é desencorajado, pois o aumento da temperatura reduz a estabilidade do complexo não fluorescente.¹³⁹

Com a finalidade de verificar qual seria o mecanismo de supressão da fluorescência, os experimentos de interação com HSA foram realizados em três diferentes temperaturas (293, 298 e 308K). Conforme mostrado na Figura 3.14, foram obtidos gráficos do tipo F_0/F em função da concentração do agente supressor, empregando-se como referência a intensidade de fluorescência em $\lambda_{em} = 340$ nm. A constante de supressão de fluorescência é determinada como o coeficiente angular da reta.

¹³⁹ M.R. Eftink, C.A. Ghiron. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80(5), 486-493.

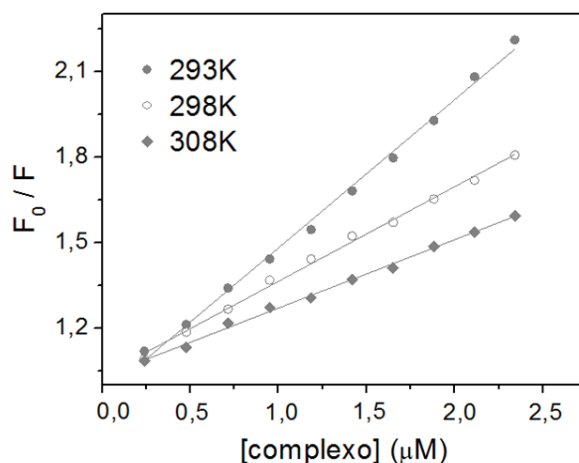


Figura 3.14. Representação gráfica das relações de Stern–Volmer para a supressão de fluorescência de HSA por **In1** em diferentes temperaturas.

Conforme apresentado na Tabela 3.17, os valores de K_S são inversamente correlacionados com a temperatura, sugerindo que a supressão de fluorescência ocorre pelo mecanismo estático.

Tabela 3.17. Constantes de supressão fotofísica da fluorescência (K_S), logaritmo das constantes de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e os complexos **In1–In4** a diferentes temperaturas.

Complexo	T (K)	K_S ($10^5 M^{-1}$)	Log K_b	n
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)] In1	293	$5,20 \pm 0,09$	$5,86 \pm 0,12$	$1,03 \pm 0,02$
	298	$3,32 \pm 0,07$	$5,32 \pm 0,09$	$0,94 \pm 0,02$
	308	$2,40 \pm 0,05$	$4,69 \pm 0,16$	$0,86 \pm 0,03$
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)] In2	293	$4,69 \pm 0,07$	$5,66 \pm 0,14$	$0,98 \pm 0,02$
	298	$3,13 \pm 0,07$	$5,04 \pm 0,12$	$0,91 \pm 0,03$
	308	$2,68 \pm 0,05$	$4,41 \pm 0,07$	$0,87 \pm 0,01$
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)] In3	293	$4,88 \pm 0,09$	$5,37 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,02$
	298	$3,65 \pm 0,07$	$5,30 \pm 0,13$	$0,95 \pm 0,02$
	308	$2,61 \pm 0,07$	$4,88 \pm 0,10$	$0,90 \pm 0,02$
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)] In4	293	$3,84 \pm 0,08$	$5,38 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,02$
	298	$3,42 \pm 0,05$	$5,22 \pm 0,10$	$0,95 \pm 0,02$
	308	$2,67 \pm 0,04$	$5,02 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,01$

A taxa de supressão fotofísica (K_q ; unidade: $M^{-1}s^{-1}$) é outro parâmetro útil para corroborar a afirmação de que a supressão de fluorescência ocorre por um mecanismo estático. K_q pode ser obtido a partir da seguinte relação:

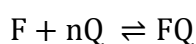
$$K_{SV} = K_q \tau_0 \quad (\text{Equação 3.5})$$

onde τ_0 é o tempo de vida médio do fluoróforo na ausência do supressor (unidade: s).

O valor de K_q reflete a eficiência da supressão dinâmica. Um processo de supressão por difusão resulta em $K_q \approx 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Valores menores são indicativos de blindagem dos fluoróforos, enquanto que valores maiores sugerem estar presente alguma forma de ligação, resultado da extinção estática de fluorescência.¹⁴⁰ Considerando-se o tempo de vida fluorescente do fluoróforo Trp-214 não-extinto como sendo 10^{-8} s , foram observados valores de K_q da ordem de $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o que excede em muito a taxa máxima de difusão da biomolécula em solução aquosa. Assim, esse resultado confirma que os processos de supressão se devem principalmente à formação de uma interação específica entre HSA e complexo de In(III).

(b) Determinação da constante de ligação (K_b) e do número de sítios de ligação (n)

Uma vez que o mecanismo de supressão estática foi observado, a constante de ligação supressor - fluoróforo (K_b) é determinada pela Equação 3.6, supondo que há um número (n) de sítios independentes de ligação em HSA. Conforme mostrado na Figura 3.15, os valores de $\log K_b$ e n foram obtidos como sendo intercepto e inclinação, respectivamente, do ajuste linear do gráfico $\log[(F_0 - F) / F]$ como função de $\log[Q]$.



$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q] \quad (\text{Equação 3.6})$$

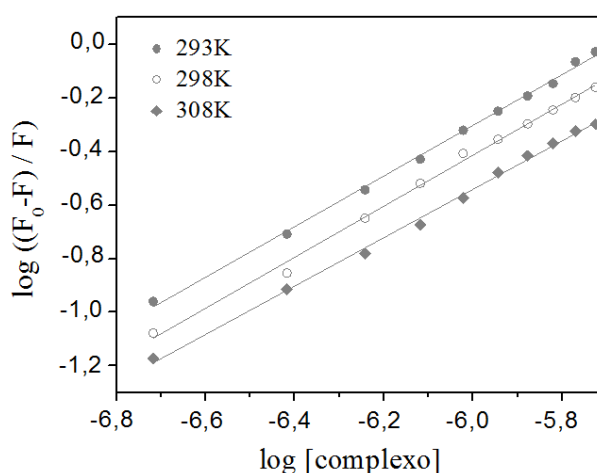


Figura 3.15. Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ x $\log[\text{complexo}]$ usados na determinação de K_b e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e **In3** a diferentes temperaturas.

¹⁴⁰ S. Tabassum, M. Zaki, M. Ahmad, M. M. Afzal, S. Srivastav, S. Srikrishna, D. Arjmand. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 141-154.

Os valores de $\log K_b$ obtidos, apresentados na Tabela 3.17, diminuem com o aumento da temperatura do experimento, resultado de uma diminuição na estabilidade do sistema HSA - In(III). Esses valores são similares aos reportados para vários agentes terapêuticos que interagem reversivelmente com HSA.¹⁴¹ Os valores de n próximos de 1 sugerem que os compostos de In(III) ligam-se a HSA de acordo com a razão molar de 1:1.

É importante observar que ambas as constantes K_S e K_b referem-se à formação do complexo fluoróforo - agente supressor, sendo obtidos a partir de modelos físicos diferentes: K_S (modelo que estabelece interação 1:1 entre fluoróforo e agente supressor), K_b (modelo que estabelece interação 1:n entre fluoróforo e agente supressor). Nesse caso, quanto mais exata for a relação molar 1:1, mais os valores de K_b e K_S se aproximam.

(c) Abordagem termodinâmica das interações entre HSA e **In1-In4**

A interação supramolecular entre HSA e pequenas moléculas é atribuída a quatro interações não covalentes: ligação de hidrogênio, Van der Waals, eletrostática e interação hidrófoba. A natureza das forças que dirigem a formação do complexo ou mantem sua estrutura pode ser revelada pela análise dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na ligação. A energia livre de Gibbs (ΔG) pode ser determinada a partir da constante de equilíbrio (K_b), conforme a relação termodinâmica:

$$\Delta G = - RT \ln K_b \quad (\text{Equação 3.7})$$

onde R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta.

A variação de entalpia padrão (ΔH°) e a variação de entropia padrão (ΔS°) podem ser determinadas graficamente a partir da dependência da constante de equilíbrio com a temperatura, usando a relação de Van't Hoff:

$$\ln K_b = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R \quad (\text{Equação 3.8})$$

Assim, os parâmetros ΔH° e ΔS° foram obtidos a partir de gráficos $\ln K_b$ vs $1/T$ ao multiplicar o coeficiente angular e o coeficiente linear das retas pela constante dos gases R . Na Figura 3.16. é mostrado o diagrama de Van't Hoff para as interações estudadas.

¹⁴¹ U.K. Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagiri. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25(6), 695-704.

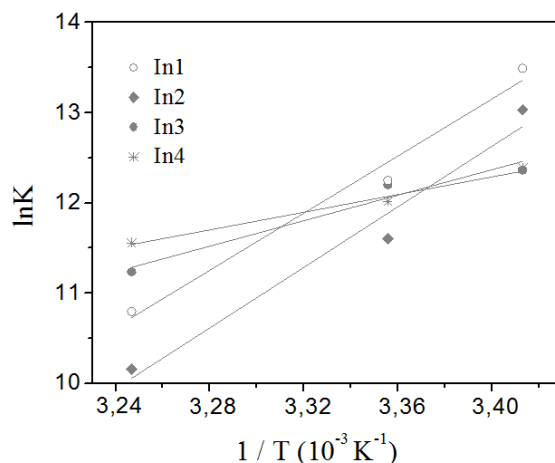


Figura 3.16. Diagrama de Van't Hoff ($\ln K$ vs $1/T$) para a interação entre HSA e **In1-In4**

Na Tabela 3.18 são apresentados os valores obtidos para ΔG , ΔH° e ΔS° . Com base em resultados termodinâmicos e evidências cristalográficas de compostos que interagem com HSA, os sinais dos parâmetros ΔH° e ΔS° podem ser associados com as interações que ocorrem entre proteínas e pequenas moléculas.¹⁴² Algumas das conclusões são: (1) as contribuições para a entropia positiva surgem de interações iônicas ($\Delta H^\circ \approx 0$) e hidrofóbicas ($\Delta H^\circ > 0$) e (2) as únicas fontes de mudanças negativas de entalpia e entropia resultam de interações de Van der Waals ou da formação de ligação de hidrogênio.

As variações de entalpia padrão (ΔH°) e entropia padrão (ΔS°) determinadas foram negativas, sugerindo que interações de Van der Waals e / ou ligações de hidrogênio desempenham um papel principal nas interações. Os sinais negativos para ΔG em todos os casos revelam a espontaneidade do processo de ligação.

Tabela 3.18. Parâmetros termodinâmicos da interação entre os complexos **In1-In4** e HSA a diferentes temperaturas.

Composto	T (K)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)] In1	293	-32,87	-131,59	-338,05
	298	-30,35		
	308	-27,66		
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)] In2	293	-31,75	-139,60	-369,61
	298	-28,75		
	308	-26,00		
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)] In3	293	-30,12	-58,72	-96,82
	298	-30,24		
	308	-28,78		
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)] In4	293	-30,18	-40,63	-35,97
	298	-29,78		
	308	-29,60		

¹⁴² P.D. Ross, S. Subramanian. *Biochemistry* **1981**, 20(11), 3096-3102.

3.2.4.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA)

(a) Titulação espectrofotométrica

A titulação espectrofotométrica no UV-Vis é a técnica *in vitro* mais comumente empregada para avaliar se um composto interage com o DNA.¹⁴³ Essencialmente, são avaliadas as progressivas alterações espectrais do composto após a adição de uma série de alíquotas de DNA. Conforme mostrado na Figura 3.17a, o espectro de absorção dos complexos **In1-In4** foi obtido na ausência e na presença de adições incrementais de DNA.

Durante a titulação, observou-se um ponto isosbético próximo de 423 nm, sugerindo contribuições ópticas de duas diferentes espécies, bem como um deslocamento batocrômico e um pronunciado efeito hipocrômico no comprimento de onda de máxima absorção. Essas alterações estão de acordo com um modo de ligação intercalativo, em que o hipocromismo resulta de interações “ π -stacking” entre grupos aromáticos e pares de bases do DNA, como no caso do agente intercalante brometo de etídio.¹⁴⁴ O deslocamento batocrômico está associado com a diminuição da diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO após a ligação ao DNA.

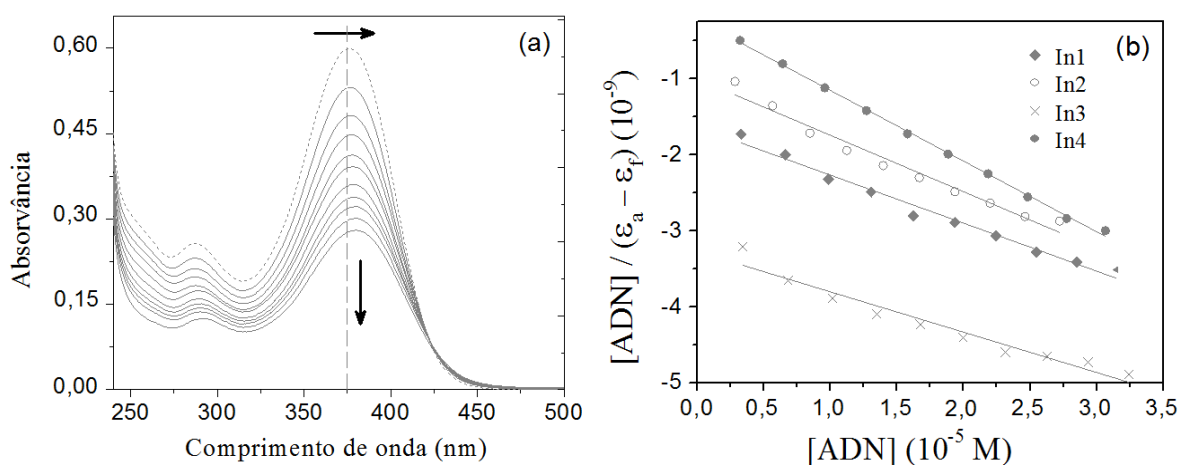


Figura 3.17. (a) Espectro de absorção eletrônica de **In1** (concentração inicial de 33 μ M) na ausência (- -) e presença (—) de quantidades crescentes de DNA (razões molares complexo:DNA variando de 10:1 a 1:1). As setas indicam as mudanças espectrais ocorridas. (b) Gráficos de [DNA] vs. [DNA]/($\epsilon_a - \epsilon_f$) para a interação entre os compostos de In(III) e DNA.

¹⁴³ R. Palchaudhuri, P.J. Hergenrother. *Curr. Opin. Biotech.* **2007**, 18, 497-503.

¹⁴⁴ E.C. Long, J.K. Barton. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23(9), 271-273.

A titulação espectrofotométrica fornece um valor confiável para a constante de ligação (K_b).¹⁴⁵ Ao assumir que há somente um tipo de interação entre um composto bioativo (CB) e DNA em solução aquosa, temos:

$$\text{CB} + \text{DNA} \rightleftharpoons \text{CB-DNA}$$

$$K_b = \frac{[\text{CB-DNA}]}{[\text{CB}][\text{DNA}]} \quad (\text{Equação 3.9})$$

A seguinte equação pode ser estabelecida:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (\text{Equação 3.10})$$

onde $[\text{DNA}]$ é a concentração do DNA por par de bases, o coeficiente de extinção aparente ϵ_a corresponde à relação $A_{\text{obs}} / [\text{CB}]$ e os termos ϵ_f e ϵ_b correspondem aos coeficientes de extinção do composto não-ligado e completamente ligado ao DNA, respectivamente.

O gráfico de $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ resulta em coeficiente angular e interceptos iguais a $1 / (\epsilon_b - \epsilon_f)$ e $1 / K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$. A razão entre o coeficiente angular e intercepto resulta na constante de ligação (K_b). Os gráficos obtidos para **In1-In4** são mostrados na Figura 3.17b, sendo apresentados na Tabela 3.19 os valores de K_b .

Tabela 3.19. Constante de ligação intrínseca (K_b), concentração requerida para reduzir em 50% a fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constante de ligação aparente (K_{app}) de **In1-In4**

Composto		K_b (M^{-1})	C_{50} (μM)	K_{app} (M^{-1})
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In1	$(3,87 \pm 0,32) \times 10^4$	24,05	$4,98 \times 10^5$
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)]	In2	$(7,46 \pm 0,45) \times 10^4$	26,08	$4,59 \times 10^5$
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)]	In3	$(1,63 \pm 0,12) \times 10^4$	51,42	$2,33 \times 10^5$
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)]	In4	$(4,27 \pm 0,54) \times 10^5$	35,86	$3,34 \times 10^5$

(b) Deslocamento competitivo do cátion etídio

Para se obter evidências adicionais que permitam estabelecer o modo de ligação de um composto ao DNA, é útil o estudo envolvendo o deslocamento competitivo de um agente intercalante da estrutura do DNA. Brometo de etídio (BE) é um corante catiônico planar que pode ser utilizado para esse propósito.

¹⁴⁵ T. Topala, A. Bodoki, L. Oprean, R. Oprean. *Farmacia* **2014**, 62, 1049-1061.

O deslocamento competitivo através da titulação de uma solução contendo adutos DNA-etídio com um composto pode ser acompanhado por fluorescência, uma vez que o sal brometo de etídio é apenas fracamente fluorescente, enquanto o aduto DNA-etídio é altamente fluorogênico. Assim, a diminuição da fluorescência sugere um mecanismo intercalante. Na Figura 3.18a estão apresentados os espectros de emissão do BE ligado ao DNA na ausência e presença do complexo **In1**.

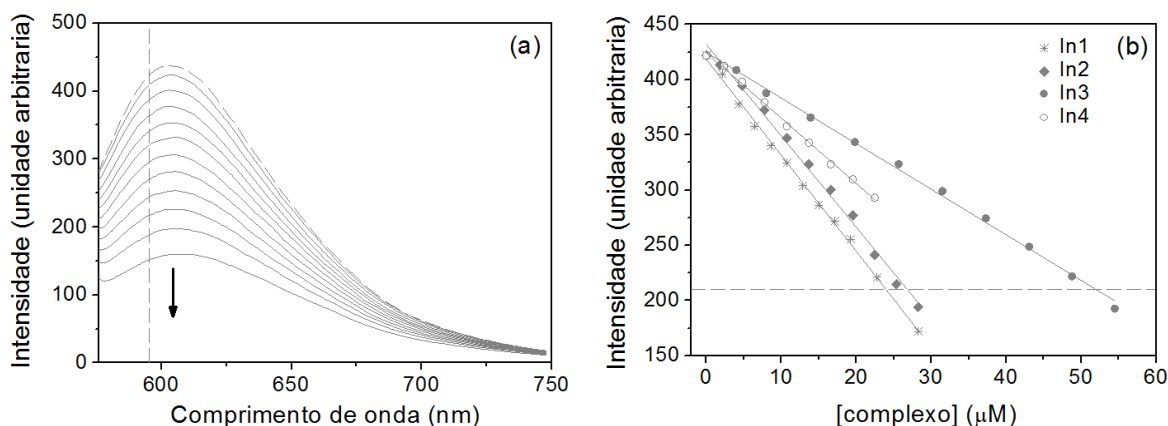


Figura 3.18. (a) Espectro de emissão do sistema BE (1,26 μM) - DNA (2,00 μM) na ausência (- - -) e presença (—) de quantidades crescentes de **In1** (0 a 29 μM). A seta mostra a mudança espectral mediante o aumento da concentração de **In1** e a linha vertical representa $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$. (b) Efeito da concentração dos complexos sobre a intensidade da fluorescência do sistema EB-DNA. A linha horizontal representa $F_0 / F = 2$.

O sistema EB-DNA mostra uma forte emissão em 595 nm quando o comprimento de onda de excitação é 546 nm. Uma redução notável na intensidade de emissão foi observada quando **In1** foi adicionado ao sistema, presumivelmente devido à redução no número de locais de ligação no DNA disponíveis para o cátion etídio. Embora desprovido de anéis fundidos, característica estrutural comumente associada com o mecanismo intercalador, a variação espectral suporta a ideia de que o complexo interage com DNA, ao menos parcialmente, por um mecanismo de intercalação atípico.¹⁴⁶

A constante de ligação aparente K_{app} , um indicador indireto da afinidade de ligação, pode ser calculada por:

$$K_{\text{app}} = \frac{K_{BE} \times [\text{BE}]}{C_{50}} \quad (\text{Equação 3.11})$$

¹⁴⁶ R.D. Snyder. *Mutat. Res.* **2007**, 623(2), 72-82.

em que K_{BE} é a constante de ligação entre brometo de etídio e DNA ($9,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ por par de base, $[BE]$ é a concentração de brometo de etídio utilizada nos testes ($1,92 \mu\text{M}$) e C_{50} é a concentração necessária do composto para que 50% da fluorescência inicial seja perdida, o que corresponde ao deslocamento de 50% do íon etídio inicialmente intercalado.

Conforme mostrado na Figura 3.18b, os valores de C_{50} para os complexos **In1-In4** foram obtidos a partir do gráfico de intensidade de fluorescência em função da concentração do complexo de In(III), no ponto em que a intensidade de fluorescência representa 50% do valor inicial. Os valores de C_{50} determinados e os valores de K_{app} calculados estão presentes na Tabela 3.19. Os valores de K_{app} obtidos são comparáveis ao valor apresentado pelo agente intercalador actinomicina D, $K_{app} = 9,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$,¹⁴⁷ um conhecido fármaco antitumoral.¹⁴⁸

3.3. Conclusões e perspectivas

A complexação de tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ heterocíclicas a diferentes cátions metálicos tem se revelado uma estratégia interessante para aumentar a ação dessas como agentes antimicrobianos e citotóxicos frente a células tumorais. Assim, pareceu-nos interessante sintetizar complexos de In(III) derivados de 2-acetilpiridina *N*(4)-fenil-tiossemicarbazonas. Foram obtidos dez compostos, sendo quatro complexos neutros do tipo $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**In1-In4**) e seis sais do tipo $[\text{InL}_2]\text{NO}_3$ (**In5-In10**). As caracterizações de **In1-In10** revelaram que as tiossemicarbazonas atuam como ligantes tridentados coordenando-se ao centro metálico através do sistema $\text{N}_{py}\text{-N}_{imina}\text{-S}$. Dados de condutividade eletrolítica mostram que os complexos **In1-In4** são neutros e **In5-In10** são eletrólitos do tipo 1:1. As estruturas cristalográficas de **In1a-In8a** foram determinadas e indicaram uma geometria octaédrica distorcida ao redor do centro metálico.

Os estudos de atividade antimicrobiana revelaram que os microrganismos avaliados foram pouco sensíveis aos complexos **In5-In10**. As cepas bacterianas mostraram-se ainda pouco sensíveis ao sal InCl_3 e as tiossemicarbazonas precursoras exibiram atividades pouco significativas (valores de CI_{50} superiores a $220 \mu\text{mol/L}$). No entanto, os complexos **In1-In4** são ativos, embora com valores de CI_{50} ainda bastante superiores aos exibidos pelos antibióticos usados como referência, ciprofloxacina e tetraciclina. A ação

¹⁴⁷ A. Kellett, M. O'Connor, M. McCann, M. McNamara, P. Lynch, G. Rosair, V. McKee, B. Creaven, M. Walsh, S. McClean, A. Foltyn, D. O'Shea, O. Howe, M. Devereux. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 1024-1027.

¹⁴⁸ U. Hollstein. *Chem. Rev.* **1974**, 74(6), 625-652.

antibacteriana de maior destaque foi de **In1** frente a *C. freundii* ($CI_{50} = 7,51 \pm 2,63$ $\mu\text{mol/L}$). Em relação à atividade antifúngica, a complexação das tiossemicarbazonas com In(III) provou ser uma estratégia interessante para redução da dose necessária para inibir o crescimento das espécies avaliadas. Em destaque, os complexos **In1-In4** exibiram valores de CI_{50} inferiores a 3,80 $\mu\text{mol/L}$ frente às espécies *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*, mostrando-se mais ativos que o antifúngico de referência nistatina em alguns casos.

As tiossemicarbazonas e os complexos **In1-In10** foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a viabilidade de algumas linhagens celulares de leucemia humana e tumores sólidos. Os sais InCl_3 e $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ provaram ser inativos, ao passo que as tiossemicarbazonas e seus complexos provaram ser potentes agentes citotóxicos. Em vários casos, em comparação ao ligante livre, a coordenação das tiossemicarbazonas ao In(III) resultou no aumento tanto da citotoxicidade quanto do índice de seletividade (IS), obtido empregando-se células Vero como modelo de células saudáveis. $IS = CI_{50} \text{ Vero} / CI_{50} \text{ célula tumoral}$. Em relação às linhagens celulares de tumores sólidos, destacam-se os resultados frente às células de carcinoma colo-retal HCT-116: **In1** ($CI_{50} = 116$ nM, IS = 81), **In3** ($CI_{50} = 137$ nM, IS = 373), **In5** ($CI_{50} = 20$ nM, IS = 144) e **In9** ($CI_{50} = 11$ nM, IS = 420). Em relação às linhagens de leucemia humana, destacam-se os resultados frente às células HL-60, em que na maioria dos casos os compostos de In(III) exibiram valores de CI_{50} em doses nanomolares.

Embora a investigação sobre o mecanismo de seletividade dos complexos de In(III) esteja além do escopo do presente trabalho, podemos sugerir que a ligação dos complexos à proteína transferrina presente no meio de cultura poderia, pelo menos em parte, explicar os altos índices de seletividade observados para alguns dos compostos. De fato, transferrina (Tf) pode fornecer um caminho para a absorção de metalofármacos terapêuticos.¹⁴⁹ Boas correlações foram encontradas entre a expressão de receptores de transferrina (TfR) e a absorção de ^{67}Ga em tecidos malignos.¹⁵⁰ Partindo do princípio de que In(III) também se liga fortemente à transferrina,¹⁵¹ nós podemos hipotetizar que transferrina também seria capaz de entregar os complexos de In(III) para as células por um mecanismo de endocitose mediada por receptor.

Essa hipótese é suportada por estudos de biodistribuição de radiofármacos de ^{111}In em ratos, os quais mostram que, independentemente do radiofármaco injetado, os

¹⁴⁹ A. Casini, J. Reedijk, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3135-3144.

¹⁵⁰ C.R. Chitambar, Z. Zivkovic, *Cancer Res.* **1987**, 47(15), 3929-3934.

¹⁵¹ W.R. Harris, Y. Chen, K. Wein, *Inorg Chem.* **1994**, 33, 4991-4998.

compostos tendem a se localizar em tecidos de rápida divisão celular, consituídos por células que expressam numerosos receptores da transferrina.¹⁵² De forma similar, há níveis elevados de expressão de TfR em células malignas, atribuído à exigência de elevado nível de ferro para o seu crescimento.¹⁵³ Para reafirmar a nossa hipótese, na literatura é reportado que a inibição da proliferação de células HL-60 por complexos de Tf-In(III) é 50 vezes maior em comparação com a inibição induzida por nitrato de índio(III).¹⁵⁴

Estudos teóricos e evidências experimentais indicaram que os complexos [In(L)Cl₂(MeOH)] (**In1-In4**) sofrem a substituição do ligante metanol por DMSO, com a formação de [In(L)Cl₂(DMSO)] (**1a-4a**). Em solução aquosa, a substituição de DMSO por água é desfavorável, ao passo que a substituição dos ligantes cloreto por água é favorável, sugerindo a possibilidade da formação das espécies [In(L)Cl(H₂O)(DMSO)]⁺ ou [In(L)(H₂O)₂(DMSO)]⁺² em meio aquoso. A partir desses resultados, estudos de relação estrutura-atividade (SAR) foram realizados para identificar as propriedades físico-químicas que podem estar relacionadas com o mecanismo de ação citotóxico e antifúngico dos compostos **In1a-In4a** ou de seus derivados monoaquá ou diaquá.

A atividade citotóxica dos ligantes não mostrou qualquer correlação significativa com as propriedades moleculares calculadas. No entanto, correlações razoáveis foram encontradas para os complexos **In1a-In4a** entre os valores de CI₅₀ e os parâmetros energia de HOMO, momento de dipolo e volume molecular. Em relação à atividade antimicrobiana, observou-se que os parâmetros estereo-eletrônicos correlacionam de forma diferente para cada levedura do gênero *Candida*, de forma que diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos. De forma geral, os estudos de SAR não indicaram alterações significativas nas correlações calculadas com os complexos **In1a-In4a** e seus derivados mono e / ou diaquá, provavelmente como uma consequência dos processos muito favoráveis de substituição de ligantes cloreto por água. Assim, nos testes biológicos realizados, os complexos **In1-In4** podem estar atuando como pró-fármacos.

Os estudos de interação *in vitro* dos complexos **In1-In4** com o DNA mostraram a capacidade de esses interagirem com a biomolécula através de um provável mecanismo de intercalação atípico. Assim, podemos sugerir que essa interação seja parcialmente responsável pela ação biológica dos compostos. Entretanto, para essa interação de fato

¹⁵² B.A. Jonsson, S.E. Strand, B.S. Larson, *J. Nucl. Med.* **1992**, 33(10), 1825-1833.

¹⁵³ H. Li, Z.M. Qian, *Med. Res. Rev.* **2002**, 22(3), 225-250.

¹⁵⁴ P.L. Moran, P.A. Seligman, *Cancer Res.* **1989**, 49(15), 4237-4241.

ocorrer, é inevitável a passagem dos compostos pelas barreiras lipídicas formadas por membranas celulares, o que não foi estudado.

Identificou-se ainda nesse trabalho a capacidade de **In1-In4** interagirem *in vitro* com albumina do soro humano (HSA) através de ligações de hidrogênio e / ou forças de Van der Waals, com constante de ligação similar a de fármacos comerciais. Essa observação nos permite sugerir que os compostos poderiam ser transportados pela proteína no soro sanguíneo para alcançar seus alvos terapêuticos.

É importante considerar que a ligação à albumina tem sido descrita como uma possível rota de entrada de drogas oncológicas em células tumorais. O sucesso de HSA como um veículo de transporte pode ser atribuído à capacidade dos adutos formados se acumularem em tumores explorando o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR - *Enhanced permeability and retention effect*).¹⁵⁵ Essa interação é explorada no Abraxane, um fármaco oncológico aprovado pelo FDA que usa HSA para entregar paclitaxel dentro da célula.¹⁵⁶ Essa estratégia também foi recentemente explorada em estudos com pró-fármacos citotóxicos de Pt(IV).¹⁵⁷

Uma vez que os complexos **In1-In4** interagem *in vitro* com HSA, o efeito EPR também poderia ocorrer *in vivo* com associações HSA-In(III). Considerando essa possibilidade e, em vista dos baixos valores de CI_{50} e os altos índices de seletividade exibidos pelos complexos, bem como considerando a habilidade desses complexos em se ligarem ao DNA *in vitro*, é possível sugerir que os complexos de In(III) sintetizados são potenciais candidatos a fármacos. Portanto, são relevantes os estudos adicionais que investiguem os perfis farmacológicos e toxicológicos desses compostos *in vivo*.

¹⁵⁵ H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, 65, 271-284.

¹⁵⁶ Z. Liu and X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 1432-1456.

¹⁵⁷ Y.R. Zheng, K. Suntharalingam, T.C. Johnstone, H. Yoo, W. Lin, J. G. Brooks, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136(24), 8790-8798.

CAPÍTULO 4. RADIOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA:
 POTENCIAL APLICAÇÃO DE COMPLEXOS DE $^{114m}\text{In(III)}$ COM
 2-ACETILPIRIDINA-*N*(4)-FENIL TIOSSEMICARBAZONAS

Neste capítulo foi estudada a influência da radiação ionizante sobre a ação citotóxica dos complexos **In1**, **In3**, **In6** e **In9** (Figura 4.1), avaliados frente às células de câncer de mama (MCF-7) e células saudáveis de fibroblasto humano (MRC-5). Os derivados radioativos (***In1**, ***In3**, ***In6** e ***In9**) foram obtidos pelo processo de irradiação neutrônica, uma estratégia recentemente reportada para o preparo de complexos de $^{103}\text{Ru(II)}$.¹⁵⁸

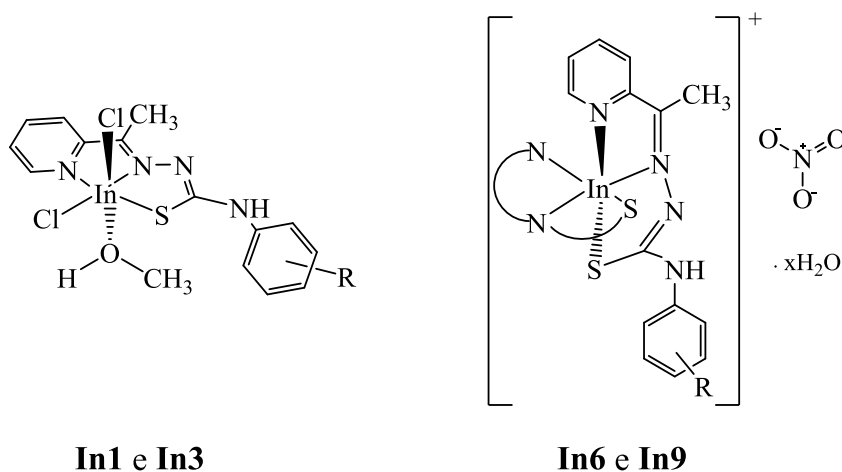


Figura 4.1. Complexos de In(III) ativados neutronicamente. R = *o*Cl (**In1** e **In6**) ou *p*F (**In3** e **In9**)

4.1. Caracterização dos complexos radioativos de In(III)

O elemento químico índio consiste naturalmente de uma mistura de dois núclídeos: ^{113}In , o único isótopo estável de índio (4,3% de abundância) e ^{115}In , um isótopo fracamente radioativo (95,7% de abundância), com meia-vida de $4,41 \times 10^{14}$ anos.¹⁵⁹ Amostras dos sais InCl_3 e $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ e dos complexos **In1**, **In3**, **In6** e **In9** contendo as abundâncias naturais de ^{113}In e ^{115}In foram ativadas neutronicamente com a finalidade de serem produzidos seus derivados radioativos.

