



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Conocimiento novedoso del complejo de indio (III)
de N,N'-bis (salicilideno) etilendiamina como
quimio-sensor para el reconocimiento selectivo de
HSO₄⁻ y estudios de toxicidad hemolítica (glóbulos
rojos): estudios experimentales y teóricos**

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

P R E S E N T A

Daniela Soledad Huerta José



Ciudad Universitaria, CD.MX, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: THANGARASU PANDIYAN

VOCAL: LUNA PABELLO VICTOR MANUEL

SECRETARIO: GONZALEZ RODRIGUEZ XOCHIQUETZAL

1er. SUPLENTE: HUERTA AGUILAR CARLOS ALBERTO

2do. SUPLENTE: RUIZ LOYOLA BENJAMIN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 215 DEL EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, CIUDAD
UNIVERSITARIA, COYOACÁN, Cd. Mx.**

ASESOR DEL TEMA:

DR. PANDIYAN THANGARASU

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. CARLOS ALBERTO HUERTA AGUILAR

SUSTENTANTE:

DANIELA SOLEDAD HUERTA JOSÉ

*"Compañera usted sabe que puede contar conmigo
no hasta dos o hasta diez sino contar conmigo*

*si alguna vez advierte que la miro a los ojos
y una veta de amor reconoce en los míos no alerte sus fusiles
ni piense qué delirio a pesar de la veta o tal vez porque existe
usted puede contar conmigo*

*si otras veces me encuentra hurao sin motivo
no piense qué flojera igual puede contar conmigo*

*pero hagamos un trato yo quisiera contar con usted
es tan lindo saber que usted existe
uno se siente vivo*

*y cuando digo esto quiero decir contar
aunque sea hasta dos, aunque sea hasta cinco
no ya para que acuda presurosa en mi auxilio*

*sino para saber a ciencia cierta
que usted sabe que puede
contar conmigo".*

-Mario Benedetti.

AGRADECIMIENTOS



A la **Universidad Nacional Autónoma de México** (mi *alma mater*) y, especialmente, a la **Facultad de Química**, por abrirme sus puertas y brindarme una educación de calidad, le agradezco los retos, los desvelos y el estrés, pero gracias a ellos adquirí enseñanzas, por los logros, por forjarme y proporcionarme una licenciatura.

Al **Dr. Pandiyan Thangarasu** por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartir su conocimiento, por dirigir mi actividad de investigación, por brindarme su confianza, por apoyarme, por alentarme, por compartir su conocimiento y, sobre todo, por su paciencia. A mis **compañeros del laboratorio F-215** por formar parte de mi equipo de trabajo en el laboratorio y ser como mi segunda familia, por momentos de éxito y aprendizaje juntos.

A **Deporte UNAM** por brindarme las mejores experiencias deportivas dentro de mi estancia en la universidad.

A mis amigos de carrera Rodrigo, David, Diana, Ernesto, Alfredo, Ángeles, Jesica, Salvador, Carranza, Francisco, León, Enrique, Lizbeth, Edwin, Hammurabi, Kevin, Armando por las experiencias en la facultad y por su amistad incondicional y por formar parte de la mejor etapa de mi vida, caer, crecer y madurar juntos. y especialmente a **Fabricio, Mary, Slater** y al **Dr. Carlos** por brindarme las muestras de sangre para esta investigación.

A la **USAII** de la Facultad de Química UNAM, por su ayuda en la realización de los estudios de caracterización.

A la **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Y DGAPA PAPIIT IN222419 e IN202622.**

AGRADECIMIENTOS



A **mi familia, especialmente a mis papás y mis hermanos**, por alentarme a continuar, por el apoyo sentimental y económico, por su compañía y paciencia en cada uno de los momentos que sentía que iba a derrumbarme, por siempre escucharme. A **mis amigos y compañeros de carrera** por los aprendizajes juntos y la sana competencia.

A **Sonia Rangel y Onésimo Guadarrama** por abrirme sus corazones, su confianza y apoyo.

A **mis compañeros y compañeras del equipo de Flag Football** por ser parte de mi formación, a mis Coaches **Jonás Valdez y Edmundo Palma** quiénes estuvieron conmigo dentro y fuera del campo, por enseñarme que el deporte es formativo dentro y fuera del campo, a mis amigas **Patt y May** con quienes recorrí un camino en el deporte.

A **mis compañeras y familia de Horda Dorada** que siempre me dieron el aliento y la confianza de creer en mí, por su apoyo, cansancio y entrega hasta el último minuto y sobre todo por estar conmigo cuando más lo necesité.

DEDICATORIAS



Esta investigación, mi licenciatura, mis logros, mis valores y todo lo que soy, está dedicado a mis padres: **Jovita José Martínez** quien me ha demostrado lo grande que es su amor de madre durante toda su vida, su esfuerzo, entrega y sacrificio **y Rubén Huerta Flores (†)** su amor, alegría, esfuerzo y fomento al deporte siempre estarán conmigo. Dedico también esta tesis a mis hermanos **María Fernanda Huerta José y Ángel Giovani Huerta José** por estar en mi vida y llenarla de risas y enojos con sus travesuras, caricaturas, colores y juguetes.

Con todo mi amor infinito esto es para ustedes.



Capítulo	Tema	Página
	LISTA DE ABREVIATURAS	VII
	RESUMEN	VIII
	ABSTRACT	IX
1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	JUSTIFICACIÓN	5
3.	OBJETIVOS	7
3.1.	Objetivos	7
3.1.1.	Objetivo general	7
3.1.2.	Objetivos particulares	7
4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	9
4.1.	Materiales y equipos	9
4.2.	Mediciones físicas	9
4.3.	Experimental	10
4.3.1.	Síntesis del ligando (L ¹).	10
4.3.2.	Síntesis de [InL ¹ (H ₂ O)(NO ₃)]	11
4.3.3.	Reconocimiento de HSO ₄ ⁻ por [InL ¹ (H ₂ O)(NO ₃)] basado en la fluorescencia	11



Capítulo	Tema	Página
4.3.4	Interacción de los glóbulos rojos con el complejo de indio.	13
4.4	Análisis computacional del complejo de indio.	14
5	Resultados y discusión	17
5.1	Estudios de reconocimiento selectivo del HSO_4^- por el complejo de indio.	17
5.2	Análisis de valoración de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ frente a HSO_4^- .	18
5.3.	Estudios de unión competitiva.	20
5.4	Actividad hemolítica del complejo de indio en eritrocitos humanos.	23
5.5	Estudios de AFM.	25
5.6	Estudios teóricos	27
5.6.1	Espectros electrónicos.	33
5.6.2	Análisis teórico: Interacción de HSO_4^- con $[\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$.	35
6.	CONCLUSIONES	38
	REFERENCIAS	39
	Anexos	46



LISTA DE ABREVIATURAS

eV:	Electrón volts.	λ:	Longitud de onda.
EDS:	Espectroscopía de energía dispersiva.		
FRET:	Transferencia de energía de resonancia de Förster.		
HOMO:	Orbital molecular ocupado de mayor energía.		
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento.		
LUMO:	Orbital molecular no ocupado de menor energía.		
mM:	Milimolar.		
PET:	Transferencia de electrones fotoinducida.		
ppm:	Partes por millón.		
UV:	Ultravioleta.		
UV-Vis:	Ultravioleta-visible		



RESUMEN

Se sintetizó y caracterizó el complejo de indio (III) de N,N'-bis (salicilideno) etilendiamina (L^1) preparado, para emplear como quimiosensor en la detección del anión HSO_4^- . Los resultados muestran que este estudio detecta selectivamente al anión después de estudiar los siguientes iones (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CH_3COO^- , PO_4^{3-} , SCN^- , PF_6^- , HSO_4^-) sin interferencia de los otros aniones excepto el acetato. Se encontró que la estequiometría de la interacción entre el complejo y HSO_4^- era 1:1. Curiosamente, el complejo se empleó en la hemólisis de glóbulos rojos, lo que demuestra que el complejo participa fuertemente en la hemólisis de las células sanguíneas evidenciada por microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica (AFM). Las paredes celulares fueron severamente dañadas por el complejo a través de su interacción con el grupo carboxílico de la hemoglobina.

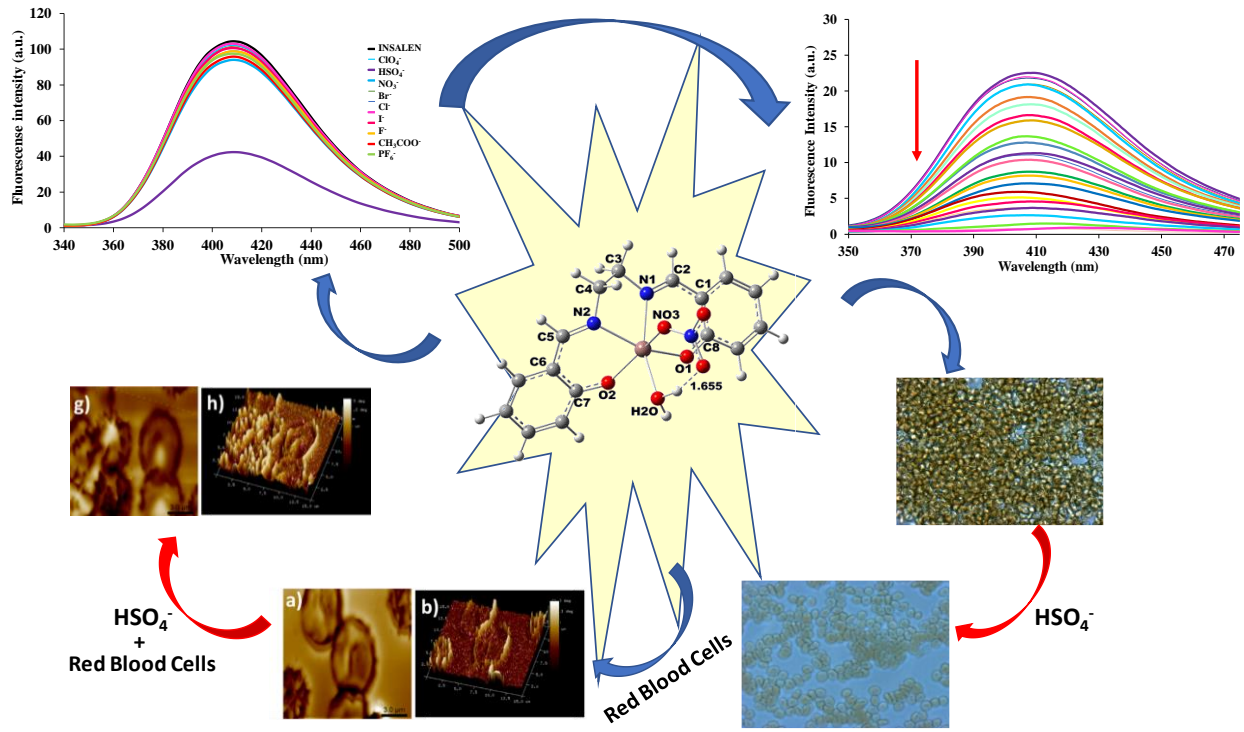
Sin embargo, en presencia de HSO_4^- , el complejo no pudo involucrar la hemólisis debido a la unión de HSO_4^- con el complejo. Esta observación es consistente con el estudio de interferencia aniónica donde el ion acetato interfiere en la detección de HSO_4^- . La intensidad de la fluorescencia del complejo se apagó con la concentración creciente de HSO_4^- . En el análisis de orbitales moleculares, el nivel de energía HOMO del complejo se utilizó para explicar cómo el estado excitado de $[InL^1(NO_3)(HSO_4)]$ que juega un papel importante en la mejora de la intensidad de la fluorescencia mediante la transferencia de fotoelectrones (PET). Un nivel de energía creciente de $[InL^1(NO_3)(HSO_4)]^-$ apaga la intensidad de fluorescencia de $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$.



ABSTRACT

Indium(III) complex of N,N'-bis (salicylidene) ethylenediamine (L^1) prepared was characterized, and employed as chemo-sensor for the recognition of HSO_4^- after studying the following ions (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CH_3COO^- , PO_4^{3-} , SCN^- , PF_6^- , HSO_4^-). The results show that the complex selectively detects HSO_4^- without interference from the other anions except acetate. The stoichiometry of the interaction between the complex and HSO_4^- was found to be 1:1. Interestingly, the complex was employed in hemolysis for Red Blood Cells; the study shows that the complex involves strongly in hemolysis of blood cells evidenced by optical microscopy and Atomic Force Microscopy (AFM). It has been observed that the cell walls were severely damaged by the complex through its interaction with carboxylic group of hemoglobin.

However, in the presence HSO_4^- , the complex was unable to involve the hemolysis of blood cells because the binding of HSO_4^- with the complex that prevents the hemolysis. This observation is consistent with the anion interference study that acetate ion interferes in the detection of HSO_4^- . The intensity of fluorescence of the complex is quenched with the increasing concentration of HSO_4^- ; in the molecular orbital analysis, the HOMO energy level of the complex was used to explain how the excited state of $[InL^1(NO_3)(HSO_4)]^-$ plays a significant role in enhancing or quenching of fluorescence intensity through the Photo Electron Transfer (PET). An increasing energy level of $[InL^1(NO_3)(HSO_4)]^-$ quenches the fluorescence intensity of $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$.





CAPÍTULO 1



1. INTRODUCCIÓN

Los metales del grupo principal (grupo 13= B, Al, Ga, In) están poco explorados en comparación con otros iones de metales de transición [1, 2]. El papel del aluminio es bien conocido por su implicación biológica en la enfermedad de Alzheimer relacionada con el cerebro [3-7]. Sin embargo, el indio es el mejor elemento del grupo 13 debido a sus mayores radios iónicos y a sus fascinantes propiedades de coordinación [8]. Debido al efecto de los átomos pesados, aumenta la tasa de cruce entre sistemas desde el estado singulete fotoexcitado al estado triplete y, en última instancia, aumenta un tiempo de vida significativo del fotosensibilizador.

Así, los complejos de indio(III) han sido probados como agentes antipalúdicos [9, 10], además de considerarse como agentes fototerapéuticos para las células. Dado que el indio exhibe la propiedad de emisor de electrones de Auger, sus complejos también se consideran potencialmente en el etiquetado de células en la imagen clínica para los sitios infectados/inflamación [11, 12]. En la terapia contra el cáncer, la emisión de electrones Auger es muy útil para dañar el ADN que conduce a la muerte celular. Por ejemplo, los complejos de indio(III) de las ftalocianinas se están estudiando como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer [5].

Sin embargo, las propiedades biológicas y fotofísicas de los complejos no radiactivos basados en el indio están todavía sin explorar, aunque algunos de los complejos se han probado para las aplicaciones farmacológicas (actividades antimicrobianas y antiproliferativas) [13, 14]. La medición de analitos en muestras biológicas o ambientales mediante la técnica de la fluorescencia se ha convertido en un método muy popular, ya que detecta eficazmente las moléculas invitadas, como cationes, aniones, neutros o



biomoléculas, a través de la molécula huésped en una concentración muy baja en condiciones fisiológicas. La unión de los fluoróforos con los analitos desempeña un papel importante en la caracterización de cualquier molécula, ya que sufre un cambio conformacional sustancial para aumentar o suprimir las intensidades de fluorescencia. Los complejos metálicos de ligandos de base schiff, especialmente la N, N'-bis (salicilideno)etilendiamina (salen, átomos donantes de N_2O_2) se han estudiado ampliamente en el campo medicinal y farmacéutico [8, 15]; además, se han explorado complejos metálicos como luminóforos para el reconocimiento de iones cloruro y acetato en muestras reales [16-18].

Recientemente, los complejos de indio han recibido una gran atención debido a sus interesantes características espectrales y fotofísicas. Así, la exploración de los complejos de indio para el reconocimiento del HSO_4^- resulta atractiva, ya que este anión interviene de forma crucial en varios procesos metabólicos (actividades enzimáticas y funciones de los anticuerpos) [19, 20]. Además, la hemólisis de los glóbulos rojos mediante el uso del complejo de indio es novedosa y valiosa desde el punto de vista de la aplicación biológica, y según nuestro conocimiento, este trabajo no ha aparecido en la literatura. Además, se utilizó el estudio DFT para ilustrar por qué la intensidad de la fluorescencia se apaga con la adición de HSO_4^- al complejo mediante el análisis de la energía de los orbitales HOMO.



CAPÍTULO 2



2. JUSTIFICACIÓN

La medición de analitos en muestras biológicas o ambientales mediante la técnica de fluorescencia se está convirtiendo en un método popular ya que detecta de manera eficiente fracciones huésped como cationes, aniones, neutrales o biomoléculas a través de la molécula huésped en muy baja concentración en condiciones fisiológicas. Complejos metálicos de ligandos de base de Schiff, especialmente, N, N'-bis (salicilideno) etilendiamina (salen, átomos donantes de tipo N_2O_2) se han estudiado ampliamente en campos médicos y farmacéuticos [8, 15]; además, se han explorado complejos metálicos como luminóforos para el reconocimiento de iones de cloruro y acetato en muestras reales [16-18]. Recientemente, los complejos de indio han recibido una gran atención debido a sus interesantes características espectrales y fotofísicas. Así mismo, la exploración de los complejos de indio para el reconocimiento del HSO_4^- resulta atractiva, ya que este anión interviene de forma crucial en varios procesos metabólicos como lo son en actividades enzimáticas y en funciones de los anticuerpos [19, 20]. Además, la hemólisis de los glóbulos rojos mediante el uso del complejo de indio es novedosa y valiosa desde el punto de vista de la aplicación biológica, y según nuestro conocimiento, este trabajo no ha aparecido en la literatura. Además, se utilizó el estudio DFT para ilustrar por qué la intensidad de la fluorescencia se apaga con la adición de HSO_4^- al complejo mediante el análisis de la energía de los orbitales HOMO.



CAPÍTULO 3



3.OBJETIVOS

3.1. Objetivos

3.1.1. Objetivo general

Estudiar las propiedades electrónicas de un complejo de indio (III) como quimiosensor para la detección de aniones y aplicación de su actividad hemolítica en los glóbulos rojos.

3.1.2. Objetivos particulares

- ❖ Sintetizar el complejo indio $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ y caracterizar por medio de métodos analíticos y analizar las propiedades electrónicas (espectrales y fluorescentes) para la detección de aniones en sistema de muestras biológicas.
- ❖ Estudiar el complejo de indio $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ como quimiosensor mediante fluorescencia para diferentes aniones (pruebas de enlace, titulación, análisis estequiométrico e interferencia).
- ❖ Emplear al complejo de indio $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ como quimiosensor para detección de HSO_4^- en sistemas biológicos (glóbulos rojos).
- ❖ Realizar estudios de DFT estructurales y de orbitales moleculares para correlacionar las propiedades electrónicas con el enlace entre HSO_4^- y $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$
- ❖ Estudiar el efecto del hemolisis de los glóbulos rojos en ausencia del complejo de indio, en presencia y con HSO_4^- .



CAPÍTULO 4



4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y equipos

Todos los reactivos químicos de grado analítico (Sigma-Aldrich) se utilizaron tal y como se recibieron de la empresa, sin ninguna otra purificación. Los resultados elementales (C, H, N) de las muestras se obtuvieron realizando en un analizador elemental (instrumento Fisons, modelo EA 1108 CHNSO). Los espectros de RMN de ^1H se obtuvieron para los compuestos registrando en un equipo Varian Gemini (RMN, 300 MHz), y se utilizó tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los fragmentos del espectro de masas de los compuestos se analizaron mediante GC-MS (instrumento Joel JMS-Axsoha). Se realizaron espectros de absorción UV-Vis. en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25) y espectros de fluorescencia en un espectrofotómetro (F96 Pro).

4.2 Mediciones físicas

Los espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer Lambda 25) y el espectrofotómetro de fluorescencia (F-96 Pro) (Figura1) se emplearon para analizar las propiedades electrónicas y de fluorescencia de complejo de indio, así como para la detección de aniones. Se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Varian Modelo Varian Pro-Star) acoplada con un detector UV (254 nm) para analizar la pureza del complejo formado.



Figura1. Equipo de fluorescencia para determinar propiedades electrónicas del complejo de indio

4.3 Experimental

4.3.1 Síntesis del ligando (L¹).

El ligando se sintetizó siguiendo el procedimiento publicado en otro lugar [21-23]; normalmente, a la solución de etilendiamina (0.60 g, 1.0 mM) disuelta en EtOH (8.0 mL), se añadió lentamente salicilaldehído (0.244 g, 2.0 mM) disuelto en EtOH (12 mL), y la mezcla resultante de la solución se agitó durante 30.0 minutos a temperatura ambiente. El sólido obtenido se filtró y se lavó varias veces con dietiléter. El sólido amarillo (rendimiento: 87%). RMN 1H (300 MHz, CD₃OD): 2CH₂-N (4H, s, 3.87), 2N=CH (2H, s, 8.60), H aromático (8H, m, 7.21), OH fenólico (2H, s, 13.36).



4.3.2 Síntesis de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$

El complejo de indio se preparó adoptando el procedimiento modificado reportado en la literatura [24]. A la solución metanólica de L^1 (0.5522 g, 1,0 mM, 50 mL), se añadió lentamente la solución de $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ (0.6289 g, 4,3 mmol) disuelta en metanol caliente, y la solución resultante se sometió a reflujo durante 2,0 horas, enfriándose después a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó por rotoevaporación para obtener un producto residual, que se lavó con MetOH. El producto amarillo obtenido se recrystalizó en metanol: Rendimiento (1.81 g, 81%). Análisis elemental: calculado $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_6\text{In}$ (461): C 41.64%, H 3.47%, N 9.11%. MS (FAB, m/z (%)):
[$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_7\text{In}^+$], 486 (7.9%) [$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{In}^+$], 382 (5.3%) M+1, [$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2^+$], 269 (5.3%) [$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}^+$], 165 (100%), [$\text{C}_7\text{H}_5\text{N}^+$]. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): $2\text{CH}_2\text{-N}$ (4H, s, 3.11-3.43), $2\text{N}=\text{CH}$ (2H, s, 4.50-4.65), $\text{H}_{\text{arom.}}$ (8H, 7.42-6.97).

4.3.3 Reconocimiento de HSO_4^- por $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ basado en la fluorescencia

Se realizaron los siguientes estudios para el reconocimiento de HSO_4^- específicamente por $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$: (i) análisis de la unión del anión, (ii) interferencia de otros iones durante la detección de un anión concreto, es decir, estudios de unión competitiva, y (iii) estudios de valoración de analitos específicos (moiety invitado) frente a la molécula huésped. En general, en el experimento de unión de aniones, se añadió una cantidad fija de sales de tetrabutilamonio particulares del anión (25 μL , 0.1 mM) a una solución estándar de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (2.5 mL, 1.0 mM) disuelta en H_2O (100%), y se analizó el comportamiento de fluorescencia (280-560 nm) del complejo de indio.



El complejo se excitó a 309 nm, y la correspondiente emisión fluorescente se observó a 409 nm. Si hay un cambio significativo en la característica de las señales de fluorescencia de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, entonces se consideraría un indicador de la unión del anión. También se estudió el comportamiento de reconocimiento del complejo de indio en diferentes disolventes [H_2O (100%), $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80%:20%), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50%:50%)] para comprender si la capacidad de unión de aniones del complejo se ve influida por el cambio de disolventes. En el estudio de interferencia, exclusivamente, en un medio competitivo, se examinó la capacidad de detección/sensibilidad del huésped $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ como receptor del donante invitado HSO_4^- junto con otros aniones coexistentes que contenían la misma concentración.

En la valoración del anión particular HSO_4^- , es decir, la sal de tetrabutilamonio de HSO_4^- se añadió a un matraz volumétrico de 10 mL que contenía una solución estándar del receptor $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, y se analizó el comportamiento de la fluorescencia para la mezcla trazando la concentración del anión frente a la intensidad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente para la consistencia de los resultados. La relación de unión del complejo con el anión se analizó con el uso de la parcela de Job mediante la obtención de la relación de estequiometría como se informó en otro lugar [25]. Así, se preparó un conjunto de soluciones del huésped $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, y del ion invitado HSO_4^- con una concentración total constante de moléculas huésped-anfitrión y se determinó una intensidad espectral máxima o mínima para el gráfico de intensidad de fluorescencia frente a $[\text{HSO}_4^-]/[\text{HSO}_4^-] + [\text{complejo}]$.



4.3.4 Interacción de los glóbulos rojos con el complejo de indio.

La muestra de sangre humana (grupo O⁺) fue recolectada del Centro de Donación de Sangre de la Facultad de Química de la UNAM, manteniéndola al vacío y se utilizó EDTA como agente anticoagulante, luego se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min. (Suppl. Mat. Fig. S2). Los pellets celulares recogidos (eritrocitos) se lavaron tres veces consecutivas con solución tampón de fosfato (PBS, pH = 7.4) para obtener los glóbulos rojos, que finalmente se diluyeron a 1:10 con agua estéril isotónica. Se evaluó la toxicidad de cada xenobiótico (HSO_4^- , In^{3+} , sal, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ y $([\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]/\text{HSO}_4^-)$ mediante la adición de esas soluciones (50 L de 0.1 mM) lentamente en 100 L de suspensión eritrocitaria.