Após 4 horas de irradiação neutrônica e um “tempo de resfriamento” adequado, as amostras foram submetidas à espectrometria de raios γ . Conforme mostrado na Figura 4.2,

¹⁵⁸ A.M. Montel, R.G. dos Santos, P.R. da Costa, E.P. Silveira-Lacerda, A.A. Batista, W.G. dos Santos. *Biometals* **2017**, 30, 295-305.

¹⁵⁹ National Nuclear Data Center. www.nndc.bnl.gov/nudat2, acessado em abril de 2017.

a formação dos isômeros radioativos ^{114m}In e ^{115m}In foi observada na forma de picos estreitos na região de baixa energia do espectro de emissão de radiação γ do complexo **In1***. A formação de ^{114m}In é caracterizada pelos picos em 190,3 keV, 558,8 keV e 725,2 keV, ao passo que o pico em 336,2 keV é característico de ^{115m}In .¹⁵⁹

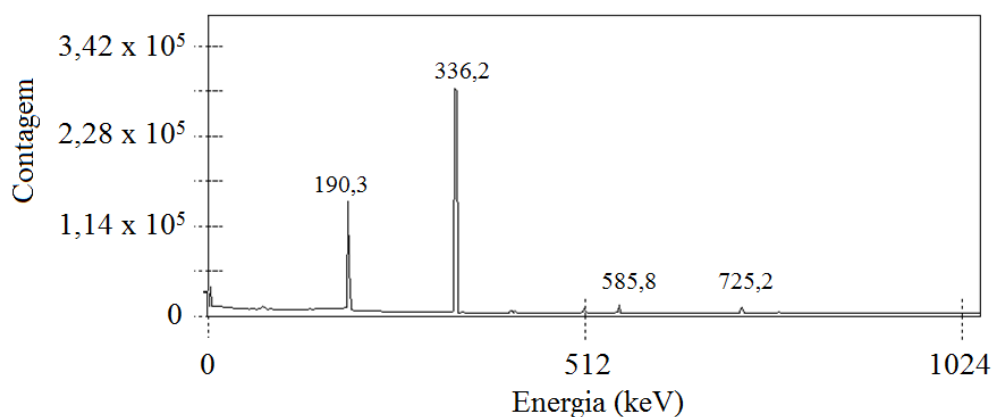


Figura 4.2. Espectro de raios γ do composto ***In1**

A interação dos nêutrons irradiados se processa essencialmente com os núcleos dos átomos presentes nas amostras, podendo ocorrer através dos mecanismos de espalhamento ou absorção do nêutron. Os mecanismos de espalhamento recebem esse nome devido a uma alteração no movimento do nêutron antes e após a colisão, podendo ser do tipo elástico (n,n) e inelástico (n,n'), conforme a troca de energia cinética entre o núcleo alvo e o nêutron incidente, onde o nêutron permanece livre após a interação.¹⁶⁰

Nas reações de absorção, o nêutron incidente é retido pelo núcleo alvo e novas espécies são formadas. A absorção pode ocorrer via: (1) captura radioativa, em que o núcleo alvo é levado a um estado excitado, emitindo o excesso de energia na forma de raios gama (n, γ); (2) emissão de partículas, em que o núcleo excitado pode se desexcitar emitindo prótons (n,p), partículas alfa (n, α) e nêutrons (n,2n) ou (n,3n); (3) fissão nuclear, em que núcleos excitados de massa elevada são quebrados dando origem a núcleos mais leves (n,f).¹⁶⁰

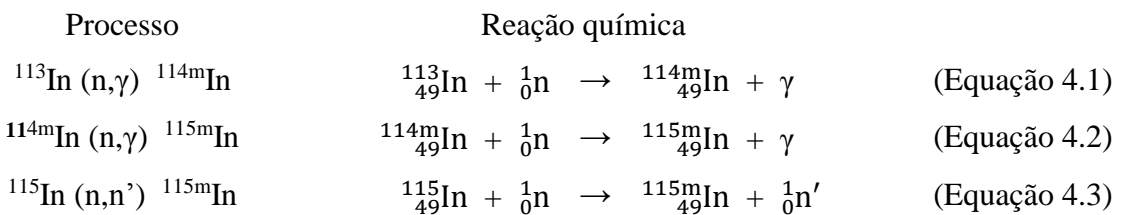
Como citado, são alguns os tipos de interações possíveis entre o nêutron incidente e o núcleo alvo, as quais podem ocorrer simultaneamente. Alguma reação prevalecerá sobre as outras, o que depende, entre outros fatores, da seção de choque nêutron-núcleo (σ). Cada tipo de interação nêutron-núcleo apresenta uma seção de choque característica que

¹⁶⁰ (a) B. Zohuri. *Neutronic Analysis for Nuclear Reactor Systems*. Switzerland: Springer, 2017; J.R. (b) Lamarsh, A.J. Baratta. *Introduction to Nuclear Engineering*, 3ª Ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2001; (c) G.B. Saha, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, New York: Springer-Verlag, 2010.

representa a probabilidade de ocorrência da reação nuclear associada. Possuindo unidade de área ($1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$), a seção de choque pode ser interpretada como uma área virtual associada ao núcleo alvo, sobre a qual o nêutron deve incidir para haver reação.¹⁶⁰

A ativação dos compostos de In(III) resultou na formação de $^{114\text{m}}\text{In}$ e $^{115\text{m}}\text{In}$. Empregando-se nêutrons rápidos de alta energia, são descritos na literatura os valores das seções de choque que resultam na formação dessas espécies, segundo os processos $^{113}\text{In} (n,\gamma) ^{114\text{m}}\text{In}$, $^{115}\text{In} (n,2n) ^{114\text{m}}\text{In}$, $^{115}\text{In} (n,n') ^{115\text{m}}\text{In}$ e $^{114\text{m}}\text{In} (n,\gamma) ^{115\text{m}}\text{In}$.¹⁶¹ Entretanto, o reator TRIGA MARK IPR-R1 utilizado fornece condições diferentes de operação, sendo baseado principalmente na produção de nêutrons térmicos (abaixo de 0,025 eV) e epitérmicos (0,5 eV a 0,5 MeV). Nessas condições ainda não foram medidas as seções de choque para os processos de ativação neutrônica citados.

Segundo a literatura, processos de emissão de partículas subatômicas (n,α) , (n,γ) e $(n,2n)$ somente ocorrem se o nêutron incidente apresentar energia suficiente para romper a força de atração entre os nucleons e posteriormente ejetá-los. Assim, a probabilidade de ocorrência de emissão de partículas será mínima empregando-se nêutrons térmicos e epitérmicos no processo de ativação e será maior empregando-se nêutrons rápidos. Por outro lado, empregando-se nêutrons com energia inferior a 2 MeV, a maior contribuição para a seção de choque total de um núcleo está relacionada com reações do tipo (n,γ) .¹⁶⁰ Dessa forma, é possível hipotetizar que os mecanismos de captura de nêutrons representados por $^{113}\text{In} (n,\gamma) ^{114\text{m}}\text{In}$ e $^{114\text{m}}\text{In} (n,\gamma) ^{115\text{m}}\text{In}$, bem como o espalhamento inelástico $^{115}\text{In} (n,n') ^{115\text{m}}\text{In}$ foram os principais processos responsáveis pela formação de $^{114\text{m}}\text{In}$ e $^{115\text{m}}\text{In}$. As reações químicas que representam esses processos são:



Além de apresentar um esquema dos processos de ativação neutrônica dos isótopos ^{113}In e ^{115}In , na Figura 4.3 é apresentado um esquema dos decaimentos radioativos característicos das espécies produzidas.

¹⁶¹ (a) R.A. Forrest. *Fusion Eng. Des.* **2006**, 81(18), 2143-2156; (b) K. Kobayashi, I. Kimura, H. Gotoh, H. Yagi. *J. Nucl. Energy* **1973**, 27(10), 741-745; (c) F. Tuo, F. Zhou, Y. Yi, X. Cao, X. Kong. *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, 64(8), 910-914.

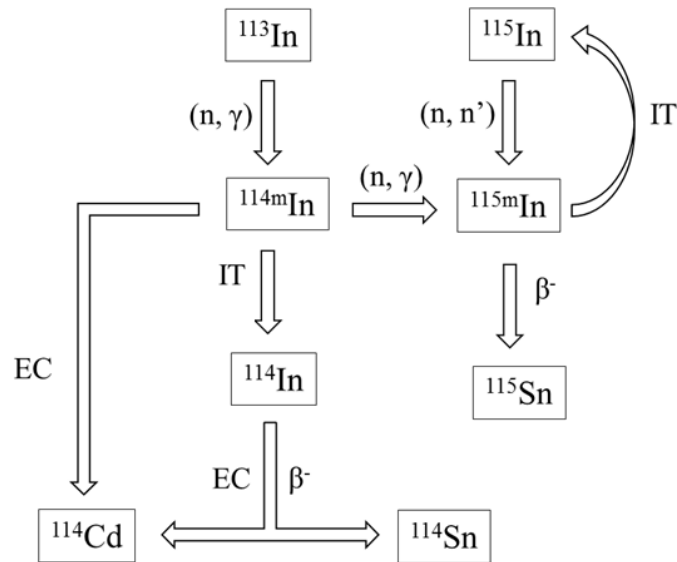


Figura 4.3. Possíveis processos de ativação neutrônica de ^{113}In / ^{115}In e processos de decaimento radioativo de $^{114\text{m}}\text{In}$ / $^{115\text{m}}\text{In}$.

O isômero $^{115\text{m}}\text{In}$ possui meia-vida relativamente curta ($t_{1/2} = 4,5$ horas). Em menor proporção (5,0%), $^{115\text{m}}\text{In}$ decai para o isótopo estável ^{115}Sn por emissão β^- . Em maior proporção (95,0%), $^{115\text{m}}\text{In}$ decai para o estado fundamental do isótopo ^{115}In pelo mecanismo de transição isomérica (IT - *isomeric transition*), sendo emitida uma radiação γ de 336,2 keV e uma quantidade substancial de elétrons Auger e elétrons de conversão.¹⁵⁹



O isômero $^{114\text{m}}\text{In}$ produzido é um estado metaestável de vida longa ($t_{1/2} = 49,5$ dias) que, com uma probabilidade de 3,25%, decai para o isótopo estável ^{114}Cd por meio de captura eletrônica (EC - *electron capture*), processo pelo qual são produzidas radiações γ de energias de 725,2 keV e 558,8 keV. A quantidade remanescente de $^{114\text{m}}\text{In}$ (96,75%) decai para o estado fundamental do isótopo ^{114}In por um mecanismo de transição isomérica, emitindo radiação γ de 190,3 keV e uma quantidade substancial de elétrons Auger de baixa energia (menor que 21 keV), além de decair por conversão interna (IC - *internal conversion*) produzindo elétrons na faixa energética de 162-190 keV.¹⁶² O radionuclídeo formado ^{114}In decai relativamente rápido ($t_{1/2} = 72$ segundos) principalmente

¹⁶² C. Wrede, B.W. Filipponi, A. García, G.C. Harper, S. Lassell, J. Liu, M.P. Mendenhall, A.S.C. Palmer, R.W. Pattie Jr., D.I. Will, A.R. Young. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2011**, 269(10), 1113-1116.

para o isótopo estável ^{114}Sn através da emissão de partículas β^- de alta energia (99,50%) e, em uma pequena proporção de 0,5%, ^{114}In decai para ^{114}Cd por captura eletrônica.^{159,163}



Medida em Becquerel (Bq), a atividade de um material radioativo refere-se ao número de desintegrações nucleares por segundo. A razão entre a atividade e a massa da substância que se desintegra é a atividade específica, medida em Bq/g.¹⁶⁰ A atividade específica induzida nas amostras, no final da irradiação, pode ser obtida a partir da Equação 4.10:¹⁶⁴

$$A_0 = \frac{N_p e^{\lambda t_d}}{\varepsilon \gamma \theta w t_m} \quad (\text{Equação 4.10})$$

em que N_p é o número de contagens totais do fotopico no intervalo t_m ; t_m é o tempo de contagem (unidade: s); t_d é o intervalo de tempo entre o final da irradiação e o início da contagem (unidade: s); λ é a constante de decaimento do nuclídeo formado (unidade: s^{-1}); ε é a eficiência de contagem no fotopico; γ é a probabilidade de emissão gama; θ é abundância isotópica do nuclídeo alvo; w é a massa em gramas correspondente ao nuclídeo alvo na amostra.

As atividades específicas induzidas nos complexos foram expressas em MBq/mol. No complexo ***In1** foram obtidos os valores de 6,34 MBq/mol e 1,40 MBq/mol para os fotopicos 190,3 keV (^{114m}In) e 336,2 keV (^{115m}In), respectivamente. A atividade específica total induzida nos complexos, considerando a soma das atividades específicas nos fotopicos 190,3 keV e 336,2 keV foram: 7,74 MBq/mol (***In1**), 7,99 MBq/mol (***In3**), 5,50 MBq/mol (***In6**) e 5,16 MBq/mol (***In9**).

Para verificar se ativação neutrônica dos compostos resultou em decomposição desses, foi realizado um controle de qualidade do processo por meio de cromatografia de camada delgada. Um baixo teor de impurezas hidrofílicas derivadas de ^{114m}In e ^{115m}In

¹⁶³ V. Tolmachev, P. Bernhardt, E. Forssell-Aronsson, H. Lundqvist. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27(2), 183-188.

¹⁶⁴ D.M. Zangirolami, A.H. Oliveira, A.V. Ferreira. *Braz. J. Phys.* **2010**, 40(1), 47-51.

foram retidas em $R_f = 0,0-0,1$, enquanto que os complexos ***In1** e ***In3** moveram-se com $R_f = 0,5-0,7$ e os complexos ***In6** e ***In9** moveram-se com $R_f = 0,5-0,8$. Nas mesmas condições de análise, os perfis cromatográficos dos compostos não radioativos foram iguais. A pureza radioquímica detectada para os complexos ativados foi maior que 90% para cada um dos compostos ativados. Adicionalmente, espectros eletrônicos de absorção na região do UV-Vis dos compostos não radioativos e dos compostos irradiados foram obtidos e mostraram-se similares, confirmando a estabilidade dos compostos após a ativação neutrônica.

4.2. Resultados biológicos e discussões

Após um tempo t do processo de ativação neutrônica, a atividade específica dos compostos (A_t) é dada pela equação da lei de decaimento radioativo exponencial:¹⁶⁰

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} \quad (\text{Equação 4.11})$$

em que A_0 é a atividade específica induzida nas amostras ao final da irradiação, $e^{-\lambda t}$ representa o fator de decaimento radioativo, sendo que $\lambda = \ln 2 / t_{1/2}$ e $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida do radioisótopo.

Considerando a meia-vida curta do isômero radioativo ^{115m}In ($t_{1/2} = 4,5$ horas) em comparação ao ^{114m}In ($t_{1/2} = 49,5$ dias), os ensaios biológicos foram planejados de iniciar 24 horas após o processo de ativação neutrônica, quando a atividade específica devida ao ^{115m}In foi considerada como sendo negligenciável. De fato, os fatores de decaimento radioativo de ^{115m}In e ^{114m}In são 0,02 e 0,99, respectivamente. Assim, durante o tratamento celular, o isômero ^{114m}In estava presente como o principal radioisótopo de In(III).

Atividade citotóxica frente a linhagem celular MCF-7

Conforme discutido no Capítulo 3, os sais InCl_3 e $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ foram inativos em inibir a viabilidade celular da linhagem MCF-7 em concentrações de até 100 μM . Entretanto, as tiossemicarbazonas $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ e $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{pFPh}$ foram altamente citotóxicas com valores de CI_{50} na faixa micromolar: $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ ($\text{CI}_{50} = 0,93 \mu\text{M}$) e $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{pFPh}$ ($\text{CI}_{50} = 1,86 \mu\text{M}$). Após a complexação com In(III) e formação dos complexos **In1**, **In3**, **In6** e **In9**, a atividade citotóxica aumentou em até 17 vezes dependendo do sal de partida e do ligante, sugerindo que a complexação foi uma boa estratégia para melhorar a citotoxicidade.

Objetivando estudar a influência da radiação sobre a ação citotóxica exibida pelos compostos, a citotoxicidade das espécies ativadas $^*In(NO_3)_3$, *InCl_3 e dos complexos (*In1 , *In3 , *In6 , *In9) foi avaliada frente às células de câncer de mama MCF-7. Na Tabela 4.1 são mostradas as concentrações dos compostos que inibiram em 50% a viabilidade celular (CI_{50}).

É possível observar que a ativação neutrônica notoriamente resultou em um aumento da ação citotóxica de **In1**, **In3**, **In6** e **In9**, visto que os derivados radioativos *In1 , *In3 , *In6 e *In9 foram de 10^3 a 10^4 vezes mais potentes do que os análogos não radioativos. Graficamente, a melhoria da atividade citotóxica após a ativação neutrônica pode ser claramente observada na Figura 4.4. Esses resultados indicam que a preparação dos complexos de ^{114m}In com tiossemicarbazonas constituiu uma interessante abordagem para combinar radiação e quimioterapia.

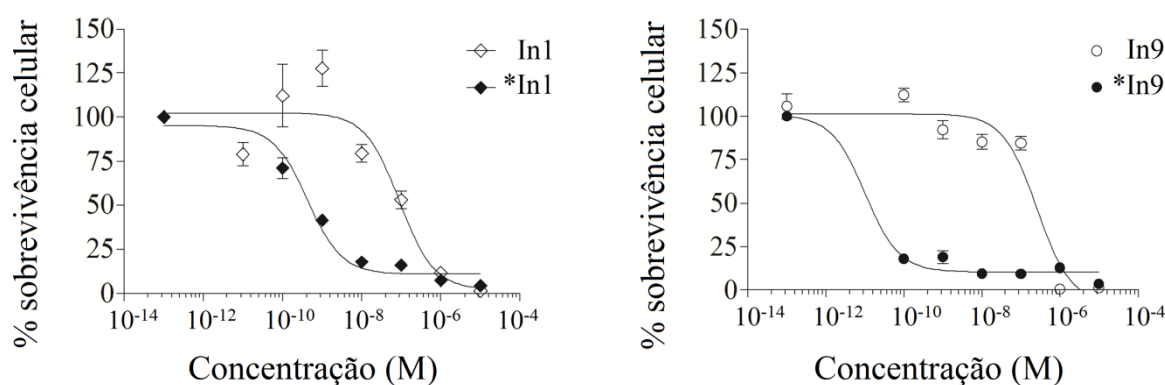


Figura 4.4. % de sobrevivência das células MCF-7 em função da concentração dos complexos **In1** e **In9** avaliados nas formas não radioativa e radioativa.

Com a finalidade de se verificar os efeitos da radiação sobre os índices de seletividade, a citotoxicidade dos complexos de In(III) não radioativos e radioativos foi avaliada em células MRC-5 (fibroblastos saudáveis de pulmão humano). Os índices de seletividade (IS) foram definidos como $CI_{50 \text{ MRC-5}} / CI_{50 \text{ MCF-7}}$. Conforme mostrado na Tabela 4.1, os índices de seletividade dos complexos não radioativos foram baixos ($IS < 1$), ao passo que valores elevados ($IS = 46 - 4716$) foram observados para os análogos radioativos, sugerindo que a irradiação representou uma estratégia eficaz para aumentar a seletividade dos complexos de In(III). Interessante notar que os índices de seletividade dos complexos *In3 e *In9 contendo tiossemicarbazonas derivadas de *para*-fluorofenil foram mais elevados do que os valores de IS dos complexos *In1 e *In6 contendo os análogos de *orto*-clorofenil.

Tabela 4.1. Atividade citotóxica (CI₅₀) dos sais In(NO₃)₃, InCl₃ e dos complexos **In1**, **In3**, **In6**, **In9** nas formas não radioativa e radioativa frente às linhagens celulares MCF-7 e MRC-5

	Valores de CI ₅₀ (μM) ^a e índices de seletividade (IS) ^b						CI ₅₀ (μM) não radioativo / CI ₅₀ (μM) radioativo	
	Compostos não radioativos			Compostos radioativos			MCF-7	MRC-5
	MCF-7	MRC-5	IS	MCF-7	MRC-5	IS		
InCl ₃	> 100	ND	ND	> 100	ND	ND	ND	ND
In(NO ₃) ₃	> 100	ND	ND	> 100	ND	ND	ND	ND
In1	0,09 (0,03 – 0,24)	3,24 x 10 ⁻² (2,02 x 10 ⁻² – 5,21 x 10 ⁻²)	0,36	4,32 x 10 ⁻⁴ (2,88 x 10 ⁻⁴ - 6,48 x 10 ⁻⁴)	1,96 x 10 ⁻² (1,34 x 10 ⁻² - 2,88 x 10 ⁻²)	46	208	1,64
In3	0,25 (0,13 – 0,47)	3,92 x 10 ⁻² (2,19 x 10 ⁻² – 7,02 x 10 ⁻²)	0,16	4,14 x 10 ⁻⁵ (2,70 x 10 ⁻⁵ - 6,35 x 10 ⁻⁵)	3,00 x 10 ⁻² (1,98 x 10 ⁻² - 4,54 x 10 ⁻²)	725	6039	1,31
In6	0,13 (0,07 – 0,22)	2,22 x 10 ⁻² (1,35 x 10 ⁻² – 3,66 x 10 ⁻²)	0,17	7,68 x 10 ⁻⁵ (5,01 x 10 ⁻⁵ - 1,18 x 10 ⁻⁴)	8,70 x 10 ⁻³ (5,29 x 10 ⁻³ - 1,43 x 10 ⁻²)	113	1695	2,55
In9	0,26 (0,12 – 0,55)	1,74 x 10 ⁻² (1,12 x 10 ⁻² – 2,72 x 10 ⁻²)	0,07	1,02 x 10 ⁻⁵ (4,83 x 10 ⁻⁶ - 2,14 x 10 ⁻⁵)	4,81 x 10 ⁻² (2,41 x 10 ⁻² - 9,62 x 10 ⁻²)	4716	25490	0,36
Cisplatina	35,15 (11,51 - 107,30)	5,05 (4,30 - 5,76)	0,14	ND	ND	ND	ND	ND

^a Valores de CI₅₀ expressos como média aritmética das medidas com o intervalo de 95% de confiança entre parênteses

^b IS = CI₅₀ MRC-5 / CI₅₀ MCF-7

ND = não determinado

Interessantemente, o aumento da atividade citotóxica nas células devido à ação da radiação, expresso por $CI_{50 \text{ não radioativo}} / CI_{50 \text{ radioativo}}$ (Tabela 4.1) foi de 0,36-2,55 e 208-25490 para a célula saudável MRC-5 e para a célula cancerígena MCF-7, respectivamente. Esses comportamentos distintos explicam o fato de o processo de ativação neutrônica resultar em compostos de In(III) com maiores índices de seletividade.

É importante ainda notar que a baixa dose radioativa dos compostos, *per se*, não resultou em efeitos citotóxicos, uma vez que os sais $*InCl_3$ e $*In(NO_3)_3$ foram inativos frente às células MCF-7 em concentrações de até 100 μM . Assim, além da sua própria atividade citotóxica, as tiossemicarbazonas podem também ter atuado como transportadores de $*In(III)$ para dentro das células.

Estudos *in vitro* reportados na literatura mostram que o decaimento de emissores de elétrons Auger que estão incorporados no DNA é altamente tóxico, ao passo que o decaimento não produz efeitos letais extraordinários quando o emissor está localizado fora do núcleo celular, como no citoplasma ou na região extracelular.¹⁶⁵ É sabido ainda que ^{114m}In é um emissor profílico de elétrons Auger, os quais possuem um caminho muito curto de penetração na matéria biológica, com ionizações ocorrendo dentro de um limitado microambiente ao redor do ponto de decaimento.¹⁶⁶ Dessa forma, nós podemos hipotetizar que o aumento da potência dos compostos ativados neutronicamente deve-se à deposição de energia ionizante de ^{114m}In nas vizinhanças de seu decaimento, supostamente o núcleo celular. Essa hipótese pode ser parcialmente sustentada pela observação de que **In1** e **In3** são capazes de se intercalar no DNA *in vitro*, conforme discutido no Capítulo 3.

Alterações morfológicas na membrana celular

Análises morfológicas empregando-se microscópio de contraste de fase mostraram que as células MCF-7 tratadas com os sais $InCl_3$ e $In(NO_3)_3$, nas formas radioativa e não radioativa, apresentaram crescimento e morfologia normais. Por outro lado, os complexos de In(III) nas formas radioativa e não radioativa induziram uma redução no número de células e mudanças morfológicas, tais como encolhimento celular, formas arredondadas e formação de “*blebs*” de membrana, consistentes com o processo de morte celular programada (apoptose). Como exemplos, na Figura 4.5 são mostradas as alterações morfológicas nas células MCF-7 tratadas com os complexos **In1**, ***In1**, **In9** e ***In9**.

¹⁶⁵ A.I. Kassis. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2011**, 143(2), 241-247.

¹⁶⁶ (a) H.A. Wright, R.N. Hamm, J.E. Turner, R.W. Howell, D.V. Rao, K.S.R. Sastry. *Radiat. Prot. Dosim.* **1990**, 31, 59-62; (b) A.I. Kassis. *Int. J. Radiat. Biol.*, **2004**, 80(11), 789-803.

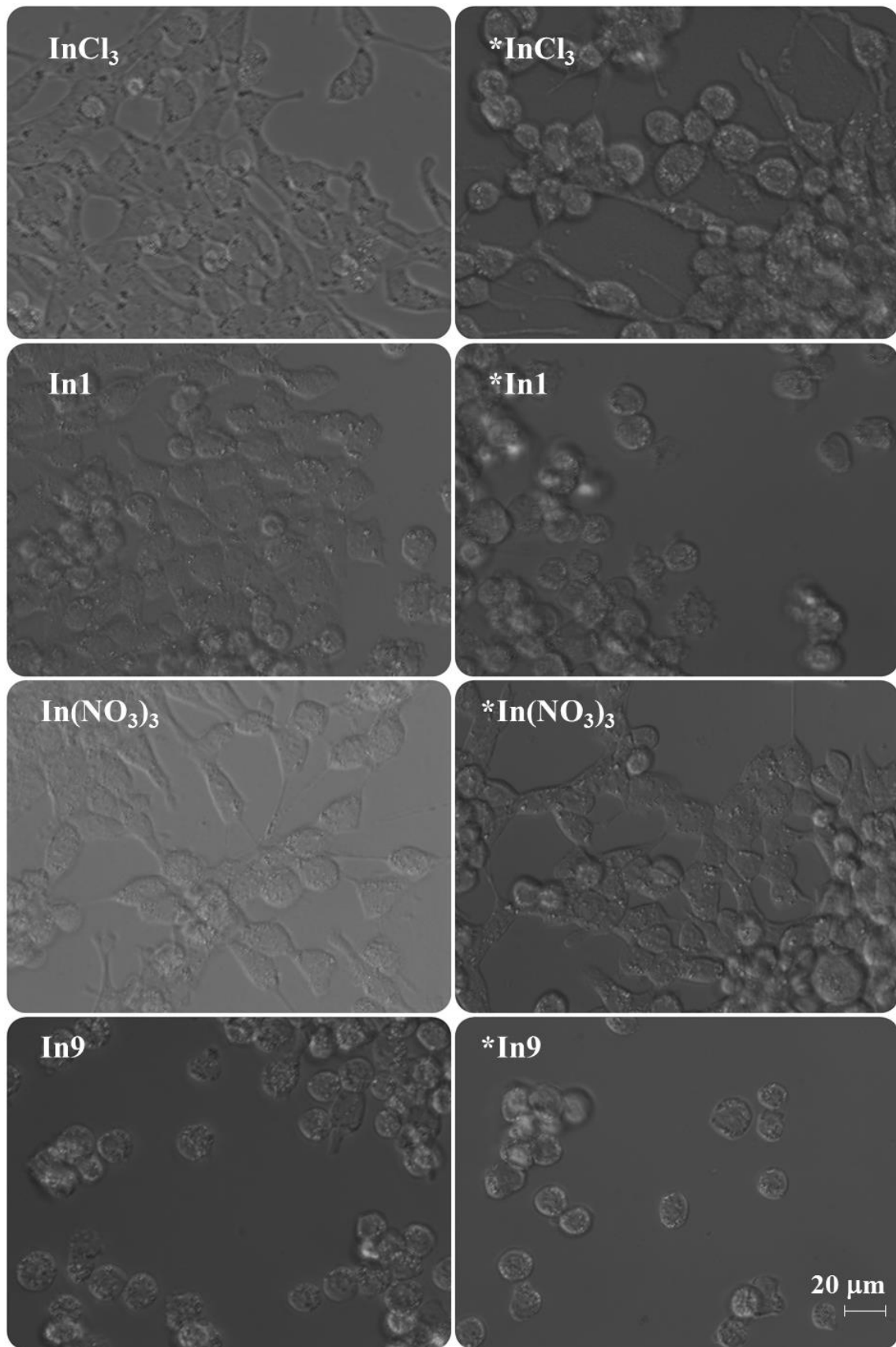


Figura 4.5. Mudanças morfológicas nas células MCF-7 após 48 horas de tratamento com os sais de In(III) ($100 \mu\text{M}$) e com os complexos **In1** e **In9** ($10^{-4} \mu\text{M}$), nas formas não radioativa e radioativa. Aumento de 400x, escala de $20 \mu\text{m}$.

Alterações morfológicas no núcleo celular

A radiobiologia clássica preconiza que os efeitos citotóxicos da radiação ionizante nas células são explicados principalmente por danos ao DNA. Vários tipos diferentes de lesões no DNA foram identificados, tais como quebra nas cadeias, modificação de base nitrogenada, perda de base nitrogenada ou formação de ligações cruzadas DNA-proteínas.¹⁶⁷

O processo de apoptose, o qual induz a fragmentação do DNA através da ativação de endonucleases, pode ser identificado através da coloração do DNA com 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI), o qual detecta DNA fragmentado e cromatina condensada. Como pode ser observado na Figura 4.6, nenhuma fragmentação do DNA foi observada nas células não tratadas. Após exposição aos complexos de In(III), foram observadas alterações incluindo a condensação da cromatina, núcleos em formato de ferradura e fragmentação dos núcleos na forma de corpos apoptóticos, visualizados como pequenos pontos brilhantes. Os complexos ativados induziram as mesmas alterações morfológicas. Estes resultados sugerem que a redução da sobrevivência celular após o tratamento com os compostos ocorreu, pelo menos em parte, devido à indução de apoptose.

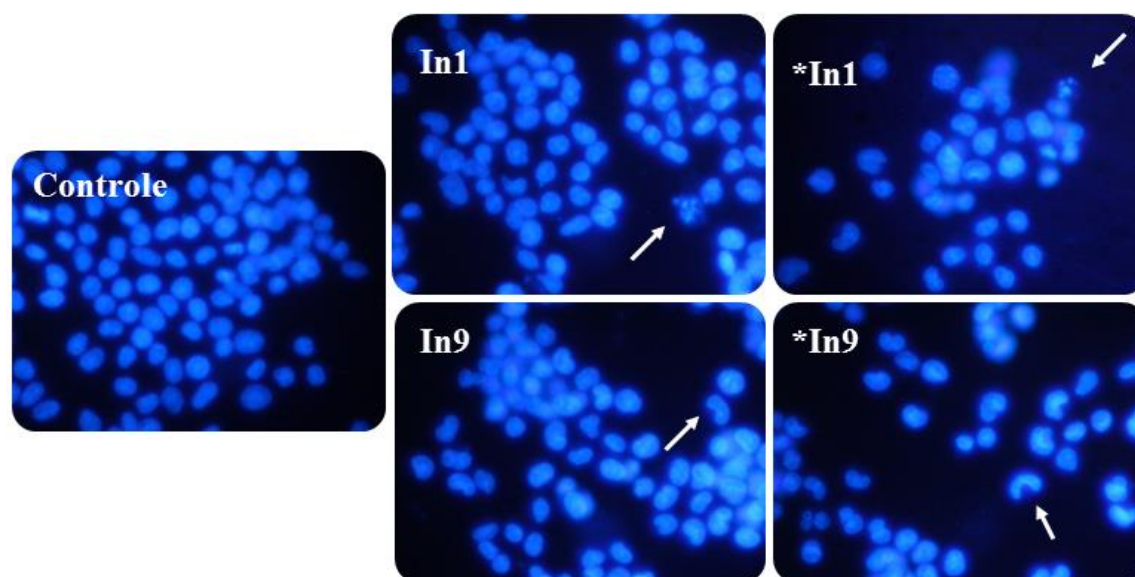


Figura 4.6. Mudanças no DNA nuclear de células MCF-7 induzidas pelo tratamento com os complexos **In1**, ***In1**, **In9** e ***In9**. As células foram tratadas com 10^{-4} μ M dos compostos por 48 horas e marcadas com DAPI. Aumento de 400x.

¹⁶⁷ J.P. Pouget, S.J. Mather. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, 28(4), 541-561.

Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) é um termo que descreve radicais livres derivados de O₂, tais como o ânion superóxido (O₂^{•-}), radicais hidroxila (HO[•]), peroxila (RO₂[•]) e alcoxila (RO[•]), bem como espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que são constantemente geradas no organismo.¹⁶⁸ Os antioxidantes celulares atuam em conjunto para detoxificar essas espécies, mas, quando o balanço é perturbado, passa a existir uma condição conhecida com estresse oxidativo, o qual pode causar danos às biomoléculas celulares (DNA, lípidos e proteínas) e resultar em morte celular.¹⁶⁹

Por sua vez, em sua maior parte os efeitos da radiação ionizante são indiretos, principalmente devido à radiólise da água presente nas células, o que gera uma cascata de ionização que conduz à geração de ROS capazes de danificar a membrana, os constituintes celulares e induzir a morte celular programada.¹⁷⁰ Como demonstrado para o emissor de elétrons Auger ¹²⁵I, na forma de *m*-[¹²⁵I]iodo-*p*-etóxiHoechst 33342, quando o nuclídeo está posicionado em estreita proximidade com o DNA, seu decaimento resulta em quebras da dupla fita por danos diretos da ionização e por danos indiretos induzidos por radicais gerados na radiólise da água.^{170,171}

Em vista de ROS estarem envolvidas nos mecanismos de ação de vários fármacos antitumorais e de complexos metálicos citotóxicos *via* a iniciação de caminhos de sinalização de apoptose, foram determinados os níveis de produção intracelular de ROS em células MCF-7 após a exposição aos complexos de In(III). Esse estudo foi realizado através da avaliação da intensidade de fluorescência produzida por DCF. Como mostrado na Figura 4.7, os complexos não radioativos não induziram um aumento significativo na produção de ROS em comparação ao controle não tratado. Por sua vez, todos os complexos ativados neutronicamente produziram ROS de forma significativa. Assim, pode-se assumir que a geração de ROS pode explicar, ao menos parcialmente, o aumento da citotoxicidade dos complexos In(III) radioativados.

De forma semelhante, recentemente foi reportado que complexos baseados em ¹⁰³Ru(II), produzidos por ativação neutrônica, foram capazes de induzir uma maior

¹⁶⁸ M.L. Circu, T.L. Aw. *Free Radic Biol Med.* **2010**, 48(6), 749-762.

¹⁶⁹ J.M. Matés, F.M. Sánchez-Jiménez. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, 32, 157-170.

¹⁷⁰ J.P. Pouget, C. Lozza, E. Deshayes, V. Boudousq, I. Navarro-Teulon. *Front. Med.* **2015**, 2, 1-11.

¹⁷¹ P. Balagurumorthy, K. Chen, S.J. Adelstein, A.I. Kassis. *Radiat Res.* **2008**, 170(1), 70-82.

produção de ROS do que os seus análogos não radioativos e essa produção pode ser correlacionada com a maior citotoxicidade dos compostos radioativos sobre gliomas.¹⁷²

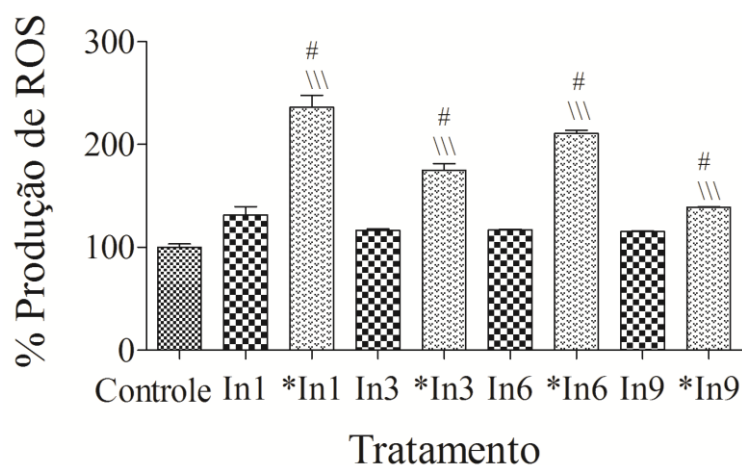


Figura 4.7. % de produção de ROS em células MCF-7 após tratamento por 24 horas com 0,1 μ M dos complexos de In(III) nas formas não radioativa e radioativa e marcação com DCFH-DA. # estatisticamente diferente do análogo não radioativo; \\\ estatisticamente diferente do controle.

4.3. Conclusões e perspectivas

Complexes radioativos de $^{114m}\text{In(III)}$ / $^{115m}\text{In(III)}$ com tiossemicarbazonas (***In1**, ***In3**, ***In6** e ***In9**) foram produzidos com sucesso empregando-se a técnica de ativação neutrônica dos análogos não radioativos (**In1**, **In3**, **In6** e **In9**). A ação citotóxica de todos os compostos foi avaliada frente a células de câncer de mama (MCF-7). Uma vez que os testes de atividade citotóxica foram planejados de iniciar após 24 horas da irradiação neutrônica e considerando a curta meia vida do ^{115m}In ($t_{1/2} = 4,5$ horas), a contribuição desse isótopo na ação citotóxica não foi considerada. Embora as radioatividades específicas induzidas nos compostos tenham sido baixas, menores do que 8 MBq/mol, os complexos radioativos provaram ser 10^2 a 10^4 vezes mais ativos do que os análogos não radioativos.

Em medicina nuclear, radiofármacos são utilizados como ferramentas diagnóstica e terapêutica. Esses compostos normalmente têm um mínimo efeito de toxicidade, porque na maioria dos casos são utilizados em quantidades traço. Ainda assim, com o objetivo de verificar o efeito da radiação sobre a seletividade dos compostos, os índices de seletividade (IS) foram calculados empregando-se células saudáveis de fibroblastos de pulmão humano

¹⁷² A.M. Montel, R.G. dos Santos, P.R. da Costa, E.P. Silveira-Lacerda, A.A. Batista, W.G. dos Santos. *Biometals* **2017**, 30, 295-305.

(MCR-5) como modelo de célula sadia. Observou-se valores de IS muito maiores para os complexos radioativos (IS = 46 - 4716) do que para os complexos não radioativos (IS = 0,07 - 0,36), indicando que a irradiação dos complexos representou uma estratégia interessante para aumentar a seletividade dos compostos.

Curiosamente, no Capítulo 3 foram descritos altos valores de IS para os complexos não radioativos (IS = 10 - 276), calculados empregando-se células Vero, extraídas do rim de macaco *Cercopithecus aethiops*, como modelo de célula saudável. Embora as células MCR-5 e Vero sejam sadias, essas originam-se de tecidos biológicos com características diferentes, o que explicaria suas diferentes sensibilidades aos compostos de In(III).

Como o objetivo de se explicar a maior potência dos complexos radioativos em comparação aos seus análogos não radioativos, determinou-se os níveis de produção de ROS nas células MCF-7 após tratamento com os compostos. Verificou-se que os complexos radioativos aumentaram significativamente a produção de ROS se comparados aos compostos precursores. Considerando que os sais de *In(III) não são citotóxicos em concentrações de até 100 μ M, houve uma possível interação supra-aditiva a partir da combinação da citotoxicidade dos complexos de In(III) e os efeitos da radiação ionizante emitida por ^{114m}In .

O uso de vetores para o transporte de radionuclídeos emissores de elétrons Auger até as células tumorais é de grande importância, uma vez que esses elétrons possuem um curto caminho de deslocamento e, assim, são ineficazes se não forem transportados para dentro das células. Trabalhos anteriores demonstraram que a incorporação dos emissores de elétrons Auger bromo-80m (^{80m}Br) e iodo-123 (^{123}I) em ligantes que retêm uma elevada afinidade com tecidos ricos em receptor de estrogênio resulta em vantagens terapêuticas, tais como um dano efetivo no DNA.¹⁷³ Desse modo, com a finalidade de alcançar um maior potencial terapêutico para o tratamento do câncer de mama, é possível sugerir que complexos similares aos estudados no presente trabalho poderiam ser empregados como plataformas para a ligação de uma porção contendo um estrogênio esteroide. Assim, uma proposta para trabalhos futuros seria o desenvolvimento de tiossemicarbazonas com um grupo N(4)-terminal funcionalizado que permita a conjugação de estrogênios, assim como feito em trabalhos reportados na literatura.¹⁷⁴

¹⁷³ (a) E.R. DeSombre, R.C. Mease, A. Hughes, P.V. Harper, O.T. DeJesus, A.M. Friedman. *Cancer Res.* **1988**, 48(4), 899-906; (b) E.R. DeSombre, A. Hughes, R.N. Hanson, T. Kearney. *Acta Oncol.* **2000**, 39(6), 659-666.

¹⁷⁴ (a) A. Jackson, J. Davis, R.J. Pither, A. Rodger, M.J. Hannon. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40(16), 3964-3973; (b) K.R. Barnes, A. Kutikov, S.J. Lippard. *Chem. Biol.* **2004**, 11(4), 557-564.

O número de radionuclídeos com potencial interesse para terapia é grande, mas a terapia radionuclídica interna dedica-se principalmente ao uso de emissores de radiação de curto alcance, mas altamente ionizante.¹⁷⁵ Esse conceito está relacionado ao radionuclídeo ^{114m}In, um prolífico emissor de elétrons Auger. Embora os estudos clínicos com emissores de elétrons Auger ainda não tenham alcançado a eficácia esperada, o presente trabalho faz uma importante contribuição ao desenvolvimento de complexos de ^{114m}In que podem reduzir eficientemente *in vitro* o crescimento de células tumorais da linhagem MCF-7.

É importante ainda ressaltar que estimativas radiobiológicas teóricas indicam que, em comparação aos radionuclídeos de curta meia-vida, as espécies de longa meia-vida, tais como ^{114m}In, podem resultar em menos efeitos deletérios na medula óssea, geralmente considerado o órgão limitante da dose.¹⁷⁶ Essa possibilidade corrobora mais uma vez a relevância na investigação de propriedades terapêuticas de compostos baseados em ^{114m}In.

¹⁷⁵ S.M. Qaim. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2015**, 305(1), 233-245.

¹⁷⁶ R.W. Howell, S.M. Goddu, D.V. Rao. *Med. Phys.* **1988**, 25(1), 37-42.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

Radiofármacos para imagem baseados em ^{111}In são os principais destaques das pesquisas e das aplicações envolvendo complexos de In(III) na medicina. Em contrapartida, a investigação envolvendo agentes terapêuticos baseados em In(III) permanece praticamente inexplorada. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho, que mostraram que complexos de In(III) com tiossemicarbazonas apresentam ação antimicrobiana e atividade citotóxica contra células leucêmicas e de tumores sólidos representam uma importante contribuição para o entendimento de potenciais aplicações farmacológicas de complexos de In(III) , evidenciando que o íon In(III) poderia ser empregado em aplicações que vão além do desenvolvimento de radiofármacos.

O estudo comparativo realizado entre complexos de In(III) não radioativos e complexos de $^{114\text{m}}\text{In}$ obtidos através de ativação neutrônica, deixa claro que a ativação radioativa dos complexos de In(III) foi uma estratégia interessante na obtenção de potenciais radiofármacos para terapia. De fato, foi observado que os complexos radioativos foram 10^2 a 10^4 vezes mais ativos do que os análogos não radioativos frente a células MCF-7 de câncer de mama. Além disso, altos índices de seletividade foram obtidos ($\text{IS} = 46 - 4716$) empregando-se fibroblastos de pulmão humano (MCR-5) como modelo de célula sadia. Portanto, são promissores os estudos que envolvem aplicações de complexos de $^{114\text{m}}\text{In}$ com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina para a terapia radionuclídica do câncer de mama.

O fato de que os sais de partida mostraram-se inativos como agentes antimicrobianos e citotóxicos sugere que as tiossemicarbazonas, além de suas próprias bioatividades, funcionaram também como carreadores do metal para dentro das células.

Os estudos preliminares de interações dos complexos de In(III) com biomoléculas-alvo revelaram que os complexos interagem com ácido desoxirribonucleico (DNA), ao menos parcialmente, por um mecanismo de intercalação atípico promovido pela presença dos ligantes tiossemicarbazonas. Em sua interação com albumina, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio desempenharam um papel importante, indicando que esses compostos poderiam ser transportados pela albumina no sangue.

Apesar de o mecanismo de seletividade não ter sido investigado no presente trabalho, pudemos sugerir que a ligação dos complexos de In(III) à transferrina seja em parte responsável por tal efeito. De fato, uma vez que In(III) se liga fortemente à

transferrina e que células tumorais expressam níveis elevados de receptores de transferrina, a incorporação preferencial de In(III) em células tumorais pareceria possível.

O presente trabalho constitui uma importante contribuição à Química Medicinal por seu caráter inovador e em virtude dos relevantes resultados obtidos para o desenvolvimento de novos candidatos a metalofármacos e radiometalofármacos.

ANEXOS

ANEXO 1. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. A.A. Oliveira, L.E. Rodrigues, J.G. da Silva, I.P. Ferreira, J.A. Takahashi, H. Beraldo. *Novel In(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones: antimicrobial activity and investigation on the mode of action.* In: XVII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry (BMIC), 2014, Araxá-MG.
2. A.A. Oliveira, L.E. Rodrigues, J.G. da Silva, G.M.C. Perdigão, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo. *In(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones: cytotoxic activity against leukemia and solid tumor cell lines.* In: 5th Latin American Symposium on Coordination and Organometallic Chemistry (SILQCOM), 2015, Angra dos Reis-RJ.
3. A.A. Oliveira, L.L. Franco, J.G. da Silva, R.G. dos Santos, H. Beraldo. *^{114m}In(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones as prototypes of targeted radionuclide therapeutic agents.* XVIII Brazilian Meeting in Inorganic Chemistry (BMIC), 2016, São Pedro-SP.

ANEXO 2. ARTIGOS PUBLICADOS

1. 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.*, **2017**, 46(3), 918-932.
2. 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*, **2017**, 135, 72-78.
3. 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.* **2017**, 41(17), 9041-9050.

Cite this: *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 918

Cytotoxic and antimicrobial effects of indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones†

Alexandre A. Oliveira,^a Gabriele M. C. Perdigão,^b Luana E. Rodrigues,^a Jeferson G. da Silva,^c Elaine M. Souza-Fagundes,^b Jacqueline A. Takahashi,^a Willian R. Rocha^a and Heloisa Beraldo*^a

Complexes [In(2Ac4oClPh)Cl₂(MeOH)] (**1**), [In(2Ac4pFPh)Cl₂(MeOH)] (**2**), [In(2Ac4pClPh)Cl₂(MeOH)] (**3**) and [In(2Ac4pIPh)Cl₂(MeOH)] (**4**) were obtained with *N*(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4oClPh), *N*(4)-*para*-fluorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4pFPh), *N*(4)-*para*-chlorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4pClPh) and *N*(4)-*para*-iodophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4pIPh). Theoretical studies suggested that the coordinated methanol molecule can be easily replaced by DMSO used in the preparation of stock solutions, with the formation of [In(L)Cl₂(DMSO)] (HL = thiosemicarbazone ligand), and that the replacement of DMSO by water is unfavorable. However, for all complexes the displacement of one or two chloride ligands by water in aqueous solution is extremely favorable. The cytotoxic activity of the compounds was evaluated against HL-60, Jurkat and THP-1 leukemia and against MDA-MB-231 and HCT-116 solid tumor cell lines, as well as against Vero non-malignant cells. The cytotoxicity and selectivity indexes (SI) increased in several cases for the indium(III) complexes in comparison with the free thiosemicarbazones. The antimicrobial activity of the compounds was investigated against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae* and *Candida parapsilosis*. In many cases complexation resulted in a substantial increase of the antifungal activity. Complexes (**1–4**) were revealed to be very active against *C. lusitanae* and *C. dubliniensis*. Structure–activity relationship (SAR) studies were carried out to identify the physico-chemical properties that might be involved in the antifungal action, as well as in the cytotoxic effect of the compounds against HL-60 cells. In both cases, correlations between the bioactivity and physico-chemical properties did not appreciably change when the chloride ligands in [In(L)Cl₂(DMSO)] were replaced by water molecules, suggesting [In(L)Cl(H₂O)(DMSO)]⁺ or [In(L)(H₂O)₂(DMSO)]²⁺ to be the species that interact with the biological media.

Received 20th September 2016,

Accepted 10th December 2016

DOI: 10.1039/c6dt03657k

www.rsc.org/dalton

1. Introduction

¹¹¹In radiopharmaceuticals are the main medical applications of indium(III) complexes.¹ Cell labelling with ¹¹¹In, developed to allow clinical imaging of infection and inflammation sites, entered general clinical use in the 1980s.² In addition, ¹¹¹In

may be employed in cancer therapy through the emission of Auger electrons, offering a method to achieve DNA damage and eventual cell death.³

It has also been shown that non-radioactive indium complexes have pharmacological applications. Hence, indium(III) complexes with phthalocyanines were investigated as photosensitizers in photodynamic therapy for cancer treatment.⁴ Indium(III) complexes have been proved to exhibit antimicrobial^{5–7} and antiproliferative activities.^{8,9} However, the investigation of non-radioactive indium-based drug candidates still remains practically unexplored.

Thiosemicarbazones have wide pharmacological versatility and their application as antitumor, antiviral and antimicrobial agents has been extensively investigated.¹⁰ In previous studies we demonstrated that 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones have potent cytotoxic effects against human solid tumor

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: hberaldo@ufmg.br, heloisaberaldo@ufmg@gmail.com; Tel: +55 (31) 3409-5740

^bDepartamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^cDepartamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, 35010-177 Governador Valadares, MG, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1503486–1503489 for **1a**, **2a**, **3a** and **4a**. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6dt03657k

and leukemia cell lines.^{11,12} Upon the coordination of thiosemicarbazones to gallium(III), increased antimicrobial and cytotoxic effects were observed.^{13–15}

To contribute to a better understanding of the bioactivities of group 13 metal compounds and considering our previous investigations on gallium(III) complexes, in the present work indium(III) complexes were obtained with *N*(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4oClPh), *N*(4)-*para*-fluorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4pFPh), *N*(4)-*para*-chlorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4pClPh) and *N*(4)-*para*-iodophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4pIPh) (see Fig. 1).

The antimicrobial effects of the compounds under study against four pathogenic *Candida* species (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae*, and *Candida parapsilosis*) were investigated, as well as their cytotoxic activity against HL-60 (human promyelocytic leukemia), Jurkat (an immortalized line of T lymphocytes) and THP-1 leukemia cell lines and against MDA-MB-231 (human breast carcinoma) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) solid tumor cell lines. The cytotoxicity of the compounds was also evaluated against Vero cells (derived from the kidney of an African green monkey) as a healthy cell model.

2. Materials and methods

2.1. Theoretical details

Full geometry optimizations of the indium(III) complexes were performed at the Density Functional Theory level¹⁶ employing the hybrid B3LYP exchange correlation functional^{17,18} and using the Ahlrichs triple-zeta valence basis set plus polarization TZVP for all atoms.¹⁹ Scalar relativistic effects were treated using the Zeroth Order Regular Approximation (ZORA) formalism.^{20–22} To speed up the calculations the resolution of the identity was used for the coulomb²³ and the chain of sphere approach²⁴ for the exchange part of the Fock matrix. For both approaches, the TZVP/J auxiliary basis set was employed.²⁵ The crystal structures, when available, were used as starting structures for all geometry optimizations reported in the present work.

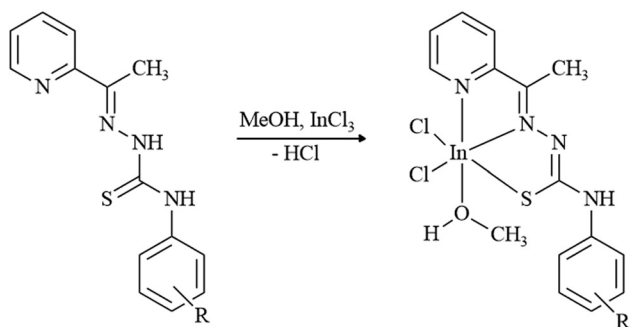


Fig. 1 Syntheses of the indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones.

The Gibbs free energy ($\Delta G_r(\text{sol})$) involved in the ligand displacement reactions in solution was computed according to eqn (1):

$$\Delta G_r(\text{sol}) = \Delta E_r(g) + \Delta \Delta G_{\text{sol}} \quad (1)$$

where $\Delta E_r(g)$ is the internal energy difference computed in gas phase at the B3LYP/TZVP level of theory and $\Delta \Delta G_{\text{sol}}$ is the difference in Gibbs solvation free energies obtained with the SMD model,²⁶ as implemented in the ORCA program,²⁷ in which the electrostatic contribution to the solvation free energy is obtained using the Conductor-like Screening Model (COSMO) of Klamt.²⁸ The energies of the frontier molecular orbitals (HOMO and LUMO), dipole moments and charges obtained after full geometry optimizations were used as descriptors for further Structure–Activity Relationship (SAR) studies. All quantum mechanical calculations reported here were performed with the ORCA program.²⁷

The surface area and molecular volumes used in the SAR analyses were obtained with the spacefill routine of the TINKER program,²⁹ employing the MM2 force field parameters.³⁰ The octanol–water partition coefficients ($\log P$) of the compounds were obtained with the ALOGPS program.^{31–33} Superficial molecular area, molecular volumes and $\log P$ were also used as descriptors for SAR studies.

2.2. Chemicals and general procedures

2-Acetylpyridine, indium(III) chloride, hydrazine dihydrate, *o*-chlorophenyl-, *p*-chlorophenyl-, *p*-fluorophenyl- and *p*-iodophenyl-isothiocyanate were purchased from Aldrich and used as received. All other common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. Partial elemental analyses were performed using a PerkinElmer CHN 2400 analyzer. Melting points were determined with a Mettler MQAPF-302 apparatus. The molar conductances (Λ_M) were measured in a dimethylformamide (DMF) solution at 298 K with a YSI model 31 conductivity bridge. Infrared spectra were recorded on a PerkinElmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr pellets (4000–400 cm^{-1}). Electronic spectra were acquired using a Shimadzu UV-2401PC double beam UV-Vis spectrophotometer using 1 cm quartz cells. Fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter using a 1 cm quartz cell. NMR spectra were obtained using a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMSO- d_6 as the solvent.

2.3. Syntheses of the thiosemicarbazones and their indium(III) complexes (1–4)

All thiosemicarbazones were prepared as previously described.³⁴ The indium(III) complexes were obtained by stirring under reflux a methanol solution (15 mL) of the desired thiosemicarbazone (1 mmol) with an equimolar amount of indium(III) chloride for 3 h. After cooling to room temperature, the obtained solids were filtered off, washed with methanol followed by diethyl ether, and then dried under reduced pressure.

2.3.1. [In(2Ac4oClPh)Cl₂(MeOH)] (1). Yellow solid. Yield: 90%. Melting point: 231.4 °C–232.5 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₆Cl₃InN₄OS (%): C, 34.54; H, 3.09; N, 10.74. Found: C, 34.50; H, 2.95; N, 10.93. FW: 521.56 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 6.16 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3380, ν(C=N) 1592, ν(C–S) 774, ρ(py) 648, ν(O–H) 3390. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 8.11 [d, 1H, H(3)], 8.30 [td, 1H, H(4)], 7.85 [m, 1H, H(5)], 8.75 [dd, 1H, H(6)], 7.61 [dd, 1H, H(11)], 7.37 [td, 1H, H(12)], 7.26 [td, 1H, H(13)], 7.53 [dd, 1H, H(14)], 2.48 [s, 3H, H(15)], 3.17 [d, 3H, H(16)], 4.11 [q, 1H, OH], 9.54 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 146.0 [C(2)], 124.5 [C(3)], 141.9 [C(4)], 126.6 [C(5)], 146.6 [C(6)], 146.4 [C(7)], 172.7 [C(8)], 136.1 [C(9)], 129.1 [C(10)], 128.7 [C(11)], 127.2 [C(12)], 127.0 [C(13)], 129.5 [C(14)], 13.8 [C(15)], 48.6 [C(16)].

2.3.2. [In(2Ac4pFPh)Cl₂(MeOH)] (2). Yellow solid. Yield: 88%. Melting point: 250.5 °C–252.0 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₆Cl₂FInN₄OS (%): C, 35.67; H, 3.19; N, 11.09. Found: C, 35.66; H, 3.12; N, 11.27. FW: 505.10 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 6.60 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3365, ν(C=N) 1601, ν(C–S) 777, ρ(py) 648, ν(O–H) 3329. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 8.21 [d, 1H, H(3)], 8.32 [td, 1H, H(4)], 7.86–7.89 [m, 1H, H(5)], 8.79 [dd, 1H, H(6)], 7.77–7.81 [m, 2H, H(10), H(14)], 7.16–7.20 [m, 2H, H(11), H(13)], 2.65 [s, 3H, H(15)], 3.17 [s, 3H, H(16)], 4.11 [s, 1H, OH], 10.04 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 145.9 [C(2)], 124.7 [C(3)], 142.0 [C(4)], 126.8 [C(5)], 146.6 [C(6)], 147.1 [C(7)], 170.4 [C(8)], 136.5 [d, C(9)], 122.8 [d, C(10), C(14)], 115.1 [d, C(11), C(13)], 157.8 [d, C(12)], 14.5 [C(15)], 48.6 [C(16)].

2.3.3. [In(2Ac4pClPh)Cl₂(MeOH)] (3). Yellow solid. Yield: 88%. Melting point: 264.8 °C–265.7 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₆Cl₃InN₄OS (%): C, 34.54; H, 3.09; N, 10.74. Found: C, 34.77; H, 3.11; N, 10.82. FW: 521.56 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 7.04 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(C=N) 1594, ν(C–S) 770, ρ(py) 646, ν(O–H) 3342. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 8.24 [d, 1H, H(3)], 8.31–8.36 [m, 1H, H(4)], 7.89 [dd, 1H, H(5)], 8.79 [d, 1H, H(6)], 7.39 [d, 2H, H(10), H(14)], 7.82 [d, 2H, H(11), H(13)], 2.67 [s, 3H, H(15)], 3.17 [s, 3H, H(16)], 4.11 [s, 1H, OH], 10.11 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 145.8 [C(2)], 124.9 [C(3)], 142.1 [C(4)], 127.0 [C(5)], 146.7 [C(6)], 147.8 [C(7)], 170.3 [C(8)], 139.0 [C(9)], 128.5 [C(10), C(14)], 122.4 [C(11), C(13)], 126.4 [C(12)], 14.6 [C(15)], 48.6 [C(16)].

2.3.4. [In(2Ac4pIPh)Cl₂(MeOH)] (4). Yellow solid. Yield: 93%. Melting point: 254.1 °C–254.7 °C. Anal. Calc. for C₁₅H₁₆Cl₂IInN₄OS (%): C, 29.39; H, 2.63; N, 9.14. Found: C, 29.07; H, 2.55; N, 9.17. FW: 613.01 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 6.20 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3358, ν(C=N) 1586, ν(C–S) 771, ρ(py) 648, ν(O–H) 3367. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 8.23 [d, 1H, H(3)], 8.33 [td, 1H, H(4)], 7.89 [dd, 1H, H(5)], 8.79 [d, 1H, H(6)], 7.63 [d, 2H, H(10), H(14)], 7.67 [d, 2H, H(11), H(13)], 2.66 [s, 3H, H(15)], 3.17 [s, 3H, H(16)], 4.11 [s, 1H, OH], 10.08 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 145.8 [C(2)], 124.8 [C(3)], 142.0 [C(4)], 126.9 [C(5)], 146.7 [C(6)],

147.8 [C(7)], 170.3 [C(8)], 139.9 [C(9)], 123.1 [C(10), C(14)], 137.2 [C(11), C(13)], 86.2 [C(12)], 14.6 [C(15)], 48.6 [C(16)].

2.4. Crystal structures determination

Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out using an Oxford-Diffraction Gemini-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using graphite-Enhance Source Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at 150(2) K. Data collection, cell refinements and data reduction were performed using the CrysAlisPro software package.³⁵ An absorption correction based on a multi-scan method was applied. The structures were solved by direct methods using SHELXS-2013/1.³⁶ The full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried out using SHELXL-2014/7.³⁷ The disorder in the structures was modeled using free variables. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model.

Crystals of [In(2Ac4oClPh)Cl₂(DMSO)] (1a) and [In(2Ac4pClPh)Cl₂(DMSO)]·CH₃CN (3a) were obtained by slow evaporation of a solution of 1 or 3 in 3 : 1 acetonitrile/DMSO at room temperature. Crystals of [In(2Ac4pFPh)Cl₂(DMSO)]·0.22DMSO·0.78C₃H₆O (2a) and [In(2Ac4pIPh)Cl₂(DMSO)]·0.41DMSO·0.59C₃H₆O (4a) were obtained by slow evaporation of a solution of 2 and 4, respectively, in 9 : 1 acetone/DMSO at room temperature. A summary of the crystal data, data collection details and refinement results is listed in Table 1. Molecular graphics were plotted using PLATON.³⁸

2.5. Cytotoxic activity

2.5.1. Cell lines. HL-60 (wild type human promyelocytic leukemia), Jurkat (human immortalized line of T lymphocytes) and THP-1 (human monocytic cells derived from an acute monocytic leukemia patient) cell lines were provided by Dr Gustavo Amarante-Mendes (Universidade de São Paulo, Brazil). The MDA-MB-231 (human breast carcinoma) cell line was provided by Dr Alfredo Goes (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) cells were purchased from ATCC. Mammalian healthy Vero cells (African green monkey kidney cells) were provided by Erna Kroon (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil).

All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in RPMI 1640 or DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 mg mL⁻¹ streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mM of L-glutamine and 10% (for leukemia cells) or 5% (for adherent cells) fetal bovine serum (FBS). All cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

2.5.2. Evaluation of the cytotoxic effect. Cells were seeded at densities per well of 50 000 for HL-60 and 100 000 for Jurkat and THP-1 cells. Adherent (MDA-MB 231, HCT-116 and Vero) cells were inoculated at 10 000 cells per well. The plates were pre-incubated for 24 h at 37 °C to allow adaptation of cells

Table 1 Crystal data and structure refinement results for 1a, 2a, 3a and 4a

Compound	1a	2a	3a	4a
Empirical formula	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₃ InN ₄ OS ₂	C _{18.78} H ₂₄ Cl ₂ FIN ₄ O ₂ S _{2.22}	C ₁₈ H ₂₁ Cl ₃ InN ₅ OS ₂	C _{18.56} H ₂₇ Cl ₂ IInN ₄ O ₂ S _{2.41}
Formula weight (g mol ⁻¹)	567.63	613.70	608.69	728.29
Crystal system	Triclinic	Monoclinic	Triclinic	Monoclinic
Space group	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Temperature (K)	150(2)	150(2)	150(2)	150(2)
Unit cell dimensions				
<i>a</i> (Å)	8.7685(2)	12.5903(2)	8.8806(2)	12.6115(5)
<i>b</i> (Å)	9.6898(3)	12.9279(2)	11.5497(2)	13.0330(5)
<i>c</i> (Å)	12.5738(3)	15.5193(3)	13.0644(3)	15.7258(7)
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	$\alpha = 88.014(2)/\beta = 79.523(2)/\gamma = 87.683(2)$	$\alpha = \gamma = 90/\beta = 103.090(2)$	$\alpha = 110.300(2)/\beta = 90.297(2)/\gamma = 105.723(2)$	$\alpha = \gamma = 90/\beta = 100.906(4)$
<i>V</i> (Å ³)	1049.26(5)	2460.38(7)	1202.41(5)	2538.10(18)
<i>Z</i>	2	4	2	4
Density calculated (mg m ⁻³)	1.797	1.657	1.681	1.898
<i>F</i> (000)	564	1233	608	1416
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	1.722	1.397	1.510	2.580
Limiting indices	$-10 \leq h \leq 10$ $-12 \leq k \leq 12$ $-15 \leq l \leq 15$	$-15 \leq h \leq 15$ $-16 \leq k \leq 16$ $-19 \leq l \leq 19$	$-11 \leq h \leq 11$ $-14 \leq k \leq 14$ $-16 \leq l \leq 16$	$-15 \leq h \leq 15$ $-16 \leq k \leq 16$ $-17 \leq l \leq 19$
θ range for data collection (°)	2.104 to 26.371	1.887 to 26.372	1.965 to 26.372	1.903 to 26.370
Reflections collected	34 020	48 916	49 071	22 210
Independent reflections [<i>R</i> _{int}]	4291[0.0384]	5035[0.0340]	4927[0.0391]	5203[0.0453]
Completeness to $\theta = 26.37^\circ$ (%)	100	100	100	100
Data/restraints/parameters	4291/1/250	5035/3/296	4927/3/277	5203/0/310
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0174; <i>wR</i> ₂ = 0.0423	<i>R</i> ₁ = 0.0182; <i>wR</i> ₂ = 0.0430	<i>R</i> ₁ = 0.0167; <i>wR</i> ₂ = 0.0394	<i>R</i> ₁ = 0.0488; <i>wR</i> ₂ = 0.1077
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0193; <i>wR</i> ₂ = 0.0432	<i>R</i> ₁ = 0.0223; <i>wR</i> ₂ = 0.0454	<i>R</i> ₁ = 0.0193; <i>wR</i> ₂ = 0.0409	<i>R</i> ₁ = 0.0606; <i>wR</i> ₂ = 0.1159
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.058	1.071	1.061	1.084
$\Delta\rho_{\max}$ and $\Delta\rho_{\min}$	0.312 and -0.511	0.318 and -0.401	0.315 and -0.362	1.946 and -1.913

prior to the addition of the test compounds. Freshly prepared solutions of the different compounds were screened at 10 μ M. Subsequently, the plates were inoculated for 48 h under an atmosphere of 5% CO₂ and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.5% DMSO (dimethyl sulfoxide, negative control) and 10 μ M of cisplatin (positive control). Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). All compounds were dissolved in DMSO prior to dilution. Compounds that inhibited the viability/proliferation by more than 50% were selected for determination of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀ or CC₅₀).

IC₅₀ was defined as the inhibitory concentration of 50% cell proliferation for tumor cells and CC₅₀ was considered as the inhibitory concentration of 50% cell proliferation for Vero cells, used as a model of non-malignant cells.³⁹ IC₅₀ and CC₅₀ values were determined over a range of ten-fold concentrations (100–0.001 μ M). All compounds were tested in triplicate in three independent experiments. IC₅₀ and CC₅₀ were determined by non-linear regression analysis of dose/response curves using GraphPad Prism 5.0. Data were expressed as geometric mean IC₅₀ or CC₅₀ plus 95% confidence interval.