La mezcla completa de glóbulos rojos se trató con cada una de las muestras anteriores, dejando que reaccionara durante 15 minutos, y se analizó el rendimiento de la hemólisis por hipertonicidad. Con el uso de la solución madre del complejo de indio (22.7 mg, 1.0 mM, 50 mL), se prepararon las soluciones estándar de diferentes concentraciones del complejo (5.0 μM , 10.0 μM , 20.0 μM , 30.0 μM , 40.0 μM , 60.0 μM , 70 μM , 80 μM , 90 μM , y 100 μM), y se midió la absorción UV-visible para todas las soluciones. La curva de calibración se trazó utilizando la absorción frente a las concentraciones (véase la Anexo Fig. S3). También se preparó un control negativo (glóbulos rojos + 1,0 mL de tampón PBS) y un control positivo (glóbulos rojos +1.0 mL de solución de Na_2CO_3 al 0.1%).

La hemólisis se realizó para los glóbulos rojos en suspensión acuosa (1.0 mL, 2%) utilizando el complejo de indio (1.0 mL) en las diferentes concentraciones (5,0, 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100 μM) y se permitió el proceso durante 30 min. Después de tratar las células con el complejo, todas las muestras se centrifugaron primero a 3000 rpm durante 10 min., para eliminar el residuo



resultante, y se registraron los espectros de absorción UV Visible de las células sanguíneas tratadas, y se midió la intensidad del pico a 545 nm. Se calculó el porcentaje de hemólisis (% Hem.) mediante la siguiente ecuación:

$$\%Hemólisis = \left(\frac{A_M - A_{CN}}{A_P - A_{CN}} * 100 \right)$$

A= absorbancia de la muestra, A_M = absorbancia de las muestras a diferentes concentraciones, A_{CN} = absorbancia del control negativo, A_{CP} = absorbancia del control positivo

El comportamiento del complejo sobre los glóbulos rojos se observó bajo el microscopio de luz y el microscopio de fuerza atómica (AFM).

4.4 Análisis computacional del complejo de indio

Las propiedades estructurales y electrónicas de In^1 y sus complejos de indio se estudiaron derivando diferentes combinaciones de aniones como $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$, $[InL^1(H_2O)(NO_3)]^-$, $[InL^1(H_2O)(NO_3)]^{2-}$, $[InL^1(H_2O)(HSO_4)]$, $[InL^1(HSO_4)(NO_3)]^-$, $[InL^1(H_2O)_2]$, $[InL^1(NO_3)_2]^-$, $[InL^1(HSO_4)_2]^-$ e $[InL^1(HSO_4)(CH_3COO)]^-$. Las estructuras se optimizaron mediante la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) empleando Gaussian-09 [26], donde los datos estructurales totalmente optimizados del ligando se consideraron como entrada para la optimización geométrica de la optimización (Ver anexo Fig. S4 y S5). En el cálculo se utilizó el B3LYP como funcional de correlación de intercambio con conjuntos de bases 6-31G** para los átomos de C, N y H y DGDZVP para el In^{3+} [27-29].

El mismo funcional de correlación de intercambio y conjuntos de bases se utilizaron para el análisis de las propiedades electrónicas, especialmente, para las energías de los orbitales moleculares de frontera, es decir, los orbitales moleculares más ocupados (HOMOs) y también los orbitales moleculares más



bajos desocupados (LUMOs). Considerando el Análisis de la Población Natural (NPA), se examinó la distribución de la carga entre los átomos estructurales.

Es bien sabido que se consideran varios descriptores locales y globales [30-34] para determinar el sitio reactivo de cualquier molécula orgánica. Dado que el índice de Fukui condensado a átomo (CAFI) $f(r)$ es tan eficiente, puede aplicarse para identificar los sitios reactivos del ligando L^1 como se describe en el método publicado en otro lugar [32, 35, 36], especialmente, se empleó un descriptor adecuado, la carga de Hirshfeld para calcular el CAFI [37, 38]. Se determinaron las cargas fiables del NPA en diferentes conjuntos de bases (DGDZVP y 6-31G**) con B3LYP. La densidad electrónica $\rho(r)$ del sitio molecular en el ligando se obtuvo como una función derivada del Fukui $f(r)$ con respecto al número de electrones N a un potencial externo constante $v(r)$:

Los valores de los índices f^{+k} , f^k y $f^{\circ k}$ se designan a la dirección de la transferencia de electrones [35] con la consideración de aproximaciones de diferencias finitas en el análisis de la población de átomos en las moléculas. Si no se tiene en cuenta el efecto de relajación para la adición o eliminación de cargas electrónicas en la molécula, se emplean las siguientes ecuaciones.



CAPÍTULO 5



5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudios de reconocimiento selectivo del HSO_4^- por el complejo de indio.

Pruebas de reconocimiento de aniones: Analizando las propiedades de fluorescencia del complejo $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, se ha probado como quimiosensor para el reconocimiento de aniones. Se añadieron al complejo diferentes aniones (Cl^- , Br^- , F^- , I^- , NO_3^- , ACOO^- , PO_4^{3-} , SCN^- , PF_6^- , HSO_4^-) en forma de sales de amonio tetrabutílico, y se estudió el rendimiento del complejo en la fluorescencia. Por ejemplo, cada solución del anión mencionado (25 L, 0.1 M) se añadió al complejo $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (2.5 mL, 1.0 mM) disuelto en H_2O /(100%) a través de una micropipeta, y se observó el cambio de la emisión de fluorescencia (280-560 nm). Curiosamente, sólo en el caso de la adición de HSO_4^- , se observó un cambio de fluorescencia significativo, y para otros aniones no se observó tal cambio.

Todas las soluciones se excitaron a 309 nm y la emisión correspondiente se detectó a 405 nm, observándose que la intensidad de la fluorescencia se apagaba al añadir HSO_4^- . Por tanto, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ se comporta como quimiosensor para la detección de HSO_4^- (ver Fig. 1). Los experimentos se repitieron varias veces, obteniendo el mismo comportamiento espectral para el complejo, y no se notó ningún cambio apreciable de la intensidad de emisión. También se analizó el efecto del disolvente en el reconocimiento utilizando diferentes disolventes [H_2O (100%), $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80%:20%), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50%:50%)], observando que no se notaba ningún cambio apreciable en el rendimiento del complejo para la detección.

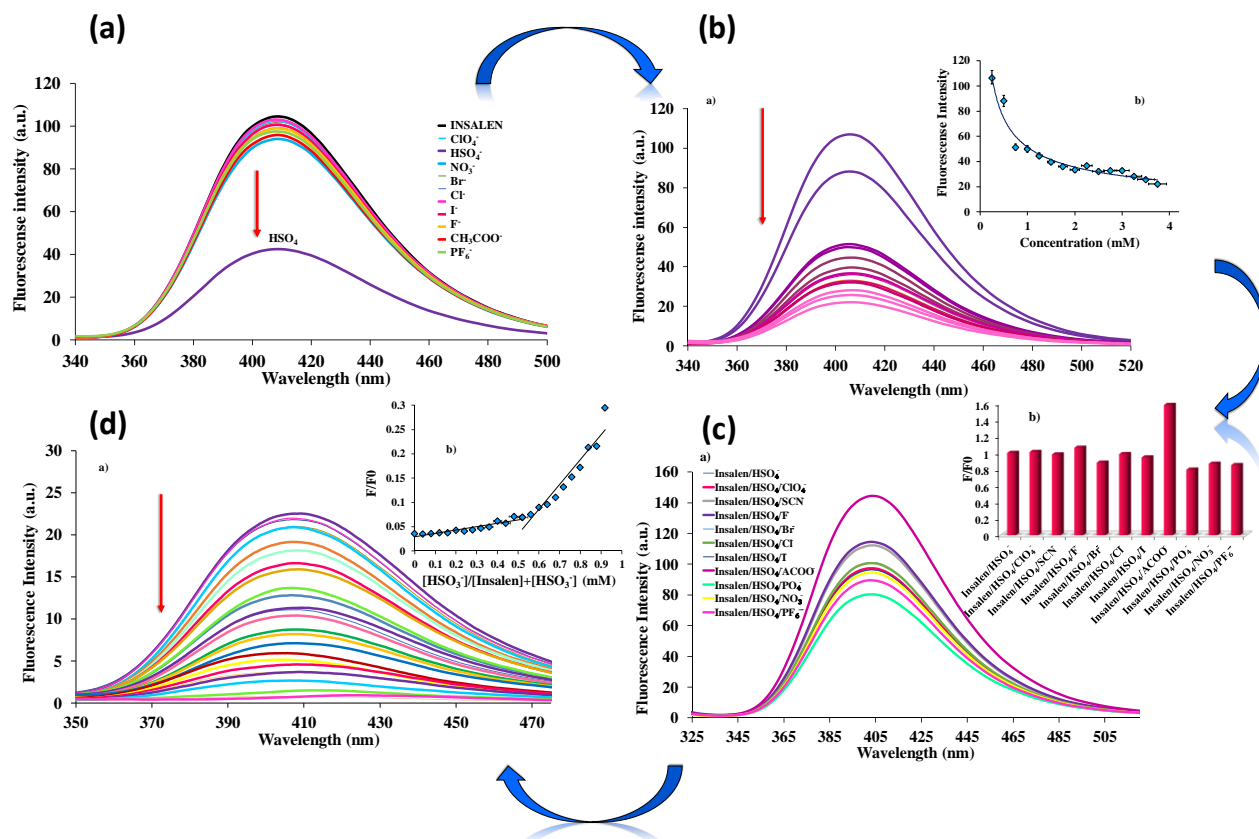


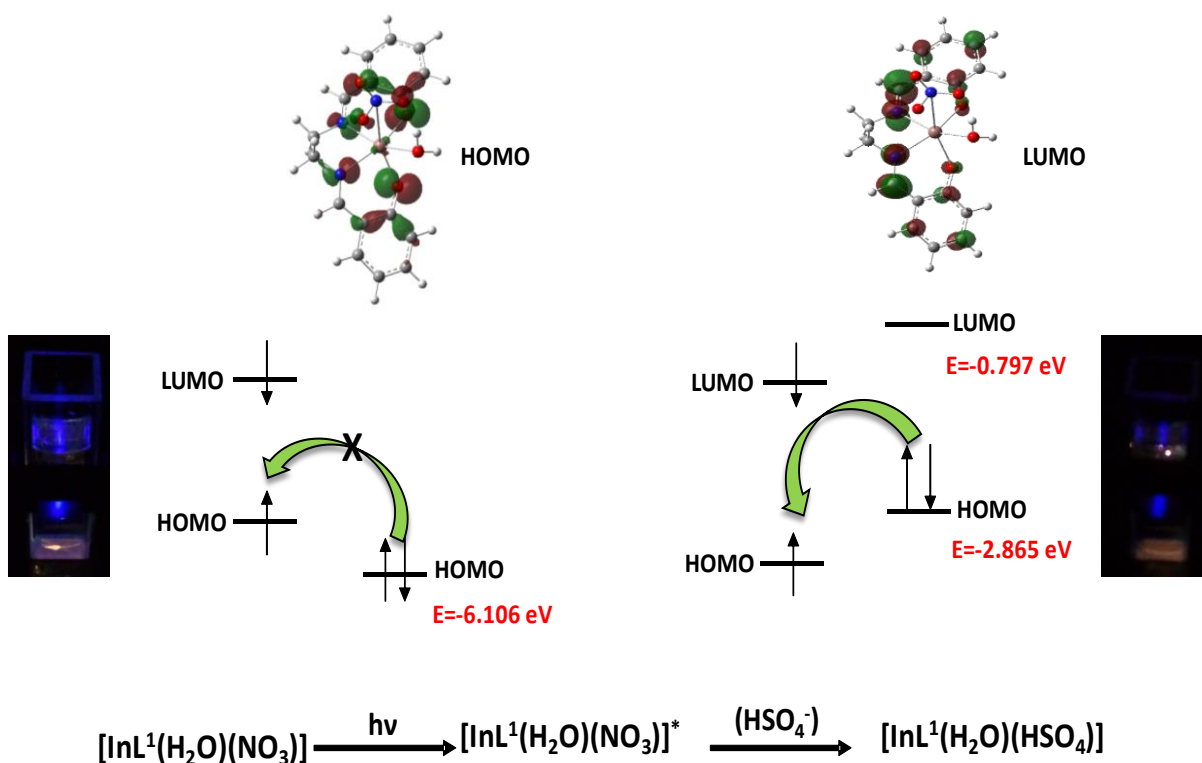
Figura 1. a) Estudio de unión de aniones: el comportamiento de la fluorescencia del cambio durante la adición de diferentes aniones (0.1 M) a $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (1.0 mM); b) una disminución de la intensidad de fluorescencia del complejo (1 mM) por la sucesiva adición de HSO_4^- (0.0 – 0.1 mM) en H_2O ; c) el estudio de la interferencia de aniones durante la detección de HSO_4^- por el complejo; d) Gráfico de Job de intensidad de fluorescencia vs. concentración de anión, detección de HSO_4^- con complejo receptor (0.1 mM) en presencia de una cantidad equimolar de anión en medio acuoso.

5.2 Análisis de valoración de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ frente a HSO_4^- .

Se estudió la selectividad de unión de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ frente a la concentración de HSO_4^- , y se midió la intensidad de la fluorescencia alrededor de 405 nm; para cada adición posterior de HSO_4^- (0.0 a 0.45 mM) al complejo



(5.0 mL, 0.1 mM), la intensidad del pico medido disminuye linealmente con el aumento de la concentración de HSO_4^- (Fig. 1b). Parece que la interacción entre el complejo receptor y el anión HSO_4^- no favorece el estado excitado Foto Transferencia de Electrones (PET), y se prefiere la transferencia de electrones desde el HOMO (donante) al HOMO de baja altitud del aceptor (fluoróforo). Esto sugiere que $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ puede reconocer al HSO_4^- en solución acuosa a través de un apagado de la emisión de fluorescencia, y significa que la transferencia de electrones fotoinducida desde el HOMO (donante) al fluoróforo está siendo permitida para apagar la emisión de fluorescencia (Esquema 1).



Esquema 1: Ilustración del mecanismo de PET que no favorece para el estado excitado la transferencia de electrones para la interacción de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ con HSO_4^- .



5.3 Estudios de unión competitiva.

Con la interferencia de otros aniones en el medio competitivo, se determinó la selectividad de unión del complejo con el HSO_4^- . Se estudió la influencia de la intensidad de fluorescencia de otros aniones durante la detección de HSO_4^- por $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, mostrando que no hay un cambio significativo en la intensidad por la adición de otros iones excepto el acetato. La intensidad observada para el complejo con la adición de HSO_4^- se mantiene casi constante, y sólo para el acetato, la intensidad se potenció interfiriendo en la determinación. En el estudio, normalmente, se añadieron diferentes aniones (Cl^- , Br^- , F^- , I^- , NO_3^- , ACOO^- , PO_4^{3-} , SCN^- , PF_6^- , HSO_4^-) a la solución de la mezcla de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (0.1 mM, 2.5 mL) + HSO_4^- (25.0 μL , 100.0 mM) en H_2O (100%), y la concentración final fue de 16.0 mM.

La solución completa se agitó primero durante 15 minutos y luego se mantuvo durante 5 minutos para alcanzar el equilibrio antes de medir la emisión de fluorescencia. Los resultados indican que no hay interferencia significativa de otros aniones durante la detección de HSO_4^- a través de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (Fig. 1c). Después de haber estudiado el efecto de los pHs con la intensidad de fluorescencia para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (0.1 mM, 2.0 mL), se observó que a pHs bajos o altos, se detectó una baja fluorescencia, y sólo a pH neutro, se observó una alta intensidad (Fig.2). Esto describe que la protonación y deportación del complejo influye en la intensidad de la fluorescencia.

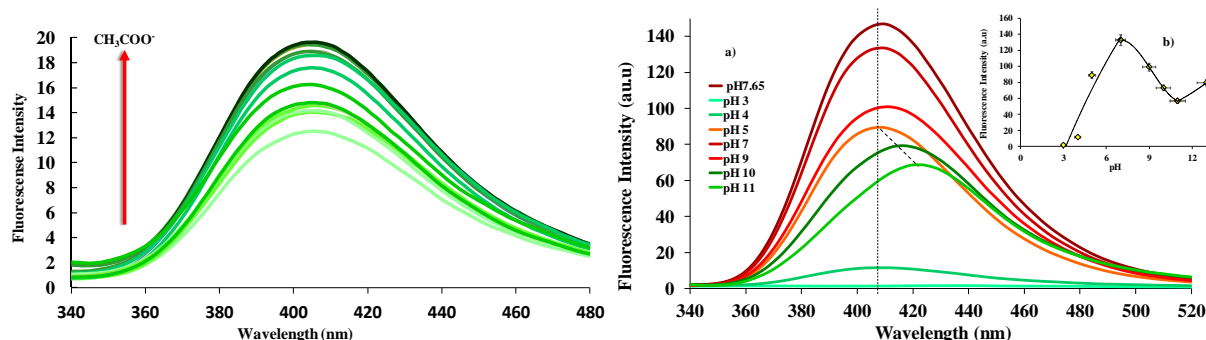


Figura 2. a) Titulación del complejo con HSO_4^- frente a acetato; b) Gráfico de la intensidad de la fluorescencia frente al pH.

Empleando el método de Job, se estimó la relación de la interacción HSO_4^- con el complejo de indio, mostrando que la relación resultó ser 1: 1 (Fig. 1d). Significa que la intensidad de la fluorescencia se apaga proporcionalmente hasta ~ 1.0 equivalentes para la adición de HSO_4^- . La detección selectiva de diferentes aniones mediante el empleo de complejos de indio como quimiosensor, en comparación con el presente estudio (ver Tabla 1).

Tabla 1. Datos espectrales de fluorescencia y UV-vis para el reconocimiento de diferentes complejos de indio recopilados de la literatura.

Indium complexes	Wavelength (λ_{abs} , nm)	Excitation (λ_{exc} , nm)	Emission (λ_{em} , nm)	Ref.
$[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ L=N, bis(salicylidene)ethylenediamine N'-		309	405	This work
$[\text{In}_2(\text{OH})_2(1,3\text{-BDC})_2(2,2'\text{-bipy})_2]$ 1,3-BDC= benzenedicarboxylate bipy= 2,2'-bipyridine 1,3-	340	340	520	[39]
In(III)-bis(thiosemicarbonato)	355, 440	488	540	[40]
$[\text{In}(\text{cis-1,4-pda})_2]$ (1,4-H ₂ pda)=1,4-phenylenediacetic acid	356	356	428	[41]
HIn(1,3-bdc) ₂ -2DMF 1,3-H ₂ bdc=1,3-benzendicarboxylic acid	363	363	398	[41]
In(OH)(trans-1,4-chdc)	264	264	324	[41]



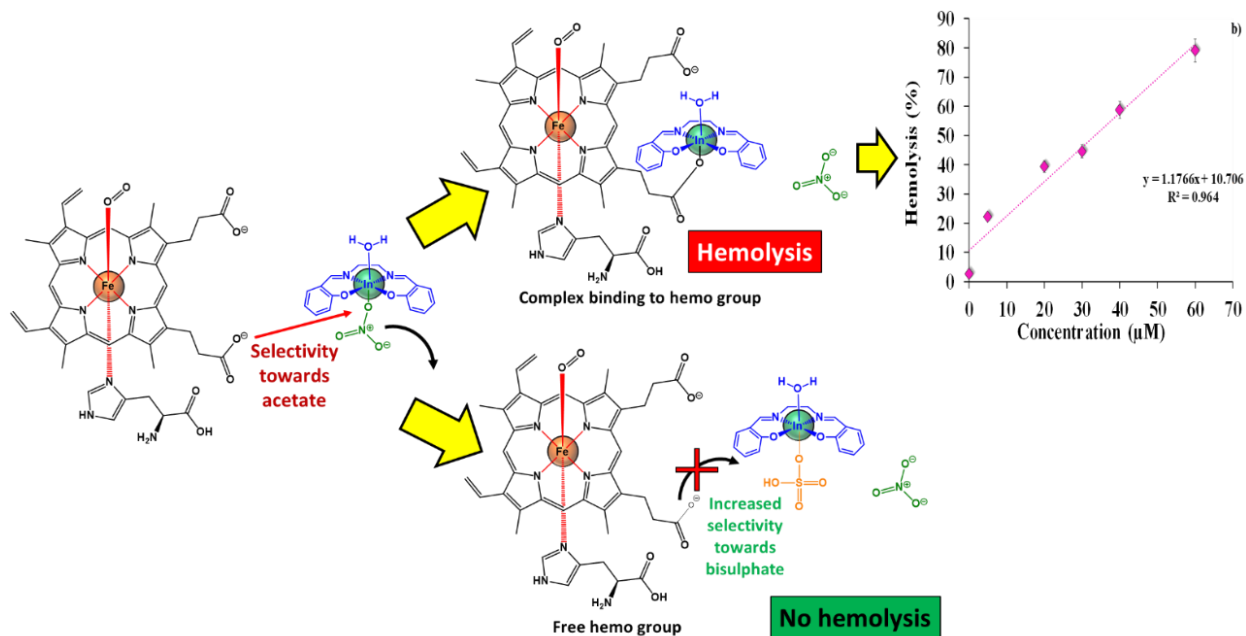
1,4-H ₂ chdc=1-4-cyclohexanedicarboxylic acid			420	
[In(E/Z)-3-[(3-Hydroxypropylamino)-phenylmethylidene]-1,3-dihydro-2H-1-phenylpyrido[2,3-b]pyrrolo[2,3-e]pyrazin-2-one]	407	425	480	[42].
Tris(dipyrrinato)indium(III)	570	459	592	[43]
[[InL(NO ₃)(OH)] NO ₃ CH ₃ OH] ₂ L=N,N'-bis(2-pyridinylmethylene) cyclohexane-1,2-diamine	237	467	520 650	[44]
In ₃ (2,6-pydc) ₃ (1,4-bda)1.5(H ₂ O) ₆ 2,6-H ₂ pydc=Pyridine-2,6-dicarboxylic acid (1,4-bda)= <i>cis</i> -2-butene-1,4-dial	-	260	351 421	[45]
[In(phen) ₂ Cl ₂](H ₄ bptc)(NO ₃)(H ₂ O) phen = phenanthroline H ₄ bptc =bipiridine-tricarboxylic acid	398	420	494	[46]
[In(Tab) ₂ Tab=4-Trimethylammonio)benzene thiolate	272	415	515	[23]
[In(Tab) ₄ (Phen)](OAc) ₃ Tab=4-Trimethylammonio)benzene thiolate Phen=1,10-Phenanthroline	266	415	515	[23]
[In(Tab) ₂ (Dpphen) ₂](PF ₆) ₃ ; Tab=4-(Trimethylammonio)benzene thiolate, Dpphen=4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline)	284	415	515	[23]
[C ₆ H ₁₁ N ₂] ₂ [In ₂ (BDC) ₃ Br ₂] BDC=1,4-benzenedicarboxylate	-	270	420	[47]
[In(L) ₂]NO ₃ (L = 2-benzoylpyridine N(4)-cyclohexylthiosemicarbazone)	302 398	361	508	[48]
[InCl(Hphth)(nia)(H ₂ O) ₂] Hphth=phthalic acid nia=nicotinic acid	218 267 310	320	339	[49]
[InCl(nia) ₂ (Hox) ₂].3H ₂ O (nia)=nicotinic acid Hox= oxalic acid	216 263 295	320	374	[49]
In(III) based on a phosphoserine as a receptor with a pyrene fluorophore using solid phase	-	342	476 480	[50]



5.4 Actividad hemolítica del complejo de indio en eritrocitos humanos.

La hemólisis generalmente ocurre si los anticuerpos se adhieren a los glóbulos rojos (GR) desgarrando la membrana de las células a través de un proceso físico o químico y altera las reacciones inmunes [51] y el estrés oxidativo [52, 53]. Sin embargo, el mecanismo del proceso de hemólisis provocado por agentes exógenos no se comprende por completo, aunque existen múltiples propuestas como la conjugación de un agente hemolítico, el proceso inflamatorio y la respuesta inmunitaria. En el presente estudio, se analizó la hemólisis de las células sanguíneas utilizando el complejo de indio en presencia de iones HSO_4^- y acetato.

Los resultados muestran que la existencia de una fuerte hemólisis por parte del complejo; esto significa que el catión indio puede coordinarse fuertemente con el residuo carboxílico de la hemoglobina (Fig. 3), afectando la función biológica de la hemoglobina. Los eritrocitos se presentan en forma redonda con un diámetro que varía de 7 a 10 μm , por lo que la hemoglobina y otros componentes pueden migrar desde los límites celulares a través de efectos osmóticos, dejando las estructuras membranosas como fantasmas (Esquema 3).



Esquema 2. El mecanismo de hemólisis propuesto para la interacción de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ con las células sanguíneas.

En el estudio de microscopía óptica, las muestras se prepararon de la siguiente manera: (1) control (glóbulos rojos, 30 µL); (2) glóbulos rojos (30 µL) + 15 µL de complejo de indio; (3) 30 µL de glóbulos rojos + 15 µL de complejo de indio/bisulfato. Después de permitir las muestras para la reacción, se observó el daño físico en la forma de los glóbulos rojos y el cambio de color de las células a un marrón rojizo intenso también se observó en presencia de complejo de indio, y el tamaño de las células fue aumentado por hemólisis. Sin embargo, para el sistema (30 µL de glóbulos rojos + 15 µL de complejo indio / bisulfato), solo se observó un cambio de color de los eritrocitos de rojo a blanco sin alterar la forma de las células, lo que demuestra que las células no han sufrido por lisados.