2.5.3. In vitro cell viability MTT assay. MTT is a tetrazolium salt that is reduced to purple formazan crystals mainly by mitochondrial succinate dehydrogenase, and the color intensity of the formazan dye is correlated to the number of viable cells.⁴⁰ Briefly, after the end of incubation of the cells with the different compounds, 20 μ L of MTT solution (5 mg mL⁻¹ in

phosphate-buffered saline) were added to each well. After 4 h, the supernatant was removed and 200 μ L of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystals. The optical densities (OD) were evaluated using a spectrophotometer at 595 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as the control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing medium. Results were expressed as percentage of cell proliferation compared with 0.5% DMSO control and were calculated as follows: viability (%) = (mean OD of treated – mean OD of background)/(mean OD of untreated culture, *i.e.* 0.5% DMSO – mean OD of blank wells) \times 100. The interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative in relation to the control.⁴¹

2.5.4. Toxicity and selectivity index (SI). The cytotoxic effects of the compounds on non-malignant cells were evaluated using Vero cells as a model. The cytotoxicities of the compounds against tumor (IC₅₀) and non-malignant Vero (CC₅₀) cells were compared using the selectivity index (SI), which is the ratio between the 50% inhibitory concentration of cell proliferation for non-malignant and tumor cells, $SI = CC_{50 \text{ Vero}}/IC_{50 \text{ tumor cell}}$.^{39,42}

2.6. Antimicrobial activity

2.6.1. Yeast cell cultures. *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (clinical isolate 28), *Candida lusitanae*

(CBS 6936) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA) and from Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, the Netherlands). The *Candida* strains were stored and sub-cultured for testing in Sabouraud dextrose broth (SDB) and incubated at 37 °C for 24 h in a bacteriological incubator.

2.6.2. Inoculum standardization. The inoculum preparation was based on the procedure described in NCCLS M27-A2, with adaptations.⁴³ To ensure the reproducibility of the tests, the concentration of the inoculum was standardized by a spectrophotometric method to obtain a turbidity comparable to the standard solution of 0.5 McFarland at a wavelength of 530 nm. Adjustments provided a suspension of yeast of approximately $1-5 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ (CFU = colony forming units).

2.6.3. In vitro susceptibility testing by the microdilution method. The activity of the compounds was evaluated in final concentrations ranging from 250 to 0.12 mg mL⁻¹ in microdilution plates with 96 wells. The compounds under study and the negative controls were prepared as 12.5 mg mL⁻¹ stock solutions in DMSO. Subsequently, the stock solutions were diluted in culture medium containing Tween 80 (0.5% v/v) in order to obtain 500 µg mL⁻¹ solutions. Further dilutions of each compound were performed. The wells of the microdilution plates were filled with 100 µL solutions with decreasing concentrations of the compounds in the culture medium.

Then 100 µL of the solution containing the standardized inocula were added and the microplates were incubated at 37 °C for 24 h. Three control tests were prepared, as follows: (i) with the microorganisms in the culture medium alone (positive control), (ii) with the compounds in the culture medium without microorganisms and (iii) with only the culture medium. The experiments were performed in triplicate and the absorbances were determined using an ELISA tray reader (Thermoplate, Brazil) at a fixed wavelength of 490 nm. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were calculated based on the quantity of microorganisms present after the experiments, *i.e.*, the lowest concentration of compounds that resulted in the inhibition of 50% of growth (IC₅₀) compared with the positive control test. The results were processed using OriginPro 9.0 software (OriginLab Corporation, USA) using dose-response curves. For comparison, IC₅₀ values were converted to µM.

2.7. Albumin binding studies

The interaction of the complexes with human serum albumin (HSA) was studied in Tris-HCl buffer solution (50 mM NaCl / 5 mM Tris-HCl, pH 7.20). A stock solution of HSA (1.92 µM) was prepared in Tris-HCl buffer, stored in the dark in a refrigerator and used within one week. Protein concentration was determined by optical density measurements at 280 nm using the molar absorption coefficient (ϵ) value at this wavelength ($35\,353\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).⁴⁴

An exact portion of 3.0 mL of HSA solution was titrated by successive additions of the indium(III) complexes (stock solution freshly prepared in DMSO) using a micropipette. At each

addition, the solution was stirred and allowed to stand for 5 minutes at the corresponding experimental temperature (293 K, 298 K and 308 K). The emission spectra were recorded in the 310–550 nm range with an excitation wavelength at 295 nm. The excitation and emission slit widths and scan rates were maintained constant for all the experiments. The emission intensity at 340 nm was used to calculate the binding constant (K_b). In all experiments, the amount of DMSO was kept less than 3% (by volume) for each set of experiments and had no effect on any of the experimental results. The fluorescence spectra were recorded using low concentration solutions of the compounds, where the absorbances of HSA and complexes (1–4) at 340 nm are low (<0.018), so that the inner filter effect could be neglected and the fluorescence intensities were not corrected.⁴⁵

2.8. DNA binding studies

A stock solution of deoxyribonucleic acid from calf thymus (CT-DNA) in Tris-HCl buffer (50 mM NaCl/5 mM Tris-HCl, pH 7.20) was prepared by shaking in an orbital shaker at 120 rpm at 37 °C for 24 h. Then, the solution was filtered with a Millipore filter (0.45 µm), and its concentration was calculated using the absorption intensity at 260 nm and the molar absorption coefficient (ϵ) value at this wavelength ($6600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).⁴⁶ The stock solutions of the complexes were freshly prepared by first dissolving the compounds in DMSO and then diluting with buffer. The amount of DMSO was kept less than 3% (by volume) for each set of experiments and had no effect on any of the experimental results.

Absorption titration experiments were performed at 293 K by increasing the concentration of the CT-DNA *via* successive additions of its stock solution at a fixed concentration of the complex (*ca.* 30 µM). Upon addition into each cuvette (sample and blank) of the same aliquot of CT-DNA (double beam mode), the samples were shaken and left in equilibrium for 5 minutes, before recording each spectrum.

Competitive intercalation experiments were performed at 293 K employing the ethidium bromide (EB) intercalator. A working solution containing 2.0 µM of CT-DNA with 1.26 µM of EB was prepared in Tris-HCl buffer. During the experiment, an exact portion of 2.0 mL of the DNA-EB solution was titrated with repeated aliquots of the indium(III) complexes (2.0 mM, stock solution freshly prepared in DMSO) and, after equilibrium, the fluorescence spectra were recorded. The changes in the fluorescence intensity at 595 nm (excitation at 546 nm) were measured with respect to the concentration of the complex.⁴⁷ The experiments were carried out until the fluorescence reached 20–40% of the initial intensity.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the indium(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data were compatible with the formation of [In(2Ac4oClPh)Cl₂(MeOH)] (1), [In(2Ac4pFPh)Cl₂(MeOH)] (2), [In(2Ac4pClPh)Cl₂(MeOH)] (3)

and $[\text{In}(\text{2Ac4pIPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**4**), in which one anionic thiosemicarbazone is attached to the metal center together with two chloride ions and a methanol molecule.⁴⁸ All solids are stable when stored at room temperature and protected from light. The compounds are stable toward thiosemicarbazone release in DMSO and DMSO (5%)–buffer solution (pH 7.4).

3.2. Spectroscopic characterization

The $\nu(\text{C}=\text{N})$ vibrational mode at 1588–1581 cm^{-1} in the infrared spectra of the free thiosemicarbazones shifts to 1601–1586 cm^{-1} in the spectra of their complexes (**1–4**), in agreement with coordination of the imine nitrogen.⁴⁹ The $\nu(\text{CS})$ absorption, observed at 825–783 cm^{-1} in the spectra of the thiosemicarbazones, shifts to 781–766 cm^{-1} in the spectra of the complexes, indicating coordination of the sulfur. The 24–54 cm^{-1} shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur.^{13,50} The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 622–620 cm^{-1} in the spectra of the thiosemicarbazones shifts to 648–646 cm^{-1} in complexes (**1–4**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen.⁵¹ Therefore, the data suggest that the thiosemicarbazone ligand is attached to the metal through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imine}}\text{-S}$ chelating system. Additionally, the $\nu(\text{OH})$ vibrational mode observed at 3390–3329 cm^{-1} was attributed to the presence of a methanol ligand.⁵² Other complexes of the $[\text{In}(\text{halide})_2(\text{thiosemicarbazonato})(\text{MeOH})]$ type have been reported in the literature.^{53–55}

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their indium(III) complexes (**1–4**) were recorded in $\text{DMSO-}d_6$. The ^1H resonances were doubtless assigned on the basis of chemical shifts, multiplicities and by using 2D homonuclear $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments and the assignments were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) and heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) experiments.

Duplicated signals were observed in the ^1H NMR spectra of the free thiosemicarbazones, indicating a mixture of the *E* (89–96%) and *Z* (11–4%) configurational isomers. The N3–H chemical shifts close to δ 11 ppm are characteristic of the *E* configuration, in which N3–H is hydrogen bonded to the solvent and the chemical shifts around δ 13 ppm indicate the *Z* configuration, in which N3–H is hydrogen bonded to the pyridine nitrogen.^{11,12} In the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of the thiosemicarbazones the signals are not duplicated due to the low concentration of the *Z* isomer in all cases. In the ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of complexes (**1–4**) only one signal was observed for each magnetically different nucleus. The absence of the N3–H signal indicates coordination of an anionic thiosemicarbazone. The signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free ligand. Similarly, the signals of $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{S}$ and the pyridine carbons undergo significant shifts, indicating coordination of the thiosemicarbazones through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imine}}\text{-S}$ chelating system. Hence, in **1–4** the thiosemicarbazones adopt the *E* configuration. Additionally, the presence of coordinated methanol is

supported by the presence of a doublet at δ 3.17 ppm and a quartet at δ 4.11 ppm for (**1**) (singlets in **2–4**) in the ^1H NMR spectra, and a resonance at δ 48.6 ppm in the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra.

3.3. X-ray crystallography

The atom arrangements and atom numbering scheme for **1a** and **3a** are shown in Fig. 2. Molecular plots for **2a** and **4a** are shown in Fig. S16, ESI.† Selected intramolecular bond distances and angles are listed in Table S1, ESI.† Data for H2Ac4oClPh ,¹¹ H2Ac4pFPh ,¹² H2Ac4pClPh ¹¹ and H2Ac4pIPh ¹² are also reported for the sake of comparison.

1a and **3a** crystallize in the triclinic system, space group $P\bar{1}$, with one molecule of the complex per asymmetric unit, while **2a** and **4a** crystallize in the monoclinic system, space group $P2_1/n$, with one molecule of the complex per asymmetric unit. In all these complexes the solvent molecules were incorporated into the crystal as solvate molecules or ligands. The presence of DMSO as solvent in the recrystallization systems, allied to its coordinating capacity, justifies the exchange of methanol by DMSO in the coordination sphere.

In **1a–4a** the geometry around indium(III) is distorted octahedral, in which one anionic thiosemicarbazone is attached to the metal through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imine}}\text{-S}$ system, along with two chloride ligands and one oxygen-bound dimethyl sulfoxide

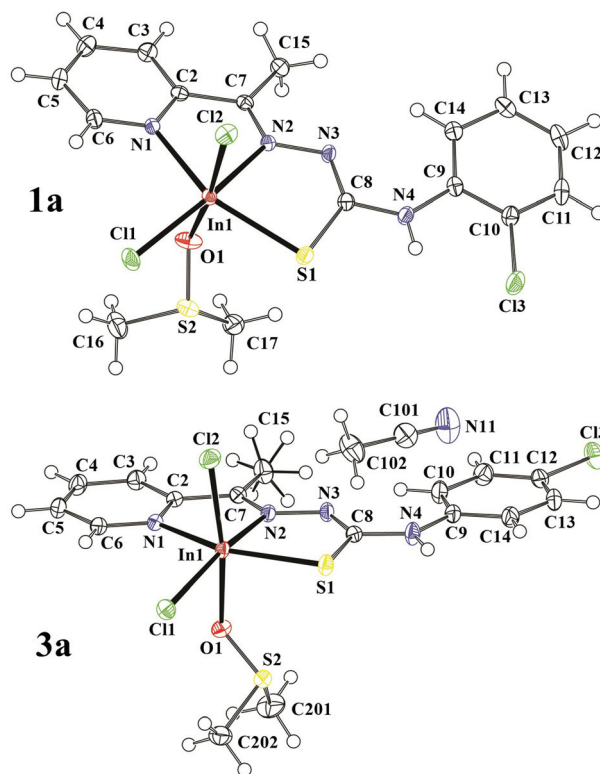


Fig. 2 Molecular plots of complexes $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]$ (**1a**) and $[\text{In}(\text{2Ac4pClPh})\text{Cl}_2(\text{DMSO})]\cdot\text{CH}_3\text{CN}$ (**3a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

molecule. Distortion from an ideal octahedral arrangement mainly arises from the small N1–In1–N2 and N2–In1–S1 chelate bite angles, which are less than 79° (see Table S1, ESI†). The chlorine atoms are *cis* to each other with Cl1–In1–Cl2 angles between 95° and 99°. The same behavior was observed for similar indium(III) complexes.^{53–55}

In these compounds, the bond distances and angles in the thiosemicarbazone skeleton are comparable. However, the N3–C8 and C8–S1 bond distances in the complexes differ significantly in relation to the free bases. The C8–S1 bond changes from a double to a predominantly single bond whereas N3–C8 acquires some double bond character due to deprotonation at N3 and the formation of a highly delocalized system. The data showing the shortening of the N3–C8 bond (*ca.* 0.04 Å) and lengthening of the C8–S1 bond (*ca.* 0.09 Å) upon coordination are presented in Table S1, ESI.† The free thiosemicarbazones crystallize in the *EE* conformation.^{11,12} A twisting of approximately 180° in the C8–N3 bond of the thiosemicarbazone to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced. Therefore, in **1a–4a** the thiosemicarbazone ligand adopts the *EZ* conformation to bind to the metal.

3.4. Cytotoxic activity

Thiosemicarbazones, indium(III) chloride and complexes (**1–4**) were evaluated by the MTT colorimetric assay for their ability to reduce cellular viability at 10 μM against human leukemia (HL-60, Jurkat and THP-1) and solid tumor (MDA-MB 231, HCT-116) cell lines, as well as against Vero non-malignant cells. Indium(III) chloride proved to be inactive against the tested malignant cells. In contrast, complexes (**1–4**) and the organic ligands showed strong cytotoxic activity in several cases (cell viability lower than 50%, data not shown). Hence, IC₅₀ was determined for the thiosemicarbazones and complexes (**1–4**) for the evaluation of potency and selectivity. The determined IC₅₀ values are shown in Table 2.

Although InCl₃ was inactive, the cytotoxicity of the thiosemicarbazones against the assayed cancer cells increased in several cases upon coordination to indium(III). Complexes (**1–4**) exhibited IC₅₀ values corresponding to sub-micromolar doses and very high selectivity indexes (SI). Complex (**1**) proved to be the most active compound against HL-60 cells, with SI = 209 and IC₅₀ = 45 nM. Hence, **1** proved to be 22-fold more active than the parent ligand and 11-fold more active than cisplatin. In addition, upon complexation the selectivity index significantly increased (6 to 45-fold) in complex (**2**) against all tested cell lines, with IC₅₀ = 0.102 μM and SI = 501 for HL-60 cells.

3.5. Antimicrobial activity

Table 3 reports the IC₅₀ values for the thiosemicarbazones and complexes (**1–4**) against the studied microorganisms. In several cases complexation resulted in a substantial increase of the antifungal activity. Complexes (**1–4**) have been revealed to be very active against *C. lusitaniae* and *C. dubliniensis*. Complex (**1**) (IC₅₀ = 1.4 ± 0.1 μM) was as active as nystatin (IC₅₀ = 2.0 ± 0.3 μM) and 100 times more active than the

Table 2 Cytotoxic activity (IC₅₀ and CC₅₀)^a and selectivity indexes (SI)^b of the thiosemicarbazones and their indium(III) complexes on HL-60, Jurkat, THP-1, MDA-MB 231, HCT-116 and Vero cell lines

	IC ₅₀ (μM) and selectivity indexes (SI)										CC ₅₀ (μM)		
	HL-60	Jurkat	SI	Jurkat	SI	THP-1	SI	MDA-MB 231	SI	HCT-116	SI	Vero	Vero
H2Ac4oCIPh	1.002 (0.254–3.955)	ND	3.164 (0.926–10.81)	ND	0.407 (0.164–1.008)	ND	0.213 (0.057–0.799)	ND	0.478 (0.059–3.882)	ND	ND	ND	ND
[In(2Ac4oCIPh)Cl ₂ (MeOH)]	0.045 (0.018–0.113)	209	0.351 (0.145–0.851)	27	0.735 (0.427–1.264)	13	0.359 (0.086–1.507)	26	0.116 (0.045–0.304)	81	9.390 (3.856–22.87)	81	9.390 (3.856–22.87)
H2Ac4pFFPh	0.277 (0.130–0.588)	11	2.270 (1.312–3.930)	1	3.261 (1.222–8.703)	<1	0.354 (0.200–0.625)	8	0.050 (0.009–0.289)	59	2.941 (1.688–5.183)	59	2.941 (1.688–5.183)
[In(2Ac4pFFPh)Cl ₂ (MeOH)]	0.102 (0.046–0.226)	501	1.941 (0.571–6.600)	26	1.312 (0.512–3.359)	39	0.179 (0.036–0.883)	285	0.137 (0.037–0.517)	373	51.09 (11.62–224.5)	373	51.09 (11.62–224.5)
H2Ac4pCIPh	0.187 (0.017–2.041)	57	1.777 (0.753–4.197)	6	0.840 (0.182–3.868)	13	0.076 (0.029–0.198)	141	0.550 (0.179–1.693)	19	10.68 (0.774–147.5)	19	10.68 (0.774–147.5)
[In(2Ac4pCIPh)Cl ₂ (MeOH)]	0.200 (0.055–0.731)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.398 (0.091–1.747)	ND	ND	ND	ND
H2Ac4pIPh	0.863 (0.458–1.626)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)]	0.396 (0.221–0.710)	8	9.808 (8.339–11.53)	<1	1.497 (0.888–2.523)	2	0.367 (0.109–1.231)	9	0.652 (0.081–5.245)	5	3.238 (1.667–6.291)	5	3.238 (1.667–6.291)
Cisplatin	0.493 (0.085–2.864)	34	36.91 (10.20–133.6)	<1	9.684 (9.417–9.958)	2	63.2 (1.920–208.6)	<1	49.85 (18.78–91.02)	<1	16.79 (7.151–34.64)	<1	16.79 (7.151–34.64)

^a IC₅₀: concentration that reduced 50% of cell proliferation in human tumor cells; CC₅₀: concentration that reduced 50% of cell proliferation in non-malignant Vero cells; values (μM) plus 95% confidence interval (in brackets). ^b Selectivity indexes, SI = CC₅₀ Vero/IC₅₀ tumor cell; ND = IC₅₀ or CC₅₀ was not determined due to precipitation at 10 μM, while at 1 μM the compounds did not induce at least 50% reduction of cell proliferation.

Table 3 IC₅₀ values for the thiosemicarbazones and their indium(III) complexes against *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida lusitanae* (CBS 6936) and *Candida dubliniensis* (clinical isolate 28)

Compound		IC ₅₀ (μM)			
		<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. dubliniensis</i>
H2Ac4oClPh		60 ± 2	257 ± 18	138 ± 1	131 ± 8
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)]	1	23 ± 1	9 ± 2	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1
H2Ac4pFPPh		17 ± 1	19 ± 3	12 ± 1	9.2 ± 0.3
[In(2Ac4pFPPh)Cl ₂ (MeOH)]	2	22 ± 2	3 ± 1	1.5 ± 0.1	3.8 ± 0.4
H2Ac4pClPh		19 ± 4	22 ± 4	44 ± 4	21 ± 3
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)]	3	38 ± 4	11 ± 1	1.5 ± 0.2	2.2 ± 0.1
H2Ac4pIPh		193 ± 3	294 ± 25	58 ± 5	100 ± 8
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)]	4	16 ± 1	13 ± 2	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2
InCl ₃		119 ± 6	263 ± 7	98 ± 5	103 ± 4
Miconazole nitrate		14 ± 2	1.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Nystatin		6 ± 1	5.1 ± 0.4	2.0 ± 0.3	2.3 ± 0.3

parent thiosemicarbazone (IC₅₀ = 138 ± 1 μM) against *C. lusitanae*.

3.6. Albumin binding studies

3.6.1. Fluorescence quenching studies with HSA. The distribution, metabolism, and elimination of drugs are related to their reversible binding to plasma proteins. In addition, the action of drugs in target tissues depends on their fractions that are unbound to serum proteins.⁵⁶ Among the proteins that drugs potentially bind to, human serum albumin (HSA) is of significance, since it is the most abundant extracellular protein in human blood plasma.⁵⁷

Although there are several possible binding sites on HSA, the pioneering work of Sudlow *et al.* (1975) revealed that the majority of chemotherapeutic agents bind to two main sites: site I (located on IIA subdomain) and site II (located on IIIA subdomain).⁵⁸ The interaction on site I can be evidenced *in vitro* by investigating the fluorescence properties of the single tryptophan residue (Trp-214) present in the IIA subdomain. Fluorescence spectra employing λ_{ex} ≥ 295 nm are due entirely to this residue.⁵⁹

The emission spectra of HSA were recorded at 298 K in the absence and in the presence of various concentrations of complex **1** (Fig. S17, ESI†). HSA displays strong emission at 340 nm (excitation at 295 nm). On increasing the concentration of **1**, a decrease of the fluorescence maximum together with a hypsochromic shift (from 340 nm to 331 nm) were observed, indicating the presence of a more hydrophobic microenvironment around the Trp-214 residue upon formation of the HSA-**1** system.⁶⁰ Similar changes occurred for complexes **(2–4)**.

In order to determine the fluorescence quenching mechanism, HSA titration experiments were performed at three different temperatures (293, 298 and 308 K). Based on the fluorescence intensity at λ_{em} = 340 nm for each of the different temperatures, the Stern–Volmer quenching constant (*K*_{SV}) and the bimolecular quenching rate constant (*K*_q) were obtained using the classical Stern–Volmer equation^{61,62} (see ESI†) (Fig. 3a).

As shown in Table 4, the Stern–Volmer quenching constants *K*_{SV} were inversely correlated with temperature. Furthermore, *K*_q values of the order of 10¹³ M⁻¹ s⁻¹ far exceed typical diffusion-controlled quenching rates of biomolecules in aqueous solution, 2.0 × 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹.⁶¹ Hence, it may be suggested that the fluorescence quenching process was not originating from dynamic collision but might have been caused by a specific interaction between HSA and complexes **(1–4)**, consistent with a static quenching mechanism.

3.6.2. Binding constants. The fluorescence quenching was most probably preceded by complex formation between the fluorophore (F) and the quencher (Q). The binding constant (*K*_b) and the number of independent binding sites (*n*) on HSA were determined graphically using the Scatchard equation.⁶³

As shown in Fig. 3b, the plot of log[(F₀ - F)/F] vs. log[complex] gives *n* and log *K*_b as the slope and the intercept, respectively. The data, summarized in Table 4, revealed that the binding constant decreased with increasing temperature, resulting from a reduction in the stability of the HSA-In(III) system. Moreover, the obtained log *K*_b values are similar to those reported for various therapeutic agents which interact reversibly with HSA.⁶⁴ The *n* values close to 1 suggest that the indium(III) complexes bind to HSA in a 1 : 1 molar ratio.

3.6.3. Determination of thermodynamic parameters. The supramolecular interaction between HSA and small molecules is generally attributed to four non-covalent weak interactions: hydrogen bonding, van der Waals, electrostatic and hydrophobic interactions. The nature of the forces which direct the complexes formation or stabilizes their three-dimensional structure can be revealed through analysis of the thermodynamic parameters involved in binding.⁶⁵ Fig. 3c shows the Van't Hoff diagram (ln *K* vs. 1/*T*) for the interaction between HSA and complexes **(1–4)**. The standard enthalpy change (Δ*H*^o) and the standard entropy change (Δ*S*^o) were obtained from the Van't Hoff equation by plotting ln *K*_b vs. 1/*T*, where -Δ*H*^o/*R* is the angular coefficient and Δ*S*^o/*R* is the linear coefficient (see ESI†).

As shown in Table 4, the variations in standard enthalpy (Δ*H*^o) and standard entropy (Δ*S*^o) are negative, suggesting that

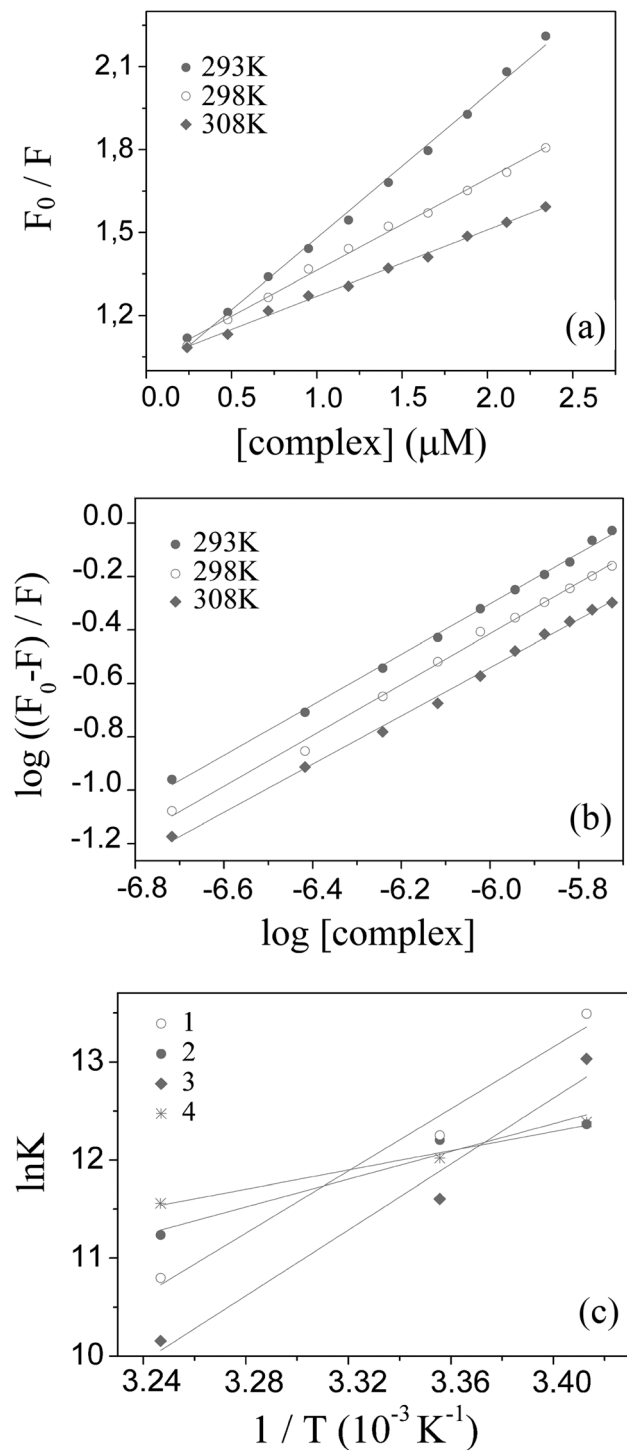


Fig. 3 (a) Stern–Volmer plots for the binding between complex 1 and HSA at different temperatures, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$. (b) Plots of $\log[(F_0 - F)/F]$ vs. $\log[\text{complex}]$ used to determine the binding constant logarithm ($\log K_b$) and the number of independent binding sites (n) in HSA for the interaction with complex 1 at different temperatures, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$. (c) Van't Hoff diagram ($\ln K$ vs. $1/T$) for the interaction between HSA and indium(III) complexes (1–4).

van der Waals forces and/or hydrogen bonds play a major role in the interactions. The negative values for ΔG show that the binding processes are spontaneous.

3.7. DNA binding studies

3.7.1. Electronic spectral studies. The absorption spectra of 1–4 were recorded in the absence and in the presence of increasing concentrations of CT-DNA. Upon addition of DNA, a significant hypochromism accompanied by a small bathochromic shift were observed at the wavelength of maximum absorption (Fig. S18, ESI†). This behavior is in accordance with an intercalative binding mode, since hypochromism occurs due to π -stacking interactions between aromatic heterocyclic groups and the DNA base pairs, as in the case of classical intercalators such as ethidium bromide (EB).⁶⁶

In order to quantitatively compare the non-covalent binding strength, the intrinsic binding constants (K_b) of 1–4 with CT-DNA were obtained as previously reported.⁶³ As shown in Fig. 4a, the plot of $[\text{DNA}]/[\varepsilon_a - \varepsilon_f]$ vs. $[\text{DNA}]$ gives $1/[\varepsilon_b - \varepsilon_f]$ as the slope and $1/(K_b[\varepsilon_b - \varepsilon_f])$ as the intercept. $[\text{DNA}]$ is the concentration of DNA base pairs, ε_a is the molar absorption coefficient of the complex at a given DNA concentration, and ε_f and ε_b are the molar absorption coefficients of the complex unbound and fully bound to DNA, respectively.

The intrinsic binding constant K_b is calculated as the ratio between the slope and the intercept. The determined K_b values are shown in Table 5.

3.7.2. Competitive binding between ethidium bromide (EB) and complexes (1–4) for CT-DNA. Steady-state competitive binding experiments were undertaken to obtain further proof for the binding of the complexes to DNA. Fig. S19 (ESI†) shows the emission spectra of EB bound to DNA in the absence and presence of complex (1). The EB–DNA system shows a strong emission at 595 nm when the excitation wavelength is 546 nm. In all cases a remarkable reduction in the emission intensity was observed in the presence of the indium(III) complex, presumably due to the reduction in the number of binding sites on DNA available for EB. Although devoid of fused rings, a structural feature commonly associated with the intercalating mechanism, the spectral variations support the idea that the complexes under study interact with DNA, at least partially by an atypical intercalating mechanism.⁶⁷

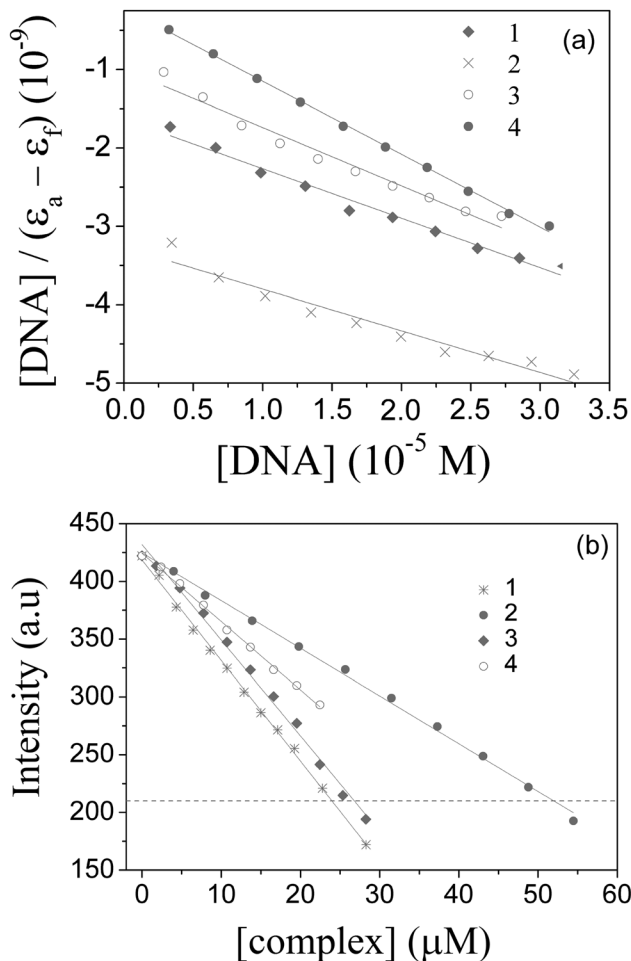
The apparent binding constants (K_{app}) for complexes (1–4) were calculated as previously described.⁶³ As shown in Fig. 4b, the C_{50} values were obtained from the plot of fluorescence intensity vs. $[\text{complex}]$ when the fluorescence is 50% of the initial fluorescence. The C_{50} values (μM) and K_{app} (10^5 M^{-1}) are shown in Table 5. The obtained K_{app} values are comparable to the value for the antitumor intercalating agent actinomycin D ($K_{\text{app}} = 9.69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$).⁶⁸

3.8. Theoretical studies

As previously mentioned, complexes (1–4) were obtained in methanol solution and the presence of the methanol molecule is confirmed by the O–H stretching vibration in their IR spectra and by the ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR signals. However, the

Table 4 Fluorescence suppression constants (K_{SV}), binding constants logarithm ($\log K_b$), number of binding sites (n) and thermodynamic parameters for the interaction between HSA and indium(III) complexes (1–4) at different temperatures

Compound	T (K)	K_{SV} ($10^5 M^{-1}$)	$\log K_b$	n	ΔG ($kJ mol^{-1}$)	ΔH° ($kJ mol^{-1}$)	ΔS° ($J mol^{-1} K^{-1}$)
1	293	(5.20 ± 0.09)	(5.86 ± 0.12)	(1.03 ± 0.02)	-32.87	-131.59	-338.05
	308	(2.40 ± 0.05)	(4.69 ± 0.16)	(0.86 ± 0.03)	-27.66		
2	293	(4.88 ± 0.09)	(5.37 ± 0.09)	(0.95 ± 0.02)	-30.12	-58.72	-96.82
	308	(2.61 ± 0.07)	(4.88 ± 0.10)	(0.90 ± 0.02)	-28.78		
3	293	(4.69 ± 0.07)	(5.66 ± 0.14)	(0.98 ± 0.02)	-31.75	-139.60	-369.61
	308	(2.68 ± 0.05)	(4.41 ± 0.07)	(0.87 ± 0.01)	-26.00		
4	293	(3.84 ± 0.08)	(5.38 ± 0.10)	(0.96 ± 0.02)	-30.18	-40.63	-35.97
	308	(2.67 ± 0.04)	(5.02 ± 0.09)	(0.93 ± 0.01)	-29.60		

**Fig. 4** (a) Plots of $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs. $[DNA]$. (b) Effect of increasing concentrations of indium(III) complexes on the fluorescence intensity of the EB–DNA system. The horizontal line represents 50% of the initial fluorescence.

spectral data were unable to confirm whether the methanol molecule is coordinated to the metallic center or not. The largely reduced mass involved in a possible In–O_{MeOH} vibration imposes limitation on its detection by IR analysis. Therefore, it is important to investigate the coordination ability of the solvent methanol molecule. Complex (1) was chosen as a model for this analysis. The crystal structure of 1 was used to generate the initial structures for the geometry optimizations considering the methanol molecule either coordinated or making an intermolecular hydrogen bond with the coordinated chloride ligands. The final B3LYP/TZVP optimized structures, in methanol solution, are shown in Fig. 5.

In the optimized structure of the intermolecular complex, the methanol molecule interacts weakly with the coordinated sulfur atom with a distance of 2.557 Å. The compound shows a distorted trigonal-bipyramidal like structure with the two chloride ligands occupying the equatorial position. The complex with coordinated methanol presents octahedral geometry, the methanol ligand occupying the axial position, with a bond distance of 2.404 Å.

Despite the distinct geometrical parameters, the difference in Gibbs free energy for these two species in methanol solution is only 1.94 kcal mol⁻¹ in favor of the coordinated species. From the relation $\Delta G = -RT \ln K_{eq}$, the calculated $K_{eq} = 26.43$ at 298.15 K. Considering this equilibrium constant and assuming that only the coordinated and intermolecular complexes are present, the coordinated : intermolar ratio is 96 : 4 at 298.15 K. That is, if these species are in equilibrium, the equilibrium may be shifted towards the coordinated species.

In summary, the theoretical results obtained for complex (1) indicate that in methanol solution the methanol molecule is coordinated to the metallic center. This conclusion can be extended to complexes (2–4). However, the coordinated methanol molecule can easily be replaced by DMSO, as shown in

Table 5 Intrinsic binding constant (K_b), concentration required to reduce 50% of the fluorescence of EB–DNA system (C_{50}) and apparent binding constant (K_{app}) for the competitive binding between EB bound to CT–DNA and indium(III) complexes (1–4)

Compound		K_b (M^{-1})	C_{50} (μM)	K_{app} (M^{-1})
[In(2Ac4oClPh)Cl ₂ (MeOH)]	1	$(3.87 \pm 0.32) \times 10^4$	24.05	4.98×10^5
[In(2Ac4pFPh)Cl ₂ (MeOH)]	2	$(1.63 \pm 0.12) \times 10^4$	51.42	2.33×10^5
[In(2Ac4pClPh)Cl ₂ (MeOH)]	3	$(7.46 \pm 0.45) \times 10^4$	26.08	4.59×10^5
[In(2Ac4pIPh)Cl ₂ (MeOH)]	4	$(4.27 \pm 0.54) \times 10^5$	35.86	3.34×10^5

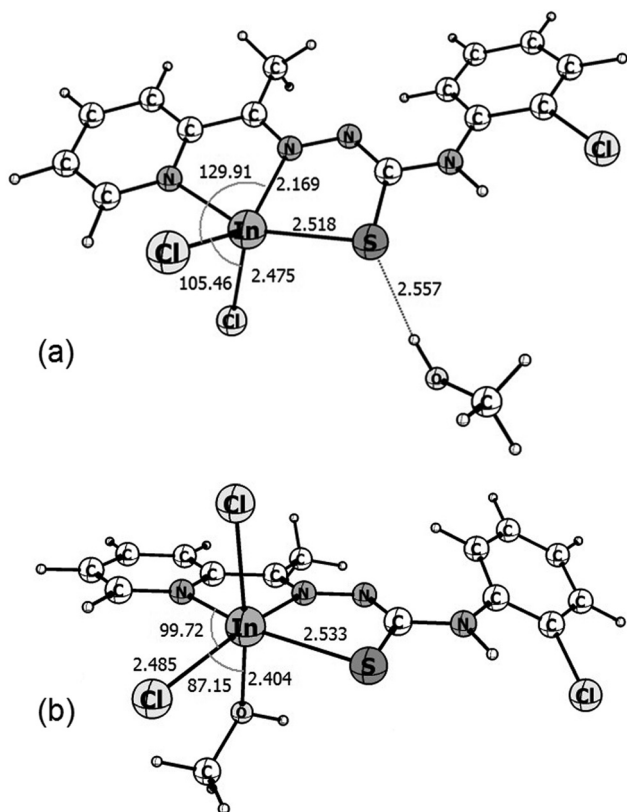


Fig. 5 Optimized structure of complex 1, with the methanol molecule making (a) weak intermolecular interactions and (b) coordinated to the indium atom. Distances are given in Å and angles in degrees.

Table 6. The Gibbs free energy for the displacement of methanol by DMSO for all complexes is negative, showing that this is a spontaneous process in DMSO solution. Hence, methanol displacement by DMSO probably takes place during the biological assays, which involve preparation of DMSO stock solu-

Table 6 Computed Gibbs free energy ($\Delta G_r(\text{sol})$) for the ligand displacement reactions in solution^a

	Reaction	$\Delta G_r(\text{sol})$ (kcal mol ⁻¹)
Results in DMSO solution	1 + DMSO → 1a + CH ₃ OH	-8.30
	2 + DMSO → 2a + CH ₃ OH	-10.42
	3 + DMSO → 3a + CH ₃ OH	-9.81
	4 + DMSO → 4a + CH ₃ OH	-4.37
Results in aqueous solution	1a + H ₂ O → 1a-(H ₂ O) + DMSO	1.52
	1a + H ₂ O → 1a-(H ₂ O) _{ax} + Cl ⁻	-78.96
	1a + H ₂ O → 1a-(H ₂ O) _{eq} + Cl ⁻	-85.50
	2a + H ₂ O → 2a-(H ₂ O) _{ax} + Cl ⁻	-77.26
	3a + H ₂ O → 3a-(H ₂ O) _{ax} + Cl ⁻	-80.66
	4a + H ₂ O → 4a-(H ₂ O) _{ax} + Cl ⁻	-79.74
	1a + 2H ₂ O → 1a-(H ₂ O) ₂ + 2Cl ⁻	-245.52
	2a + 2H ₂ O → 2a-(H ₂ O) ₂ + 2Cl ⁻	-241.82
	3a + 2H ₂ O → 3a-(H ₂ O) ₂ + 2Cl ⁻	-258.54
	4a + 2H ₂ O → 4a-(H ₂ O) ₂ + 2Cl ⁻	-247.51

^a The subscripts ax and eq mean substitution at the axial and equatorial positions, respectively.

tions of the complexes prior to the dilution with culture media.

It is well known that the chloride ligands of anticancer metallodrugs such as cisplatin and NAMI-A are easily replaced by water in the biological environment.⁶⁹ Based on these data, we decided to compute the thermodynamics of the ligand displacement reactions involving the chloride and DMSO ligands of complexes (1a–4a) and water in aqueous solution. The results are also listed in Table 6. As can be seen, the replacement of DMSO by water is unfavorable by 1.52 kcal mol⁻¹. However, for all complexes, the displacement of a chloride ligand by water in aqueous solution is extremely favorable, with Gibbs free energy of the reaction around -80 kcal mol⁻¹. The second substitution (double aquation) is even more favorable, with ΔG in the range of -240 to -250 kcal mol⁻¹. The optimized structures of complexes 1a–4a and their mono and diaqua derivatives can be found in the ESI.†

The thermodynamic results show that in aqueous solution, and possibly in the biological environment, the chloride ligands may be replaced by water, and the DMSO ligand should remain in the coordination sphere of the metal. Therefore, in aqueous solution, complexes (1–4) could in principle generate [In(L)Cl(H₂O)(DMSO)]⁺ or [In(L)(H₂O)₂(DMSO)]²⁺ (L = thiosemicarbazone ligand) as the species that interact with the biological media.

Based on the thermodynamics of substitution reactions, the SAR studies were conducted for the non-substituted complexes (1a–4a) and their mono (1a-(H₂O)-4a-(H₂O)) and diaqua (1a-(H₂O)₂-4a-(H₂O)₂) derivatives. The computed stereo-electronic properties are listed in Table 7. The data clearly show that substitution of the chloride ligands by water decreases the lipophilic character of the complexes and decreases both the surface area and the molecular volume. For instance, for complex (1a), the octanol/water partition coefficient log *P* decreases from 4.20 in 1a, to 3.38 in 1a-(H₂O) and to 2.59 in 1a-(H₂O)₂ and the molecular volume also decreases from 407.7 to 398.7 and to 391.2 Å³ in the same substitution sequence. For all complexes the HOMO–LUMO energy gap also decreases with substitution of chloride by water.

Structure–activity relationship studies were carried out to identify possible physico-chemical properties that might be involved in the cytotoxic and antimicrobial mechanism of action of these compounds. Properties of interest in this study were the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energies, the dipole moment, the octanol–water partition coefficient (log *P*), the surface area (SA) and the molecular volume, which were correlated to IC₅₀. HOMO and LUMO energies are related to ionization potential and electron affinity, respectively. These frontier orbitals are associated with the molecule reactivity. The HOMO energy is closely related to susceptibility to electrophilic attack, while LUMO energy is closely related to susceptibility to nucleophilic attack. Dipole moment may give some insight into the degree of hydrophobicity/hydrophilicity of the compounds. Additionally, log *P* is often used as a measure of lipophilicity of the compounds. Surface area may offer information on stereo features for drug–receptor interactions.

Table 7 Stereo-electronic properties computed for complexes **1a–4a** and their mono (**1a**-(H₂O)–**4a**-(H₂O)) and diaqua (**1a**-(H₂O)₂–**4a**-(H₂O)₂) derivatives

Compound	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	S.A (Å ²)	V (Å ³)	log P
1a	−6.018	−2.456	3.562	21.954	508.98	407.68	4.20
2a	−5.884	−2.427	3.457	20.613	500.11	397.38	3.78
3a	−5.960	−2.414	3.546	20.830	516.70	409.22	4.16
4a	−5.757	−2.417	3.340	18.034	520.49	419.81	4.25
1a -(H ₂ O) _{ax}	−6.075	−2.595	3.479	15.767	495.73	398.72	3.38
2a -(H ₂ O) _{ax}	−5.969	−2.558	3.411	13.013	489.14	388.70	2.95
3a -(H ₂ O) _{ax}	−5.966	−2.584	3.382	13.406	504.34	400.02	3.34
4a -(H ₂ O) _{ax}	−5.837	−2.560	3.278	15.891	510.52	411.35	3.48
1a -(H ₂ O) ₂	−6.180	−2.741	3.439	24.934	491.90	391.18	2.59
2a -(H ₂ O) ₂	−6.060	−2.742	3.318	23.647	478.17	380.14	2.22
3a -(H ₂ O) ₂	−6.051	−2.746	3.305	26.368	490.29	391.13	2.57
4a -(H ₂ O) ₂	−5.924	−2.748	3.176	36.783	499.92	402.69	2.68

IC₅₀ values for the cytotoxic and antimicrobial activities are listed in Tables 3 and 4, respectively. Regarding cytotoxic activity, the determination of the IC₅₀ for some complexes was not possible due to their low solubility. Therefore, the SAR analysis was conducted only for the HL-60 cells for which the measurements for all complexes and free ligands were possible. On the other hand, the SAR study was possible for the four species of *Candida* yeasts. The correlation matrices involving the stereo-electronic parameters and the IC₅₀ values can be found in ESI.† The stereo-electronic properties computed for the ligands were reported by us elsewhere.¹²

The cytotoxic activity of the free ligands does not show any appreciable correlation with the computed molecular properties. The best correlation was found for the log P ($R = 0.58$) and the molecular dipole moment of the ligands ($R = 0.73$).

However, reasonably good correlations were found for the complexes. For instance, a good correlation of the HOMO energy with the IC₅₀ is found for complexes **1a–4a** ($R = 0.85$), the monoqua ($R = 0.95$) and the diaqua ($R = 0.94$) derivatives. The lipophilic character of the compounds does not play an important role in the cytotoxic activity since no correlation is found with the log P parameter. The dipole moment of the unsubstituted complexes ($R = 0.95$) and the diaqua derivatives ($R = 0.94$) also correlates well with the activity as well as the molecular volume, which exhibits reasonable correlations with $R = 0.81$ (**1a–4a**), $R = 0.82$ (monoqua) and $R = 0.79$ (diaqua). Hence, there was no appreciable change in the correlation when the chloride ligands are replaced by water.

Although the SAR studies did not allow a general conclusion about the molecular parameters associated with the cytotoxic activity, IC₅₀ correlates reasonably with the energy of the highest occupied molecular orbital, which suggests that an external electrophilic attack on these compounds or an electron donation from these compounds to the receptor may be involved in the mechanism of action. In addition, the results also indicate that the polarity and the molecular volume of the complexes may be involved in the mechanism.

For the antimicrobial activity, the stereo-electronic parameters correlate differently for each *candida* yeast and, there-

fore, do not allow a general conclusion. The activity against *C. albicans* does not correlate well with any of the computed properties of the complexes. However, for *C. parapsilosis* good correlations were found involving the surface area ($R > 0.90$), molecular volume ($R > 0.90$) and log P ($R > 0.90$). These results suggest that transport of the complexes through the reactive area plays an important role in the mechanism of action. There was no appreciable change in the correlation when the chloride ligands were replaced by water in the mono- or diaqua complexes.

For *C. lusitaniae* good correlations were found for the energy of the HOMO ($R > 0.90$). Once again, there was no appreciable difference in the correlation when the chloride ligands were substituted by one or two water molecules. Therefore, different mechanisms of action for the complexes may be involved in the antimicrobial activity.

4. Conclusions

In conclusion, experimental and theoretical studies indicated that complexes [In(L)Cl₂(MeOH)] (**1–4**) formed with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones (HL) undergo substitution of the methanol ligand by DMSO with the formation of [In(L)Cl₂(DMSO)] (**1a–4a**). In aqueous solution, replacement of DMSO by water is unfavorable while substitution of the chloride ligands by one or two water molecules is extremely favorable, suggesting [In(L)Cl(H₂O)(DMSO)]⁺ or [In(L)(H₂O)₂(DMSO)]⁺² to be the species that interact with the biological media.

Complexes (**1–4**) or their substitution products [In(L)Cl(H₂O)(DMSO)]⁺ or [In(L)(H₂O)₂(DMSO)]⁺² exhibit high antifungal activity and proved to be potent cytotoxic agents against leukemia and solid tumor cells with high selectivity indexes (SI).

In the case of HL-60 cells, structure–activity relationship (SAR) studies indicated no appreciable changes in correlations of the physico-chemical properties with cytotoxicity for complexes (**1a–4a**) and their mono and/or diaqua derivatives, probably as a consequence of the very favorable processes of

substitution of chlorides by water. The same effect was observed in the case of SAR studies involving the antimicrobial activities of the compounds. Hence, complexes (1–4) could act as prodrugs.

The complexes under study interact *in vitro* with human serum albumin (HSA), indicating that they could be transported by HSA. The complexes bind to DNA *in vitro*, suggesting DNA to be a possible target for their bioactivities.

Although investigation on the mechanism of selectivity of complexes (1–4) or their substitution derivatives is beyond the scope of the present work, we may suggest that transferrin binding could at least in part explain the high selectivity indexes observed for some of the compounds under study.

Transferrin (Tf) may provide a pathway for uptake of therapeutic metallodrugs.⁷⁰ It is well known that gallium(III) complexes can be delivered into cells by transferrin. In fact, good correlations were found between transferrin receptor (TfR) expression and ⁶⁷Ga(III) uptake in malignant tissue.⁷¹

Considering that indium(III) also strongly binds to transferrin,⁷² transferrin could be able to deliver indium(III) complexes to cells by receptor mediated endocytosis. In fact, biodistribution studies of ¹¹¹In-labelled radiopharmaceuticals in rats revealed that the compounds tended to localize in cells of fast dividing tissues, which express numerous transferrin receptors (TfR).⁷³ Similarly, in malignant cells there are elevated levels of TfR expression, attributed to the high amount of iron required for their growth.⁷⁴ It has been demonstrated that inhibition of HL-60 leukemia cell proliferation by transferrin-bound-In(III) is 50-fold higher in comparison with inhibition induced by indium nitrate. A similar effect has previously been verified for transferrin-Ga(III).⁷⁵

Binding to albumin has also been described as a possible route for the uptake for oncology drugs into cancer cells. Indeed, this interaction has been exploited in Abraxane, a FDA-approved oncology product that uses HSA to deliver paclitaxel.⁷⁶ Similarly, albumin binding has been recently used in the design of platinum(IV) cytotoxic pro-drugs.⁷⁷ The success of HSA as a carrier for anticancer drugs can be attributed to the capacity of albumin adducts to accumulate into tumors by means of the enhanced permeability and retention (EPR) effect.⁷⁸

The high selectivity indexes of the indium(III)-thiosemicarbazone complexes against several leukemia and solid tumor cells, together with their ability to bind to DNA and albumin, suggest their relevance as potential metal-based drug candidates and encourage the investigation of their pharmacological and toxicological profiles *in vivo*.

It is worth noticing that ¹¹¹In radiopharmaceuticals for imaging are the main highlight of the research and applications of indium(III) complexes in medicine whereas investigation on indium-based therapeutic drug candidates remains practically unexplored. Our results strongly suggest that future investigation on the cytotoxic activity of ¹¹¹In complexes with the thiosemicarbazones under study or their analogues could also be of considerable relevance.

Acknowledgements

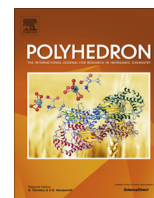
The authors gratefully acknowledge CNPq, FAPEMIG and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) for financial support. W. R. Rocha would like to thank INCT-Catálise (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Estudos de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados) for their support.

References

- 1 R. E. Weiner and M. L. Thakur, in *Handbook of radiopharmaceuticals – radiochemistry and applications*, ed. M. J. Welch and C. S. Redvanly, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2005, vol. 11, pp. 363–399.
- 2 P. J. Blower, *Dalton Trans.*, 2015, **44**(11), 4819–4844.
- 3 J. R. Dilworth and S. I. Pascu, in *The Chemistry of Molecular Imaging*, ed. N. Long and W. T. Wong, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2009, vol. 7, pp. 165–178.
- 4 E. N. Kaya, M. Durmuş and M. Bulut, *J. Organomet. Chem.*, 2014, **774**, 94–100.
- 5 S. Tajbakhsh, K. Mohammadi, I. Deilami, K. Zandi, M. Fouladvand, E. Ramedani and G. Asayesh, *Afr. J. Biotechnol.*, 2008, **7**(21), 3832–3835.
- 6 H. J. Rogers, C. Synge and V. E. Woods, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, **18**(1), 63–68.
- 7 S. David, V. Barros, C. Cruz and R. Delgado, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **251**(1), 119–124.
- 8 K. Mohammadi, K. H. Thompson, B. O. Patrick, T. Storr, C. Martins, E. Polishchuk, V. G. Yuen, J. H. McNeill and C. Orvig, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**(11), 2217–2225.
- 9 M. Asadi, N. Savaripoor, Z. Asadi, M. H. Ghatee, F. Moosavi, R. Yousefi and M. Jamshidi, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2013, **101**, 394–399.
- 10 H. Beraldo and D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2004, **4**(1), 31–39.
- 11 J. A. Lessa, I. C. Mendes, P. R. O. Silva, M. A. Soares, R. G. Santos, N. L. Speziali, N. C. Romeiro, E. J. Barreiro and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**(12), 5671–5677.
- 12 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. I. Pesquero, W. R. Rocha and H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**(11), 3396–3409.
- 13 J. A. Lessa, M. A. Soares, R. G. Santos, I. C. Mendes, L. B. Salum, H. N. Daghestani, A. D. Andricopulo, B. W. Day, A. Vogt and H. Beraldo, *Biomaterials*, 2013, **26**(1), 151–165.
- 14 I. C. Mendes, M. A. Soares, R. G. dos Santos, C. Pinheiro and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**(5), 1870–1877.
- 15 J. G. da Silva, L. S. Azzolini, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2009, **28**(11), 2301–2305.

- 16 R. G. Parr and W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecule*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
- 17 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**(7), 5648.
- 18 C. T. Lee, W. T. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, 1988, **37**(2), 785–789.
- 19 F. Weigend and R. Ahlrichsl, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**(18), 3297–3305.
- 20 E. van Lenthe, E. J. Baerends and J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.*, 1993, **99**(6), 4597–4610.
- 21 E. van Lenthe, E. J. Baerends and J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.*, 1994, **101**(11), 9783–9792.
- 22 E. van Lenthe, R. van Leeuwen, E. J. Baerends and J. G. Snijders, *Int. J. Quantum Chem.*, 1996, **57**(3), 281–293.
- 23 F. Neese, *J. Comput. Chem.*, 2003, **24**(14), 1740–1747.
- 24 F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen and U. Becker, *Chem. Phys.*, 2009, **356**(3), 98–109.
- 25 F. Weigend, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**(9), 1057–1065.
- 26 A. V. Marenich, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**(18), 6378–6396.
- 27 F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, 2012, **2**(1), 73–78.
- 28 A. Klamt and G. Schuurmann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1993, **5**, 799–805.
- 29 *TINKER - Software Tools for Molecular Design 7.1*, Jay Ponder Laboratory, Department of Chemistry, Washington University, St. Louis, 2015.
- 30 N. L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**(25), 8127–8134.
- 31 I. V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V. A. Palyulin, E. V. Radchenko, N. S. Zefirov, A. S. Makarenko, V. Y. Tanchuk and V. V. Prokopenko, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2005, **19**(6), 453–463.
- 32 VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org> (accessed August 2016).
- 33 I. V. Tetko, *Drug Discovery Today*, 2005, **10**(22), 1497–1500.
- 34 D. L. Klayman, J. F. Bartosevich, T. S. Griffin, C. J. Mason and J. P. Scovill, *J. Med. Chem.*, 1979, **22**(7), 855–862.
- 35 Oxford Diffraction, *CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21 (Release 20-01-2012 CrysAlis171.NET)*, Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England, 2010.
- 36 (a) G. M. Sheldrick, *SHELXS-2013/1: Program for Crystal Structure Solution*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2013; (b) G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, 2015, **71**, 3–8.
- 37 G. M. Sheldrick, *SHELXL-2014/7: Program for the Solution of Crystal Structures*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2014.
- 38 A. L. Spek, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2009, **65**, 148–155.
- 39 C. C. Lin, L. T. Ng, F. F. Hsu, D. E. Shieh and L. C. Chiang, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2004, **31**, 65–69.
- 40 T. J. Mosmann, *Methods*, 1983, **65**(2), 55–63.
- 41 E. Ulukaya, M. Colakogullari and E. J. Wood, *Chemother.*, 2004, **50**(1), 43–50.
- 42 R. B. Badisa, S. F. Darling-Reed, P. Joseph, J. S. Cooperwood, L. M. Latinwo and C. B. Goodman, *Anticancer Res.*, 2009, **29**(8), 2993–2996.
- 43 National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. NCCLS Document M27-A2*, Pennsylvania, 2002.
- 44 A. Ray, B. K. Seth, U. Pal and S. Basu, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2012, **92**, 164–174.
- 45 M. Kubista, R. Sjöback, S. Ericksson and B. Albinsson, *Analyst*, 1994, **119**(3), 417–419.
- 46 M. E. Reichmann, S. A. Rice and C. A. P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**(11), 3047–3053.
- 47 T. C. Jenkins, in *Drug-DNA interaction protocols*, ed. K. R. Fox, Humana Press, New Jersey, 1997, vol. 14, pp. 195–218.
- 48 W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.*, 1971, **7**(1), 81–122.
- 49 G. L. Parrilha, K. S. O. Ferraz, J. A. Lessa, K. N. Oliveira, B. L. Rodrigues, J. P. Ramos, E. M. Souza-Fagundes, I. Ott and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **84**, 537–544.
- 50 J. A. Lessa, J. C. Guerra, L. F. Miranda, C. F. D. Romeiro, J. G. da Silva, I. C. Mendes, N. L. Speziali, E. M. Souza-Fagundes and H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**(12), 1729–1739.
- 51 K. S. O. Ferraz, J. G. Silva, F. M. Costa, B. M. Mendes, B. L. Rodrigues, R. G. Santos and H. Beraldo, *Biometals*, 2013, **26**(5), 677–691.
- 52 K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2009.
- 53 S. Abram, C. Mossmer-Maichle and U. Abram, *Polyhedron*, 1998, **17**(1), 131–143.
- 54 J. Chan, A. L. Thompson, M. W. Jones and J. M. Peach, *Inorg. Chim. Acta*, 2010, **363**(6), 1140–1149.
- 55 A. Molter and F. Mohr, *Dalton Trans.*, 2011, **40**(14), 3754–3758.
- 56 T. Bohnert and L. S. Gan, *J. Pharm. Sci.*, 2013, **102**(9), 2953–2994.
- 57 P. Ascenzi, G. Fanali, M. Fasano, V. Pallottini and V. Trezza, *J. Mol. Struct.*, 2014, **1077**, 4–13.
- 58 G. Sudlow, D. J. Birkett and D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.*, 1975, **11**(6), 824–832.
- 59 S. Bobone, M. Van de Weert and L. Stella, *J. Mol. Struct.*, 2014, **1077**, 68–76.
- 60 S. D'Auria, M. Staiano, I. M. Kuznetsova and K. K. Turoverov, in *Reviews in fluorescence 2005*, ed. C. D. Geddes and J. R. Lakowicz, Springer, New York, 2005, vol. 2, pp. 25–61.
- 61 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 2006.
- 62 M. R. Eftink, *Fluorescence Quenching Reaction: Probing Biological Macromolecular Structures, Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1991.

- 63 J. G. da Silva, A. A. Recio-Despaigne, S. R. W. Louro, C. C. Bandeira, E. M. Souza-Fagundes and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **65**, 415–426.
- 64 K. Yamasaki, V. T. G. Chuang, T. Maruyama and M. Otagiri, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1830**(12), 5435–5443.
- 65 P. D. Ross and S. Subramanian, *Biochemistry*, 1981, **20**(11), 3096–3102.
- 66 E. C. Long and J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23**(9), 271–273.
- 67 R. D. Snyder, *Mutat. Res.*, 2007, **623**(2), 72–82.
- 68 A. Kellett, M. O'Connor, M. McCann, M. McNamara, P. Lynch, G. Rosair, V. McKee, B. Creaven, M. Walsh, S. McClean, A. Foltyn, D. O'Shea, O. Howe and M. Devereux, *Dalton Trans.*, 2011, **40**(5), 1024–1027.
- 69 J. Chen, L. Chen, S. Liao, K. Zheng and L. Ji, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**(27), 7862–7869.
- 70 A. Casini and J. Reedijk, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 3135–3144.
- 71 C. R. Chitambar and Z. Zivkovic, *Cancer Res.*, 1987, **47**(15), 3929–3934.
- 72 W. R. Harris, Y. Chen and K. Wein, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 4991–4998.
- 73 B. A. Jonsson, S. E. Strand and B. S. Larson, *J. Nucl. Med.*, 1992, **33**(10), 1825–1833.
- 74 H. Li and Z. M. Qian, *Med. Res. Rev.*, 2002, **22**(3), 225–250.
- 75 P. L. Moran and P. A. Seligman, *Cancer Res.*, 1989, **49**(15), 4237–4241.
- 76 Z. Liu and X. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 1432–1456.
- 77 Y. R. Zheng, K. Suntharalingam, T. C. Johnstone, H. Yoo, W. Lin, J. G. Brooks and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**(24), 8790–8798.
- 78 H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori, *J. Controlled Release*, 2000, **65**, 271–284.



Indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones exhibit cytotoxic activity against human leukemia and solid tumor cell lines



Alexandre A. Oliveira^a, Gabriele M.C. Perdigão^b, Jeferson G. da Silva^c, Elaine M. Souza-Fagundes^b, Heloisa Beraldo^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^bDepartamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^cDepartamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Governador Valadares, MG 35010-177, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2017

Accepted 28 June 2017

Available online 4 July 2017

Keywords:

Indium(III) complexes

Thiosemicarbazones

Crystal structures

Cytotoxic activity

Metal-based drugs

ABSTRACT

Complexes $[\text{In}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{In}(\text{2Ac4mClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{In}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) and $[\text{In}(\text{2Ac4pIPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**4**) were obtained with *N*(4)-phenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4Ph), and its *N*(4)-*meta*-chlorophenyl-(H2Ac4mClPh), *N*(4)-*para*-chlorophenyl-(H2Ac4pClPh) and *N*(4)-*para*-iodophenyl-(H2Ac4pIPh) derivatives. The crystal structures of $[\text{In}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{MeOH}$ (**1a**), $[\text{In}(\text{2Ac4mClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2a**) and $[\text{In}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{NO}_3$ (**3a**) were determined. The cytotoxic effects of the thiosemicarbazone ligands and of complexes (**1–4**) were evaluated against HL-60, Jurkat and THP-1 leukemia cells and against MCF-7, MDA-MB-231 and HCT-116 solid tumor cells, as well as against mammalian healthy Vero cells. Upon coordination to indium(III) cytotoxicity increased in several cases. In addition, complex (**1**) was active in sub-micromolar doses against all tested cell lineages, with selectivity indexes ($\text{SI} = \text{IC}_{50 \text{ Vero}}/\text{IC}_{50 \text{ tumor cell}}$) ranging from 3 (against THP-1 cells) to 144 (against HCT-116 cells).

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

¹¹¹In is among the frequently used radionuclides in diagnostic nuclear medicine. ¹¹¹In is employed in labeling of cellular blood components, monoclonal antibodies, in myocardial damage detection and in imaging for cancer [1]. The use of ¹¹¹In offers an accurate, non-invasive and early method for imaging of tissues containing tumor or inflammation, raising the possibility of cure or survival of patients [2]. In addition, ¹¹¹In might be used in cancer therapy through emission of Auger electrons, potentially enabling its complexes to be dual imaging-therapeutic agents [3].

Non-radioactive indium(III) compounds also present several pharmacological properties. In fact, indium(III) complexes with phthalocyanines have been investigated as photosensitizers in photodynamic therapy (PDT) of neuroblastoma cells [4] and in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) on *Escherichia coli* [5]. Indium tin oxide (ITO) nanoparticles have demonstrated

to induce DNA damage in A549 human lung adenocarcinoma cells [6]. In addition, considering the transmembrane enzyme carbonic anhydrase IX (CA IX) as a marker of tumor hypoxia and a potential chemotherapeutic target, indium(III) complexes containing arylsulfonamide conjugates with porphyrins were investigated as CA IX inhibitors which could be used as SPECT imaging agents for tumor hypoxia [7].

In previous works our research group demonstrated that 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones possess potent cytotoxic effects against numerous tumor cell lines [8,9]. We also demonstrated that $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ complexes (HL = 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones) were highly cytotoxic to a panel of human leukemia and solid tumor cells [10]. Moreover, we recently showed that thiosemicarbazone complexes with the Auger electrons emitter ^{114m}In(III) present high cytotoxic activity against MCF-7 human breast cancer cells [11].

Aiming to get more information about the cytotoxic profile of indium(III) complexes with thiosemicarbazones, in the present work a family of indium(III) complexes of the $[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$ type was obtained, in which HL = *N*(4)-phenyl-2-acetylpyridine

* Corresponding author.

E-mail addresses: hberaldo@ufmg.br, heloisaberaldoufmg@gmail.com (H. Beraldo).

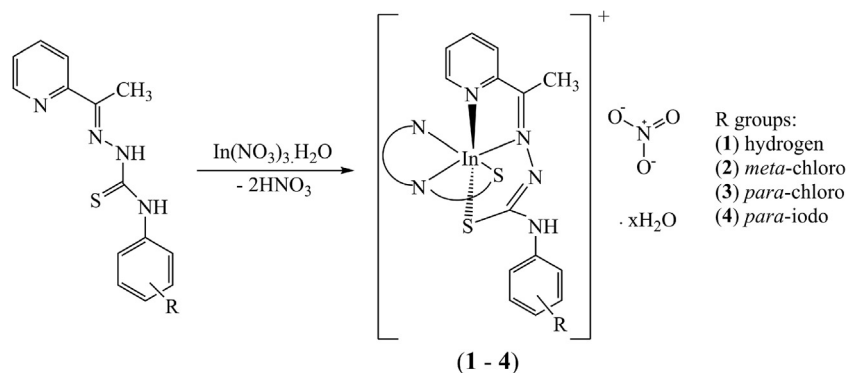


Fig. 1. Syntheses of the indium(III) complexes (1–4) with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones.

thiosemicarbazone (H2Ac4Ph) and its *N*(4)-*meta*-chlorophenyl-(H2Ac4mClPh), *N*(4)-*para*-chlorophenyl-(H2Ac4pClPh) and *N*(4)-*para*-iodophenyl-(H2Ac4pIPh) derivatives (see Fig. 1). The cytotoxic effects of the novel indium(III) complexes were investigated against HL-60 (human promyelocytic leukemia), THP-1 (human monocytic leukemia) and Jurkat (human immortalized line of T lymphocyte leukemia cells, and against MCF-7 and MDA-MB-231 (human breast carcinoma) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) solid tumor cells. Cytotoxicity against Vero cells (derived from the kidney of an African green monkey) as healthy cell model was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2-Acetylpyridine, indium(III) nitrate, hydrazine dihydrate, *m*-chlorophenyl-, *p*-chlorophenyl-, *p*-iodophenyl- and phenyl-isothiocyanate were purchased from Aldrich and used as received. All other common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.