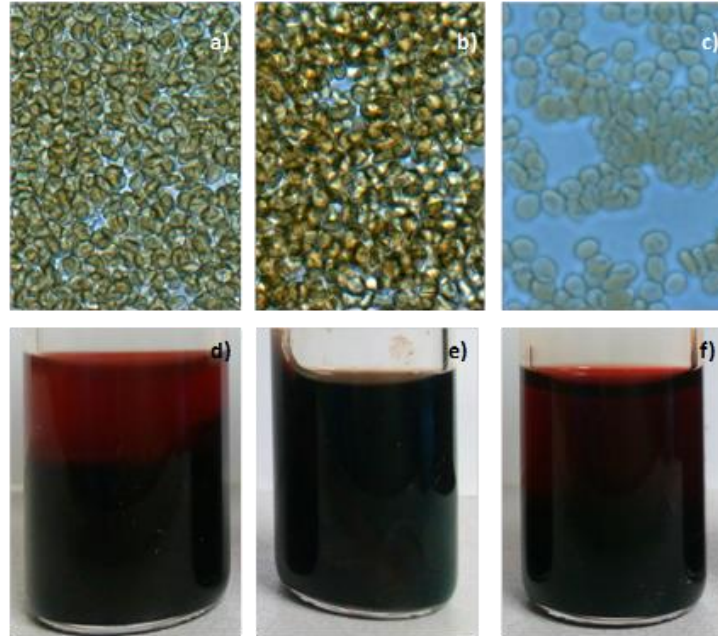


Figura 3. Imágenes microscópicas invertidas Olympus IX71. (a, d) eritrocitos sanos, (b, e) eritrocitos con complejo de indio y (c, f) eritrocitos con complejo de indio y HSO_4^- $60 \mu\text{M}$, $40 \times 1 \mu\text{m} = 8.30$ píxeles.

5.5 Estudios de AFM.

Se analizó el comportamiento de superficie de las células sanguíneas después del tratamiento con complejo de indio mediante un escaneo de aproximadamente $15 \mu\text{m}^2$ por AFM (Fig. 4). Los eritrocitos se trataron con $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (Fig. 4e y 4d) y $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]/\text{HSO}_4^-$ (Fig. 4e y 4f). En la muestra de control (eritrocitos), se observaron glóbulos rojos humanos de forma redonda regular con un diámetro de entre 7 y $10 \mu\text{m}$ [54], además de una depresión central que se encuentra típicamente en los eritrocitos humanos (Fig. 4b) [55, 56]. Si los eritrocitos se trataron con $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, la mayoría de las células experimentan daños líticos, lo que demuestra que el complejo puede dañar las células en funcionamiento y afectar en gran medida la forma y el tamaño.



Sin embargo, el complejo $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ en presencia de ion bisulfato, se observó una disminución considerable en el grado de lisis celular, lo que indica que HSO_4^- se une fuertemente con el complejo dificultando el efecto de lisis celular. Por lo que se propone una posible explicación de la interacción compleja con el grupo hemo que el complejo tiende a tener interacción con los grupos acetato presentando hemoglobina que causa un daño severo en la superficie de los glóbulos rojos [57]. Por el contrario, en presencia de HSO_4^- que interactúa directamente con el complejo y no permite que el complejo interactúe con el resto hemo, posteriormente, la lisis de RBC se reduce (Tabla 2). Este es un buen acuerdo con la prueba de unión de aniones, donde se encontró la interferencia del acetato durante la detección de HSO_4^- por el complejo.

Tabla 2. Estudios de hemólisis para la toxicidad de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$.

Sistema	Hemolisis
Control	No
HSO_4^-	No
Complejo	Yes
Complejo+ HSO_4^-	No

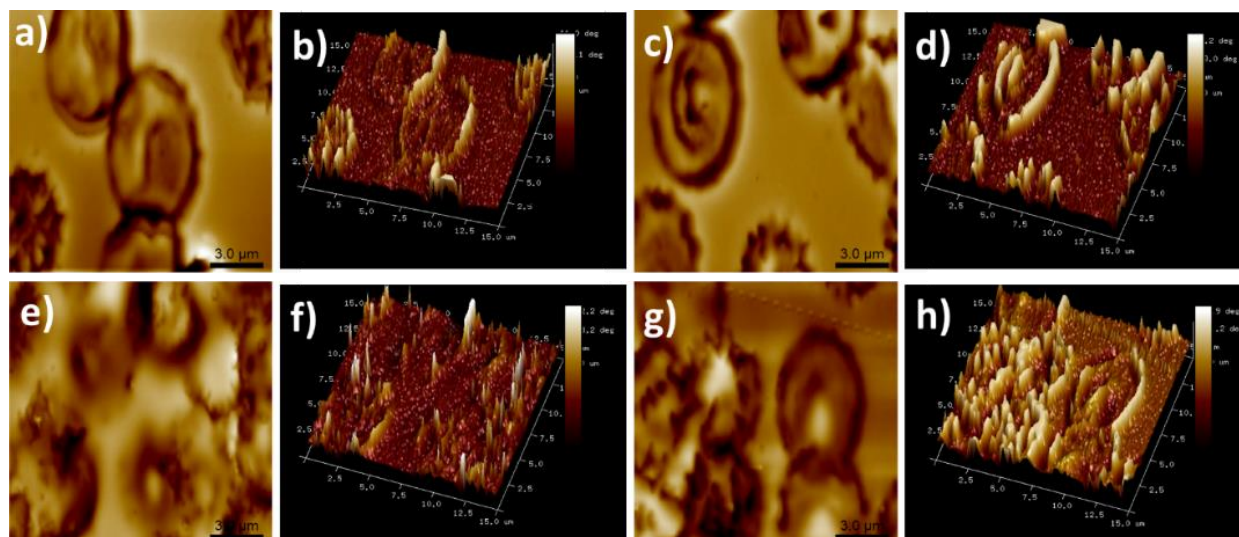


Figura 4. Análisis AFM de eritrocitos en presencia de diferentes xenobióticos: a) control; b) control en análisis topográfico 3D; c) HSO_4^- ; d) HSO_4^- en análisis topográfico 3D; e) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$; f) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ en análisis topográfico 3D; g) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]/\text{HSO}_4^-$; h) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]/\text{HSO}_4^-$ en análisis topográfico 3D.

5.6 Estudios teóricos.

En la estructura optimizada de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, la presencia de intermoleculares enlaces de hidrógeno entre el terminal O1W (molécula de agua) y O1 (nitrato) (Fig.5), como HO-H--ONO2 (1.655 Å), estabilizando la estructura de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$. Esta observación es consistente con las reportadas para otros relacionados en (III) complejos [58].

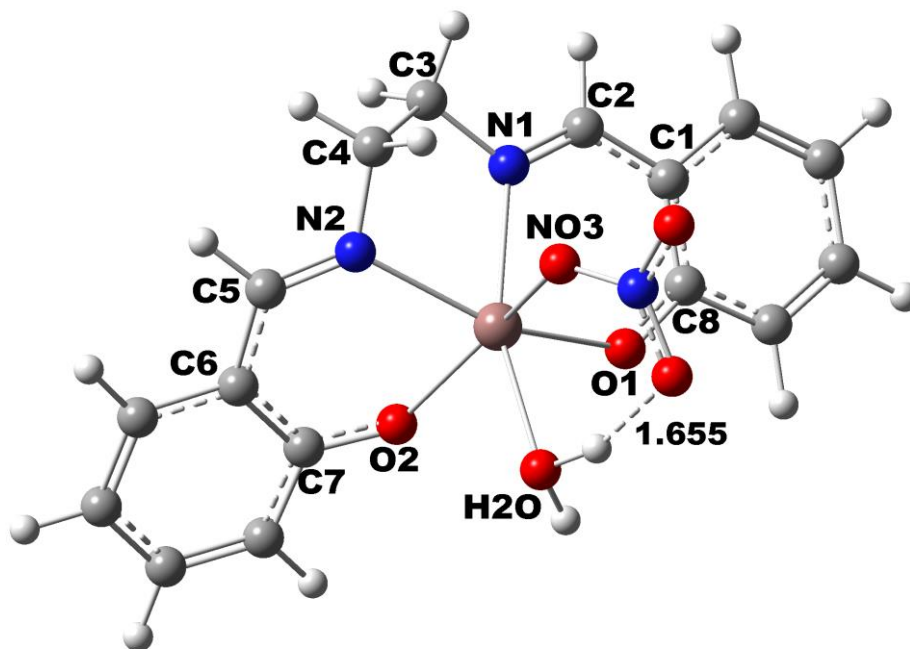


Figura 5. Estructura optimizada de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ en estado gaseoso.

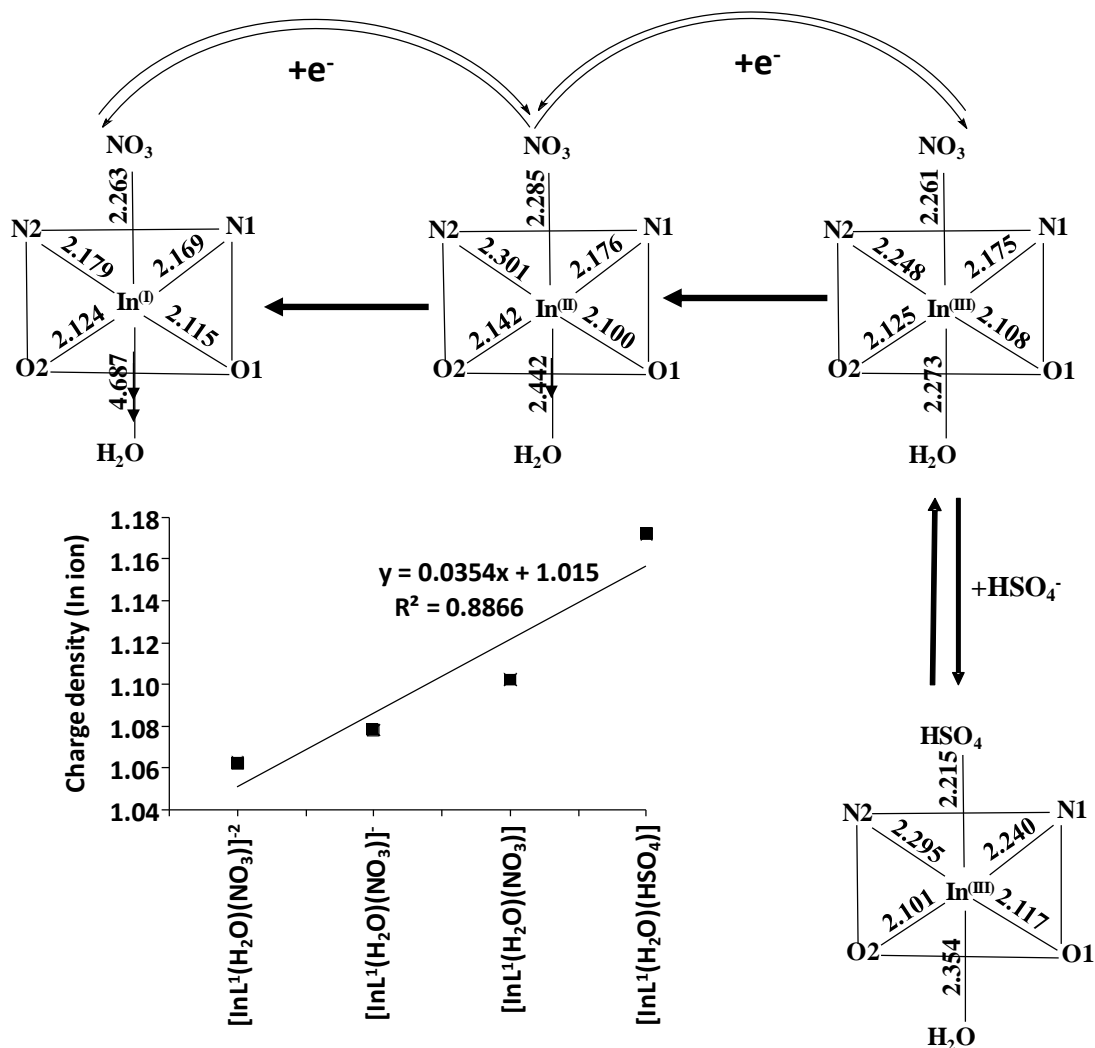
Después de haber analizado la estructura optimizada, se encuentra que el ligando L1 coordina convenientemente con el ion In (III) para exhibir una geometría octaédrica distorsionada donde el plano ecuatorial está formado por átomos de N(1), N(2), O(2) y O(1); el vínculo resultante las longitudes son 2.275 Å, 2.248 Å, 2.125 Å y 2.108 Å, respectivamente. Los enlaces axiales están en In(III)-ONO2 (2.261) e In(III)-(H₂O)] (2.273 Å)) (Supl. Mat. Fig. S5, Tabla S1). Los ángulos de enlace trans resultantes para el centro de metal son: 156,0 ° para O1-In1-N2, 158.5 ° para N1-In1-(OH₂) 1 y 149.2 ° para O2-In1-(ONO2) y otros ángulos de enlace caen en el rango de 73.9 a 118.8°. Esta observación es consistente con las reportadas para otros complejos de In (III) relacionados [36, 59].

Además, la estructura del complejo en diferentes estados de oxidación se ha optimizado para comprender cómo la estructura sufre un cambio significativo cuando el estado de oxidación del metal ha cambiado (Anexo Tabla S1). Se ha observado que la interacción axial de la molécula de H₂O es tan débil si In(III)



se reduce a In(II), luego a In (I); esto es probablemente, está presente el concepto HSAB ya que In(III) prefiere coordinarse con la naturaleza dura del H₂O favoreciendo una interacción con el ion In(III), pero no favorece con In(I). Sin embargo, no hay un cambio considerable en la interacción del NO₃ con el ion metálico. El complejo en diferentes estados de oxidación contra densidades de carga sigue una línea recta, que muestra que existe una fuerte relación entre la densidad de carga alrededor del metal con los estados de oxidación (ver recuadro, Esquema 3).

Desde los resultados experimentales indican que el complejo de indio actúa activamente como sensor para la detección del ion HSO₄⁻ con la interferencia del ion acetato, también tenemos estructuralmente optimizado el reemplazando de NO₃⁻ por HSO₄⁻ y también H₂O por acetato y se analizó los impactos estructurales con propiedades electrónicas (Esquema 3).



Esquema 3. La variación de las distancias de enlace (axial y ecuatorial) durante el cambio de estado de oxidación en $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ a $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]^-$ + en metanol. (insertar: diferentes estados de oxidación frente a densidades de carga).

La dureza (η) y la suavidad (σ) de cada estructura optimizada se calcularon para comprender el rendimiento de la densidad de electrones y su distribución en los sistemas [38, 60]. $\eta = (\text{LUMO}-\text{HOMO})/2 =$ la dureza global (η) del complejo: 0.406, 1.705, 1.933, 1.621, 1.034, 0.411, 1.881 y 1.888 eV para $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$,



$[\text{InL}_1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$ y $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$, respectivamente.

La suavidad (σ) se determinó usando $\sigma = 1/\eta$, obteniendo $\sigma = 0.586, 0.517, 0.617, 0.967, 2.433, 0.532$ y 0.529 eV para $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{-2}$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$ y $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$, respectivamente en estado gaseoso (Tabla de materiales suplementarios S2). Se utilizó la siguiente ecuación para calcular E y μ para los complejos.

$$\Delta E = \frac{\mu^2}{2\eta} \text{ y } \mu = -\frac{I+A}{2}$$

I = potencial de ionización (IP); A = afinidad electrónica (EA) y μ = potencial químico; η = dureza química del ligando.

Los resultados son: $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]^{-2}$ ($\Delta E = 1.685$ eV) $< [\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]^-$ ($\Delta E = -0.322$ eV) $< [\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ ($\Delta E = -1.901$ eV) $< [\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{HSO}_4)]$ ($\Delta E = -2.811$ eV), lo que indica que el estado de oxidación del ion metálico aumenta con la disminución de la dureza global de los complejos; esto muestra que $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ es más reactivo que otros complejos, lo cual es consistente con la observación reportada de que si $\eta > 0$ y $\Delta E < 0$, la transferencia de carga es energéticamente favorable [58].

Después de analizar la distribución de carga de heteroátomos en el ligando (nitrógeno imínico e hidroxilo de oxígeno), se observó un exceso de densidad de electrones en los heteroátomos, y facilita la formación de un enlace con el ion metálico (Anexo Tabla S5 y S6). Como se esperaba, un cambio considerable en la densidad de carga para el donante de átomos se obtuvo que el ligando forma el complejo (transferencia de carga de heteroátomos al metal); esto es consistente con el análisis de carga de Mulliken. Por ejemplo, las densidades de carga detectadas para el ligando fueron: O1, O2 (-0.550), N1, N2 (-0.317); pero estos valores se vieron obligados a cambiar como -



0.602, 598 y -0.301, 302 después su formación compleja con In (III) debido a la transferencia de carga del ligando al metal.

El estudio de orbitales moleculares (MO) establece la formación de un enlace fuerte a través de superposición del orbital del ligando con los del metal, estabilizando la energía entre indio(III) y el ligando. Por ejemplo, para $[\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, los orbitales HOMOs fueron el resultado de la superposición de d [In(III)] con los orbitales π/p de L^1 , produciendo los siguientes orbitales moleculares: HOMO a HOMO-X; $X= 0-6, 10, 12$) (Anexo Fig. S6a). Además, la presencia del carácter π del resto imina se corrobora al observar la presencia de HOMO, y otros orbitales bajos (HOMO-X ($X = 0-3$) para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (Anexo Fig. S6c). Para el caso de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, donde NO_3 es sustituido por HSO_4^- como reconoce el complejo selectivamente ion acetato, los siguientes orbitales: HOMO a HOMO-X ($X = 0,1, 2, 4, 6$) se obtuvieron mientras que para $[\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{HSO}_4)]$,, HOMO a HOMO-X ($X = 0-6$) (Anexo Fig. S6e). El LUMO se obtiene debido a la mezcla con los orbitales de los átomos [N(1), N(2) (12), O(1), O(2) y N(1)], confirmando la existencia de un enlace In-O en la geometría.

Reactividad del ligando: - Con el uso de los descriptores análisis de Hirshfeld y el natural análisis de población (NPA), analizamos la reactividad del ligando para comprender interacciones intra e intermoleculares que describen la orientación de las moléculas en la vecindad y la naturaleza de los átomos que hacen contactos cercanos la molécula seleccionada [61]. Los resultados muestran que el análisis de población de Hirshfeld y el análisis de población (NPA) predice valores positivos para todos los átomos del ligando. En el análisis de la función de Fukui, donde existe el mayor valor de Fukui (sitio más reactivo) como O2, N2imina, C1, C2, C6, C7 y C8 se consideran ataques electrofílicos $f(r)$, mientras que para $f^+(r)$ ataques nucleofílicos, los sitios más reactivos son todos los átomos (O1, O2, N1imina, N2imina, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8) (Anexo S4, Fig.S7).



5.6.1 Espectros electrónicos

Se registró el espectro electrónico para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ en diferentes disolventes: las bandas de absorción fueron 256, 282 y 322 nm en medio acuoso; en la mezcla de solventes ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$), las bandas fueron 256, 286 y 324 nm, y en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ fueron 256, 286 y 321 nm. Esto muestra que las bandas electrónicas no sufren ningún cambio significativo con el efecto solvente (Ver Fig.6). Dado que el complejo reconoce HSO_4^- en medio acuoso, se estudió la adición de HSO_4^- al complejo, observándose solo un pequeño cambio en la intensidad de absorbancia.

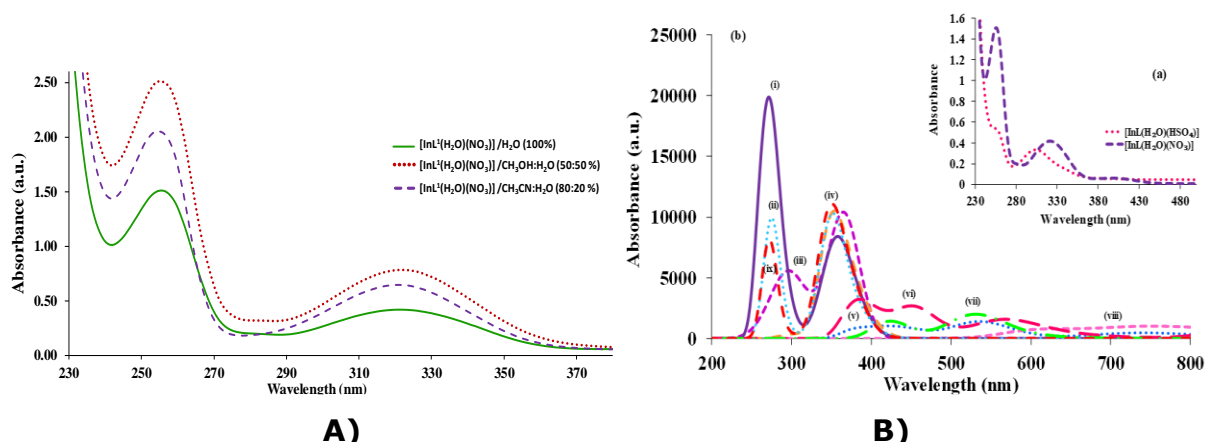


Figura 6. a) Espectros de absorción experimentales en agua; (b) Espectros TD-DFT: (i) $[\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{HSO}_4)]$, (ii) $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]$, (iii) $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]$, (iv) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, (v) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]$ y (vi) $[\text{InL}_1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, (vii) $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, (viii) $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]$ y $[\text{InL}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$ en estado gaseoso.

Las bandas de alta energía (282 y 325 nm) en la región UV obtenidas se asignan a las transiciones $\pi-\pi^*$, y las bandas de absorción de baja energía (390 a 540 nm) se atribuyen a la transferencia de carga de metal a ligando (MLCT o LMCT) tal como $\text{In}(\text{III})(d\pi) \rightarrow (\pi^*)$ Nimine; En $\text{In}(\text{III})(d\pi) \rightarrow \text{O}$ agua y N nitrato (π^*). Esta característica proporciona una buena evidencia de la quelación del ligando al centro metálico. Además, el TD-DFT estudió la contribución orbital a las bandas espectrales con el uso de DFT en el conjunto de bases B3LYP/DGDZVP; el agua se considera un disolvente en el modelo PCM. El



espectro TD-DFT derivado para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ es comparable con el experimental (Ver Fig. 7b) ($\lambda_{\text{exp}} = 260, 309 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{calc}} = 282 \text{ y } 364 \text{ nm}$). Como se indicó anteriormente, el pico 282 nm está dominado por transiciones $\pi-\pi^*$, y la banda 364 nm se origina a partir de MLCT o LMCT [37, 38, 62] (Ver anexo S5).

Dado que $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ reconoce eficazmente HSO_4^- , se calcularon los espectros TD-DFT (Fig. 6b) para la posible interacción del anión, generando los siguientes complejos posibles: $[\text{InL}^1\text{NO}_3](\text{H}_2\text{O})$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]$ y $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]$ (Ver anexo Fig. S5 y Tabla S5). Los datos muestran que $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ presenta dos bandas con hombro en fase gaseosa (282 y 364 nm), concordando aproximadamente con el espectro experimental [60]. Para el caso de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, existe un efecto disolvente considerable en los espectros con bandas desplazadas al rojo (276 y 367 nm) en fase gaseosa.

También se analiza la contribución orbital a las bandas espectrales resultantes para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (282 y 364 nm) y se observan las transiciones originadas en el HOMO-x ($x = 0$ a 6) (In-Nimina) mediante superposición con LUMO de la siguiente manera: 1918.7, 1185.2, 375.3, 360.9, 346.1, 299.2, 294.9, 291.1, 288.7, 281.2 y 277.6 nm (ver Tabla de materiales suplementarios S5). Para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, HOMO-x ($x = 0-6$) se acoplan con el metal LUMO para exhibir bandas electrónicas (378.9, 362.3, 294.4, 283.8, 279.2, 270.9, 262.9 y 258.3 nm). Esto indica que las bandas visibles se derivan de un estado excitado de mezcla de In(III)-N, es decir, los HOMO localizados en el ligando, especialmente sobre restos de imina e hidroxilo, se superponen considerablemente con el LUMO del ion metálico a través de MLCT.



5.6.2 Análisis teórico: Interacción de HSO_4^- con $[\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$.

Se estudió teóricamente la subestación de HSO_4^- y acetato en $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ reemplazando H_2O o NO_3 . Se vio que hay una disminución en la longitud del enlace axial cuando el acetato se coordina en la posición axial, lo que muestra que la geometría octaédrica está comprimida axialmente en la esfera de coordinación. Por ejemplo, para In(III)-ONO , la distancia fue 2.261 Å que disminuye a 2.208 Å para In-OAc . Además, la banda prohibida (HOMO-LUMO) obtenida para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ fue 3.866 eV y se redujo a 2.068 para $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$ (ver Fig. 7, ver anexo Fig. S8 y S9).