2.2. Physical measurements

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Thermogravimetric curves were obtained with a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the 25–400 °C temperature range under dynamic nitrogen atmosphere at a heating rate of 10 °C min⁻¹. The molar conductances (Λ_m) were measured in dimethylformamide (DMF) solutions at 298 K with an YSI model 31 conductivity bridge. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr pellets (4000–400 cm⁻¹). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as solvent. Mass spectra were recorded with a Shimadzu LCMS-IT-TOF instrument working at high-resolution.

2.3. Syntheses of the thiosemicarbazones and their indium(III) complexes (1–4)

All thiosemicarbazones were synthesized by the reaction of the appropriate isothiocyanate with hydrazine dihydrate in methanol, as previously described [12]. The indium(III) complexes were obtained by mixing a methanol solution (15 mL) of the desired thiosemicarbazone (2 mmol) with indium nitrate (1.1 mmol) under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was placed in the fridge for 24 h. The resulting crystalline yellow solids were filtered off, washed with methanol followed by diethyl ether, and then dried under reduced pressure.

2.3.1. Bis[*N*(4)-phenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]indium(III) nitrate hydrate [In(2Ac4Ph)₂NO₃·H₂O (1)]

Yellow solid. Yield: 81%. Anal. Calc. for C₂₈H₂₈InN₉O₄S₂ (%): C, 45.85; H, 3.85; N, 17.19. Found: C, 45.22; H, 3.99; N, 17.33%. Thermogravimetry (30–100 °C range): Calc. weight loss of one water molecule: 2.46%. Found: 2.59%. FW: 733.53 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 68.20 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3247, ν(C=N) 1597, ν(C–S) 766, ρ(py) 644, ν(NO₃⁻) 1384, ν(O–H) 3300–3550. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 8.26–8.31 [m, 1H, H(3)], 8.26–8.31 [m, 1H, H(4)], 7.71–7.74 [m, 1H, H(5)], 8.14 [d, 1H, H(6)], 7.82 [d, 2H, H(10), H(14)], 7.38 [appt, 2H, H(11), H(13)], 7.09 [t, 1H, H(12)], 2.87 [s, 3H, H(15)], 10.22 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 146.4 [C(2)], 125.1 [C(3)], 142.6 [C(4)], 127.9 [C(5)], 146.8 [C(6)], 152.2 [C(7)], 169.8 [C(8)], 139.8 [C(9)], 121.4 [C(10), C(14)], 128.6 [C(11), C(13)], 123.3 [C(12)], 15.8 [C(15)]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₂₈H₂₆InN₈S₂ ([M]⁺) 653.0761, found 653.0751.

2.3.2. Bis[*N*(4)-*meta*-chlorophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]indium(III) nitrate sesquihydrate [In(2Ac4mClPh)₂NO₃·1.5H₂O (2)]

Yellow solid. Yield: 80%. Anal. Calc. for C₂₈H₂₇Cl₂InN₉O_{4.5}S₂ (%): C, 41.45; H, 3.35; N, 15.54. Found: C, 41.94; H, 3.39; N, 15.58%. Thermogravimetry (30–100 °C range): Calc. weight loss of 1.5 water molecule: 3.33%. Found: 3.66%. FW: 811.43 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 67.32 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3254, ν(C=N) 1595, ν(C–S) 772, ρ(py) 647, ν(NO₃⁻) 1384, ν(O–H) 3320–3600. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 8.29–8.35 [m, 1H, H(3)], 8.29–8.35 [m, 1H, H(4)], 7.73–7.76 [m, 1H, H(5)], 8.17 [d, 1H, H(6)], 8.15 [s, 1H, H(10)], 7.68 [d, 1H, H(12)], 7.40 [t, 1H, H(13)], 7.13–7.16 [m, 1H, H(14)], 2.89 [s, 3H, H(15)], 10.38 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 146.3 [C(2)], 125.4 [C(3)], 142.7 [C(4)], 128.2 [C(5)], 147.0 [C(6)], 153.5 [C(7)], 169.8 [C(8)], 141.2 [C(9)], 120.8 [C(10)], 132.9 [C(11)], 119.3 [C(12)], 130.3 [C(13)], 122.7 [C(14)], 15.9 [C(15)]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₂₈H₂₄Cl₂InN₈S₂ ([M]⁺) 720.9981, found 720.9988.

2.3.3. Bis[*N*(4)-*para*-chlorophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]indium(III) nitrate dihydrate [In(2Ac4pClPh)₂NO₃·2.0H₂O (3)]

Yellow solid. Yield: 76%. Anal. Calc. for C₂₈H₂₈Cl₂InN₉O₅S₂: C, 40.99; H, 3.44; N, 15.37. Found: C, 40.80; H, 3.55; N, 15.54%. Thermogravimetry (30–100 °C range): Calc. weight loss of 2.0 water molecules: 4.39%. Found: 4.32%. FW: 820.43 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 67.40 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3265, ν(C=N) 1601, ν(C–S) 778, ρ(py) 651, ν(NO₃⁻) 1390, ν(O–H) 3350–3550. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 8.27–8.34 [m, 1H, H(3)], 8.27–8.34 [m, 1H, H(4)], 7.71–7.74 [m, 1H, H(5)], 8.14 [d, 1H, H(6)], 7.44 [d, 2H, H(10), H(14)], 7.85 [d, 2H, H(11), H(13)], 2.86 [s, 3H, H(15)], 10.32 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C

$\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 146.3 [C(2)], 125.3 [C(3)], 142.7 [C(4)], 128.1 [C(5)], 146.9 [C(6)], 152.8 [C(7)], 169.7 [C(8)], 138.7 [C(9)], 128.5 [C(10), C(14)], 122.8 [C(11), C(13)], 126.8 [C(12)], 15.9 [C(15)]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{InN}_8\text{S}_2$ ($[\text{M}]^+$) 720.9981, found 720.9994.

2.3.4. Bis[*N*(4)-*para*-iodophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]indium(III) nitrate hydrate [*In*(2Ac4pIPh) $_2$]NO $_3$ ·H $_2$ O (**4**)

Yellow solid. Yield: 82%. Anal. Calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{I}_2\text{InN}_9\text{O}_4\text{S}_2$ (%): C, 34.13; H, 2.66; N, 12.79. Found: C, 34.13; H, 2.67; N, 12.96%. Thermogravimetry (30–100 °C range): Calc. weight loss of one water molecule: 1.83%. Found: 1.72%. FW: 985.32 g mol $^{-1}$. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 69.96 Ω^{-1} cm 2 mol $^{-1}$. IR (KBr, cm $^{-1}$): ν (N–H) 3250, ν (C=N) 1600, ν (C–S) 771, ρ (py) 646, ν (NO $_3^-$) 1385, ν (O–H) 3300–3600. ^1H NMR [400.13 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 8.27–8.33 [m, 1H, H(3)], 8.27–8.33 [m, 1H, H(4)], 7.71–7.73 [m, 1H, H(5)], 8.14 [d, 1H, H(6)], 7.66 [d, 2H, H(10), H(14)], 7.72 [d, 2H, H(11), H(13)], 2.85 [s, 3H, H(15)], 10.27 [s, 1H, N(4)H]. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 146.3 [C(2)], 125.3 [C(3)], 142.7 [C(4)], 128.0 [C(5)], 146.8 [C(6)], 153.0 [C(7)], 169.6 [C(8)], 139.6 [C(9)], 123.4 [C(10), C(14)], 137.3 [C(11), C(13)], 86.9 [C(12)], 15.9 [C(15)]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{I}_2\text{InN}_8\text{S}_2$ ($[\text{M}]^+$) 904.8693, found 904.8712.

2.4. Crystal structures determination

Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using graphite-Enhance Source Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at 150(2) K. Data collection, cell refinements and data reduction were performed using the CrysAlisPro software package [13]. An absorption correction based on multi-scan method was applied. The structures were solved by direct methods using SHELXS-2013/1 [14]. Full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-2014/7 [15]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms.

Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model.

Crystals of [*In*(2Ac4Ph) $_2$]NO $_3$ ·MeOH (**1a**) and [*In*(2Ac4pCIPh) $_2$]·NO $_3$ (**3a**) were obtained at room temperature from slow evaporation of the mother liquor of **1** and **3**, respectively. Crystals of [*In*(2Ac4mCIPh) $_2$]NO $_3$ ·EtOH·H $_2$ O (**2a**) were obtained from a 4:1 ethanol/DMSO solution of **2**. A summary of the crystal data, data collection details and refinement results is listed in Table 1. The molecular graphics were plotted using PLATON [16].

2.5. Cytotoxic activity

2.5.1. Cell lines

HL-60 (wild type human promyelocytic leukemia), Jurkat (human immortalized line of T lymphocyte) and THP-1 (human monocytic cells derived from an acute monocytic leukemia patient) cell lines were provided by Dr. Gustavo Amarante-Mendes (Universidade de São Paulo, Brazil). MCF-7 and MDA-MB-231 (human breast carcinoma) cell lines were provided by Dr. Alfredo Goes (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil), and HCT-116 (human colorectal carcinoma) cells were purchased from ATCC. Mammalian healthy Vero cells (African green monkey kidney cells) were provided by Erna Kroon (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil).

All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in RPMI 1640 or DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 100 U mL $^{-1}$ penicillin and 100 mg mL $^{-1}$ streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mM of L-glutamine and 10% (for leukemia cells) or 5% (for adherent cells) of fetal bovine serum (FBS). All cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO $_2$ and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

2.5.2. Evaluation of the cytotoxic effect

Cells were seeded at densities/well of 50,000 for HL-60 and 100,000 for Jurkat and THP-1 leukemia cells. Adherent (MCF-7, MDA-MB-231, HCT-116 and Vero) cells were inoculated at

Table 1
Crystal data and structure refinement results for [*In*(2Ac4Ph) $_2$]NO $_3$ ·MeOH (**1a**), [*In*(2Ac4mCIPh) $_2$]NO $_3$ ·EtOH·H $_2$ O (**2a**) and [*In*(2Ac4pCIPh) $_2$]·NO $_3$ (**3a**).

Compound	1a	2a	3a
Empirical formula	$\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{InN}_9\text{O}_4\text{S}_2$	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{InN}_9\text{O}_5\text{S}_2$	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{InN}_9\text{O}_3\text{S}_2$
Formula weight (g mol $^{-1}$)	747.56	848.48	784.40
Crystal system	monoclinic	monoclinic	monoclinic
Space group	$P2_1/n$	$P2_1/c$	$P2_1/n$
λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
T (K)	150(2)	150(2)	150(2)
Unit cell dimensions			
a (Å)	12.6962(3)	10.9997(3)	10.7997(2)
b (Å)	14.5589(4)	20.8178(8)	15.3736(3)
c (Å)	17.0149(4)	14.8520(4)	18.5999(4)
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	$\alpha = \gamma = 90/\beta = 100.426(2)$	$\alpha = \gamma = 90/\beta = 90.329(2)$	$\alpha = \gamma = 90/\beta = 97.799(2)$
V (Å 3)	3093.15(14)	3400.90(18)	3059.58(11)
Z	4	4	4
D_{calc} (mg m $^{-3}$)	1.605	1.657	1.703
$F(000)$	1520	1720	1576
Absorption coefficient (mm $^{-1}$)	0.951	1.030	1.132
Limiting indices	$-15 \leq h \leq 15$ $-18 \leq k \leq 18$ $-21 \leq l \leq 21$	$-13 \leq h \leq 13$ $-26 \leq k \leq 26$ $-18 \leq l \leq 18$	$-13 \leq h \leq 13$ $-19 \leq k \leq 19$ $-23 \leq l \leq 23$
θ range for data collection (°)	1.850–26.371	1.851–26.372	2.067–26.372
Reflections collected	61873	68807	61147
Independent reflections [R_{int}]	6329 [0.0559]	6953 [0.0570]	6262 [0.0483]
Completeness to $\theta = 26.37^\circ$ (%)	100	100	100
Data/restraints/parameters	6329/0/410	6953/0/441	6262/0/408
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0264$; $wR_2 = 0.0560$	$R_1 = 0.0390$; $wR_2 = 0.0902$	$R_1 = 0.0241$; $wR_2 = 0.0512$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0381$; $wR_2 = 0.0622$	$R_1 = 0.0552$; $wR_2 = 0.1014$	$R_1 = 0.0337$; $wR_2 = 0.0569$
Goodness-of-fit on F^2	1.097	1.084	1.087
$\Delta\rho_{\text{máx.}}$ and $\Delta\rho_{\text{mín.}}$	0.611 and -0.422	1.636 and -0.792	0.586 and -0.417

10,000 cells/well. The plates were pre-incubated for 24 h at 37 °C to allow adaptation of cells prior to the addition of the test compounds. After addition, the plates were inoculated for 48 h in an atmosphere of 5% CO₂ and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.5% DMSO (negative control), drug-containing medium (background) and drug-free complete medium (blank). All substances were dissolved in DMSO prior to dilution and freshly prepared solutions were screened at 10 μM. Compounds that inhibited the proliferation in more than 50% were selected for determination of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). IC₅₀ values were determined over a range of ten-fold concentrations (100–0.001 μM). All compounds were tested in triplicate, in three independent experiments.

In vitro cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). MTT is a tetrazolium salt that is reduced to purple formazan crystals mainly by mitochondrial succinate dehydrogenase, and the color intensity of the formazan dye is correlated to the number of viable cells [17]. Briefly, after the end of incubation of cells with the compounds, 20 μL of MTT solution (5 mg mL⁻¹ in phosphate-buffered saline) were added to each well. After 4 h, the supernatant was removed and 200 μL of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystals. The optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 595 nm. Results were expressed as percentage of cell proliferation and were calculated as follows: viability (%) = (mean OD treated – mean OD background)/(mean OD 0.5% DMSO – mean OD blank) × 100. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative in relation to the control [18].

2.5.3. Toxicity and selectivity index (SI)

The cytotoxic effects on non-malignant cells were evaluated using Vero (African green monkey kidney) cells as a model. The cytotoxicity of the compounds against tumor and non-malignant cells was compared using the selectivity index (SI), which is the ratio between the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the cell proliferation for non-malignant and tumor cells, SI = IC₅₀ Vero/IC₅₀ tumor cell [19].

3. Results and discussion

3.1. Formation of the indium(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data were compatible with the formation of [In(2Ac4Ph)₂]NO₃·H₂O (**1**), [In(2Ac4mCIPh)₂]NO₃·1.5H₂O (**2**), [In(2Ac4pCIPh)₂]NO₃·2H₂O (**3**) and [In(2Ac4pIPh)₂]NO₃·H₂O (**4**) in which two anionic thiosemicarbazones are attached to the metal center and one nitrate is present as counter ion [20]. The formation of cationic [In(thiosemicarbazonato)₂]⁺ species was confirmed by high resolution mass spectra (Figs. S2–S5, see Supplementary data). The presence of crystallization water molecules was confirmed by the thermogravimetric curves, which showed weight losses of 2.59% (calc. 2.46%) (**1**); 3.66% (calc. 3.33%) (**2**); 4.32% (calc. 4.39%) (**3**) and 1.72% (calc. 1.83%) (**4**).

3.2. Spectroscopic characterization

The ν(C=N) vibrational mode at 1588–1581 cm⁻¹ in the infrared spectra of the free thiosemicarbazones shifts to 1601–1596 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1–4**), in agreement with coordination *via* the imine nitrogen atom [10,21,22]. The ν(C–S) absorption, observed at 826–783 cm⁻¹ in the spectra of the thiosemicarbazones, shifts to 778–766 cm⁻¹ in the spectra of the

complexes, indicating coordination through the sulfur. The observed shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur [10,21,22]. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 621–620 cm⁻¹ in the spectra of the thiosemicarbazones shifts to 651–644 cm⁻¹ in complexes (**1–4**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [10,21,22]. Therefore, the data suggest that the thiosemicarbazones are attached to the metal through the N_{py}–N_{imine}–S chelating system, as previously reported by us and other authors for indium(III) complexes with thiosemicarbazones [10,23–25]. Moreover, a broad absorption at 3300–3600 cm⁻¹ was attributed to the ν(O–H) stretching vibration and the presence of uncomplexed nitrate ion was confirmed by the ν(NO₃⁻) vibrational mode in the 1384–1390 cm⁻¹ range [26] (see the infrared spectra of the ligands and of complexes (**1–4**) in Figs. S6–S13, Supplementary data).

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their indium(III) complexes (**1–4**) were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were doubtless assigned on the basis of chemical shifts, multiplicities and by using 2D homonuclear ¹H–¹H correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments and the assignments were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) and heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) experiments.

Duplicated signals were observed in the ¹H NMR spectra of the free thiosemicarbazones, which correspond to a mixture of the *E* (89–96%) and *Z* (11–4%) configurational isomers. The N3–H chemical shifts close to δ 11 ppm are characteristic of the *E* configuration, in which N3–H is hydrogen bonded to the solvent and the chemical shifts around δ 13 ppm indicate *Z* configuration, in which N3–H is hydrogen bonded to the pyridine nitrogen [8]. In the ¹³C {¹H} NMR spectra of the thiosemicarbazones the signals were not duplicated due to the low concentration of the *Z* isomer in all cases.

In the ¹H and ¹³C{¹H} NMR spectra of complexes (**1–4**) only one signal was observed for each magnetically different nucleus (Figs. S14–S21, see Supplementary data). The absence of the N3–H signal indicates coordination of an anionic thiosemicarbazone. The signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free ligand. Similarly, the signals of C=N, C=S and the pyridine carbons undergo significant shifts, indicating coordination of the thiosemicarbazones through the N_{py}–N_{imine}–S chelating system. The 2D NMR contour maps support the ¹H and ¹³C attributions. Hence in **1–4** the thiosemicarbazones adopt the *E* configuration.

3.3. X-ray crystallography

The crystal structures of [In(2Ac4Ph)₂]NO₃·MeOH (**1a**), [In(2Ac4mCIPh)₂]NO₃·EtOH·H₂O (**2a**) and [In(2Ac4pCIPh)₂]·NO₃ (**3a**) were determined by X-ray diffraction. The atom arrangements and atom numbering scheme for **1a–3a** are shown in Fig. 2. The nitrate anion and solvation molecules are omitted for the sake of clarity. Selected intramolecular bond distances and angles are presented in Table 2 together with data on the parent ligands [8,27].

In the crystallographic structures, indium(III) is in a distorted octahedral environment, in which two molecules of the thiosemicarbazone are coordinated to the metal center. The formation of five membered rings is presumably the reason for the distortion, since the N1–In1–N2 and N2–In1–S1 chelate bite angles are near 75°. The free thiosemicarbazones crystallize in *EE* conformation [8,27]. A twisting of approximately 180° in the C8–N3 bond of the thiosemicarbazone to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced. Therefore, in the structures the two ligands adopt the *EZ* conformation. The same behavior had also been observed for similar indium(III) and gallium(III) complexes [10,28,29].

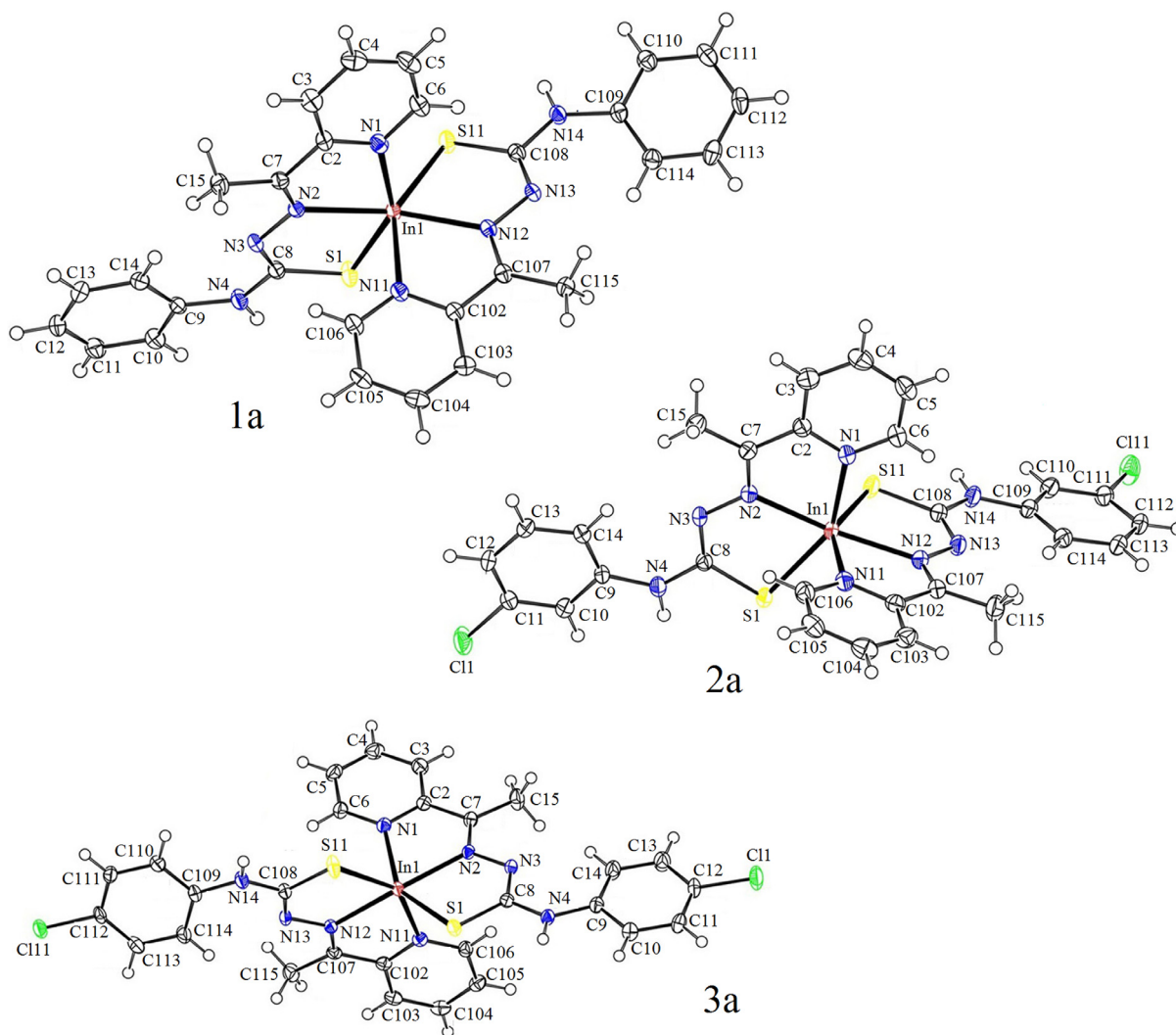


Fig. 2. Molecular plots of $[\text{In}(\text{2Ac4Ph})_2]^+$, $[\text{In}(\text{2Ac4mClPh})_2]^+$ and $[\text{In}(\text{2Ac4pClPh})_2]^+$ in $[\text{In}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{MeOH}$ (**1a**), $[\text{In}(\text{2Ac4mClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2a**) and $[\text{In}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{NO}_3$ (**3a**), respectively, showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

The expected lengthening of the C8–S1 bond (0.072–0.091 Å) and shortening of the N3–C8 bond (around to 0.04 Å) were observed in the complexes. Therefore, the C8–S1 bond changes from a double to a predominantly single bond whereas N3–C8 acquires some double bond character.

The literature describes the crystal structure of a trinuclear indium(III) complex obtained by reacting *N*(4)-phenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone with trimethylindium. Interestingly, in this case the indium atoms are in unusual distorted-square-based-pyramidal environments. In the complex, two thiosemicarbazone ligands coordinate to two indium(III) centers through the $\text{N}_{\text{py}}\text{--N}_{\text{imine}}\text{--N}$ chelating system while the third metal center is attached to two nitrogen and two sulfur atoms of the thiosemicarbazones with an apical methyl group completing the coordination sphere [30]. Complex $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ with the same thiosemicarbazone ligand was also obtained by other authors using InCl_3 as starting salt. Its crystal structure reveals the presence of a pseudo-octahedral geometry around indium(III), in which one anionic thiosemicarbazone is attached to the metal through the $\text{N}_{\text{py}}\text{--N}_{\text{imine}}\text{--S}$ system, along with two chlorides and one methanol molecule [24]. In the present work $[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$ complexes were obtained by reacting the thiosemicarbazones with $\text{In}(\text{NO}_3)_3$. Therefore, the nature of the starting indium precursor has a strong

influence on the geometry and coordination sphere of the resulting indium(III) complexes.

3.4. Cytotoxic activity

The thiosemicarbazones, indium(III) nitrate and complexes (**1–4**) were evaluated by the MTT colorimetric assay for their ability to reduce cellular viability of human leukemia (HL-60, Jurkat and THP-1) and solid tumor (MDA-MB-231, MCF-7, HCT-116) cells.

Indium(III) nitrate proved to be inactive against the tested malignant cells. We recently demonstrated that indium(III) chloride was also inactive against tumor cells in low concentrations [10]. In fact, previous studies by other authors demonstrated that indium(III) was not cytotoxic against Balb/c 3T3 mouse fibroblasts [31]. In addition, considering the use of indium-containing dental alloys, the cytotoxic effects of indium(III) were investigated on human oral keratinocytes cell lines and no cytotoxicity was observed [32].

The determined IC_{50} values for the indium(III) complexes (**1–3**) and their parent ligands are shown in Table 3. For H2Ac4pIph ($\text{IC}_{50} = 0.86 \mu\text{M}$) and complex (**4**) ($\text{IC}_{50} = 0.88 \mu\text{M}$), the IC_{50} values were obtained only against HL-60 cells due to precipitation at

Table 2Selected bond lengths (Å) and angles (°) for [In(2Ac4Ph)₂]₂NO₃·MeOH (**1a**), [In(2Ac4mClPh)₂]₂NO₃·EtOH·H₂O (**2a**) and [In(2Ac4pClPh)₂]₂NO₃ (**3a**) in comparison with the parent free thiosemicarbazones.

	H2Ac4Ph [27]	1a ^a	H2Ac4mClPh [8]	2a ^a	H2Ac4pClPh [8]	3a ^a
<i>Bond</i>						
S1–C8	1.677(2)	1.751(2)/1.749(2)	1.669(3)	1.760(3)/1.760(3)	1.671(2)	1.759(2)/1.748(2)
N2–C7	1.284(3)	1.293(3)/1.296(3)	1.290(3)	1.291(4)/1.290(4)	1.283(2)	1.292(3)/1.293(3)
N2–N3	1.376(2)	1.373(3)/1.374(3)	1.378(3)	1.375(4)/1.373(4)	1.374(2)	1.369(2)/1.372(3)
N3–C8	1.358(3)	1.319(3)/1.312(3)	1.354(3)	1.312(4)/1.320(4)	1.352(2)	1.315(3)/1.318(3)
In1–N1	–	2.274(2)	–	2.272(3)	–	2.3026(19)
In1–N2	–	2.2774(18)	–	2.268(3)	–	2.2539(18)
In1–S1	–	2.4729(6)	–	2.4884(9)	–	2.5074(6)
In1–N11	–	2.3320(19)	–	2.293(3)	–	2.3235(19)
In1–N12	–	2.2514(18)	–	2.270(3)	–	2.2979(18)
In1–S11	–	2.5085(6)	–	2.4946(9)	–	2.4790(6)
<i>Angle</i>						
C7–N2–N3	118.8(2)	118.47(19)/116.73(19)	118.7(2)	117.9(3)/117.9(3)	118.86(15)	117.24(18)/117.61(18)
N2–N3–C8	118.9(2)	113.77(18)/114.39(18)	119.0(2)	114.4(3)/114.4(3)	118.66(15)	114.89(18)/114.35(18)
N3–C8–S1	119.7(1)	128.60(18)/128.16(18)	121.2(2)	128.8(3)/128.2(3)	119.99(15)	128.31(17)/128.16(17)
N1–In1–N2	–	71.18(7)	–	71.19(10)	–	71.14(6)
N1–In1–S1	–	147.37(5)	–	148.49(7)	–	147.08(5)
N1–In1–N11	–	95.66(7)	–	86.63(10)	–	91.98(6)
N1–In1–N12	–	95.87(7)	–	94.57(10)	–	88.75(6)
N1–In1–S11	–	94.06(5)	–	93.19(8)	–	94.95(5)
N2–In1–S1	–	77.32(5)	–	77.56(7)	–	77.45(5)
N2–In1–N11	–	86.32(7)	–	96.50(10)	–	84.14(6)
N2–In1–N12	–	152.72(7)	–	162.03(11)	–	146.87(7)
N2–In1–S11	–	126.74(5)	–	113.24(7)	–	129.61(5)
S1–In1–N11	–	90.51(5)	–	93.08(8)	–	94.45(5)
S1–In1–N12	–	116.34(5)	–	115.15(8)	–	123.74(5)
S1–In1–S11	–	98.07(2)	–	102.86(3)	–	97.54(2)
N11–In1–N12	–	70.79(7)	–	71.11(10)	–	70.14(6)
N11–In1–S11	–	146.89(5)	–	148.52(7)	–	145.91(5)
N12–In1–S11	–	76.77(5)	–	77.54(8)	–	76.68(5)

^a The two bond distances and angles refer to two ligands coordinated to the metal center.**Table 3**Cytotoxic activity (IC₅₀)^a and selectivity indexes (SI)^b of the thiosemicarbazones and their indium(III) complexes (**1–3**) on HL-60, Jurkat, THP-1, MDA-MB-231, MCF-7, HCT-116 and Vero cell lines.

	IC ₅₀ (μM) and selectivity indexes (SI)													
	HL-60	SI	Jurkat	SI	THP-1	SI	MDA-MB 231	SI	MCF-7	SI	HCT-116	SI	Vero	
H2Ac4Ph	0.14	ND	1.42	ND	1.24	ND	4.13	ND	0.34	ND	0.60	ND	ND	
(1)	(0.03–0.59)	72	(0.76–2.64)	5	(0.40–3.86)	3	(1.05–16.24)	18	(0.04–2.65)	5	(0.12–1.87)	144	2.87	
	0.04		0.53		0.90		0.16		0.54		0.02		(1.02–8.11)	
	(0.02–0.08)		(0.23–1.23)		(0.41–1.99)		(0.05–0.50)		(0.06–5.32)		(0.01–0.06)			
H2Ac4mClPh	0.50	14	0.71	10	0.70	10	0.17	41	0.16	43	0.70	10	6.93	
(2)	(0.09–2.89)	ND	(0.37–1.34)	ND	(0.30–1.61)	ND	(0.06–0.46)	ND	(0.04–0.71)	ND	(0.25–1.97)	ND	(4.30–11.16)	
	0.10		ND		ND		0.11		ND		0.04		ND	
	(0.02–0.34)						(0.04–0.31)				(0.02–0.09)		ND	
H2Ac4pClPh	0.19	16	1.78	2	0.84	4	0.08	37	0.03	100	0.55	5	2.99	
(3)	(0.02–2.04)	ND	(0.75–4.19)	ND	(0.18–3.87)	ND	(0.03–0.20)	ND	(0.01–0.24)	ND	(0.18–1.69)	ND	(0.49–18.45)	
	0.34		0.90		ND		ND		ND		0.19		ND	
	(0.14–0.79)		(0.44–1.85)								(0.01–3.41)		ND	
Cisplatin	0.49	21	20.89	<1	9.68	1	51.50	<1	37.66	<1	12.95	<1	10.05	
	(0.09–2.86)		(11.18–39.04)		(9.42–9.96)		(30.35–87.39)		(18.12–78.27)		(7.86–21.32)		(4.67–21.61)	

^a IC₅₀: concentration that reduced 50% of cell proliferation; values (μM) plus 95% confidence interval (in brackets).^b Selectivity indexes, SI = IC₅₀ Vero/IC₅₀ tumor cell; ND = IC₅₀ was not determined due to precipitation at 10 μM, while at 1 μM the compounds did not induce at least 50% reduction of cell proliferation.

10 μM, while at 1 μM the compounds did not induce at least 50% reduction of cell proliferation on the other cell lineages.

Although In(NO₃)₃ was inactive, the cytotoxicity of the thiosemicarbazones against the assayed cancer cells increased in several cases upon coordination to indium(III). Complexes (**1–3**) were highly cytotoxic with good selectivity indexes against HL-60 leukemia and HCT-116 colorectal carcinoma cells. Complex (**1**) exhibited IC₅₀ = 40 nM (SI = 72) against HL-60 cells and IC₅₀ = 20 nM (SI = 144) against HCT-116 cells. **1** was 3.5-fold more active than the parent ligand against HL-60 cells and 30-fold more

active than the free thiosemicarbazone against HCT-116 cells, being much more potent than cisplatin in both cases. Moreover, it was active in sub-micromolar doses against all tested cell lineages, with selectivity indexes ranging from 3 (for THP-1 cells) to 144 (for HCT-116 cells).

Similarly, the literature reports that an indium(III) complex with 2-benzoylpyridine *N*(4)-cyclohexylthiosemicarbazone exhibits antiproliferative activity against HepG2 (human hepatocellular carcinoma) cells with 5-fold lower toxicity on normal hepatocyte QSG7701 cells [29].

4. Conclusions

In previous works we demonstrated that although indium chloride was inactive, indium(III) complexes with thiosemicarbazones of the $[\text{In}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ type were highly cytotoxic to leukemia and solid tumor cells [10]. The present results indicate that $[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$ complexes also show potent cytotoxic effects in spite of the fact that indium nitrate was devoid of activity. Hence, the thiosemicarbazones, besides of their own cytotoxic effect, also probably acted as carriers of indium into the cells.

On the other hand, our results suggest that complexation to indium(III) might constitute an efficacious strategy of thiosemicarbazones cytotoxicity improvement. In addition, our results show that indium(III) complexes with thiosemicarbazones possess a broad spectrum of cytotoxic action and may present high selectivity indexes. Taking into consideration that the pharmacological profile of non-radioactive indium(III) complexes has been poorly investigated, the present work represents an important contribution to the understanding of their potential applications as anti-cancer agents.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CNPq, FAPEMIG and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) for financial support and student grants.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material contains the FT-IR spectra of the ligands (H2Ac4Ph, H2Ac4mClPh, H2Ac4pClPh and H2Ac4plPh) and of complexes (1–4). It also contains the ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of 1–4, as well as their high resolution Mass Spectra [ESI (+), IT-TOF]. CCDC 1549935, 159936 and 1549937 contains the supplementary crystallographic data for 1a, 2a and 3a, respectively. These data can be obtained free of charge via <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2017.06.045>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2017.06.045>.

References

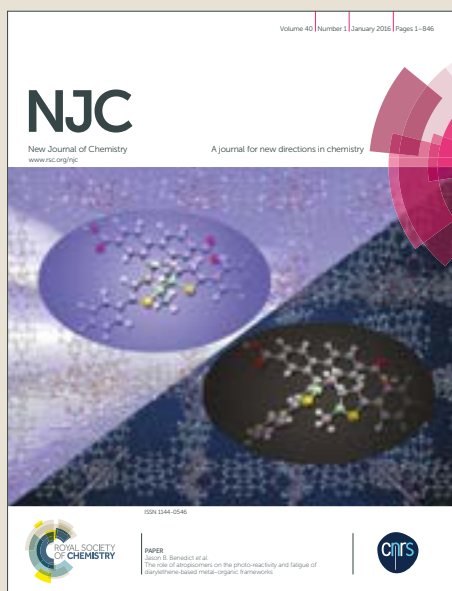
- [1] S. Lahiri, M. Maiti, K. Ghosh, J. Radioanal. Nucl. Chem. 297 (2013) 309, <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-012-2344-3>.
- [2] C.S. Cutler, H.M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, S.S. Jurisson, Chem. Rev. 113 (2013) 858, <http://dx.doi.org/10.1021/cr3003104>.
- [3] J.R. Dilworth, S.I. Pascu, in: N. Long, W.T. Wong (Eds.), The Chemistry of Molecular Imaging, John Wiley & Sons, Hoboken, 2014, pp. 165–178, doi: 10.1002/9781118854754.ch7.
- [4] M. Neagu, C. Constantin, M. Tampa, C. Matei, A. Lupu, E. Manole, R.M. Ion, C. Fenga, A.M. Tsatsakis, Oncotarget 7 (2016) 69718. <https://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.11942>.
- [5] O.L. Osifeko, I. Uddin, P.N. Mashazi, T. Nyokong, New J. Chem. 40 (2016) 2710, <http://dx.doi.org/10.1039/c5nj01922b>.
- [6] Y. Tabei, A. Sonoda, Y. Nakajima, V. Biju, Y. Makita, Y. Yoshida, M. Horie, Metallomics 7 (2015) 816, <http://dx.doi.org/10.1039/c5mt00031a>.
- [7] J.R. Dilworth, S.I. Pascu, P.A. Waghorn, D. Vullo, S.R. Bayly, M. Christlieb, X. Sun, C.T. Supuran, Dalton Trans. 44 (2015) 4859, <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt03206c>.
- [8] J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. da Silva, M.A. Soares, R.G. dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 5671, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.021>.
- [9] 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.I. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo, Bioorg. Med. Chem. 20 (2012) 3396, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.027>.
- [10] 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, Dalton Trans. 46 (2017) 918, <http://dx.doi.org/10.1039/C6DT03657K>.
- [11] A.A. Oliveira, L.L. Franco, R.G. dos Santos, G.M.C. Perdigão, J.G. da Silva, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, New J. Chem. (2017), <http://dx.doi.org/10.1039/C7NJ01547J>, accepted manuscript.
- [12] D.L. Klayman, J.F. Bartosevich, T.S. Griffin, C.J. Mason, J.P. Scovill, J. Med. Chem. 22 (1979) 855, PMID: 376848.
- [13] Oxford Diffraction, CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21 (Release 20–01–2012 CrysAlis171.NET), Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England, 2010.
- [14] (a) G.M. Sheldrick, SHELXS-2013/1, Program for Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2013; (b) G.M. Sheldrick, Acta Crystallogr. C71 (2015) 3, <http://dx.doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- [15] G.M. Sheldrick, SHELXL-2014/7: Program for the Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2014.
- [16] A.L. Spek, Acta Crystallogr. D65 (2009) 148, <http://dx.doi.org/10.1107/S090744490804362X>.
- [17] T. Mosmann, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [18] E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood, Chemotherapy 50 (2004) 43, <http://dx.doi.org/10.1159/000077285>.
- [19] R.B. Badisa, S.F. Darling-Reed, P. Joseph, J.S. Cooperwood, L.M. Latinwo, C.B. Goodman, Anticancer Res. 29 (2009) 2993, PMID: 2885965.
- [20] W.J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81, [http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).
- [21] L.B.P. Sâmia, G.L. Parrilha, J.G. da Silva, J.P. Ramos, E.M. Souza-Fagundes, S. Castelli, V. Vutey, A. Desideri, H. Beraldo, Biometals 29 (2016) 515, <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-016-9933-5>.
- [22] C.V. Garcia, G.L. Parrilha, B.L. Rodrigues, P.J.S. Barbeira, R.M. Clarke, T. Storr, H. Beraldo, Polyhedron 124 (2017) 86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2016.12.024>.
- [23] S. Abram, C. Maichle-Mössmer, U. Abram, Polyhedron 17 (1998) 131, [http://dx.doi.org/10.1016/S0277-5387\(97\)00240-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0277-5387(97)00240-4).
- [24] J. Chan, A.L. Thompson, M.W. Jones, J.M. Peach, Inorg. Chim. Acta 363 (2010) 1140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2009.10.020>.
- [25] A. Molter, F. Mohr, Dalton Trans. 40 (2011) 3754, <http://dx.doi.org/10.1039/C0DT01693D>.
- [26] K. Nakamoto, Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry, sixth ed., John Wiley & Sons Inc, New Jersey, 2009.
- [27] E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Domínguez, R. Carballo, C. Maichle-Mössmer, J. Strähle, D.X. West, Z. Anorg. Allg. Chem. 625 (1999) 961, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3749\(199906\)625:6<961::AID-ZAAC961>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-3749(199906)625:6<961::AID-ZAAC961>3.0.CO;2-J).
- [28] J.A. Lessa, M.A. Soares, R.G. dos Santos, I.C. Mendes, L.B. Salum, H.N. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, H. Beraldo, Biometals 26 (2013) 151, <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-012-9603-1>.
- [29] Y.X. Tai, Y.M. Ji, Y.L. Lu, M.X. Li, Y.Y. Wu, Q.X. Han, Synth. Met. 219 (2016) 109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.05.015>.
- [30] C. Paek, S.O. Kang, J. Ko, P.J. Carroll, Organometallics 16 (1997) 4755, <http://dx.doi.org/10.1021/om970119p>.
- [31] J.C. Wataha, C.T. Hanks, R.G. Craig, J. Biomed. Mater. Res. 25 (1991) 1133, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.820250907>.
- [32] J.H. Lee, S.H. Seo, S.B. Lee, J.Y. Om, K.M. Kim, K.N. Kim, Dent. Mater. 31 (2015) 123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.11.006>.

NJC

Accepted Manuscript



This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: A. A. Oliveira, L. L. Franco, R. G. Dos Santos, G. D. M. C. Perdigão, J. G. Da Silva, E. Souza-Fagundes and H. Beraldo, *New J. Chem.*, 2017, DOI: 10.1039/C7NJ01547J.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the [author guidelines](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the ethical guidelines, outlined in our [author and reviewer resource centre](#), still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.

Neutron activation of In(III) complexes with thiosemicarbazones leads to the production of potential radiopharmaceuticals for the treatment of breast cancer

Alexandre A. Oliveira^a, Lucas L. Franco^a, Raquel G. dos Santos^b, Gabriele M. C. Perdigão^c, Jeferson G. da Silva^d, Elaine M. Souza-Fagundes^c, Heloisa Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

^b Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

^c Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

^d Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, 35010-177 Governador Valadares, MG, Brazil.

*Corresponding author. Phone number: +55 (31) 3409-5740.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br

heloisaberaldoufmg@gmail.com (H. Beraldo)

Abstract

In(III) complexes $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{NO}_3$ (**1**) and $[\text{In}(\text{2Ac4pFPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**2**) were obtained with *N*(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4oClPh) and *N*(4)-*para*-fluorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4pFPh). Neutron activation of complexes (**1**), (**2**) and of previously prepared $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**3**) and $[\text{In}(\text{2Ac4pFPh})\text{Cl}_2(\text{MeOH})]$ (**4**) resulted in the formation of the $^{114\text{m}}\text{In}/^{115\text{m}}\text{In}$ analogues (***1**-***4**). The cytotoxic activities of the compounds under study were investigated on MCF-7 breast cancer cells as well as against non-malignant MRC-5 fibroblast cells. Upon coordination to In(III) cytotoxicity against MCF-7 cells significantly increased in complexes (**1-4**), suggesting that complexation was a good strategy to improve the cytotoxic effect. While both non-radioactive and radioactive In(III) salts were inactive against MCF-7 cells, the radioactive complexes (***1**-***4**) proved to be 10^3 to 10^4 times more potent than the non-radioactive analogues (**1-4**). For the non-radioactive In(III) complexes (**1-4**) the selectivity indexes (SI), defined as $\text{IC}_{50 \text{ MRC-5}}/\text{IC}_{50 \text{ MCF-7}}$ were $\text{SI} = 0.07\text{-}0.36$, while high values of SI were found for the radioactive In(III) analogues (***1**-***4**), $\text{SI} = 46\text{-}4716$, indicating that irradiation represented an interesting strategy for increasing selectivity. Since cytotoxicity was evaluated following 48 h of treatment and 72 h after neutron activation, the observed cytotoxic effects were attributed mainly to $^{114\text{m}}\text{In}$, the contribution of the $^{115\text{m}}\text{In}$ ($t_{1/2} = 4.5$ h) isomer being considered irrelevant. Complexes (***1**-***4**) induced higher levels of intracellular ROS in MCF-7 cells in comparison to the parent compounds. The results suggest that $^{114\text{m}}\text{In}$ complexes with thiosemicarbazones might have applications as radiopharmaceuticals for the treatment of breast cancer.

Keywords: Thiosemicarbazones, In(III) complexes, neutron activation, $^{114\text{m}}\text{In}$, cytotoxicity, breast cancer.

Introduction

The current estimates of the American Cancer Society (USA) indicate that breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women aged 20 to 59 years.¹ Despite a significant progress in early diagnosis and treatment, resistance to conventional chemotherapeutic agents remains an important challenge to effective therapy.² Treatment of metastatic disease is still palliative with a very low probability to induce complete remission and definitive cure. So far, no cytotoxic or targeted agents have gained regulatory approval for the treatment or prevention of breast cancer metastases.³

Considerable efforts have been made to maximize drug efficiency and minimize side effects at the same time. Considering its non-invasiveness and relatively low toxicity in comparison to conventional chemotherapy and external beam radiotherapy, radionuclide therapy (RNT) is becoming an area of significant interest for cancer treatment.⁴

Several radionuclides, such as phosphorous-32 (³²P), strontium-89 (⁸⁹Sr), radium-223 (²²³Ra), yttrium-90 (⁹⁰Y), iodine-131 (¹³¹I) and samarium-153 (¹⁵³Sm) have been successfully used for the treatment of many disorders.^{5,6} The choice of the radionuclide best suited for treatment of a neoplasia depends on the tumor characteristics. For example, radionuclides that emit high-energy β^- particles provide radiation with deep penetration for the treatment of bulky solid tumors, while Auger electron emitters are in principle more appropriate for the therapy of small clusters of cancer cells or small tumors.^{4,5}

In recent years investigation on Auger electron emitting radionuclides for RNT has shown promising results.⁷⁻⁹ Conceptually, the use of Auger electron emitters is relevant, since most of the emitted electrons have very low energies (less than a few hundred eV) and a short-range penetration in biological matter (nm to μ m). These features result in moderate (4 to 26 keV) values of linear energy transfer (LET), a parameter related to the energy deposited per unit track in the tissue.¹⁰ Moreover, Auger electron emitters decay via a complex cascade process which ultimately results in the emission of a shower of very low-energy electrons in the immediate microenvironment around

the decay site. Hence, Auger electron emitters can reach a high relative biological effectiveness (RBE) associated to DNA damage and cell death.¹¹

The radionuclides iodine-125 (¹²⁵I), iodine-123 (¹²³I), technetium-99m (^{99m}Tc), platinum-193m (^{193m}Pt), platinum-195m (^{195m}Pt) and indium-111 (¹¹¹In) are the most widely investigated Auger electron emitters.^{11,12} Although the metastable ^{114m}In radionuclide was regarded as undesirable impurity in the production of ¹¹¹In radiopharmaceuticals,¹³ there is an increasing interest in studying ^{114m}In compounds for RNT due to the substantial amount of Auger and conversion electrons with low energies resulting from its decay.¹⁴⁻¹⁶

Considering that investigation on indium-based therapeutic drug candidates remains practically unexplored, we recently prepared non-radioactive In(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones. The compounds exhibited potent cytotoxic activities against human leukemia and solid tumor cells.¹⁷

The present work aimed to evaluate the cytotoxic effects of In(III) complexes with *N*(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4*o*ClPh) and *N*(4)-*para*-fluorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4*p*FPh) (see Figure 1) on MCF-7 (human breast carcinoma) cells. In view of the potential use of radionuclides in therapy, ^{114m}In(III) analogues were obtained by neutron activation of the non-radioactive complexes and the cytotoxic activities of the radioactive complexes were investigated.

Experimental

Chemicals

2-Acetylpyridine, In(III) nitrate, hydrazine dihydrate, *o*-chlorophenyl isothiocyanate and *p*-fluorophenyl isothiocyanate were purchased from Aldrich and used as received. All other common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.

Physical measurements

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Thermogravimetric curves were obtained with a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the 25–400 °C temperature range under dynamic nitrogen atmosphere, at a heating rate of 10 °C min⁻¹. Melting points were determined with a Mettler MQAPF-302 apparatus. Molar conductances (Λ_M) were measured in dimethylformamide (DMF) solution at 298 K with an YSI model 31 conductivity bridge. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr pellets (4000–400 cm⁻¹). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as solvent. Mass spectra were recorded with a Shimadzu LCMS-IT-TOF instrument working at high-resolution.

Syntheses of the thiosemicarbazones and their In(III) complexes

N(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4*o*ClPh) and *N*(4)-*para*-fluorophenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4*p*FPh) were prepared as previously described.¹⁸ Complexes [In(2Ac4*o*ClPh)₂]*N*O₃ (**1**) and [In(2Ac4*p*FPh)₂]*N*O₃·1.5H₂O (**2**) were obtained by mixing a methanol solution (15 mL) of the desired thiosemicarbazone (2 mmol) with indium nitrate (1.1 mmol) under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was placed in the fridge for 24 h. The resulting yellow crystalline solids were filtered off, washed with methanol followed by diethyl ether, and then dried under reduced pressure. Complexes [In(2Ac4*o*ClPh)Cl₂(MeOH)] (**3**) and [In(2Ac4*p*FPh)Cl₂(MeOH)] (**4**) were obtained as previously reported by us¹⁷ (see Figure 1).

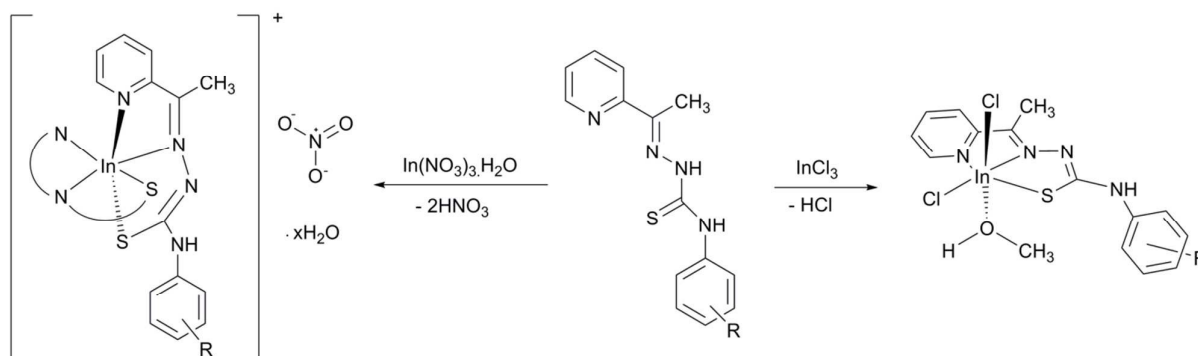


Figure 1. Syntheses of In(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones (R = *o*Cl or *p*F). Left: complexes (1) and (2). Right: complexes (3) and (4).

Bis[*N*(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]indium(III) nitrate

[In(2Ac4oClPh)₂]NO₃ (1) Yellow solid. Yield: 87%. Melting point: 166.8 °C - 168.3 °C. Anal. Calc. for C₂₈H₂₄Cl₂InN₉O₃S₂ (%): C, 42.87; H, 3.08; N, 16.07. Found: C, 42.57; H, 3.06; N, 16.11. FW: 784.40 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 71.72 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N-H) 3369, ν(C=N) 1591, ν(C-S) 781, ρ(py) 646, ν(NO₃⁻) 1384. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 8.19 [d, 1H, H(3)], 8.23-8.31 [m, 1H, H(4)], 7.73 [dd, 1H, H(5)], 8.09 [d, 1H, H(6)], 7.62 [dd, 1H, H(11)], 7.34-7.44 [m, 1H, H(12)], 7.30 [td, 1H, H(13)], 7.55 [dd, 1H, H(14)], 2.66 [s, 3H, H(15)], 9.61 [s, 1H, N(4)H]. ¹³C {¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 146.5 [C(2)], 124.9 [C(3)], 142.6 [C(4)], 127.7 [C(5)], 146.6 [C(6)], 151.3 [C(7)], 172.6 [C(8)], 135.9 [C(9)], 129.7 [C(10)], 129.1 [C(11)], 127.3 [C(12)], 127.6 [C(13)], 129.6 [C(14)], 15.0 [C(15)]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₂₈H₂₄Cl₂InN₈S₂ ([M]⁺) 720.9981; found 721.0008.

Bis[*N*(4)-*para*-fluorophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]indium(III) nitrate

[In(2Ac4pFPh)₂]NO₃·1.5H₂O (2) Yellow solid. Yield: 73%. Melting point: 184.9 °C - 186.1 °C. Anal. Calc. for C₂₈H₂₈F₂InN₉O₅S₂: C, 43.20; H, 3.50; N, 16.19. Found: C, 42.63; H, 3.52; N, 16.22. Calc. weight loss of 1.5 water molecules: 3.47%. Found: 3.70%. FW: 778.52 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMF, 1 mM): 69.08 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N-H) 3254, ν(C=N) 1602, ν(C-S) 781, ρ(py) 643, ν(NO₃⁻) 1384, ν(O-H) 3350-3600. ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆,

δ (ppm): 8.26-8.32 [m, 1H, H(3)], 8.26-8.32 [m, 1H, H(4)], 7.71-7.74 [m, 1H, H(5)], 8.13 [d, 1H, H(6)], 7.81-7.85 [m, 2H, H(10), H(14)], 7.21-7.26 [m, 2H, H(11), H(13)], 2.85 [s, 3H, H(15)], 10.22 [s, 1H, N(4)H]. ^{13}C { ^1H } NMR [100.61 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 146.4 [C(2)], 125.2 [C(3)], 142.7 [C(4)], 128.0 [C(5)], 146.8 [C(6)], 152.3 [C(7)], 169.8 [C(8)], 136.2 [d, C(9)], 123.2 [d, C(10), C(14)], 115.2 [d, C(11), C(13)], 158.1 [d, C(12)], 15.8 [C(15)]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{InN}_8\text{S}_2$ ($[\text{M}]^+$) 689.0572; found 689.0599.

Neutron activation

Irradiation process

Samples of complexes (**1-4**) (1.0 mg) were irradiated during 4 hours inside the TRIGA MARK I IPR R-1 reactor housed at Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN-MG), applying average thermal and epithermal neutron fluence rates (ϕ_{th} , ϕ_{epi}) of $(28.0 \times 10^{11} \pm 4\%)$ $\text{n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $(26.0 \times 10^{10} \pm 4\%)$ $\text{n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectively at 100 kW.¹⁹ The samples were submitted to gamma spectrometry in a system equipped with a CANBERRA 5019 high purity germanium (HPGe) detector. Gennie 2000 v2.0 CANBERRA software was used for the spectrometric analyses and calculation of the induced specific radioactivity of the samples. In the present work, the neutron activated species will be hereafter identified by the asterisk symbol (*).

Quality control

Radiochemical analyses of $^*\text{In}(\text{NO}_3)_3$ and complexes (***1**) and (***2**) were performed by paper chromatography using a Whatman quantitative filter paper as stationary phase and 1% trimethylamine in methanol as eluent. For $^*\text{InCl}_3$ and complexes (***3**) and (***4**) thin layer chromatography (TLC) with silica gel as stationary phase and 1% NaNO_2 in methanol as eluent was employed. One drop of each sample was spotted 1 cm from the origin of the chromatographic support strips and, after elution, the strips (10 cm x 2 cm) were divided in 10 segments of 1 cm each

and radioactivity was measured using a NaI (TI) scintillation detector coupled to an automatic gamma spectrometer (Perkin Elmer, model 2480).

Crystal structure determination

Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFGM) using graphite-Enhance Source Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at 150(2) K. Data collection, cell refinements and data reduction were performed using the CrysAlisPro software package.²⁰ An absorption correction based on a multi-scan method was applied. The structures were solved by direct methods using SHELXS-2013/1.²¹ Full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-2014/7.²² Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model.

A single crystal of $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1a**) was obtained at room temperature from slow evaporation of the mother liquor of **1**. A summary of the crystal data, data collection details and refinement results is listed in Table 1. Molecular graphics were plotted using PLATON.²³

Table 1. Crystal data and structure refinement results for $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1a**)

Compound		1a
Empirical formula		$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{InN}_9\text{O}_6\text{S}_2$
Formula weight (g mol^{-1})		866.50
Crystal system		Triclinic
Space group		$P\bar{1}$
Wavelength (\AA)		0.71073
Temperature (K)		150(2)
Unit cell dimensions	a (\AA)	10.6000(2)
	b (\AA)	12.5286(3)
	c (\AA)	14.5861(3)
	$\alpha / \beta / \gamma$ ($^\circ$)	$\alpha = 65.447(2) / \beta = 78.817(2) / \gamma = 76.648(2)$
V (\AA^3)		1703.76(7)
Z		2
Density calculated (mg m^{-3})		1.689
$F(000)$		880
Absorption coefficient (mm^{-1})		1.032
Limiting indices		$-13 \leq h \leq 13$
		$-15 \leq k \leq 15$
		$-18 \leq l \leq 18$
θ range for data collection ($^\circ$)		1.813 to 26.372
Reflections collected		69994
Independent reflections [R_{int}]		6976 [0.0546]
Completeness to $\theta = 25.242$ (%)		100
Data / restraints / parameters		6976/0/455
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]		$R_1 = 0.0404$; $wR_2 = 0.1005$
R indices (all data)		$R_1 = 0.0470$; $wR_2 = 0.1056$
Goodness-of-fit on F^2		1.151
$\Delta\rho_{\text{max.}}$ and $\Delta\rho_{\text{min.}}$		1.624 and -1.105

Cytotoxic activity

Cell lines

MCF-7 (human breast cancer) and MRC-5 (human fetal lung fibroblast) cells were maintained in the logarithmic phase of growth in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplemented with 50 U mL^{-1} penicillin and 50 mg mL^{-1} streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mM of L-glutamine and 10% of fetal bovine serum (FBS). All cultures were maintained at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in a humidified incubator with 5% CO_2 and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) is a tetrazolium salt that is reduced to purple formazan crystals mainly by mitochondrial succinate dehydrogenase, and the color intensity of the formazan dye is correlated to the number of viable cells.²⁴ Briefly, 2000 cells/well of a 96-well plate were seeded 24 h prior to addition of compounds. Cells were incubated in the presence of varying concentrations (10-0.0001 μM) of the non-radioactive and radioactive indium complexes or indium salts (100 μM) in order to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}).

Biological assays with the radioactive compounds were performed after 24 h of cooling time. Solutions of the non-radioactive and radioactive compounds were freshly prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and final concentrations were adjusted in DMEM in such manner that the final DMSO concentration was lower than 0.5%. Tests using DMSO (0.5% in DMEM) as negative control and cisplatin as positive control were carried out in parallel. Following 48 h of treatment, cytotoxicity was evaluated by the MTT assay. MTT reagent was added to each well and incubated at 37 °C for 4 h. After incubation, DMSO was added to each well to dissolve formazan crystals and absorbance was measured at 570 nm on a microplate reader (Enspire 2300 Multilabel Reader - Perkin Elmer). Data were normalized to the control cells, which were considered to present 100% viability.

All tests were performed at least in triplicates in three independent experiments with full agreement between the results. Statistical analyses were carried out by unpaired, one-tailed Student's *t*. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Morphological analysis

Cells were plated in 96-well plates and treated with the In(III) complexes. Morphological changes were analyzed by contrast-phase microscopy (Zeiss Axioplan microscope coupled to a digital camera) 48 h after treatment.

Analyses of chromosomal alterations

DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) is a fluorescent dye which is able to bind specifically to double strands of chromosomal DNA.²⁵ For analysis of chromosomal DNA changes, tumor cells were treated with the In(III) complexes for 48 h. Then, cells were washed with phosphate buffer (PBS) and fixed in methanol (70%) for 20 min. Cells were incubated for 30 min with 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DAPI (Sigma). DNA alterations were observed by fluorescence microscopy at 385–410 nm (Nikon Eclipse TS100, Tokyo, Japan).

ROS generation assessment

Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation following exposure to the In(III) complexes was monitored via the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma) fluorimetric assay.²⁶ DCFH-DA is a non-fluorescent compound, that when it is taken up by passive diffusion into the cells, is hydrolyzed by esterases to yield non-permeable 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH). In the presence of ROS, DCFH is oxidized to the fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, cells were treated with the compounds for 24 h and were then incubated with DCFH-DA (10 μM) for 30 min at 37 °C. Following incubation, the cells were washed twice with PBS. Thereafter, the cells were observed at excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively, under the Nikon TS100 fluorescence microscope coupled to a digital camera. Data were analyzed using ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) and expressed as percentage of DCF fluorescence of the corresponding control.²⁷ Statistical analyses were carried out by ANOVA one-way with Bonferroni post test.

Results and Discussion

Formation of the In(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{In}(\text{2Ac4}o\text{ClPh})_2]\text{NO}_3$ (**1**) and $[\text{In}(\text{2Ac4}p\text{FPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**2**), in which two anionic thiosemicarbazone ligands are attached to the metal center and one nitrate is present as counter ion.²⁸ The formation of cationic $[\text{In}(\text{thiosemicarbazonato})_2]^+$ species was confirmed by high resolution mass spectra. The presence of crystallization water molecules in complex (**2**) was confirmed by its thermogravimetric curve, which showed a weight loss of 3.70% (calc. 3.47%).

Spectroscopic characterization

The $\nu(\text{C}=\text{N})$ vibrational mode at 1582 cm^{-1} in the infrared spectra of the free thiosemicarbazones shifts to 1591 cm^{-1} (**1**) and 1602 cm^{-1} (**2**) in the spectra of the complexes, in agreement with coordination of the imine nitrogen.²⁹ The $\nu(\text{C}-\text{S})$ absorption observed at 808 cm^{-1} ($\text{H2Ac4}o\text{ClPh}$) and 825 cm^{-1} ($\text{H2Ac4}p\text{FPh}$) in the spectra of the free ligands is found at 781 cm^{-1} in the spectra of the complexes, in accordance with complexation of a thiolate sulfur.³⁰ The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 620 cm^{-1} in the spectra of the thiosemicarbazones shifts to 646 cm^{-1} (**1**) and 643 cm^{-1} (**2**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen.³¹ Therefore, in complexes (**1**) and (**2**) the thiosemicarbazones are attached to the metal center through the $\text{N}_{\text{py}}-\text{N}_{\text{imine}}-\text{S}$ chelating system, as previously reported by us and by other authors for In(III) complexes with thiosemicarbazones.^{17,32-34} In the spectrum of **2**, a broad absorption at $3350-3600\text{ cm}^{-1}$ was attributed to the $\nu(\text{O}-\text{H})$ stretching vibration. Moreover, the presence of uncomplexed nitrate ion was confirmed by the appearance of an absorption attributed to $\nu(\text{NO}_3^-)$ at 1384 cm^{-1} .³⁵

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their In(III) complexes (**1-2**) were recorded in $\text{DMSO}-d_6$. The ^1H resonances were doubtless assigned on the basis of chemical shifts, multiplicities and by using 2D homonuclear $^1\text{H}-^1\text{H}$ correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT-135) experiments and the assignments were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) and heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) experiments.

Duplicated signals were observed in the ^1H NMR spectra of the free thiosemicarbazones, which correspond to a mixture of the *E* (95%) and *Z* (5%) configurational isomers. The N3-H chemical shifts close to δ 11 ppm are characteristic of the *E* configuration, in which N3-H is hydrogen bonded to the solvent and the chemical shifts around δ 13 ppm indicate *Z* configuration, in which N3-H is hydrogen bonded to the pyridine nitrogen.^{36,37} In the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of the thiosemicarbazones the signals are not duplicated due to the low concentration of the *Z* isomer in all cases.

In the ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of **1** and **2** only one signal was observed for each magnetically different nucleus. The absence of the N3-H signal indicates the presence of an anionic thiosemicarbazone. The signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free ligand (Figure S2, ESI). Similarly, the signals of C=N, C=S and the pyridine carbons undergo significant shifts (Figure S3, ESI), indicating coordination of the thiosemicarbazones through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imine}}\text{-S}$ chelating system. Hence, in **1** and **2** the thiosemicarbazones adopt the *E* configuration. The 2D NMR contour maps support the attributions of the ^1H and ^{13}C signals (Figures S4-S6, ESI).

X-ray crystallography

The atom arrangements and atom numbering scheme for $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{NO}_3\cdot 2\text{MeOH}\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1a**) are shown in Figure 2. The nitrate anion and solvation molecules are omitted for the sake of clarity. Selected intramolecular bond distances and angles in the structure of **1a** are listed in Table 2 and Table S10, ESI, together with data on the parent ligand.³⁶

1a crystallizes in the triclinic system, space group $P\bar{1}$, with one molecule of the complex per asymmetric unit. In(III) is in a distorted octahedral environment, in which two molecules of the thiosemicarbazone are coordinated to the metal center through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imine}}\text{-S}$ system. The coordination mode affords the formation of two five-membered chelate rings, which are nearly

planar, with dihedral angles between the chelate rings of 2.34° and 8.68°. Distortion from an ideal octahedral arrangement mainly arises from the small N1-In1-N2, N11-In1-N12, N2-In1-S1 and N12-In1-S11 chelate bite angles, which are less than 78°.

The free thiosemicarbazone crystallizes in the *EE* conformation.³⁶ A twisting of approximately 180° in the C8-N3 bond of the thiosemicarbazone to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced. Therefore, in **1a** the two ligands adopt the *EZ* conformation. The same behavior was also observed for similar Ga(III) complexes³⁸ and for other In(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones.¹⁷

Upon coordination of the thiosemicarbazones to In(III) the expected lengthening of the C8-S1 bond (*c.a.* 0.101 Å) and shortening of the N3-C8 bond (*c.a.* 0.04 Å) were observed. Therefore, the C8-S1 bond changes from a double to a predominantly single bond whereas N3-C8 acquires some double bond character.

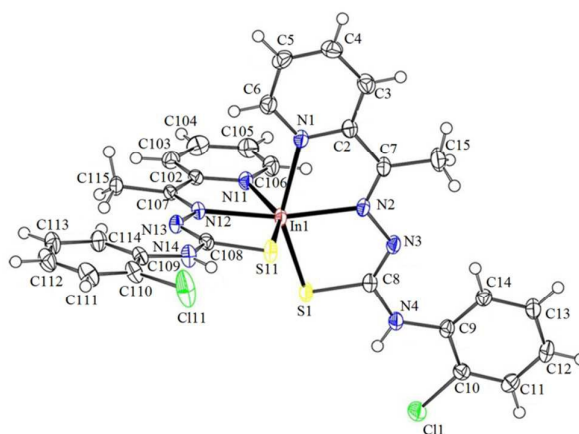


Figure 2. Molecular plot of cationic $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]^+$ in $[\text{In}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 2. Selected bond lengths (Å) and angles (°) for **1a** in comparison with the parent ligand

Bond	H2Ac4oClPh ^{a 35}	1a ^a
S1–C8	1.654(3)/1.654(3)	1.755(4)/1.756(4)
N2–C7	1.281(3)/1.278(3)	1.292(5)/1.292(4)
N2–N3	1.362(3)/1.361(3)	1.376(4)/1.381(4)
N3–C8	1.359(3)/1.351(3)	1.309(5)/1.315(5)
In1–N1	-	2.287(3)
In1–N2	-	2.264(3)
In1–S1	-	2.5028(10)
C7–N2–N3	119.1(2)/118.7(2)	117.6(3)/117.7(3)
N2–N3–C8	118.2(2)/118.9(2)	114.1(3)/114.7(3)
N3–C8–S1	121.0(2)/121.5(2)	128.9(3)/128.5(3)
N1–In1–N2	-	71.01(11)
N2–In1–S1	-	74.04(8)
N11–In1–N12	-	71.30(10)
N12–In1–S11	-	77.41(8)

^a The two values of bond distances and angles in H2Ac4oClPh refer to the two molecules in the asymmetric unit. For **1a** the two values refer to the two ligands coordinated to the metal center.