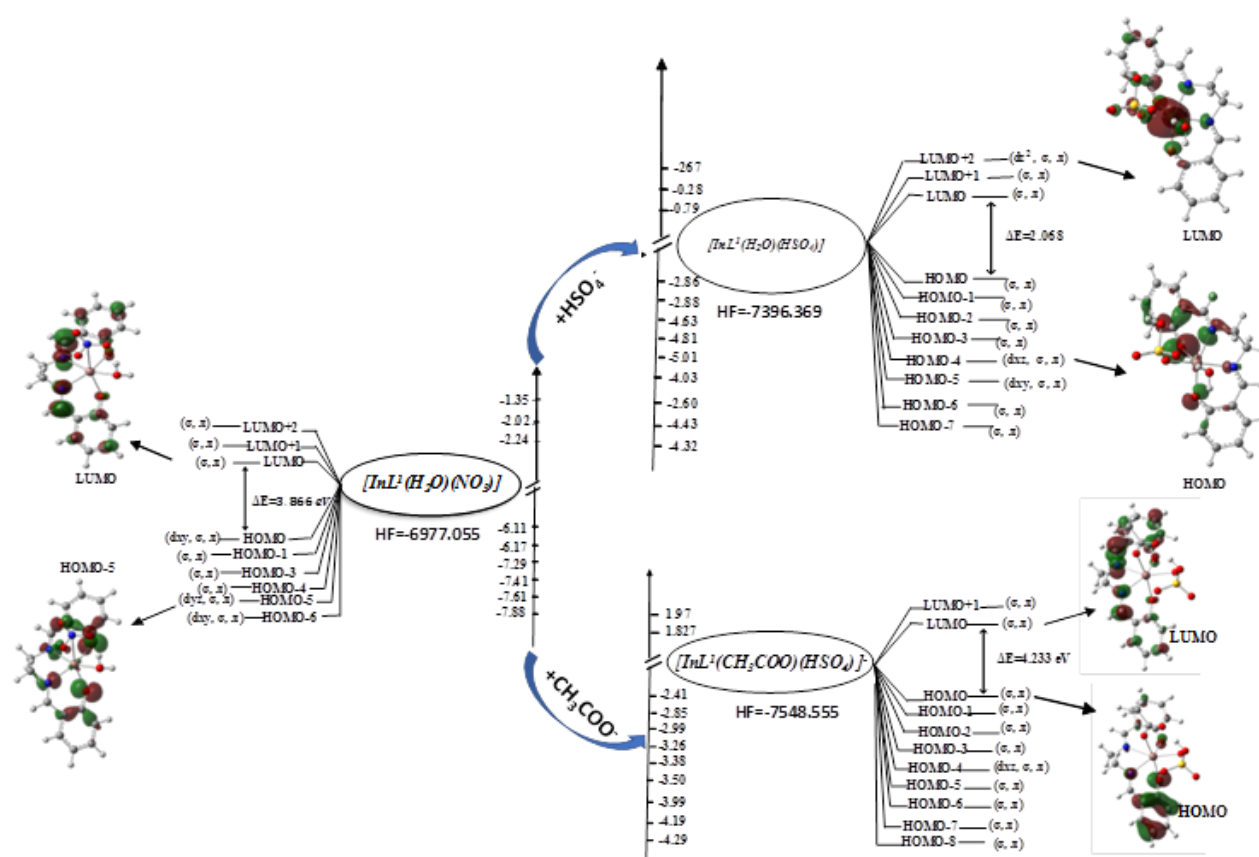


Figura 7. Análisis del orbital molecular del complejo de indio durante la interacción de bisulfito.



Mientras que para el caso de la adición de HSO_4^- al complejo $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (3.866 eV, HOMO-LUMO), la energía de la banda prohibida se incrementó a 4.233 eV para $[\text{InL}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$. Como se anticipó, la brecha de energía aumenta significativamente a 4.233 eV para $[\text{InL}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$. Esta observación es consistente con los resultados experimentales de fluorescencia.



CAPÍTULO 6



6. CONCLUSIONES

El complejo de indio (III) de N,N'-bis(salicilideno) etilendiamina (L^1) actúa como un quimio-sensor basado en fluorescencia para el reconocimiento selectivo de HSO_4^- después de analizar diferentes aniones, pero en presencia de acetato, la intensidad aumenta interfiriendo en la detección. de HSO_4^- . Curiosamente, el complejo está involucrado de manera eficiente en la hemólisis de los "glóbulos rojos", evidenciada por microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica, donde las paredes celulares fueron severamente perforadas por el complejo a través de la interacción del grupo carboxílico de hemoglobina con el complejo. Pero en presencia de HSO_4^- , el complejo no puede involucrar la hemólisis porque HSO_4^- se une fuertemente al complejo inhibiendo su interacción con la hemoglobina. Q Esta observación consiste en un estudio de interferencia aniónica. Además, la intensidad de la fluorescencia del complejo se apaga si la solución contiene HSO_4^- , por lo que el análisis orbital molecular se utiliza para explicar cómo la transferencia de fotoelectrones (PET) relaciona la energía HOMO de $[InL^1(NO_3)(HSO_4)]^-$ con la extinción de la intensidad, mientras que para $[InL^1(H_2O)(CH_3COO)]^-$, se correlaciona con el aumento de la intensidad.



REFERENCIAS

1. Hyun, K., et al., *Systematic design of indium-based luminophores with color-tunable emission via combined manipulation of HOMO and LUMO levels*. Dyes Pigments, 2018. **158**: p. 285-294.
2. Kümmerer, K., A. Al-Ahmad, and V.J.C. Mersch-Sundermann, *Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test*. Chemosphere, 2000. **40**(7): p. 701-710.
3. Crapper, D., S. Krishnan, and A.J.S. Dalton, *Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration*. Science, 1973. **180**(4085): p. 511-513.
4. Nayak, P.J.E.r., *Aluminum: impacts and disease*. Environmental research, 2002. **89**(2): p. 101-115.
5. Walton, J.J.J.o.i.b., *An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration*. Journal of inorganic biochemistry, 2007. **101**(9): p. 1275-1284.
6. House, E., et al., *Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of A β 42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's Disease, 2004. **6**(3): p. 291-301.
7. House, E., et al., *Copper Abolishes the β -Sheet Secondary Structure of Preformed Amyloid Fibrils of Amyloid- β 42*. Journal of Alzheimer's Disease, 2009. **18**(4): p. 811-817.
8. Wang, S.J.C.C.R., *Luminescence and electroluminescence of Al (III), B (III), Be (II) and Zn (II) complexes with nitrogen donors*. Coordination Chemistry Reviews, 2001. **215**(1): p. 79-98.
9. David, S., et al., *In vitro effect of free and complexed indium (III) against Mycobacterium tuberculosis*. FEMS microbiology letters, 2005. **251**(1): p. 119-124.



10. Rogers, H.J., et al., *Antibacterial effect of scandium and indium complexes of enterochelin on Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1980. **18**(1): p. 63-68.
11. Cutler, C.S., et al., *Radiometals for combined imaging and therapy*. *Chemical reviews*, 2013. **113**(2): p. 858-883.
12. Lahiri, S., et al., *Production and separation of ¹¹¹In: an important radionuclide in life sciences: a mini review*. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry*, 2013. **297**(3): p. 309-318.
13. Lessa, J.A., et al., *2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas*. *European journal of medicinal chemistry*, 2010. **45**(12): p. 5671-5677.
14. Oliveira, A.A., et al., *Cytotoxic and antimicrobial effects of indium (III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones*. *Dalton Transactions*, 2017. **46**(3): p. 918-932.
15. Kwak, S.W., et al., *Salen-indium/triarylborane triads: synthesis and ratiometric emission-colour changes by fluoride ion binding*. *Dalton Transactions*, 2018. **47**(15): p. 5310-5317.
16. Granados, J.A.O., et al., *Exploration of ruthenium complex of (E)-2-((pyridine-2-yl) methyleneamino) benzoic acid as chemosensor for simultaneous recognition of acetate and HSO₄⁻ ions in cell bio-imaging: Experimental and theoretical studies*. *Sensors Actuators B: Chemical*, 2018. **270**: p. 570-581.
17. Hernández, J.G., et al., *A ruthenium (III) complex derived from N, N'-bis (salicylidene) ethylenediamine as a chemosensor for the selective recognition of acetate and its interaction with cells for bio-imaging: Experimental and theoretical studies*. *New Journal of Chemistry*, 2017. **41**(19): p. 10815-10827.
18. Sharma, H., et al., *Pyridyl-and benzimidazole-based ruthenium (III) complex for selective chloride recognition through fluorescence spectroscopy*. *Analytical methods*, 2013. **5**(16): p. 3880-3887.
19. Gunnlaugsson, T., et al., *Fluorescent sensing of pyrophosphate and bis-carboxylates with charge neutral PET chemosensors*. *Organic Letters*, 2002. **4**(15): p. 2449-2452.



20. Maity, D., T.J.O. Govindaraju, and b. chemistry, *A turn-on NIR fluorescence and colourimetric cyanine probe for monitoring the thiol content in serum and the glutathione reductase assisted glutathione redox process*. *Organic biomolecular chemistry*, 2013. **11**(13): p. 2098-2104.
21. Leoni, L., *Fine-tuning of Supramolecular Selectivity in Metal-salophen-based Receptors*. 1933.
22. Cheng, J., et al., *Functionalized Salen ligands linking with non-conjugated bridges: unique and colorful aggregation-induced emission, mechanism, and applications*. *Journal of Materials Chemistry C*, 2015. **3**(42): p. 11099-11110.
23. Stöhr, A., et al., *Iron salen-catalysed oxidative coupling of phenol derivatives: formaldehyde-free access to amphiphilic polymers*. *Polymer International*, 2016. **65**(5): p. 544-550.
24. Ganjali, M.R., et al., *Ruthenium (III) Schiff's base complex as novel chloride selective membrane sensor*. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental Practical Aspects of Electroanalysis*, 2004. **16**(11): p. 922-927.
25. Benesi, H.A. and J.J.J.o.t.A.C.S. Hildebrand, *A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons*. *Journal of the American Chemical Society*, 1949. **71**(8): p. 2703-2707.
26. Gaussian09, R.A.J.I., Wallingford CT, 1, *mj frisch, gw trucks, hb schlegel, ge scuseria, ma robb, jr cheeseman, g. Scalmani, v. Barone, b. Mennucci, ga petersson et al., gaussian*. Inc., Wallingford CT, 2009. **121**: p. 150-166.
27. Hay, P.J. and W.R.J.T.J.o.c.p. Wadt, *Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals*. *The Journal of chemical physics*, 1985. **82**(1): p. 299-310.
28. Lee, C., W. Yang, and R.G.J.P.r.B. Parr, *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. *Physical review B*, 1988. **37**(2): p. 785.



29. Schirmer, B. and S.J.C.c. Grimme, *Electric field induced activation of H₂—Can DFT do the job?* Chemical communications, 2010. **46**(42): p. 7942-7944.
30. Parr, R.G. and R.G.J.J.o.t.A.c.s. Pearson, *Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity.* Journal of the American chemical society, 1983. **105**(26): p. 7512-7516.
31. Yang, W., R.G. Parr, and R.J.T.J.o.C.P. Pucci, *Electron density, Kohn–Sham frontier orbitals, and Fukui functions.* The Journal of Chemical Physics, 1984. **81**(6): p. 2862-2863.
32. Parr, R.G. and W.J.J.o.t.A.C.S. Yang, *Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity.* Journal of the American Chemical Society, 1984. **106**(14): p. 4049-4050.
33. Pal, S. and K.J.J.o.t.A.C.S. Chandrakumar, *Critical study of local reactivity descriptors for weak interactions: Qualitative and quantitative analysis of adsorption of molecules in the zeolite lattice.* Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(17): p. 4145-4153.
34. Pérez, P., et al., *Empirical energy– density relationships for the analysis of substituent effects in chemical reactivity.* Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(19): p. 4756-4762.
35. Yang, W. and W.J.J.J.o.t.A.C.S. Mortier, *The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines.* Journal of the American Chemical Society, 1986. **108**(19): p. 5708-5711.
36. Geerlings, P., F. De Proft, and W.J.C.r. Langenaeker, *Conceptual density functional theory.* Chemical reviews, 2003. **103**(5): p. 1793-1874.
37. Cheng, F., et al., *Synthesis, photophysical, and electrochemical properties of two polynuclear ruthenium (II) polypyridyl complexes containing diazafluorene.* Transition Metal Chemistry, 2011. **36**(5): p. 573-578.
38. Hirahara, M., et al., *New series of dinuclear ruthenium (II) complexes synthesized using photoisomerization for efficient water oxidation catalysis.* Inorganic Chemistry, 2015. **54**(15): p. 7627-7635.



39. Wang, L.P., et al., *Synthesis, crystal structure and photoluminescent property of a novel indium (III) supramolecular 3D framework*. Journal of Molecular Structure, 2010. **975**(1-3): p. 215-219.
40. Arrowsmith, R.L., et al., *Fluorescent gallium and indium bis(thiosemicarbazones) and their radiolabelled analogues: Synthesis, structures and cellular confocal fluorescence imaging investigations*. Dalton Transactions, 2011. **40**(23): p. 6238-6252.
41. Wang, L.P., et al., *Three novel indium MOFs derived from dicarboxylate ligands: Syntheses, structures and photoluminescent properties*. Journal of Solid State Chemistry, 2012. **190**: p. 208-215.
42. Ostrowska, K., et al., *Ratiometric fluorescent Zn²⁺ and In³⁺ receptors of fused pyrazine with an aminopropanol chain in acetonitrile*. New Journal of Chemistry, 2014. **38**(1): p. 213-226.
43. Kusaka, S., R. Sakamoto, and H. Nishihara, *Luminescent Heteroleptic Tris(dipyrrinato)indium(III) Complexes*. Inorganic Chemistry, 2014. **53**(7): p. 3275-3277.
44. Huang, R.W., et al., *Divalent cobalt, zinc, and copper coordination polymers based on a new bifunctional ligand: Syntheses, crystal structures, and properties*. Inorganic Chemistry Communications, 2014. **39**: p. 106-109.
45. Wang, X.M., et al., *Crystal transformation synthesis of a highly stable fluorescent 3D indium-tetranuclear {In-4(μ (2)-OH)(3)} building block based metal organic framework through a dinuclear complex*. Dalton Transactions, 2014. **43**(43): p. 16152-16155.
46. Wang, X.M., et al., *A series of novel indium complexes derived from aromatic carboxylic acids: Hydrothermal syntheses, crystal structures, supramolecular networks and fluorescent properties*. Inorganic Chemistry Communications, 2015. **55**: p. 73-76.
47. Zhou, P.P., et al., *Synthesis, Structure and Photoluminescent Properties of a New Ba(II)-Doped Cd(II) Coordination Polymer*. Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry, 2016. **46**(5): p. 783-786.



48. Tai, Y.X., et al., *Cadmium(II) and indium(III) complexes derived from 2-benzoylpyridine N(4)-cyclohexylthiosemicarbazone: Synthesis, crystal structures, spectroscopic characterization and cytotoxicity*. *Synthetic Metals*, 2016. **219**: p. 109-114.
49. Zhang, L.J., et al., *Multifunctional indium complexes with fluorescent sensing and selective adsorption dye properties*. *New Journal of Chemistry*, 2017. **41**(14): p. 6883-6892.
50. Mehta, P.K., et al., *Highly Sensitive Ratiometric Fluorescent Detection of Indium(III) Using Fluorescent Probe Based on Phosphoserine as a Receptor*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(19): p. 11256-11264.
51. Flegel, W.A.J.T., *Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis*. *Transfusion*, 2015. **55**(S2): p. S47-S58.
52. Sudha, K., A.V. Rao, and A.J.C.C.A. Rao, *Oxidative stress and antioxidants in epilepsy*. *Clinica Chimica Acta*, 2001. **303**(1-2): p. 19-24.
53. Fibach, E. and E.J.C.m.m. Rachmilewitz, *The role of oxidative stress in hemolytic anemia*. *Current molecular medicine*, 2008. **8**(7): p. 609-619.
54. Carvalho, F.A., et al., *Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes*. *ACS nano*, 2010. **4**(8): p. 4609-4620.
55. Girasole, M., et al., *Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation*. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*, 2007. **1768**(5): p. 1268-1276.
56. Girasole, M., et al., *The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology*, 2010. **6**(6): p. 760-768.
57. Sanna, D., et al., *Interaction of antidiabetic vanadium compounds with hemoglobin and red blood cells and their distribution between plasma and erythrocytes*. *Inorganic Chemistry*, 2014. **53**(3): p. 1449-1464.



-
58. Parr, R.G., L.v. Szentpály, and S.J.J.o.t.A.C.S. Liu, *Electrophilicity index*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(9): p. 1922-1924.
 59. Arrowsmith, R.L., et al., *Fluorescent gallium and indium bis (thiosemicarbazones) and their radiolabelled analogues: Synthesis, structures and cellular confocal fluorescence imaging investigations*. Dalton transactions, 2011. **40**(23): p. 6238-6252.
 60. Ghosh, S., et al., *Electronic structures and absorption spectra of Linkage Isomers of Trithiocyanato (4, 4', 4''-Tricarboxy-2, 2': 6, 2''-terpyridine) Ruthenium (II) complexes: a DFT study*. Inorganic chemistry, 2006. **45**(19): p. 7600-7611.
 61. Sathya, K., P. Dhamodharan, and M.J.J.o.M.S. Dhandapani, *Computational, spectral and structural studies of a new non linear optical crystal: 2-hydroxy pyridinium 3, 5-dinitrobenzoate*. Journal of Molecular Structure, 2017. **1130**: p. 414-424.
 62. Coe, B.J., M.K. Peers, and N.S.J.P. Scrutton, *Syntheses and electronic and optical properties of complexes of the bis (2, 2'-bipyrazyl) ruthenium unit*. Polyhedron, 2015. **96**: p. 57-65.



Anexos



Spectrum Mass

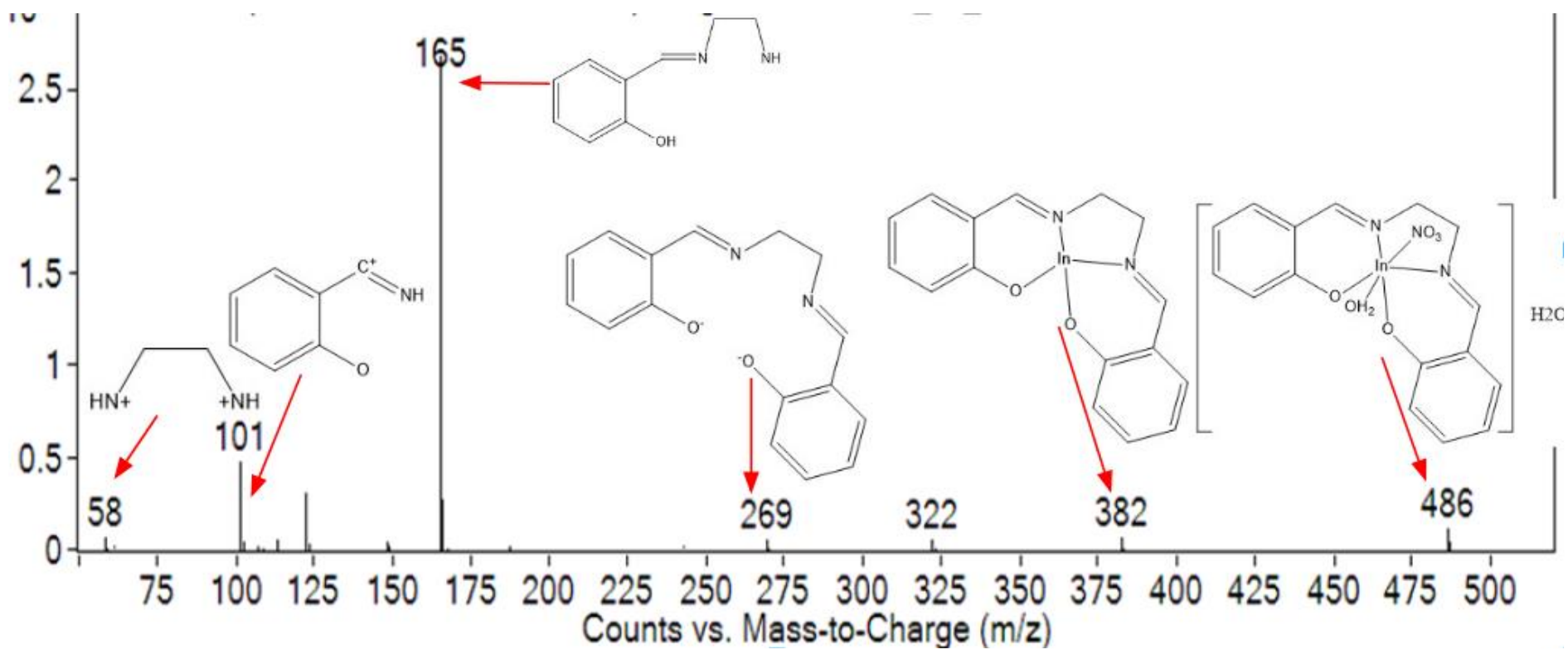
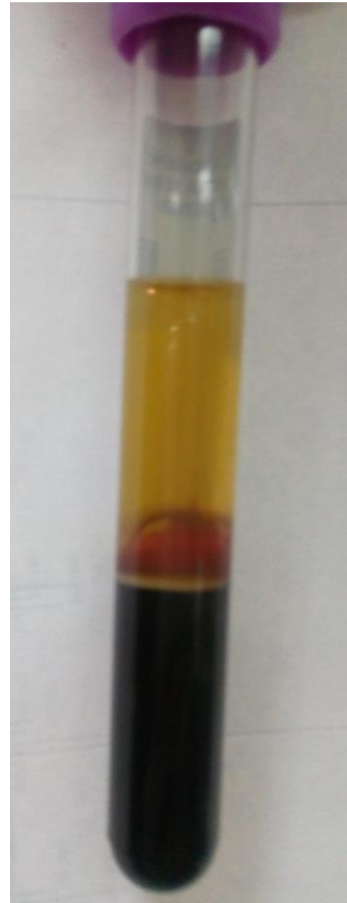


Fig. S.1 Espectro de masa de los fragmentos de $[\text{In}(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$



a)



b)

Fig. S2 a) Muestra de sangre roja fresca; b) después de centrifugar la muestra con anticoagulante

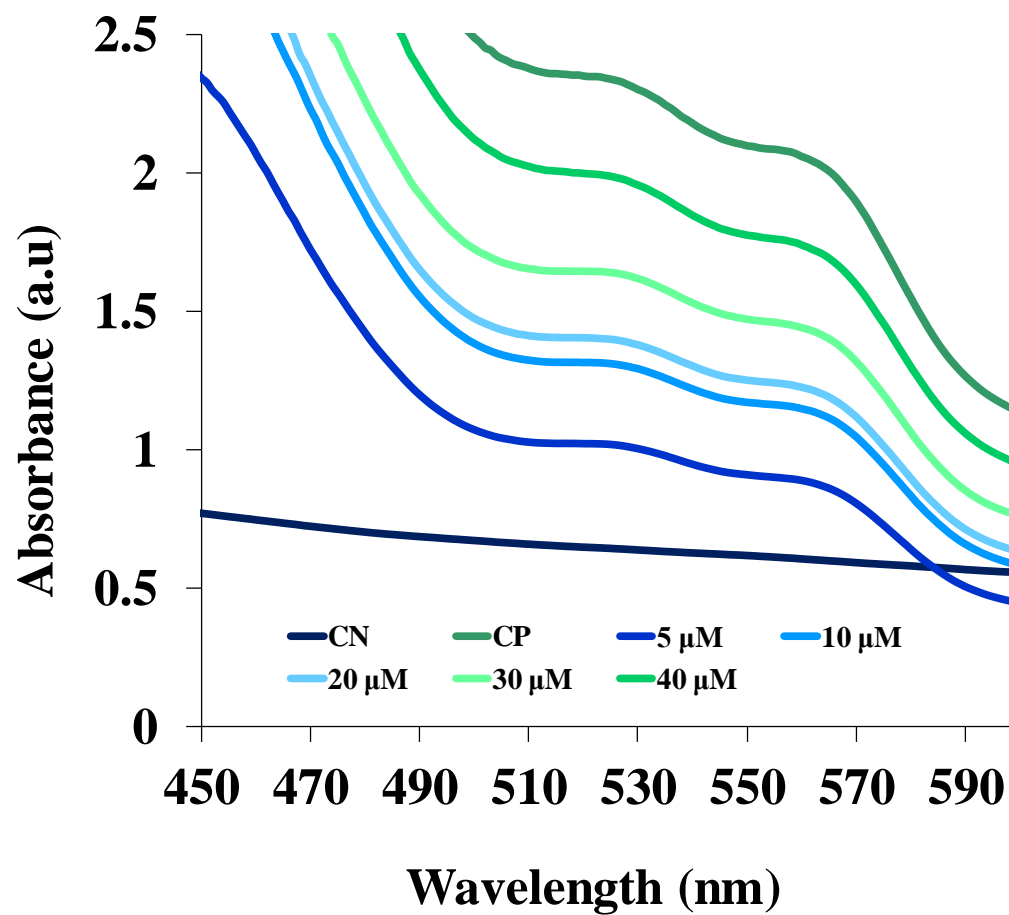


Fig. S3. Actividad hemolítica de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$ analizada por espectros UV-visible a diferentes concentraciones

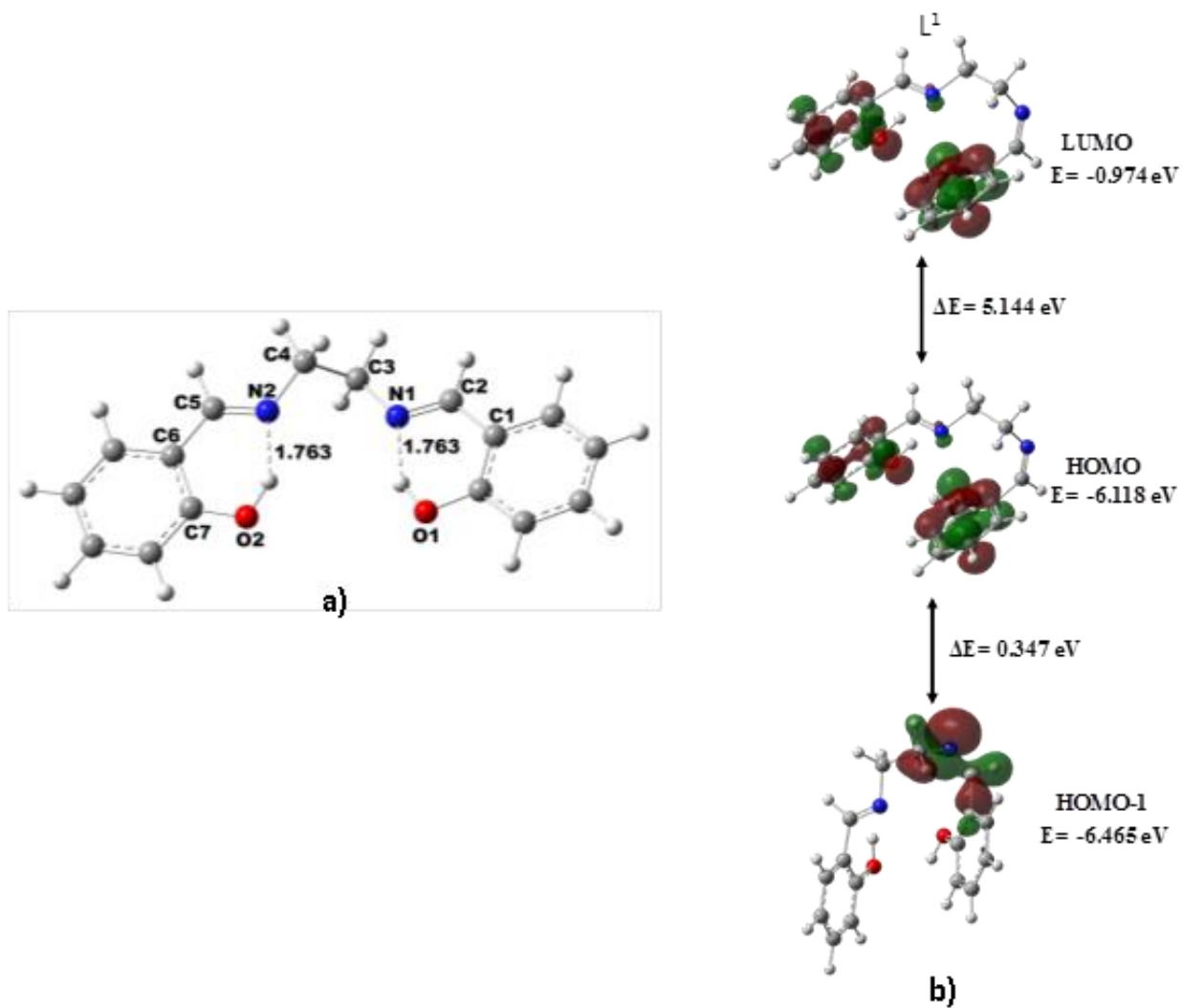


Fig. S4. Estructura optimizada con B3LYP/DGDZVP: (a) L¹ y (b) sus orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMOs).

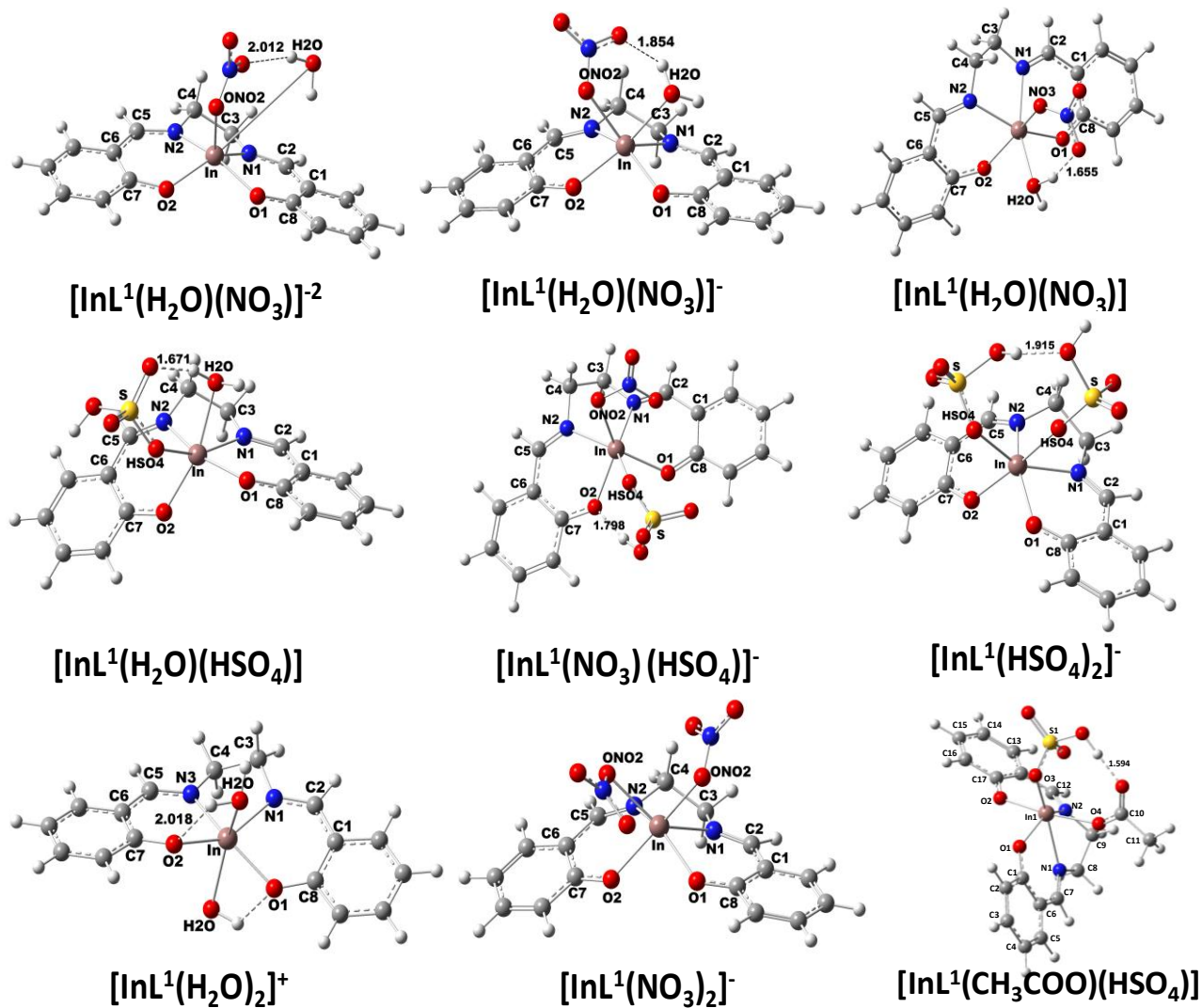
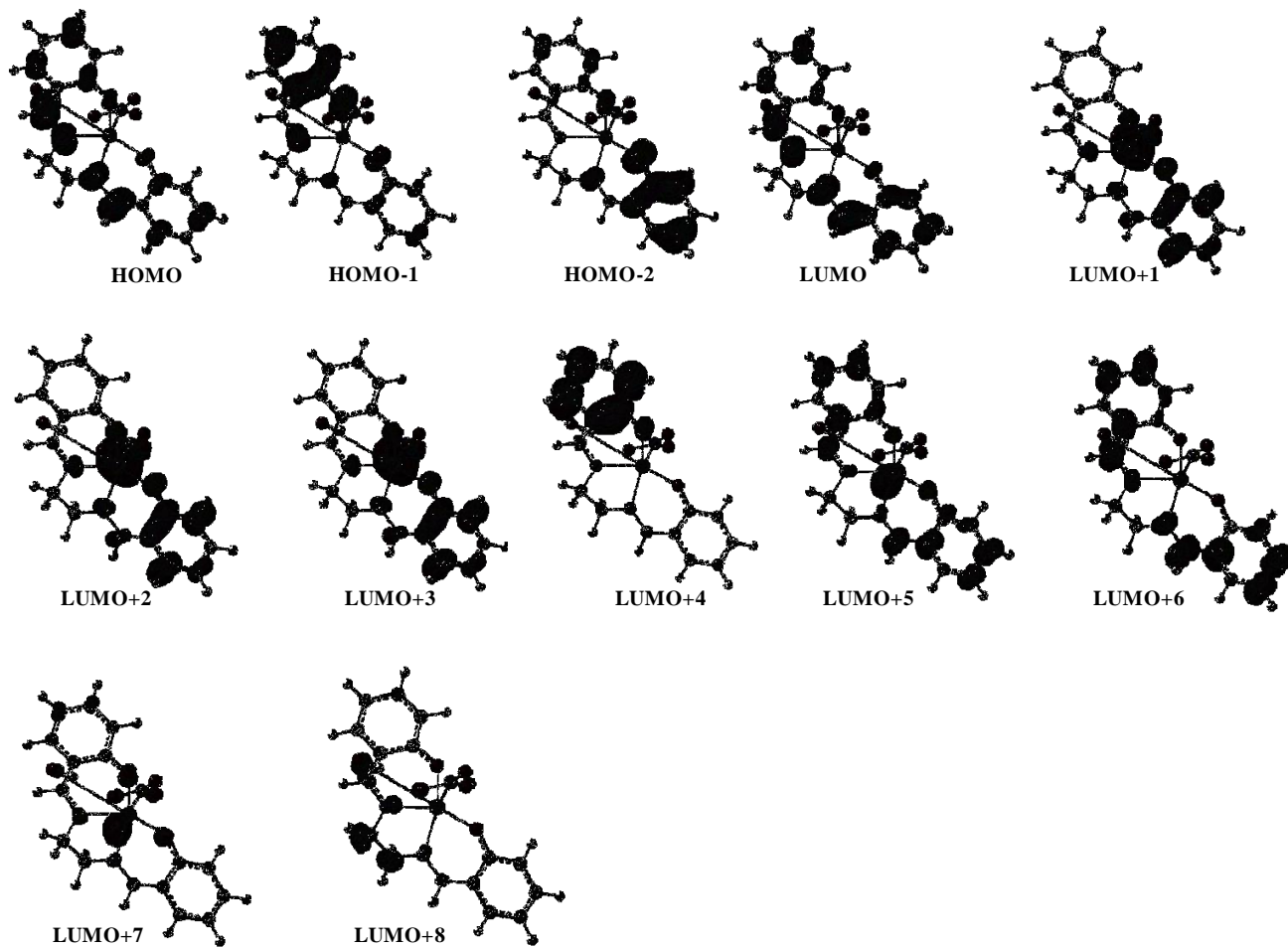
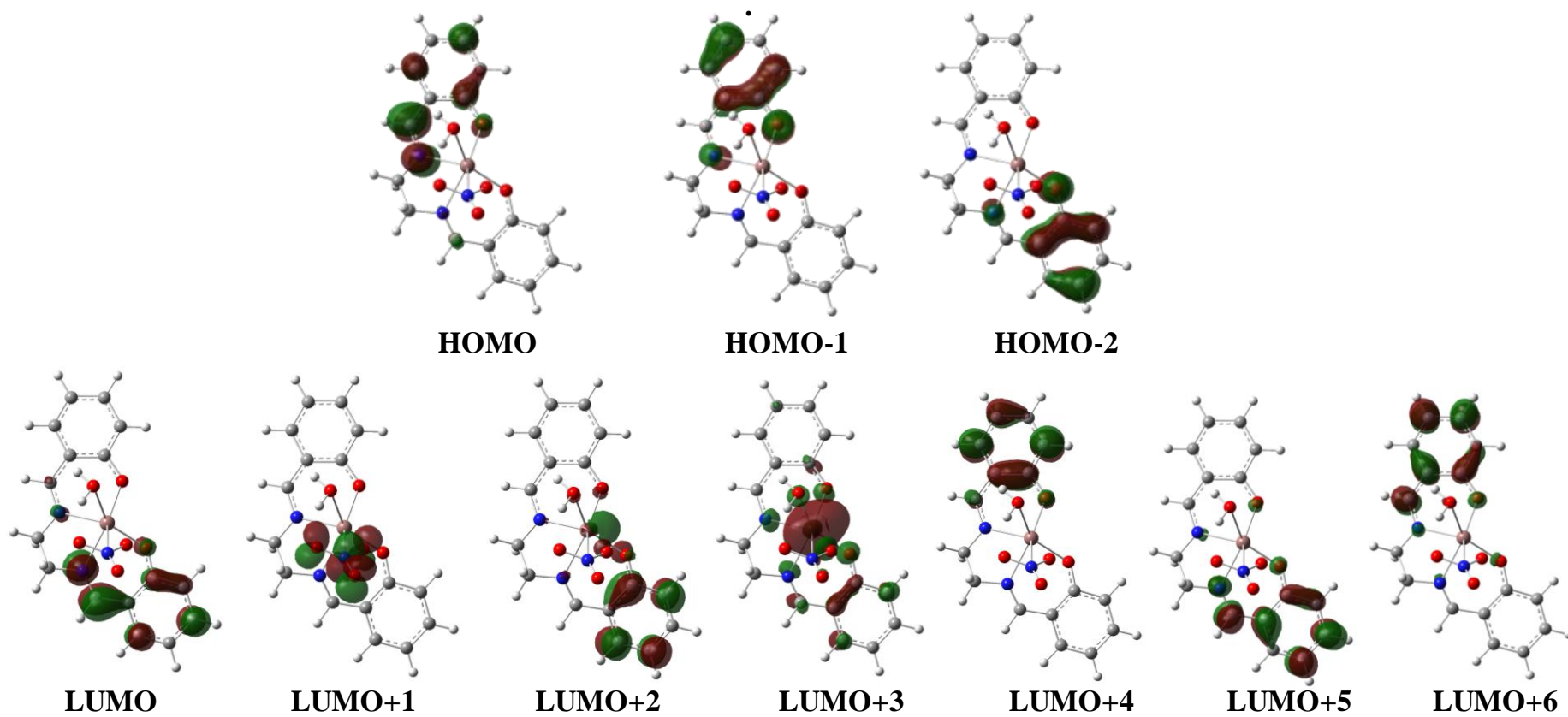


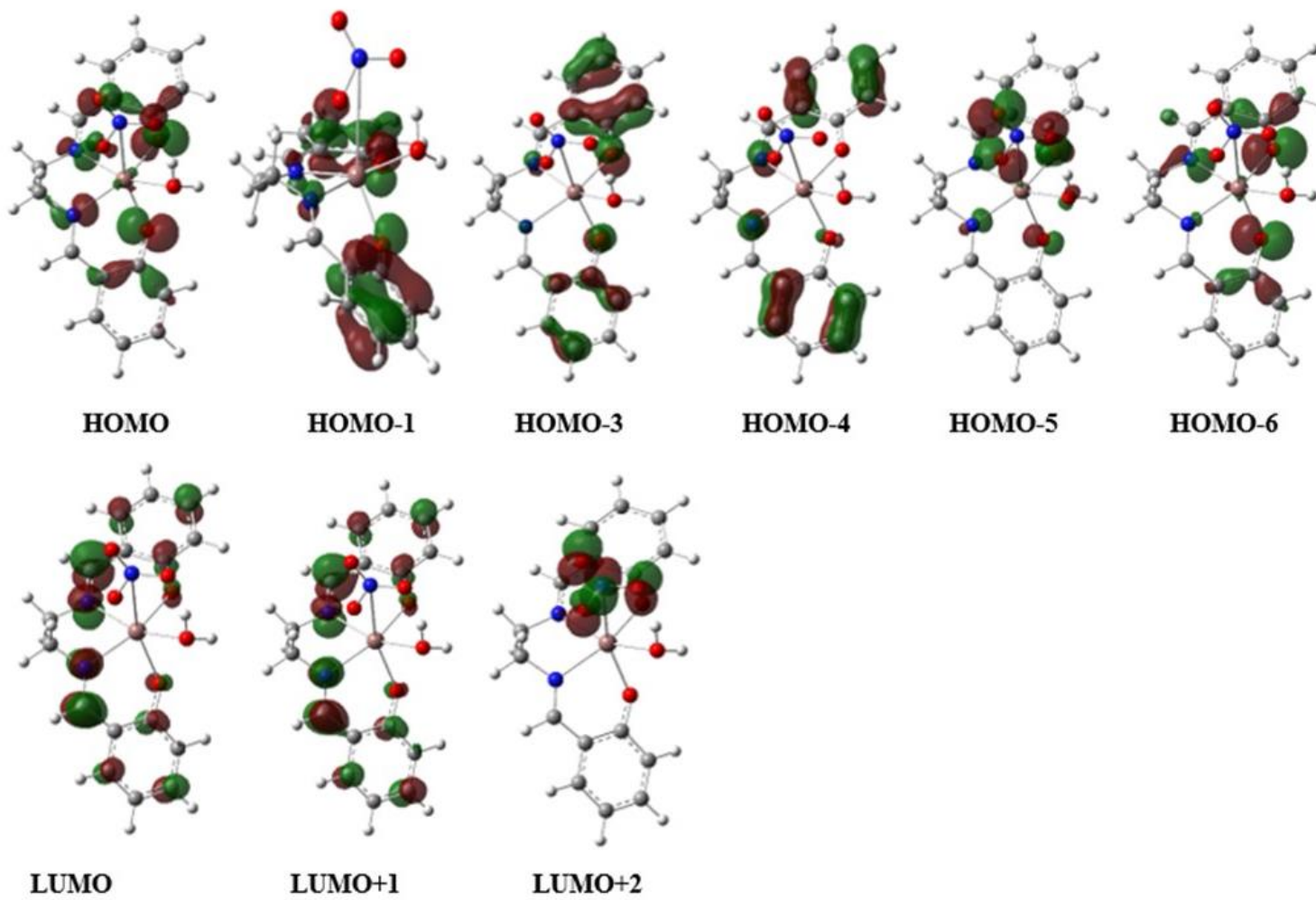
Fig. S5. Estructuras de los complejos optimizadas con B3LYP/DGDZVP en estado gaseoso.



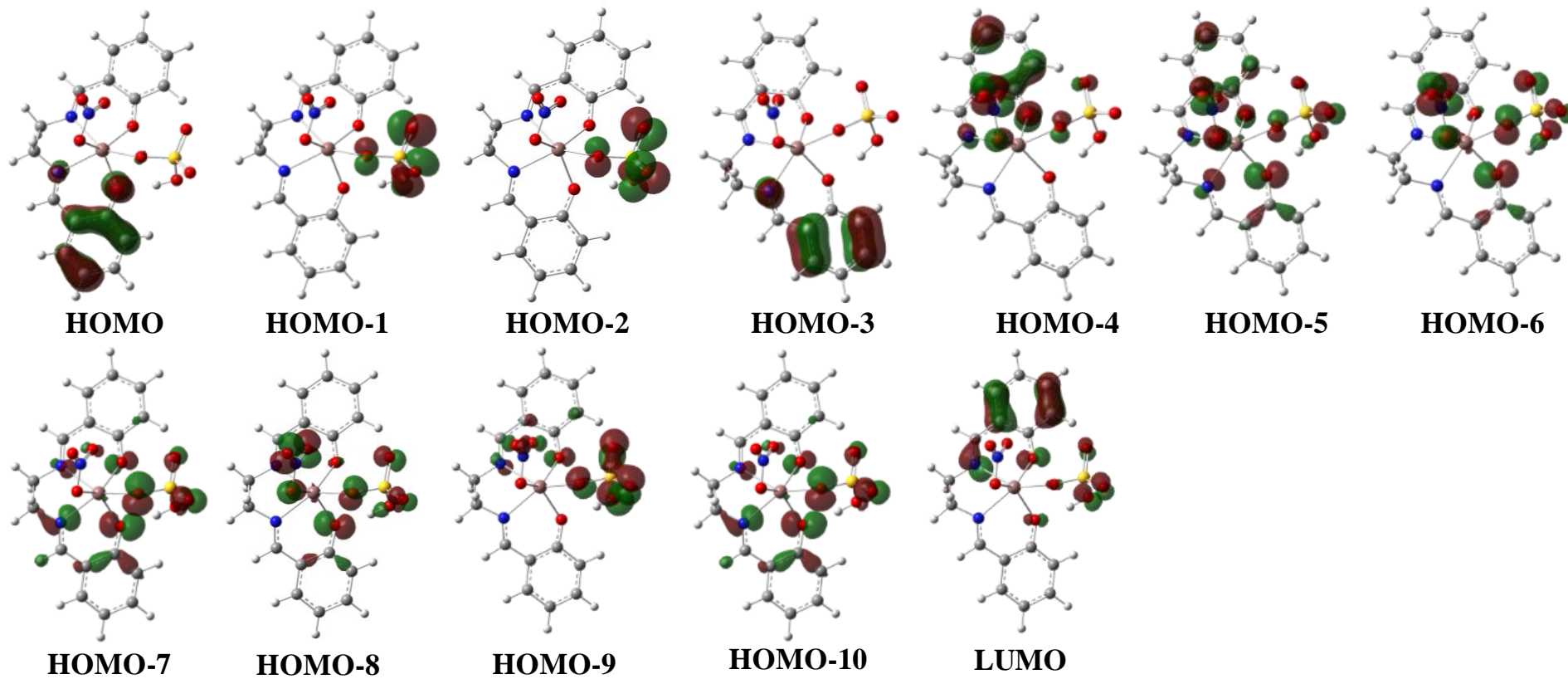
(a)



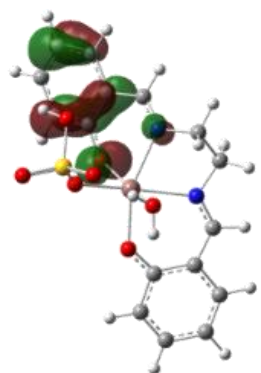
(b)



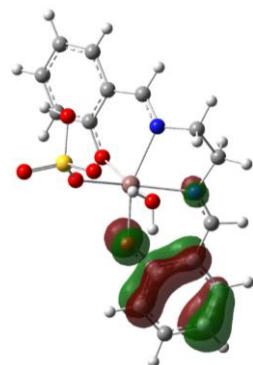
(c)



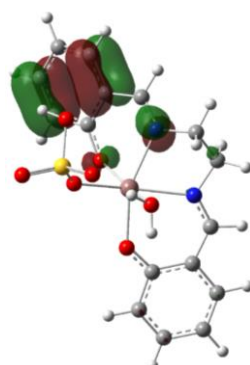
(d)