Neutron activation: characterization of radioactive In(III) complexes

Samples of In(III) complexes (**1-4**) containing the natural abundances of ¹¹³In (4.3%) and ¹¹⁵In (95.7%)³⁹ were neutron activated for 4 h and radioactivity was measured in a CANBERRA 5019 high purity germanium (HPGe) detector. As shown in Figure 3, the formation of the ^{114m}In and ^{115m}In isomers was observed as narrow peaks in the low-energy γ -spectrum of **3**: ^{114m}In (190.3 keV, 558.8 keV and 725.2 keV) and ^{115m}In (336.2 keV).³⁹

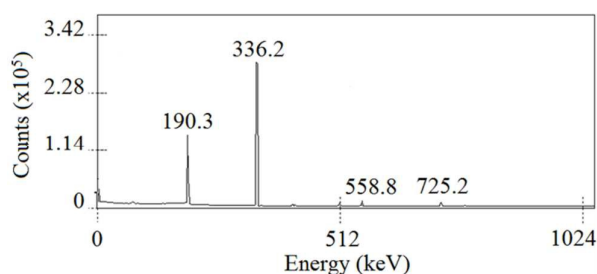


Figure 3. Low-energy γ -ray spectrum for complex (*3)

^{114m}In isomer is a long-lived state ($t_{1/2} = 49.5$ days) that decays to stable ^{114}Cd through electron capture (EC), producing γ rays of 725.2 keV and 558.8 keV energy in cascade with a branching ratio of 3.25%. The remaining ^{114m}In (96.75%) decays to the ^{114}In ground state by isomeric transition (IT), emitting γ -radiation of 190.3 keV and a substantial amount of Auger electrons with very low energies (less than 21 keV), as well as by internal conversion (IC), producing electrons in the 162-190 keV energy range.⁴⁰ The daughter radionuclide ^{114}In decays relatively quickly ($t_{1/2} = 72$ seconds) primarily to ^{114}Sn ground state, emitting high-energy β^- particles of 777 keV mean energy (99.50%), and in low proportion to the ^{114}Cd ground state by EC.^{40,41}

The ^{115m}In isomer ($t_{1/2} = 4.5$ hours) decays to the stable ^{115}Sn ground state by emission of β^- with a branching ratio of 5.0%, and to the natural ^{115}In with a branching ratio of 95.0% by IT, emitting a characteristic 336.2 keV γ -radiation and a substantial amount of Auger and conversion electrons³⁹

After irradiation, samples were counted at 2 cm from the detector. The induced specific activity may be obtained from Equation (1):

$$A_0 = \frac{N_p e^{\lambda t_d}}{\varepsilon \gamma \theta w t_m} \quad (1)$$

where N_p is the net peak area; λ is the radioisotope decay constant; t_d is the time interval between the end of irradiation and the start of counting; ε is the photo peak counting efficiency; γ is the

gamma emission probability; θ is the isotopic abundance of the target nuclide; w is the target nuclide mass in the sample; t_m is the counting interval time.

Specific activity is defined as the radioactivity per unit mass of a radionuclide or a labeled compound.⁴² After counting samples and using Equation (1), the obtained induced specific activities of the radioactive complex (***3**) were 6.34 MBq/mol for the 190.3 keV photopeak (^{114m}In) and 1.40 MBq/mol for the 336.2 keV photopeak (^{115m}In) at the end of irradiation. The total induced specific activities of the radioactive complexes, considering the sum of activities for the 190.3 and 336.2 keV photopeaks were: 5.50 MBq mol⁻¹ (***1**), 5.16 MBq mol⁻¹ (***2**), 7.74 MBq mol⁻¹ (***3**) and 7.99 MBq mol⁻¹ (***4**).

Stability of complexes ***1-4** was evaluated by planar chromatography, which showed similar patterns to those of **1-4**. In addition, the electronic spectra of ***1-4** were similar to those of **1-4**, confirming stability after neutron activation (data not shown).

Biological studies

Cytotoxic activity

Considering the shorter half-life of ^{115m}In in comparison to ^{114m}In, cell treatment was planned to occur 24 h after neutron activation, when the activity due to ^{115m}In was considered to be negligible. In fact, the decay factor ($e^{-\lambda t}$) of ^{115m}In at 24 h is 0.02, where $\lambda = \ln 2/t_{1/2}$ and $t_{1/2}$ is the radioisotope half-life. Hence, during cell treatment ^{114m}In (decay factor = 0.99) was present as the main In(III) radioisotope.

The thiosemicarbazones, the starting In(NO₃)₃ and InCl₃ salts and their radioactive analogues, together with complexes (**1-4**) and (***1-4**) were evaluated by the MTT colorimetric assay for their ability to reduce cellular viability of MCF-7 cells. In addition, the non-radioactive and radioactive In(III) compounds were evaluated for their cytotoxic effects on non-malignant MRC-5 cells in order to evaluate the selectivity index. The concentrations of the studied compounds that inhibit 50% of cell survival (IC₅₀) are listed in Table 3.

H₂Ac₄oCIPh (IC₅₀ = 0.93 μM), H₂Ac₄pFPh (IC₅₀ = 1.83 μM) and their In(III) complexes (**1-4**) were cytotoxic against MCF-7 cells in a dose dependent manner, with IC₅₀ values in the micromolar range, being even more active than cisplatin.¹⁷ Upon coordination to In(III) cytotoxicity significantly increased, suggesting that complexation was a good strategy to improve the cytotoxic effect. As shown in Table 3 the radioactive complexes (***1-4**) proved to be 10² to 10⁴ times more potent than the non-radioactive analogues (**1-4**) (see Figure 4).

Unlike the In(III)-thiosemicarbazone complexes, the In(III) salts proved to be inactive at concentrations up to 100 μM and hence these compounds were not tested on MRC-5 cells. For the non-radioactive In(III) complexes (**1-4**) the selectivity indexes (SI), defined as IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ MCF-7 were low (SI = 0.07-0.36), while high values (SI = 46-4716) were found for the radioactive In(III) analogs (***1-4**), suggesting that irradiation represented an efficacious strategy for increasing selectivity.

Interestingly, the enhancement ratios, calculated as IC₅₀ non-radioactive / IC₅₀ radioactive (Table 3) were 0.36-2.55 and 208-25490 for non-malignant MRC-5 cells and MCF-7 cells, respectively, corroborating that neutron activation resulted in improved selectivity. Moreover, the selectivity indexes of complexes (***2**) and (***4**), containing the *para*-fluorophenyl-derived thiosemicarbazone ligands were much higher than those of complexes (***1**) and (***3**), containing the *ortho*-chlorophenyl analogues.

It is worth noticing that the low-dose radiation of ^{*}In(III), *per se*, did not result in cytotoxic effects, since ^{*}InCl₃ and ^{*}In(NO₃)₃ were inactive against MCF-7 cells at concentrations up to 100 μM. Hence, in addition to their own cytotoxic activity, the thiosemicarbazones also probably acted as carriers of ^{*}In(III) into the cells.

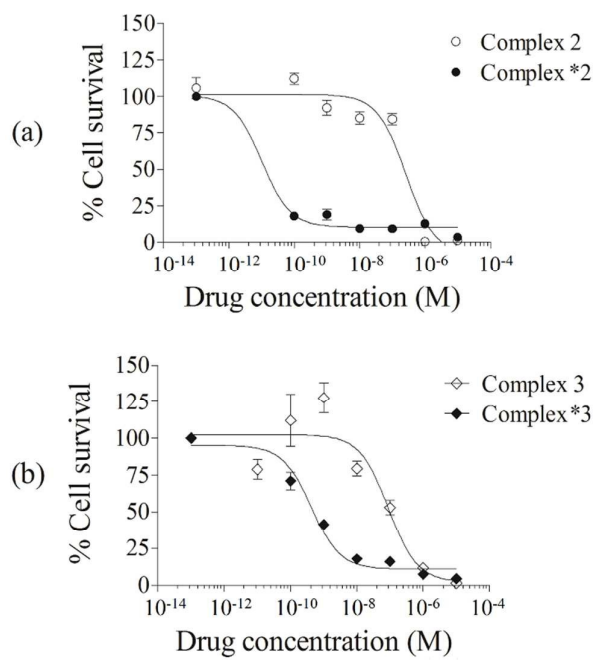


Figure 4. Percentage of cell survival of MCF-7 cells vs drug concentration for (a) **2** and ***2**; (b) **3** and ***3**.

Table 3. Cytotoxic activity (IC_{50}) of the In(III) complexes and starting In(III) salts on MCF-7 and MRC-5 cells

	IC_{50} (μ M) and selectivity indexes (SI)						IC_{50} (μ M) non-radioactive / IC_{50} (μ M) radioactive	
	Non-radioactive compounds			Radioactive compounds			MCF-7	MRC-5
	MCF-7	MRC-5	SI	MCF-7	MRC-5	SI		
InCl ₃	> 100	ND	ND	> 100	ND	ND	ND	ND
In(NO ₃) ₃	> 100	ND	ND	> 100	ND	ND	ND	ND
1	0.13 (0.07 – 0.22)	2.22×10^{-2} (1.35×10^{-2} – 3.66×10^{-2})	0.17	7.68×10^{-5} (5.01×10^{-5} – 1.18×10^{-4})	8.70×10^{-3} (5.29×10^{-3} – 1.43×10^{-2})	113	1693	2.55
2	0.26 (0.12 – 0.55)	1.74×10^{-2} (1.12×10^{-2} – 2.72×10^{-2})	0.07	1.02×10^{-5} (4.83×10^{-6} – 2.14×10^{-5})	4.81×10^{-2} (2.41×10^{-2} – 9.62×10^{-2})	4716	25490	0.36
3	0.09 (0.03 – 0.24)	3.24×10^{-2} (2.02×10^{-2} – 5.21×10^{-2})	0.36	4.32×10^{-4} (2.88×10^{-4} – 6.48×10^{-4})	1.97×10^{-2} (1.36×10^{-2} – 2.88×10^{-2})	46	208	1.64
4	0.25 (0.13 – 0.47)	3.92×10^{-2} (2.19×10^{-2} – 7.02×10^{-2})	0.16	4.14×10^{-5} (2.70×10^{-5} – 6.35×10^{-5})	3.00×10^{-2} (1.98×10^{-2} – 4.54×10^{-2})	725	6039	1.31
Cisplatin	35.15 (11.51 – 107.30)	5.05 (4.30 – 5.76)	0.14	ND	ND	ND	ND	ND

^a IC_{50} : concentration that reduced 50% of cell proliferation - values (μ M) plus 95% confidence interval (in brackets).

^b Selectivity indexes, $SI = IC_{50 \text{ MRC-5}} / IC_{50 \text{ MCF-7}}$.

ND = not determined

^{114m}In is a prolific Auger electron emitter, which has very short path length in biological matter with ionizations occurring within a limited environment around the point of decay.^{43,44} Therefore, we hypothesized that, besides the pharmacological effect of the In(III)-thiosemicarbazone complexes, the increased potency of the neutron-activated compounds might be ascribed to the highly localized energy deposition from ^{114m}In Auger emitter in the vicinity of the decay, thought to be the cell nucleus. In fact, we recently demonstrated that complexes (3) and (4) are able to bind to DNA by an intercalative mode.¹⁷ *In vitro* studies performed by other authors indicated that the decay of DNA-incorporated Auger electron emitters is highly toxic, while the decay outside of cellular nucleus, as in the cell cytoplasm or located extracellularly produces no extraordinary lethal effects.⁴⁴ Hence, we may assume that the high cytotoxic activities of complexes (*1-*4) could have arisen from DNA-bound ^{114m}In .

Morphological alterations

Morphological analysis under contrast phase microscopy showed that MCF-7 cells treated with both non-radioactive and radioactive In(III) salts present normal growth and typical morphology. On the other hand, the non-radioactive as well as the radioactive In(III) complexes induced reduction of cell number and morphological changes, such as cell shrinkage, round shapes and cytoplasmic membrane blebbing formation, consistent with programmed cell death (Figure 5).

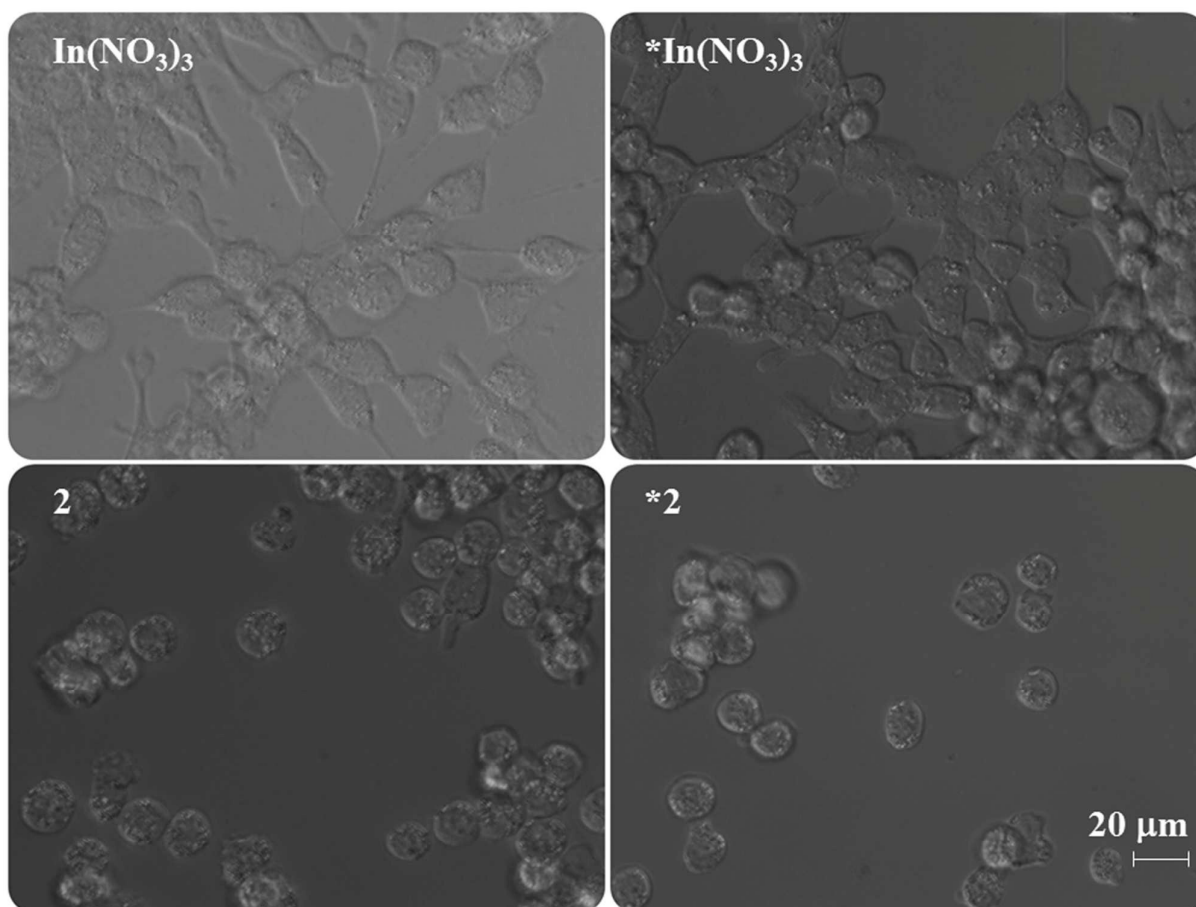


Figure 5. Morphological alterations of MCF-7 cells after 48 h treatment with $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ and $^*\text{In}(\text{NO}_3)_3$ (100 μM), and with **2** and $^*\mathbf{2}$ (10^{-4} μM). (Magnification $\times 400$, scale bar: 20 μm).

Classical radiobiology states that the cytotoxic effects of ionizing radiation on cells are mainly explained by DNA damage. Several different types of DNA lesions such as strand breaks, base modification, base loss or DNA-protein cross-links have been identified.⁴⁵ Triggering programmed cell death induces DNA fragmentation through the activation of DNA endonucleases, which can be identified through the use of DNA staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) that detects fragmented DNA and condensed chromatin.

As shown in Figure 6, no DNA fragmentation was observed in untreated cells. Upon exposure to the $\text{In}(\text{III})$ complexes, alterations were observed including chromatin condensation, horseshoe-shaped forms and fragmentation of the nuclei as apoptotic bodies, visualized as small

bright points after DAPI staining. Neutron activated compounds also induced the same morphological alterations.

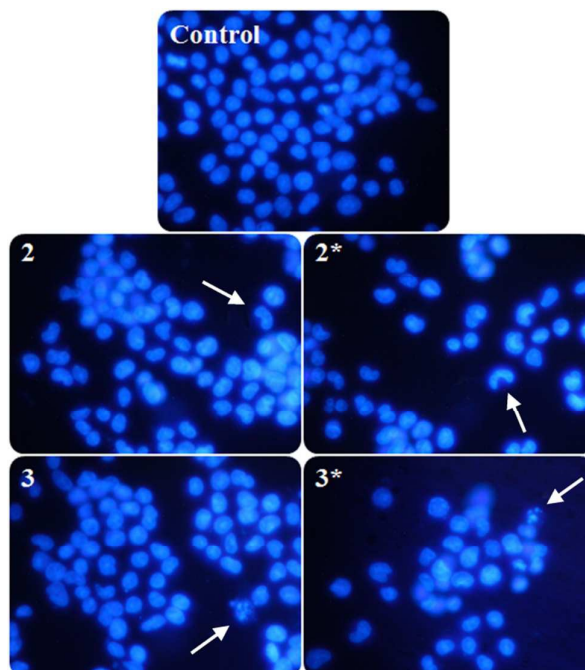


Figure 6. Nuclear changes induced by treatment of MCF-7 cells with In(III) complexes **2**, ***2**, **3** and ***3** (10^{-4} μM) or diluent (control) for 48 h. After treatment, cells were stained with DAPI. (Magnification $\times 400$)

Reactive oxygen species (ROS) generation

ROS, including superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals are involved in the mechanisms of numerous therapeutic anticancer drugs via the initiation of apoptotic signaling pathways during chemotherapy. In turn, most effects of ionizing radiation are mainly due to radiolysis of water present in the cells, which generates an ionization cascade leading to production of ROS capable of damaging the membrane and cellular constituents (DNA, lipids and proteins) and of inducing programmed cell death.⁴⁶

Since many Auger electrons traverse a very short distance, the density of hydroxyl radicals and other generated ROS is high around the nearest space around the decaying atom. Therefore,

when the nuclide is positioned in close proximity to DNA, its decay leads to double strand breaks by direct ionization and radical-induced indirect DNA damage due to the radiolysis products of water.^{44,47}

We evaluated the intracellular ROS generation levels in MCF-7 cells following exposure to the In(III) complexes via the assessment of DCF fluorescence intensity. As shown in Figure 7, the non-radioactive complexes did not induce significant increase in ROS production compared to untreated control. In turn, all the neutron-activated complexes significantly triggered ROS generation. Hence, we assume that ROS generation partially explains the increased cytotoxicity of the In(III) complexes after neutron irradiation.

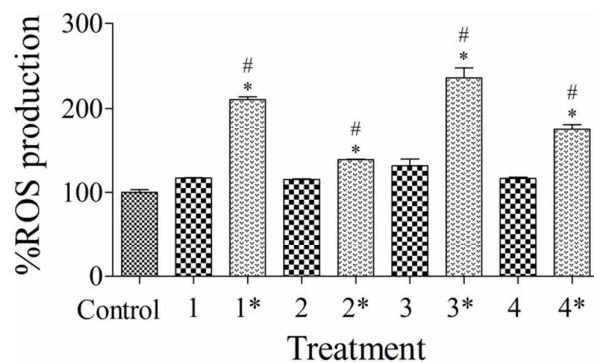


Figure 7. % ROS production in MCF-7 cells treated with 0.1 μM of the non-radioactive and radioactive In(III) complexes for 24 h and stained with DCFH-DA. Symbols: # statistically different from non radioactive analogue $P < 0.05$, * statistically different from control $P < 0.05$. ANOVA one-way with Bonferroni Post test.

Conclusions

Radiopharmaceuticals are used as diagnostic or therapeutic tools in nuclear medicine. These compounds usually have minimal pharmacologic effect, because in most cases they are used in tracer quantities. Hence, their toxic effect is normally minimal.⁴²

It has been recently reported that neutron-activation of Ru(II) complexes resulted in ^{103}Ru Auger electrons emitter derivatives, which demonstrated to have higher cytotoxic effect against

glioma cells than the non-radioactive counterparts.⁴⁸ In addition, neutron irradiation of Gadodiamide[®], used in nuclear magnetic resonance imaging, lead to the production of ¹⁵⁹Gd-Gadodiamide. The irradiated product proved to be 95 times more cytotoxic than the parent compound against Ehrlich tumor cells, suggesting that ¹⁵⁹Gd might have applications in antineoplastic therapy.⁴⁹

^{114m}In is a longer-lived conversion and Auger electrons emitter analogue of ¹¹¹In, which could be used for longer lasting therapeutic studies. However, its potential has not so far been fully demonstrated. In the present work ^{114m}In(III) complexes with thiosemicarbazones were successfully produced by neutron activation of the non-radioactive analogues. Although the obtained induced specific radioactivity was less than 8 MBq mol⁻¹, the radioactive complexes proved to be 10² to 10⁴ times more cytotoxic against MCF-7 breast cancer cells than the non-radioactive analogues. Moreover, the neutron-activated complexes significantly increased intracellular ROS levels in MCF-7 cells compared to the parent compounds.

Auger electron emitters can exert their radiotoxic effects on cells only when internalized into the cytoplasm.⁵⁰ Considering that the ^{*}In(III) salts revealed to be non-cytotoxic, the thiosemicarbazones might have acted as carriers of ^{*}In into the cells. Hence, we may suggest that once in the cytoplasm, the supra-additive interaction from the combined cytotoxic effects of the In(III)-thiosemicarbazone complexes and the Auger and conversion electrons emitted by ^{114m}In explains the high cytotoxic activity of the neutron-activated complexes on MCF-7 cells.

The selectivity indexes (SI) were much higher for the radioactive complexes than for the non-radioactive counterparts and the enhancement ratio (IC₅₀ non-radioactive / IC₅₀ radioactive) was much higher for MCF-7 cells than for the MRC-5 non-malignant cells, suggesting that irradiation represented an interesting strategy for increasing selectivity. This enhancement of selectivity might be related to the fact that cancer cells are more sensitive to radiation than non-malignant cells. Indeed, it has been demonstrated that DNA repair in cancer cells occurs more

slowly than in non-malignant cells and that radiation results in more DNA breaks in neoplastic than in normal cells.⁵¹

Therapeutic nuclear medicine is developing as an alternative choice for breast cancer treatment, and radiopharmaceuticals labeled with low-energy electron emitters have a promising future.⁵² In comparison with short-lived radionuclides, theoretical radiobiological estimations have indicated that long-lived radionuclides, such as ^{114m}In , can result in a lower deleterious effect on the bone marrow, generally considered to be the dose-limiting organ.⁵³

Our results indicate that the preparation of ^{114m}In complexes with thiosemicarbazones constituted a good approach for combining radiation and chemotherapy. In addition, ^{114m}In complexes with thiosemicarbazones constitute an interesting platform for future studies aiming the development of potential radiopharmaceuticals for the treatment of breast cancer. The preparation of ^{114m}In -thiosemicarbazones complexes using enriched nuclide sources such as $^{113}\text{In}(n,\gamma)^{114m}\text{In}$ or $^{114}\text{Cd}(p,n)^{114m}\text{In}$ to improve yield production and the investigation on their cytotoxic effects will shed more light on the applicability of ^{114m}In complexes for breast cancer therapy.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge FAPEMIG (CBB-APQ-00912-14), CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) for financial support and student grants. We are grateful to Dr. Luiz Claudio Andrade Souza and MSci Dante Marco Zangirolami, supervisors of the TRIGA IPR-R1 reactor, as well as to reactor operators Paulo F. Oliveira and Luiz O. I. S. Câmara and radiological protection supervisor Carlos Alberto Rodrigues da Costa. We are also grateful to Dr. Maria Angela de B. C. Menezes and Angela Maria Amaral for gamma spectrometry analysis and invaluable technical discussions.

Supplementary data

Electronic Supplementary Information (ESI) contains the FT-IR spectra of ligand H₂Ac₄ClPh and complex (**1**), as well as their ¹H and ¹³C{¹H} NMR spectra together with the 2D COSY, HMQC and HMBC contour maps used to support the ¹H and ¹³C attributions. It also contains X-Ray crystallography data and the high resolution Mass Spectra [ESI(+), IT-TOF] of **1** and **2**. Dose-response curves used to obtain the IC₅₀ values of the studied compounds on MCF-7 and MRC-5 are also available in ESI. CCDC reference number 1544503 contains the supplementary crystallographic data for **1a**. These data can be obtained free of charge from the CCDC via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

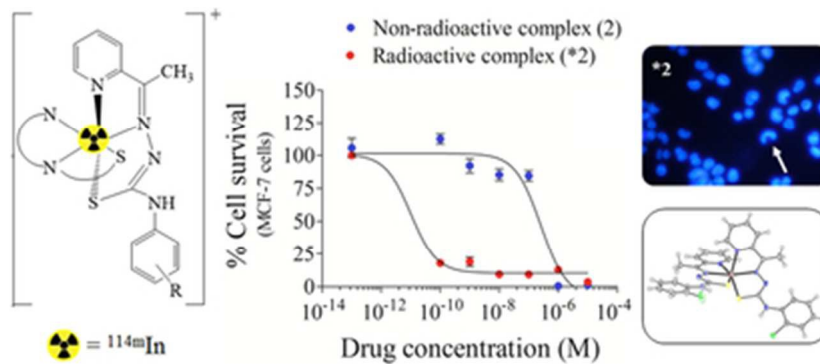
References

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal, *CA Cancer J. Clin.*, 2016, **66(1)**, 7-30.
- [2] H. M. Coley, *Cancer Treat. Rev.*, 2008, **34(4)**, 378-390.
- [3] N. U. Lin, L. Amiri-Kordestani, D. Palmieri, D. J. Liewehr, P. S. Steeg, *Clin. Cancer Res.*, 2013, **19(23)**, 6404-6418.
- [4] K. Zukotynski, H. Jadvar, J. Capala, F. Fahey, *Biomark Cancer*, 2016, **8(S2)**, 35-38.
- [5] S. V. Gudkov, N. Y. Shilyagina, V. A. Vodeneev, A. V. Zvyagin, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17(1)**, 33-50.
- [6] C. H. Yeong, M. H. Cheng, K. H. Ng, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 2014, **15(10)**, 845-863.
- [7] C. Gao, J. V. Leyton, A. D. Schimmer, M. Minden, R. M. Reilly, *Appl. Radiat. Isot.*, 2016, **110**, 1-7.
- [8] A. P. Kiess, I. Minn, Y. Chen, R. Hobbs, G. Sgouros, R. C. Mease, M. Pullambhatla, C. J. Shen, C. A. Foss, M. G. Pomper, *J. Nucl. Med.*, 2015, **56(9)**, 1401-1407.
- [9] S. Imstepf, V. Pierroz, P. Raposinho, M. Bauwens, M. Felber, T. Fox, A.B. Shapiro, R. Freudenberg, C. Fernandes, S. Gama, G. Gasser, F. Motthagay, I.R. Santos, R. Alberto, *Bioconjugate Chem.*, 2015, **26(12)**, 2397-2407.
- [10] A. I. Kassis, *Semin. Nucl. Med.*, 2008, **38(5)**, 358-366.

- [11] F. F. (Russ) Knapp, A. Dash, in *Radiopharmaceuticals for Therapy*, Springer, India, 2016, 4, 57-67.
- [12] F. Buchegger, F. Perillo-Adamer, Y. M. Dupertuis, A. B. Delaloye, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*, 2006, **33(11)**, 1352-1363.
- [13] S. Lahiri, M. Maiti, K. Ghosh, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2013, **297(3)**, 309–318.
- [14] A. Orlova, D. Rosik, M. Sandstrom, H. Lundqvist, L. Einarsson, V. Tolmachev, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2007, **51(4)**, 314-323.
- [15] R. A. Cowan, B. Murby, D. Gunton, S. E. Owens, K. P. Hoyes, H. L. Sharma, A. Smith, J. Chang, B. Van Kessel, P. M. Nuttall, D. Crowther, *Brit. J. Haematol.*, 2002, **119(2)**, 459-466.
- [16] H. L. Sharma, R. A. Cowan, B. Murby, S. Owens, P. M. Nuttall, D. Gunton, A. M. Smith, J. Chang, D. Crowther, *Anticancer Res.*, 1997, **17(3B)**, 1815-1821.
- [17] 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, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 918-932.
- [18] D. L. Klayman, J. F. Bartosevich, T. S. Griffin, C. J. Mason, J. P. Scovill, *J. Med. Chem.*, 1979, **22(7)**, 855-862.
- [19] D. M. Zangirolami, A. H. Oliveira, A. V. Ferreira, *Braz. J. Phys.*, 2010, **40(1)**, 47-51.
- [20] Oxford Diffraction, CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21 (Release 20-01-2012 CrysAlis171.NET), Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England, 2010.
- [21] (a) G. M. Sheldrick, SHELXS-2013/1: Program for Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2013; (b) G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.*, 2015, **C71**, 3-8.
- [22] G. M. Sheldrick, SHELXL-2014/7: Program for the Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2014.
- [23] A. L. Spek, *Acta Cryst.*, 2009, **D65**, 148-155.
- [24] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65(2)**, 55-63.
- [25] Y. Kubota, K. Kubota, S. Tani, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 2000, **44(1)**, 53-54.

- [26] A. A. R. Despaigne, J. G. da Silva, P. R. da Costa, R. G. dos Santos, H. Beraldo, *Molecules*, 2014, **19(11)**, 17202-17220.
- [27] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods*, 2012, **9**, 671-675.
- [28] W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.*, 1971, **7(1)**, 81-122.
- [29] G. L. Parrilha, K. S. O. Ferraz, J. A. Lessa, K. N. Oliveira, B. L. Rodrigues, J. P. Ramos, E. M. Souza-Fagundes, I. Ott, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **84**, 537-544.
- [30] L. B. P. Sâmia, G. L. Parrilha, J. G. da Silva, J. P. Ramos, E. M. Souza-Fagundes, S. Castelli, V. Vutey, A. Desideri, H. Beraldo, *Biometals*, 2016, **29(3)**, 515-526.
- [31] K. S. O. Ferraz, J. G. da Silva, F. M. Costa, B. M. Mendes, B. L. Rodrigues, R. G. dos Santos, H. Beraldo, *Biometals*, 2013, **26(5)**, 677-691.
- [32] S. Abram, C. Maichle-Mossmer, U. Abram, *Polyhedron*, 1998, **17(1)**, 131-143.
- [33] J. Chan, A. L. Thompson, M. W. Jones, J. M. Peach, *Inorg. Chim. Acta*, 2010, **363(6)**, 1140-1149.
- [34] A. Molter, F. Mohr, *Dalton Trans.*, 2011, **40(14)**, 3754-3758.
- [35] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2009.
- [36] J. A. Lessa, I. C. Mendes, P. R. O. Silva, M. A. Soares, R. G. Santos, N. L. Speziali, N. C. Romeiro, E. J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45(12)**, 5671-5677.
- [37] 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. I. Pesquero, W. R. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20(11)**, 3396-3409.
- [38] J. A. Lessa, M. A. Soares, R. G. Santos, I. C. Mendes, L. B. Salum, H. N. Daghestani, A. D. Andricopulo, B. W. Day, A. Vogt, H. Beraldo, *Biometals*, 2013, **26(1)**, 151-165.
- [39] National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/nudat2 (accessed April 2017).

- [40] C. Wrede, B. W. Filippone, A. García, G. C. Harper, S. Lassell, J. Liu, M. P. Mendenhall, A. S. C. Palmer, R. W. Pattie Jr., D. I. Will, A. R. Young, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, 2011, **269(10)**, 1113-1116.
- [41] V. Tolmachev, P. Bernhardt, E. Forssell-Aronsson, H. Lundqvist, *Nucl. Med. Biol.* 2000, **27(2)**, 183-188.
- [42] G. B. Saha, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer-Verlag, New York, 2010.
- [43] H. A. Wright, R. N. Hamm, J. E. Turner, R. W. Howell, D. V. Rao, K. S. R. Sastry, *Radiat. Prot. Dosim.*, 1990, **31**, 59-62.
- [44] A. I. Kassis, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2004, **80(11)**, 789-803.
- [45] J. P. Pouget, S. J. Mather, *Eur. J. Nucl. Med.*, 2001, **28(4)**, 541-561.
- [46] J. P. Pouget, C. Lozza, E. Deshayes, V. Boudousq, I. Navarro-Teulon, *Front. Med.*, 2015, **2**, 1-11.
- [47] P. Balagurumoorthy, K. Chen, S. J. Adelstein, A. I. Kassis, *Radiat Res.*, 2008, **170(1)**, 70-82.
- [48] A. M. Montel, R. G. Dos Santos, P. R. Da Costa, E. P. Silveira-Lacerda, A. A. Batista, W. G. Dos Santos, *Biometals*, 2017, **30**, 295-305.
- [49] D. C. F. Soares, M. A. B. C. Menezes, R. G. Dos Santos, G. A. Ramaldes, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2010, **284(2)**, 315-320.
- [50] G. Ting, C. H. Chang, H. E. Wang, *Anticancer Res.* 2009; **29(10)**, 4107-4118.
- [51] R. Baskar, J. Dai, N. Wenlong, R. Yeo, K. Yeoh, *Front. Mol. Biosci.* 2014; **1** 24.
- [52] A. I. Kassis, *J. Nucl. Med.*, 2003, **44(9)**, 1479-1481.
- [53] R. W. Howell, S. M. Goddu, D. V. Rao, *Med. Phys.*, 1998, **25(1)**, 37-42.



34x15mm (300 x 300 DPI)