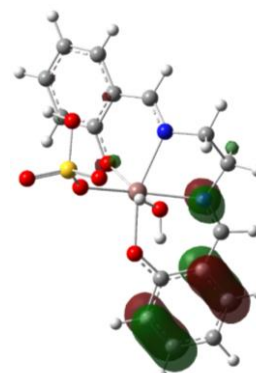
HOMO



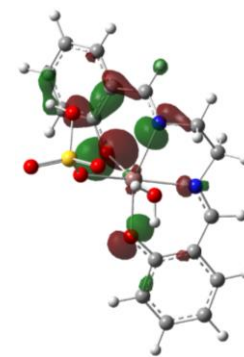
HOMO-1



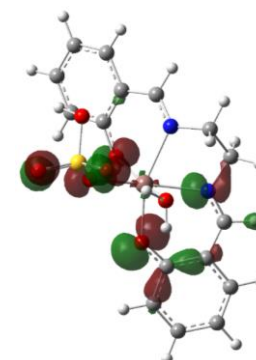
HOMO-2



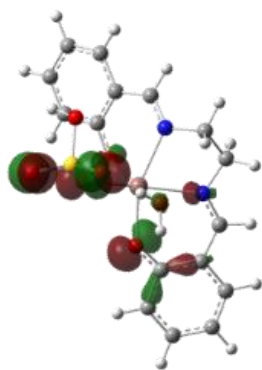
HOMO-3



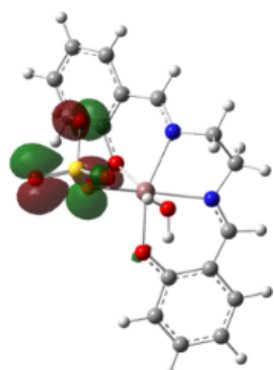
HOMO-4



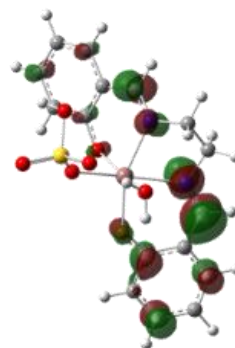
HOMO-5



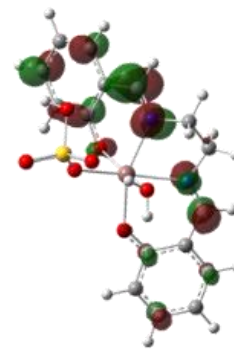
HOMO-6



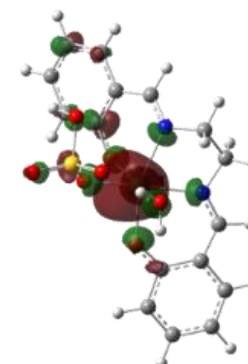
HOMO-7



LUMO

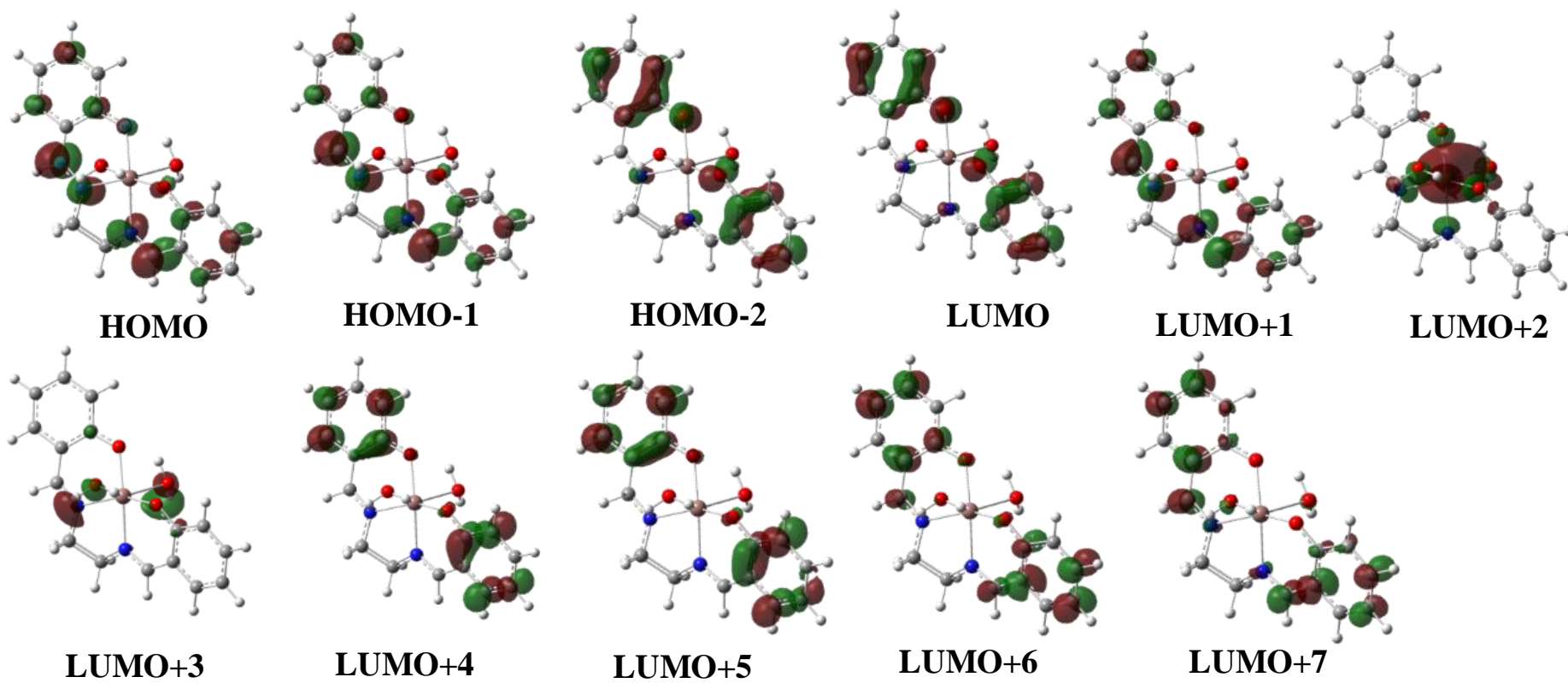


LUMO+1

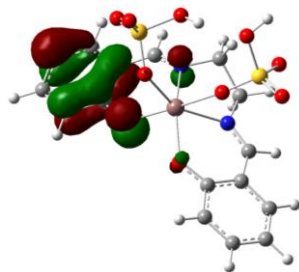


LUMO+2

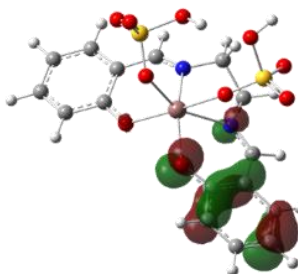
(e)



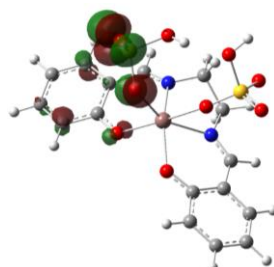
(f)



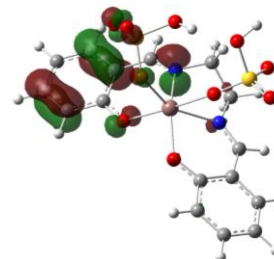
HOMO



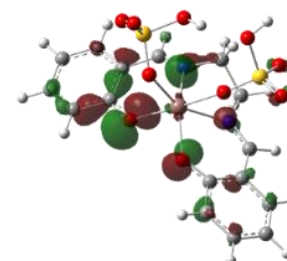
HOMO-1



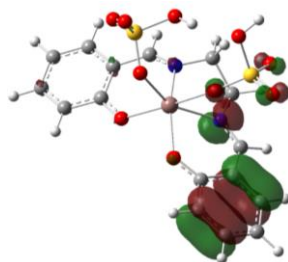
HOMO-2



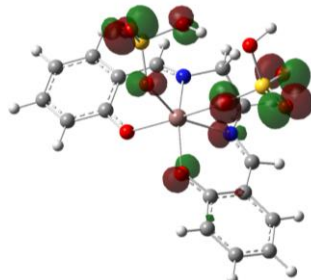
HOMO-3



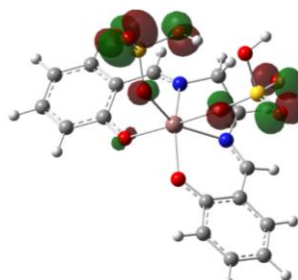
HOMO-4



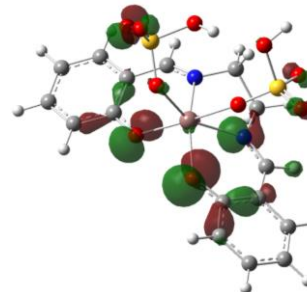
HOMO-5



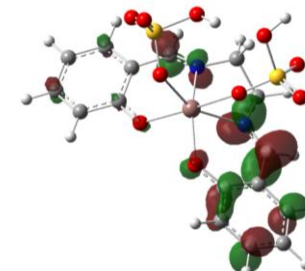
HOMO-6



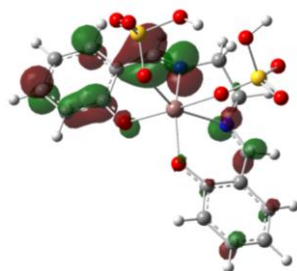
HOMO-7



HOMO-8

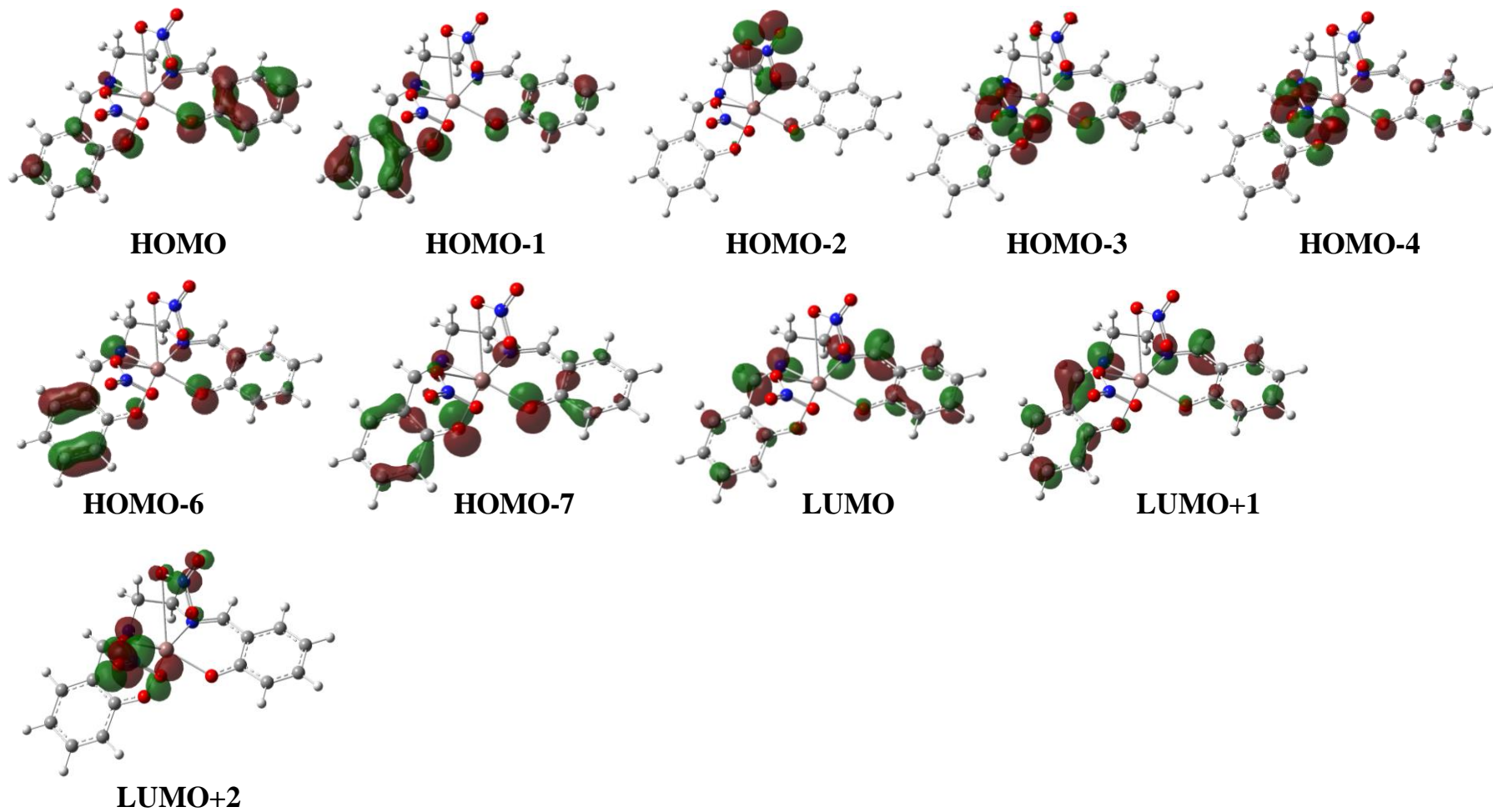


LUMO

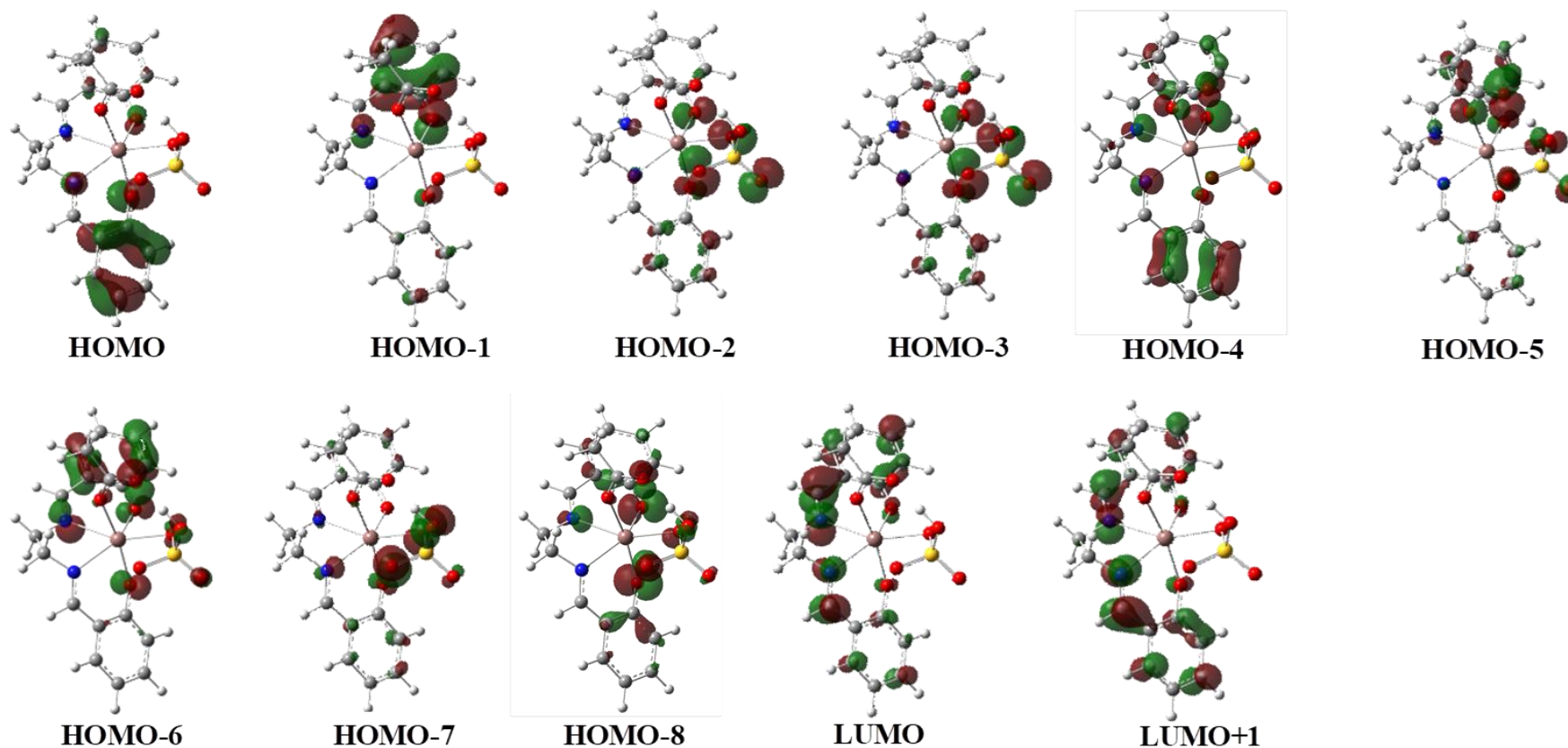


LUMO+1

(g)



(h)



(i)

Fig. S6. Orbitales moleculares: **(a)** $[\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]^{-2}$, **(b)** $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]^{-}$, **(c)** $[\text{InL}^1\text{H}_2\text{O}(\text{NO}_3)]$, **(d)** $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)(\text{NO}_3)]$, **(e)** $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, **(f)** $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]$, **(g)** $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^{-}$, and **(h)** $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^{-}$ y i) $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)(\text{CH}_3\text{COO})]^{-}$.

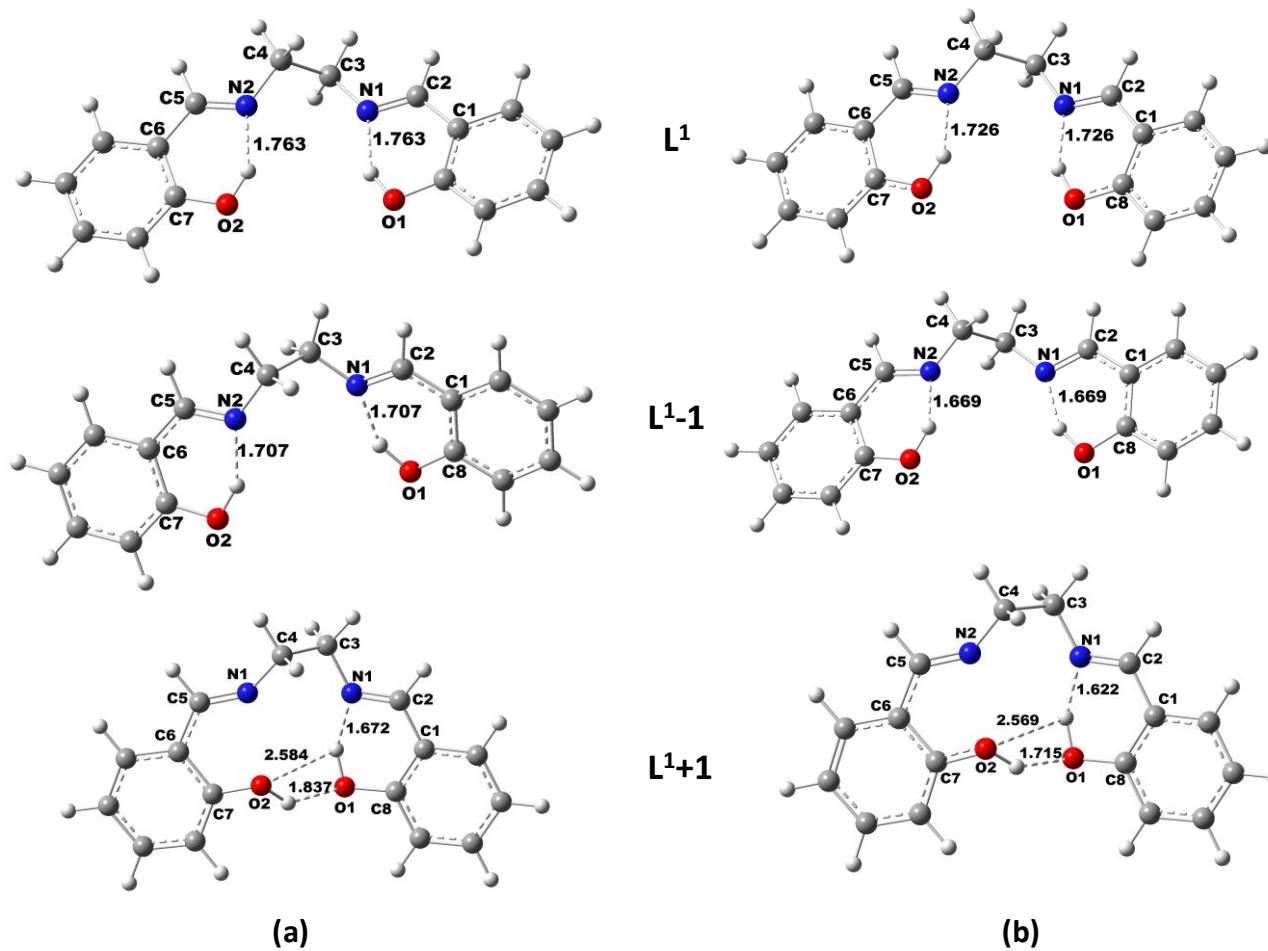
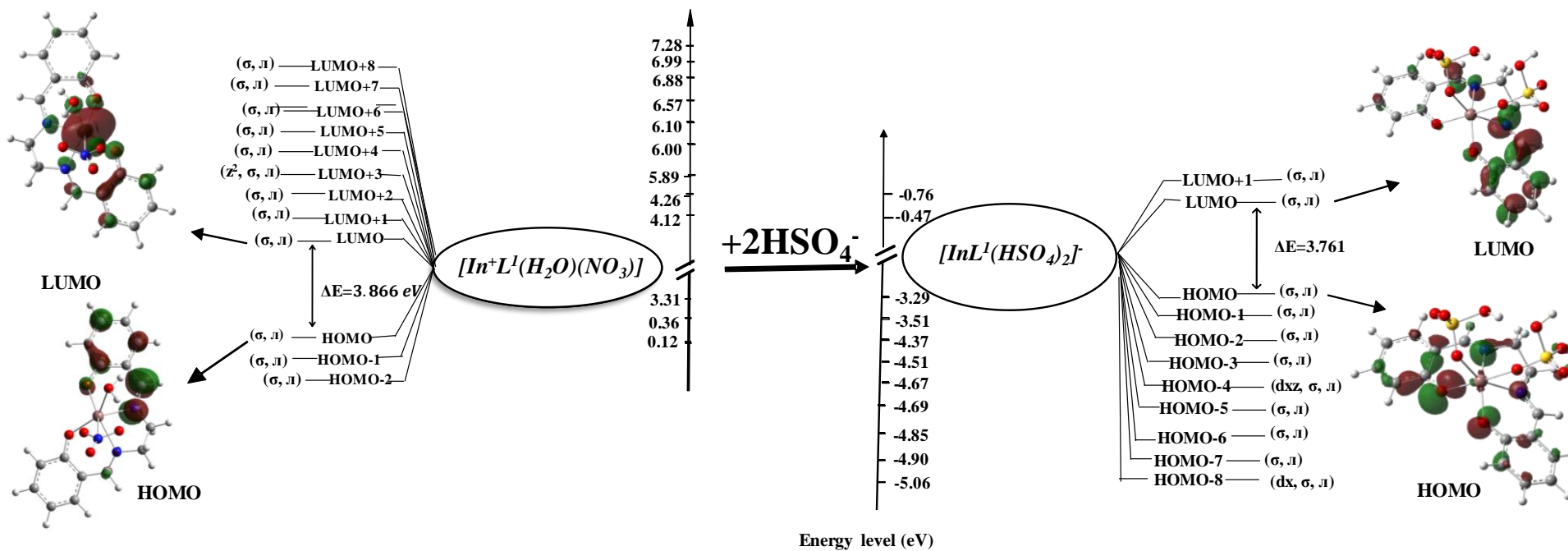
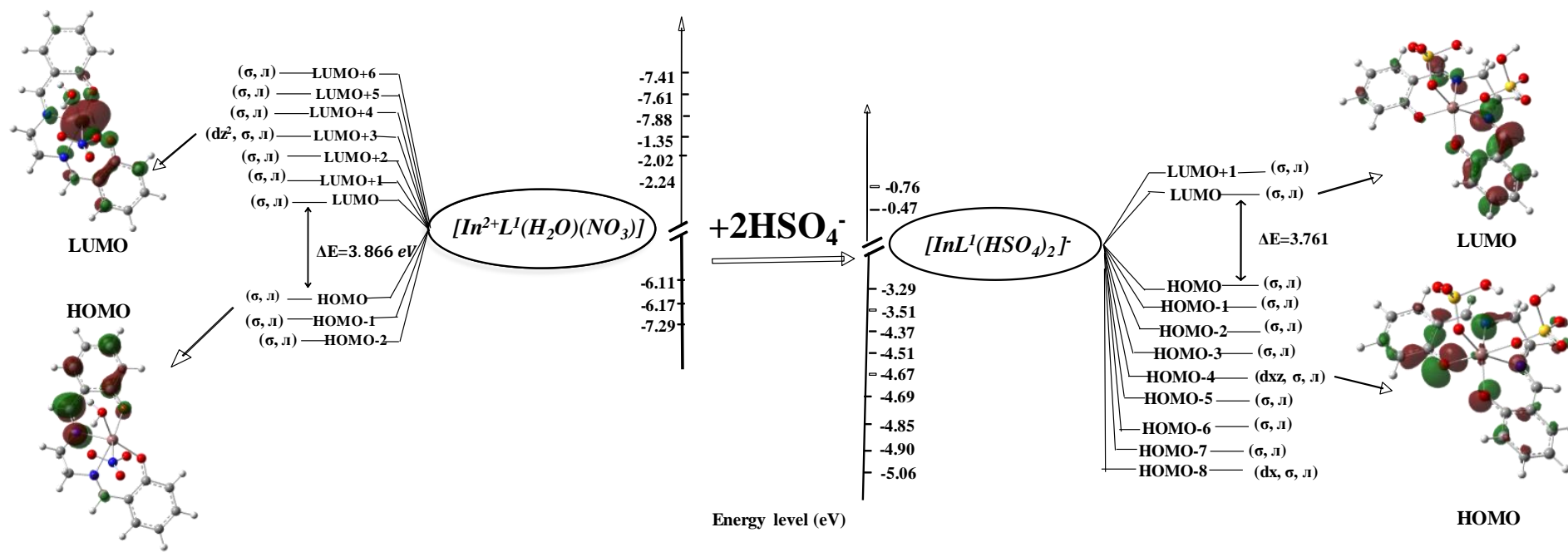
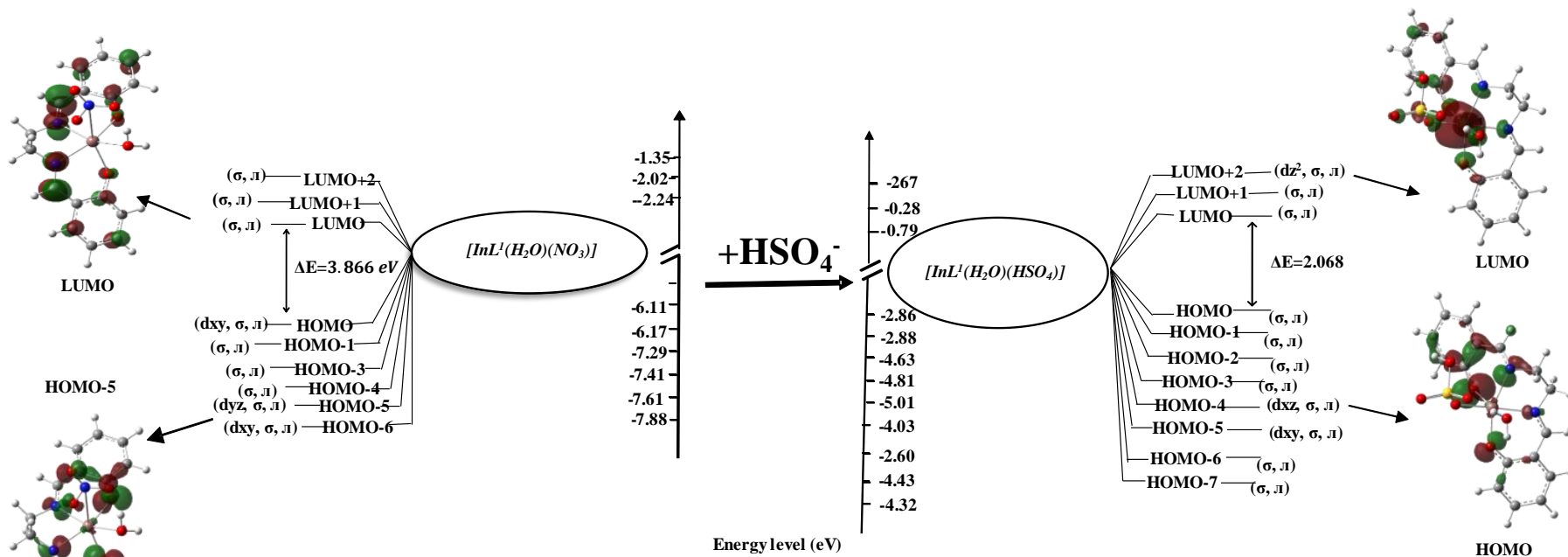
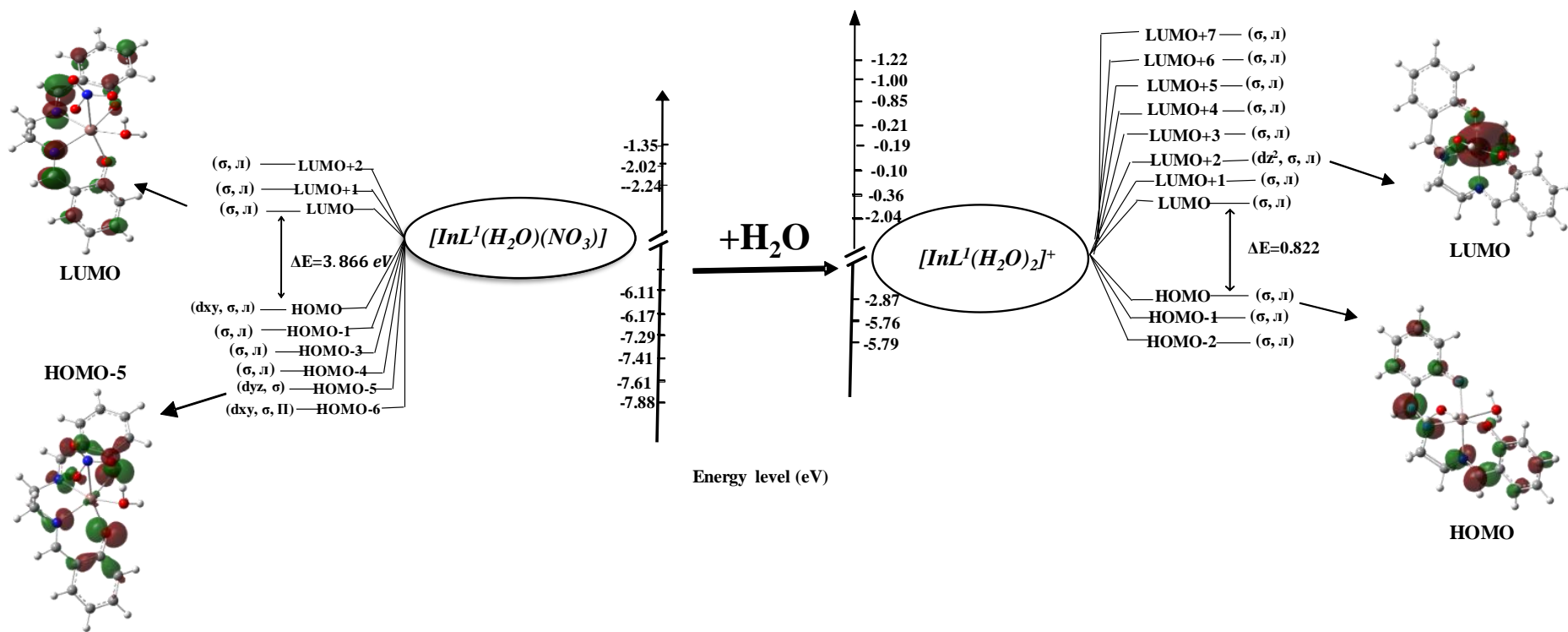


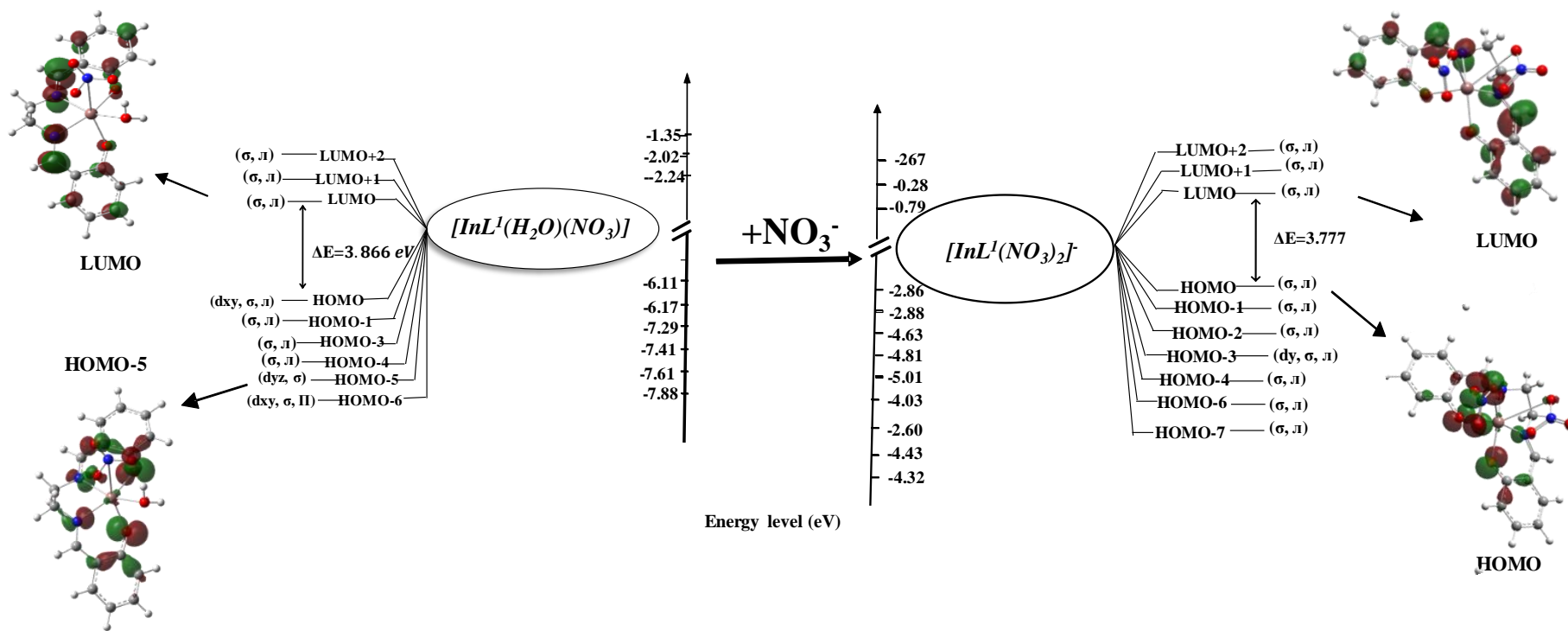
Fig. S7. Índices de Fukui: L^1 en diferentes métodos funcionales: **a)** b3lyp/dgdzvp and **b)** b3lyp/6-31g**

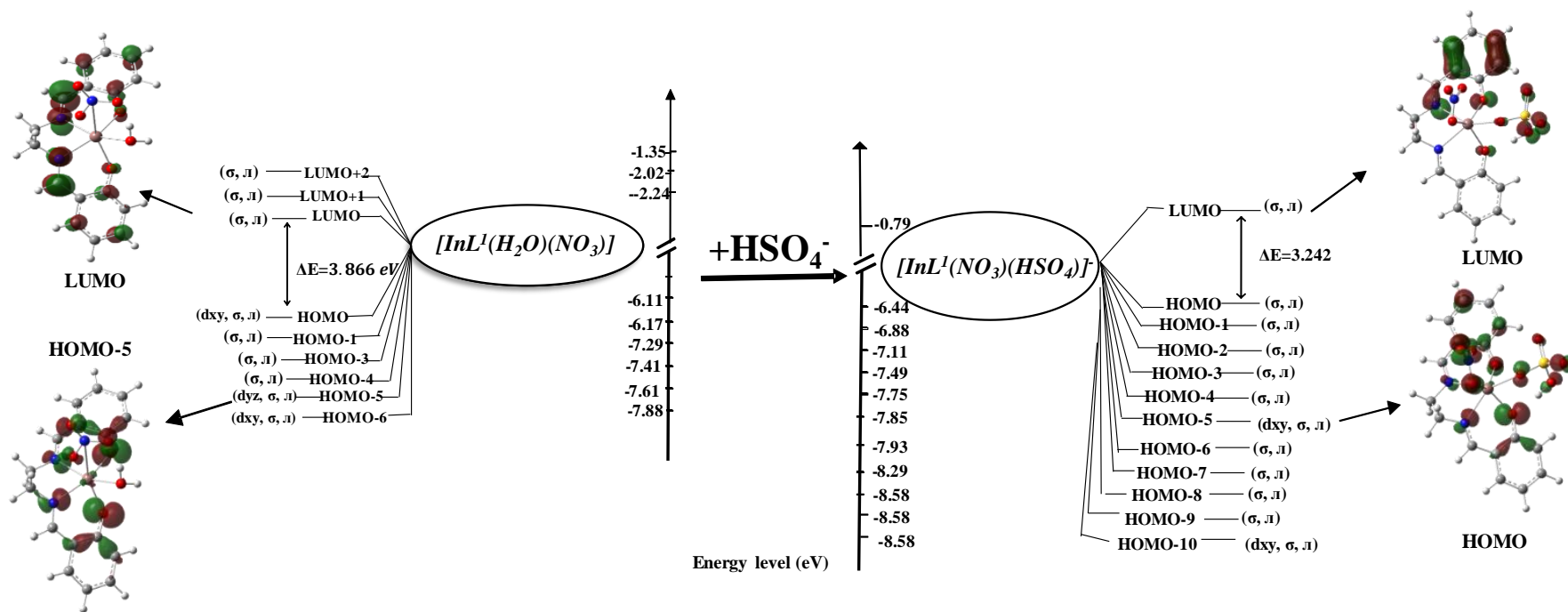


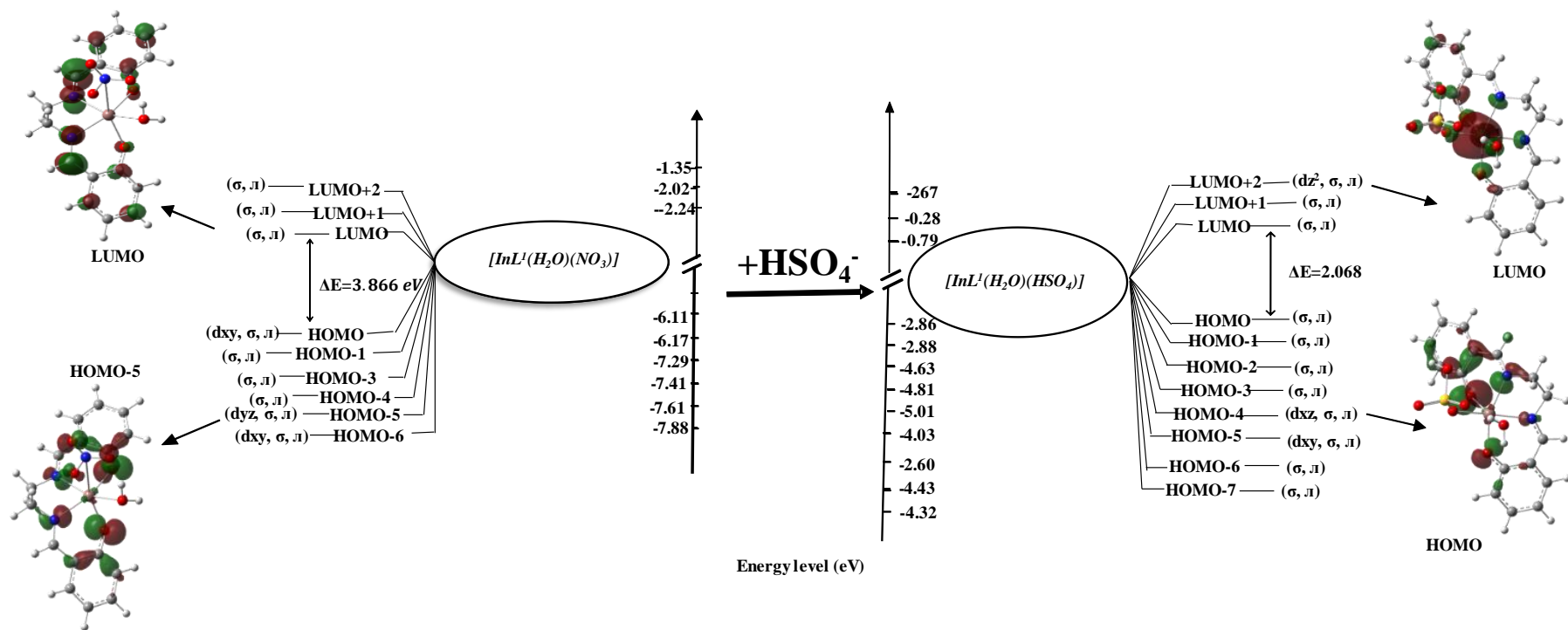












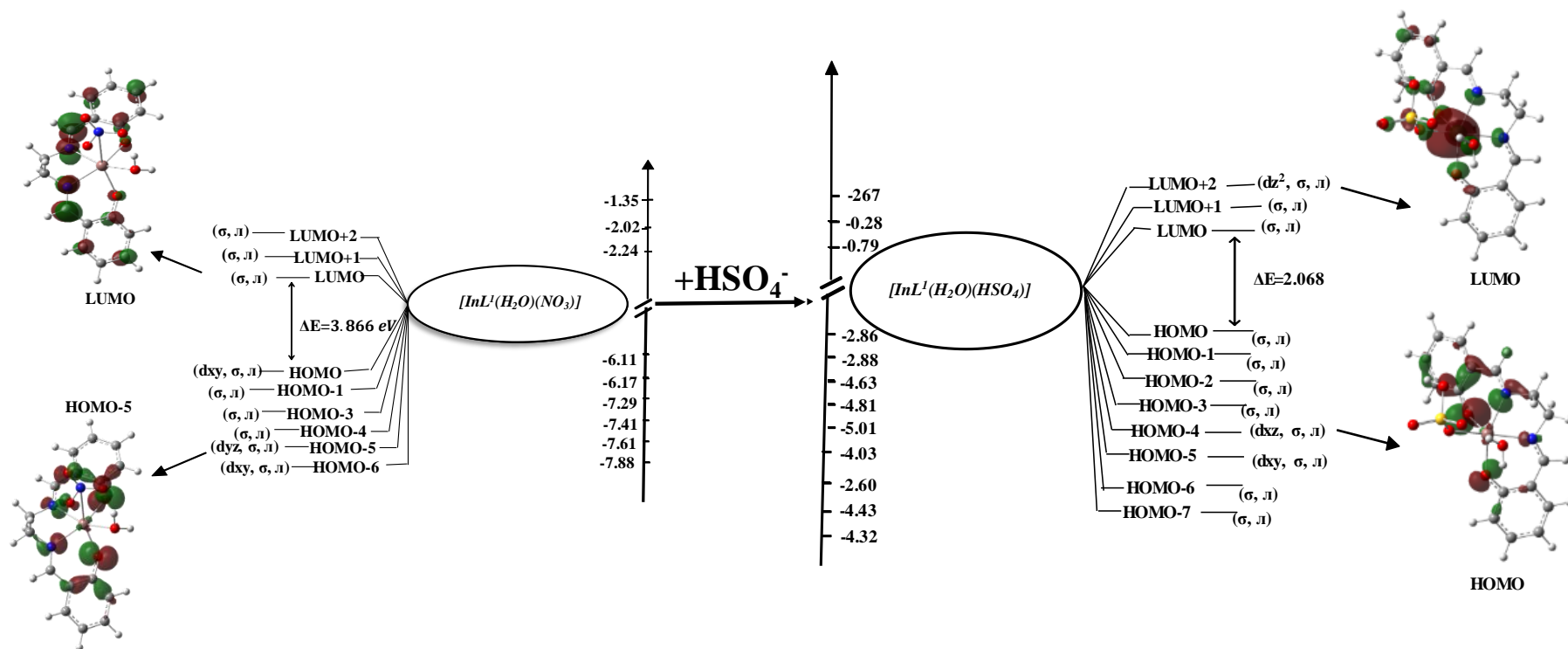


Fig. S8. Diagrama de nivel de energía de orbital molecular de frontera (eV) de complejos de indio (III).

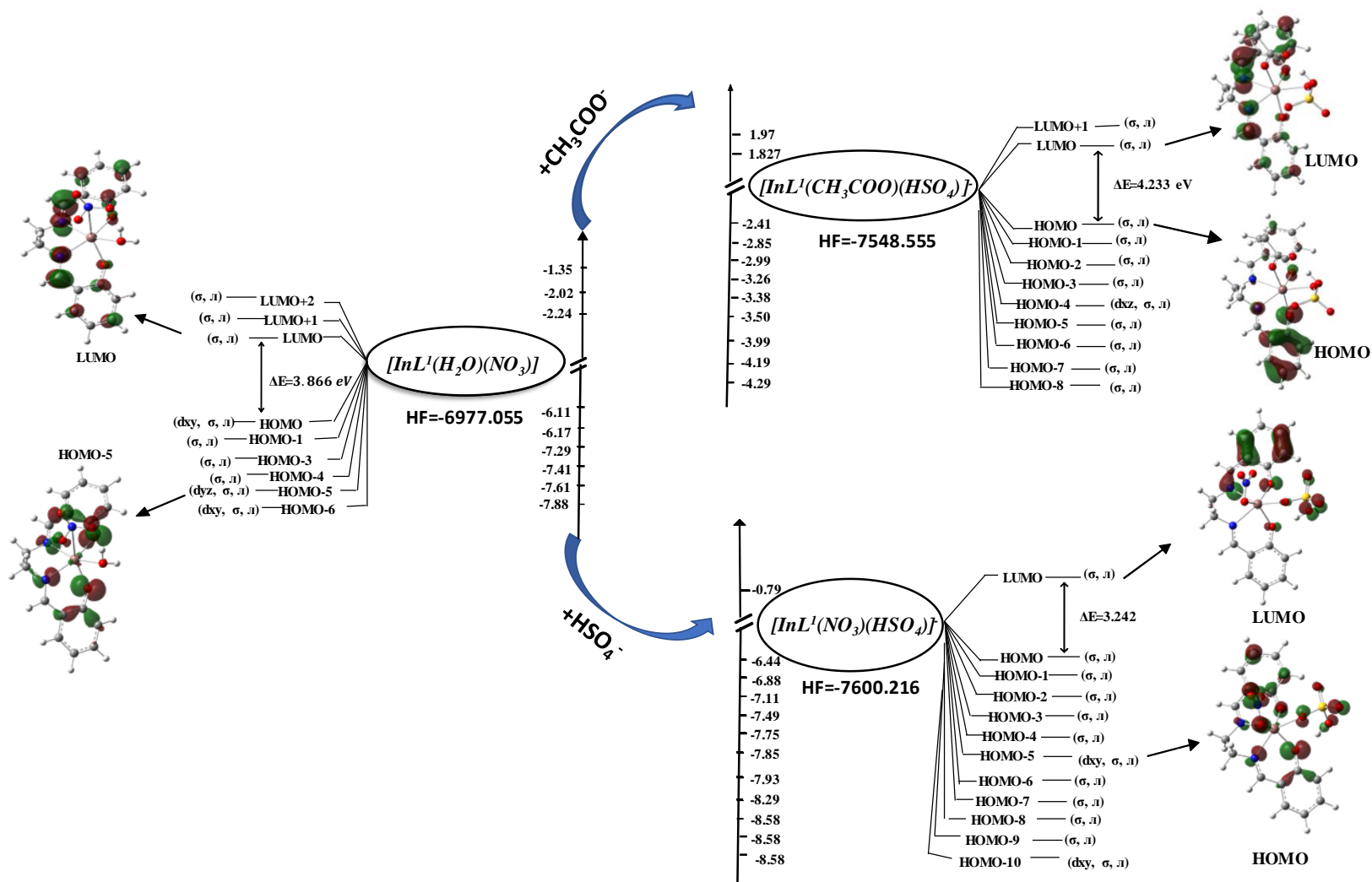


Fig. S9. Análisis comparativo de orbital molecular de $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ y adición de acetato.



Table S1. The optimized geometrical parameters (bond length in Å and bond angle °) for the salen ligand and indium complex in gaseous state.

B3LYP/DGDZVP											
Bond length complex (Å)											
	L		[InL ^I (NO ₃)(H ₂ O)] ²⁻	[InL ^I (NO ₃)(H ₂ O)] ⁻	[InL ^I (NO ₃)(H ₂ O)]	[InL ^I (H ₂ O) ₂] ⁺	[InL ^I (HSO ₄) ₂] ⁻	[InL ^I (NO ₃)(HSO ₄)] ⁻	[InL ^I (H ₂ O)(HSO ₄)]	[InL ^I (NO ₃) ₂]	[InL ^I (HSO)(AcO)] ⁻
C1-O1	1.368	In1-O1	2.115	2.100	2.125	2.113	2.147	2.165	2.117	2.423	2.153
C3-N1	1.205	In1-O2	2.124	2.142	2.108	2.113	2.113	2.238	2.101	2.155	2.159
C6-N2	1.206	In1-N1	2.169	2.176	2.275	2.185	2.305	2.276	2.295	2.361	2.456
C8-O2	1.367	In1-N2	2.178	2.301	2.248	2.185	2.256	2.418	2.295	2.336	2.308
O1-H-N1	2.666	In1-(ONO ₂)1	2.263	2.285	2.261	-	-	2.261	-	2.257	
O1-H-O2	2.529	In1-(OH ₂)1	4.687	2.442	2.273	2.404	-	-	2.354	-	
O2-H-O1	2.069	In-(OSO ₃ H)1	-	-	-	-	2.283	2.154	2.215	-	
		In-OAc	-	-	-	-	-	-	-	-	2.208
		In1-(OH ₂)2	-	-	-	2.404	-	-	-	-	
		In-(OSO ₃ H)2	-	-	-	-	2.163	-	-	-	
		In1-(ONO ₂)2	-	-	-	-	-	-	-	2.169	



		Bond Angle (°)									
C1,C13,O1	118.4	O1-In1-N1	86.9	88.1	84.5	87.0	83.8	74.5	84.0	79.4	77.1
C3,N1,C4	114.2	O1-In1-N2	156.0	144.8	156.0	152.3	149.5	129.0	157.5	137.1	141.1
C5,N2,C6	122.1	O1-In1-O2	97.3	90.2	99.0	115.9	90.2	84.6	105.0	87.1	92.7
C7,C8,O2	119.8	O1-In1-(ONO ₂)1	95.3	127.5	104.4	-	-	137.5	-	84.6	-
		O1-In1-(ONO ₂)2	-	-	-	-	-	-	-	138.1	-
		O1-In1-(OH ₂)1	87.7	81.4	87.3	92.3	-	-	88.1	-	-
		O1-In1-(HSO ₄)1	-	-	-	-	87.2	85.4	98.0	-	81.4
		O1-In1-(HSO ₄)2	-	-	-	-	109.6	-	-	-	-
		O1-In1-(OAc)									98.7
		N1-In1-N2	75.7	73.6	73.9	76.5	72.2	70.4	73.5	69.8	68.6
		O2-In1-N1	138.9	133.0	118.8	152.3	111.9	117.4	111.0	113.1	105.1
		N1-In1-(ONO ₂)1	126.0	132.3	83.5	-	-	93.6	-	85.1	
		N1-In1-(ONO ₂)2	-	-	-	-	-	-	-	139.3	
		N1-In1-(OH ₂)1	47.8	82.6	158.5	70.6	-	-	80.7	-	
		N1-In1-(HSO ₄)1	-	-	-	-	78.9	149.2	161.1	-	154.2
		N1-In1-(HSO ₄)2	-	-	-	-	153.5	-	-	-	
		N1-In1-(OAc)									75.3



	N2-In1-O2	85.5	81.6	82.8	87.0	82.0	80.1	83.2	78.6	79.5
	N2-In1-(ONO ₂)1	108.4	85.6	83.8	-	-	81.2	-	120.5	
	N2-In1-(ONO ₂)2	-	-	-	-	-	-	-	82.3	
	N2-In1-(OH ₂)1	92.7	124.0	116.6	110.8	-	-	88.6	-	
	N2-In1-(OH ₂)2	-	-	-	94.4	-	-	-	-	
	N2-In1-(HSO ₄)1	-	-	-	-	105.7	139.2	103.4	-	
	N2-In1-(HSO ₄)2	-	-	-	-	100.1	-	-	-	136.0
	N2-In1-(OAc)									89.9
	O2-In1-(ONO ₂)1	94.4	83.2	149.2	-	-	135.1	-	158.2	
	O2-In1-(ONO ₂)2	-	-	-	-	-	-	-	88.7	
	O2-In1-(OH ₂)1	171.6	143.3	82.0	70.6	-	-	163.0	-	
	O2-In1-(OH ₂)2	-	-	-	92.3	-	-	-	-	
	O2-In1-(HSO ₄)1	-	-	-	-	168.5	82.8	86.8	-	
	O2-In1-(HSO ₄)2	-	-	-	-	91.3	-	-	-	168.2
	O2-In1-(OAc)									89.8



Tabla S2. Propiedades electrónicas optimizadas de los complejos con B3LYP/DGDZVP.

Compuesto	Orbital Molecular			ΔE (eV)	Dureza (η , eV)	Blandura (α , eV)
	HF	HOMO (eV)	LUMO (eV)			
L^1						
$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{-2}$	-6977.013	3.307	4.119	0.812	0.406	2.464
$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$	-6977.088	2.413	0.997	-1.416	1.705	0.586
$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$	-6977.055	-6.106	-2.240	3.866	1.933	0.517
$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$	-7600.216	-6.444	-3.202	3.242	1.621	0.617
$[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$	-7396.369	-2.865	-0.797	2.068	1.034	0.967
$[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$	-6773.069	-2.868	-2.046	0.822	0.411	2.433
$[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$	-8019.699	-3.290	0.471	3.761	1.881	0.532
$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$	-7181.063	-3.089	0.688	3.777	1.888	0.529
$[\text{InL}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$	-7548.555	-2.414	1.819	4.233	2.116	0.472



Tabla S3. Cargas de Mulliken del complejo de indio en estado gaseoso.

DGDZVP									
Átomos	$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{-2}$	$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$	$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$	$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$	$[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$	$[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$	$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$	$[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$	$[\text{InL}^1(\text{HSO})(\text{AcO})^-$
O1	-0.645	-0.624	-0.602	-0.416	-0.608	-0.582	-0.550	-0.685	-0.550
O2	-0.637	-0.577	-0.598	-0.650	-0.594	-0.574	-0.547	-0.685	-0.564
N1	-0.396	-0.411	-0.301	-0.285	-0.297	-0.210	-0.262	-0.380	-0.234
N2	-0.380	-0.281	-0.302	-0.210	-0.312	-0.285	-0.261	-0.380	-0.266
(NO ₃)1	-0.442	-0.434	-0.487	-0.730	-	-	-0.434	-	-
(NO ₃)2	-	-	-	-	-	-	-0.385	-	-
(H ₂ O)1	-0.919	-0.848	-0.866	-	-0.700	-	-	-0.831	-
(H ₂ O)2	-	-	-	-	-	-	-	-0.831	-
(HSO ₄)1	-	-	-	-0.650	-0.886	-0.730	-	-	-
(HSO ₄)2	-	-	-	-	-	-0.444	-	-	-
CH ₃ COO	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.671
In ⁺	1.062	-	-	-	-	-	-	-	-0.526
In ²⁺	-	1.078	-	-	-	-	-	-	-
In ³⁺	-	-	1.102	1.105	1.172	1.206	1.099	1.063	1.148



Tabla S4. Índices de Fukui condensado-a-átomo para el ligando (L^1) en estado gaseoso.

L	B3LYP/DGDZVP						B3LYP/6-31G**					
	Carga Hirshfeld			Fukui			Carga NPA			Fukui		
	N	N+1	N-1	f	f^+	f^0	N	N+1	N-1	f	f^+	f^0
O1	-0.550	-0.580	-0.654	-0.074	0.030	-0.037	-0.567	-0.597	-0.631	-0.064	0.030	-0.017
O2	-0.550	-0.580	-0.553	0.027	0.030	0.014	-0.567	-0.597	-0.526	0.041	0.030	0.036
N1	-0.317	-0.359	-0.347	-0.030	0.042	0.006	-0.490	-0.516	-0.516	-0.026	0.026	0.000
N2	-0.317	-0.358	0.021	0.338	0.041	0.190	-0.490	-0.515	-0.222	0.268	0.025	0.147
C1	0.149	0.144	0.161	0.012	0.005	0.009	0.051	0.068	0.056	0.005	-0.017	-0.006
C2	-0.124	-0.182	-0.112	0.012	0.058	0.035	0.170	0.101	0.188	0.018	0.069	0.044
C3	-0.319	-0.320	-0.329	-0.010	0.001	-0.005	-0.048	-0.022	-0.063	-0.015	-0.026	-0.021
C4	-0.319	-0.320	-0.343	-0.024	0.001	-0.012	-0.048	-0.022	-0.095	-0.047	-0.026	-0.037
C5	-0.124	-0.182	-0.143	-0.019	0.058	0.020	0.170	0.101	0.146	-0.024	0.069	0.023
C6	0.149	0.144	0.181	0.032	0.005	0.019	0.051	0.068	0.074	0.023	-0.017	0.003
C7	0.264	0.244	0.362	0.098	0.020	0.059	0.306	0.288	0.323	0.017	0.018	0.018
C8	0.264	0.244	0.307	0.043	0.020	0.032	0.306	0.288	0.299	-0.007	0.018	0.006



Tabla S5. Espectros TD DFT de complejos de indio $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$ y $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$

Longitud de onda (nm)	Osc. Fuerte	Contribución molecular	Cácter	Experimental (nm)	Teórico (nm)
$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$					
2657.8	0.0059	HOMO->LUMO+1 (98%)	MLCT		
1153.4	0.2932	HOMO->LUMO (140%)	MLCT		
668.1	0.0021	HOMO->LUMO+2 (76%)	MLCT		
		HOMO->LUMO+3 (22%)			
		HOMO->LUMO+3 (74%)	MLCT		
592.0	0.0066	HOMO->LUMO+2 (23%)			
559.4	0.0163	HOMO->LUMO+4 (97%)	ML		537
454.8	0.0341	HOMO->LUMO+5 (78%)	ML		453
		HOMO->LUMO+7 (10%)			
		HOMO->LUMO+7 (72%)	ML		
412.1	0.01	HOMO-1->LUMO (23%)			
		HOMO->LUMO+6 (71%)	ML		
396.3	0.0126	HOMO-2->LUMO (21%)			
377.9	0.024	HOMO->LUMO+8 (97%)	ML		388
		HOMO-1->LUMO+1 (86%)	ML		
376.0	0.0084	HOMO-1->LUMO (11%)			
$[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$					



1918.7	0.0596	HOMO->LUMO (101%)	MLCT	
1185.2	0.0041	HOMO->LUMO+1 (100%)	MLCT	
		HOMO->LUMO+2 (58%)	MLCT	
639.8	0.001	HOMO->LUMO+3 (40%)		
		HOMO->LUMO+3 (59%)	MLCT	
552.6	0.0026	HOMO->LUMO+2 (41%)		
529.1	0.0253	HOMO->LUMO+4 (93%)	ML	532
		HOMO-2->LUMO (39%)	ML	
477.5	0.0003	HOMO-1->LUMO (38%)		
		HOMO->LUMO (31%)	ML	
		HOMO->LUMO+6 (25%)		
		HOMO->LUMO+2 (24%)		
446.1	0.0024	HOMO-1->LUMO (10%)		
		HOMO->LUMO+5 (38%)	ML	
422.8	0.0159	HOMO-1->LUMO (26%)		
		HOMO->LUMO+6 (18%)		
		HOMO->LUMO (12%)		
		HOMO->LUMO (47%)	ML	
416.6	0.0017	HOMO-1->LUMO (21%)		
		HOMO->LUMO+5 (47%)	ML	428
		HOMO-1->LUMO (27%)		
403.8	0.001	HOMO->LUMO+6 (13%)		

[InL¹(NO₃)(H₂O)]



1918.7	0.0596	HOMO->LUMO (101%)	MLCT	
1185.2	0.0041	HOMO->LUMO+1 (100%)	MLCT	
375.3	0.0245	HOMO->LUMO (96%)	MLCT	
		HOMO-1->LUMO+1 (3%)		
360.9	0.0581	HOMO-1->LUMO (98%)	MLCT	364
346.1	0.0557	HOMO-1->LUMO (98%)	MLCT	
342.1	0.0079	HOMO-1->LUMO+1 (89%)	MLCT	
		HOMO->LUMO+1 (7%)		
		HOMO->LUMO (3%)		
299.2	0.0035	HOMO->LUMO+2 (36%)	ML	309
		HOMO-4->LUMO+2 (31%)		
		HOMO-1->LUMO+2 (25%)		
		HOMO-5->LUMO+2 (5%)		
294.9	0.0017	HOMO-4->LUMO+2 (46%)	ML	
		HOMO->LUMO+2 (37%)		
		HOMO-5->LUMO+2 (8%)		
		HOMO-1->LUMO+2 (4%)		
		HOMO-4->LUMO+1 (3%)		
291.1	0.0147	HOMO-5->LUMO (39%)	ML	
		HOMO-4->LUMO (27%)		
		HOMO-2->LUMO (9%)		
		HOMO-6->LUMO+1 (8%)		



		HOMO-3->LUMO (5%)		
		HOMO-5->LUMO+1(3%)		
		HOMO-4->LUMO+1 (2%)		
288.7	0.0017	HOMO-1->LUMO+2 (70%)	ML	
		HOMO->LUMO+2 (26%)		
		HOMO-4->LUMO+2 (2%)		
281.2	0.0267	HOMO-6->LUMO (30%)	ML	282
		HOMO-5->LUMO+1 (27%)		
		HOMO-4->LUMO+1 (13%)		
		HOMO-2->LUMO (7%)		
		HOMO-5->LUMO (7%)		
		HOMO-4->LUMO (5%)		
		HOMO-6->LUMO+1 (4%)		
277.6	0.214	HOMO-2->LUMO (77%)	ML	260
		HOMO-5->LUMO+1 (6%)		
		HOMO-4->LUMO (5%)		
		HOMO-6->LUMO (4%)		
		HOMO-4->LUMO+1 (3%)		
		[InL¹(NO₃)(HSO₄)]⁻		
4035.9	0.0089	HOMO->LUMO (100%)	MLCT	
2235.6	0.0097	HOMO-2->LUMO (94%)	MLCT	



1574.6	0.0112	HOMO-1->LUMO (93%)	MLCT	
		HOMO-6->LUMO (30%)	MLCT	
		HOMO-3->LUMO (14%)		
		HOMO-8->LUMO (13%)		
		HOMO-10->LUMO (11%)		
		HOMO-7->LUMO (11%)		
940.3	0.0019	HOMO-5->LUMO (10%)		
903.5	0.0007	HOMO-3->LUMO (84%)	MLCT	
832.3	0.0044	HOMO-4->LUMO (98%)	MLCT	
785.9	0.0008	HOMO-5->LUMO (87%)	MLCT	
		HOMO-7->LUMO (70%)	MLCT	755
733.9	0.0099	HOMO-8->LUMO (15%)		
		HOMO-6->LUMO (52%)	MLCT	624
		HOMO-8->LUMO (25%)		
610.2	0.0094	HOMO-10->LUMO (10%)		
549.5	0.0003	HOMO-9->LUMO (91%)	MLCT	
[InL¹(H₂O)(HSO₄)]				
378.9	0.0277	HOMO->LUMO (94%)	MLCT	
		HOMO-1->LUMO (77%)	MLCT	367
362.5	0.0326	HOMO->LUMO+1 (15%)		
		HOMO->LUMO+1 (80%)	MLCT	
353.8	0.0654	HOMO-1->LUMO (17%)		



336.3	0.0218	HOMO-1->LUMO+1 (96%)	MLCT
		HOMO-4->LUMO (35%)	ML
		HOMO-2->LUMO (30%)	
294.4	0.0297	HOMO-4->LUMO+1 (17%)	
		HOMO-5->LUMO (40%)	ML
		HOMO-4->LUMO+1 (18%)	
		HOMO-4->LUMO (15%)	
283.8	0.01	HOMO-6->LUMO (12%)	
		HOMO-2->LUMO (65%)	ML
		HOMO-4->LUMO+1 (11%)	
279.2	0.0996	HOMO-4->LUMO (10%)	
		HOMO-3->LUMO (66%)	ML
270.9	0.1326	HOMO-2->LUMO+1 (23%)	
		HOMO->LUMO+2 (23%)	ML
		HOMO-2->LUMO+1 (21%)	
		HOMO-3->LUMO (17%)	
		HOMO-4->LUMO (13%)	
262.9	0.07	HOMO-3->LUMO+1 (12%)	
		HOMO-3->LUMO+1 (40%)	ML
		HOMO-4->LUMO+1 (17%)	
		HOMO-5->LUMO (11%)	
258.3	0.0529	HOMO-2->LUMO+1 (10%)	



276



377.3	0.0342	HOMO->LUMO (97%)	MLCT	
		HOMO-1->LUMO (87%)	MLCT	354
357.6	0.0388	HOMO->LUMO+1 (10%)		
347.3	0.0961	HOMO->LUMO+1 (83%)	MLCT	
336.5	0.0222	HOMO-1->L+1 (93%)	MLCT	
		HOMO-3->LUMO (39%)	ML	305
		HOMO-2->LUMO (23%)		
307.6	0.0011	HOMO-4->LUMO (18%)		
		HOMO-3->LUMO+1 (32%)	ML	
		HOMO-8->LUMO (16%)		
		HOMO-3->LUMO (11%)		
300.5	0.0016	HOMO-6->LUMO (10%)		
		HOMO-2->LUMO (58%)	ML	
		HOMO-3->LUMO (18%)		
281.9	0.0047	HOMO-2->LUMO+1 (17%)		
		HOMO-4->LUMO (49%)	ML	275
		HOMO-3->LUMO (20%)		
272.3	0.0817	HOMO-3->LUMO+1 (19%)		
		HOMO-5->LUMO (72%)	ML	
269.6	0.0141	HOMO-7->LUMO (10%)		
		HOMO-2->LUMO+1 (29%)	ML	256
268.7	0.0155	HOMO-3->LUMO+1 (25%)		



HOMO-4->LUMO (11%)

[InL¹(H₂O)₂]⁺

2042.6	0.1124	HOMO->LUMO (115%)	MLCT	
740.0	0.0066	HOMO->LUMO+2 (100%)	MLCT	746
609.0	0	HOMO->LUMO+1 (99%)	MLCT	
537.7	0.0154	HOMO->LUMO+3 (98%)	MLCT	543
529.8	0.0041	HOMO->LUMO+4 (97%)	MLCT	
		HOMO-1->LUMO (48%)	MLCT	
		HOMO-1->LUMO (18%)		
		HOMO->LUMO+1 (14%)		
454.6	0.0047	HOMO->LUMO+5 (12%)		
		HOMO-2->LUMO (49%)	MLCT	
		HOMO->LUMO (22%)		
446.9	0.0034	HOMO-1->LUMO+1 (13%)		
		HOMO->LUMO+5 (69%)	MLCT	424
419.4	0.0068	HOMO-1->LUMO (27%)		
		HOMO->LUMO+6 (62%)	MLCT	
405.2	0.004	HOMO-2->LUMO (28%)		
		HOMO->LUMO+7 (62%)	MLCT	
377.6	0.0094	HOMO->LUMO+6 (14%)		

[InL¹(NO₃)₂]⁻



385.1	0.0274	HOMO->LUMO (97%)	MLCT	
363.8	0.0495	HOMO-1->LUMO (95%)	MLCT	
347.9	0.0995	HOMO->LUMO+1 (94%)	MLCT	356
341.5	0.0073	HOMO-1->LUMO+1 (97%)	MLCT	
		HOMO-2->LUMO (35%)	MLCT	
		HOMO-3->LUMO (27%)		
314.1	0.0001	HOMO-4->LUMO (15%)		
		HOMO-2->LUMO (39%)	MLCT	
		HOMO-4->LUMO (14%)		
305.1	0.0038	HOMO-3->LUMO (14%)		
		HOMO-7->LUMO (22%)	MLCT	
		HOMO-3->LUMO+1 (20%)		
		HOMO-4->LUMO+1 (16%)		
		HOMO-6->LUMO (14%)		
301.3	0.0001	HOMO-2->LUMO (11%)		
		HOMO-2->LUMO+3 (60%)	ML	
		HOMO-2->LUMO+2 (15%)		
299.6	0.0004	HOMO-2->LUMO (12%)		
		HOMO-3->LUMO+2 (34%)	ML	297
		HOMO-4->LUMO+2 (30%)		
		HOMO->LUMO+2 (11%)		
292.9	0.0001			
287.1	0.0019	HOMO->LUMO+2 (65%)	ML	



HOMO-1->LUMO+2 (24%)

[InL¹(HSO₄)₂]⁻

385.8	0.0203	HOMO->LUMO (97%)	MLCT	
		HOMO-1->LUMO (74%)	MLCT	356
358.9	0.0243	HOMO->LUMO+1 (22%)		
		HOMO-1->LUMO (22%)	MLCT	
349.7	0.1155	HOMO->LUMO+1 (73%)		
329.5	0.0087	HOMO-1->LUMO+1 (97%)	MLCT	
		HOMO-4->LUMO (46%)	ML	
		HOMO-3->LUMO (17%)		
298.5	0.0022	HOMO-4->LUMO+1 (10%)		
		HOMO-2->LUMO (50%)	ML	
		HOMO-8->LUMO (12%)		
291.2	0.002	HOMO-2->LUMO+1 (11%)		
		HOMO-4->LUMO+1 (29%)	ML	
		HOMO-2->LUMO (27%)		
		HOMO-8->LUMO (18%)		
286.6	0.0007	HOMO-3->LUMO+1 (13%)		
		HOMO-3->LUMO (64%)	ML	277
		HOMO-4->LUMO (12%)		
276.7	0.0856	HOMO-2->LUMO+1 (10%)		
274.1	0.0214	HOMO-2->LUMO+1 (65%)	ML	



		HOMO-5->LUMO (37%)	ML
		HOMO-6->LUMO (31%)	
268.8	0.0373	HOMO-7->LUMO (13%)	



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb

Novel insight of indium(III) complex of N, N'-bis(salicylidene) ethylenediamine as chemo-sensor for selective recognition of HSO_4^- and hemolytic toxicity (Red Blood Cells) studies: Experimental and theoretical studies

Daniela Soledad Huerta-José^a, Jose Guadalupe Hernández-Hernández^b,
Carlos Alberto Huerta-Aguilar^c, Pandiyan Thangarasu^{a,*}

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510, D.F., México, Mexico

^bCentro Tecnológico, Facultad de Estudios Superiores (FES-Aragón), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Estado de México, CP 57130, Mexico

^cDivisión de Ingeniería en Nanotecnología, Universidad Politécnica del Valle de México, Av. Mexiquense, Tultitlan, Estado de México, CP 54910, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Indium complex
Chemo-sensor
Recognition of HSO_4^-
Hemolysis (red blood cells)

ABSTRACT

Indium(III) complex of N, N'-bis(salicylidene)ethylenediamine prepared was characterized, and employed as chemo-sensor for the recognition of HSO_4^- after studying the following ions (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CH_3COO^- , PO_4^{3-} , SCN^- , PF_6^- , HSO_4^-). The results show that the complex selectively detects HSO_4^- without interference from the other anions except acetate. The stoichiometry of the interaction between the complex and HSO_4^- was found to be 1:1. Interestingly, the complex was employed in hemolysis for Red Blood Cells, showing that the complex involves strongly in hemolysis of blood cells evidenced by optical microscopy and Atomic Force Microscopy (AFM). The cell walls were severely damaged by the complex through its interaction with carboxylic group of hemoglobin. However, in the presence HSO_4^- , the complex was unable to involve the hemolysis because of the binding of HSO_4^- with the complex. This observation is consistent with the anion interference study where acetate ion interferes in the detection of HSO_4^- . The intensity of fluorescence of the complex was quenched with the increasing concentration of HSO_4^- ; in the molecular orbital analysis, the HOMO energy level of the complex was used to explain how the excited state of $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$ plays a significant role in enhancing or quenching of fluorescence intensity through the Photo Electron Transfer (PET). An increasing energy level of $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$ quenches the fluorescence intensity of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]^-$.

1. Introduction

Main group metals (group 13 = B, Al, Ga, In) are poorly explored when compared to other transition metal ions [1]. The role of aluminum is well known causing the biological implication into brain related Alzheimer's disease [2–6]. Yet, indium is the better element among the group 13 due to its larger ionic radii and fascinating coordination properties [7]. Because of heavy atom effect, it enhances the rate of intersystem crossing from the photo-excited singlet to the triplet state, ultimately, it increases a significant lifetime of the photosensitizer. Thus, indium(III) complexes have been tested as anti-malaria agents [8,9] despite considering as imaging-therapeutic agents for cells. Since indium exhibits auger electron emitter property, its complexes are also potentially considered in cell labelling in clinical imaging for infected/ inflammation sites [10,11]. In cancer therapy, the emission of

Auger electrons is very useful to damage DNA that leads cell death. For example, the indium(III) complexes of phthalocyanines are being studied as photosensitizers in photodynamic therapy for cancer treatment [12,13]. However, the biological and photo-physical properties of non-radioactive indium-based complexes are still unexplored even though some of the complexes have been tested for the pharmacological applications (antimicrobial and antiproliferative activities) [14,15].

The measuring of analytes in biological or environmental samples by fluorescence technique is turned to be popular method since it detects efficiently guest moieties such as cation, anion, neutral or bio molecules through host molecule in very low concentration under physiological conditions. The binding of fluorophores with analytes plays an important role for the characterization of any moiety as it undergoes a substantial conformational change in order to enhance or suppress the fluorescence intensities. Metal complexes of schiff base

* Corresponding author.

E-mail address: pandiyan@unam.mx (P. Thangarasu).

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.011>

Received 1 March 2019; Accepted 2 April 2019

Available online 03 April 2019

0925-4005/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

ligands, especially, N, N'-bis (salicylidene)ethylenediamine (salen, type N_2O_2 donor atoms) have been studied extensively in medicinal and pharmaceutical fields [7,16]; moreover, metal complexes as lumiphore for the recognition of chloride and acetate ions in real samples has been explored [17–19]. Recently, indium complexes have got a great attention because of their interesting spectral and photo-physical features. So the exploration of indium complexes for the recognition of HSO_4^- is attractive as this anion involves crucially in various metabolic processes (enzymes activities and antibodies functions) [20,21]. Moreover, hemolysis of red blood cells by using the indium complex is novel and worth in the biological application points of view, and in best of our knowledge, this work is not appeared in literature. Furthermore, DFT study was used to illustrate why the intensity of fluorescence is quenched for the addition of HSO_4^- to the complex through analyzing the energy of HOMO orbitals.

2. Experimental

2.1. General information

All analytical grade chemical reagents (Sigma-Aldrich) were used as received from the company without any further purification. Elemental (C, H, N) results for the samples were obtained performing on an elemental analyzer (Fisons instrument, model EA 1108 CHNSO). 1H NMR spectra were obtained for compounds by recording on Varian Gemini equipment (NMR, 300 MHz), and tetramethylsilane (TMS) used as an internal standard. Mass spectral fragments of the compounds were analyzed by using GC-MS (Joel JMS-Axsosha instrument). UV-vis absorption spectra on spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 25), and fluorescence spectra on spectrophotometer (F96 Pro) were performed.

2.2. Synthesis of the ligand (L^1)

The salen ligand was synthesized by using the procedure published elsewhere [22–24]; typically, to the solution of ethylenediamine (0.60 g, 1.0 mM) dissolved in EtOH (8.0 mL), salicylaldehyde (0.244 g, 2.0 mM) dissolved in EtOH (12 mL) was slowly added, and the resulting solution mixture was stirred for 30.0 min at room temperature. The solid obtained was filtrated, washed several times with diethylether. The yellow solid (yield: 87%). 1H NMR (300 MHz, CD_3OD): $2CH_2-N$ (4H, s, 3.87), $2N = CH$ (2H, s, 8.60), aromatic H (8H, m, 7.21), phenolic OH (2H, s, 13.36).

2.3. Synthesis of $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$

The indium complex was prepared by adopting the modified procedure reported in literature [25]. To the methanolic solution of L^1 (0.55 g, 1.0 mM, 50 mL), the solution of $In(NO_3)_3$ (0.69 g, 4.3 mmol) dissolved in hot methanol was slowly added, and the resulting solution was refluxed for 2.0 h, then cooled to room temperature. The solvent was evaporated by roto-evaporation to yield a residual product, which was then washed with MetOH. The yellow product obtained was then re-crystallized in methanol: Yield (1.81 g, 81%). Elemental analysis: calcd $C_{16}H_{16}N_3O_6In$ (461): C 41.64%, H 3.47%, N 9.11%. MS (FAB, m/z (%)): $[C_{16}H_{18}N_3O_7In]^+$, 486 (7.9%) $[C_{16}H_{16}N_2O_2In]^+$, 382 (5.3%) $M + 1$, $[C_{16}H_{14}N_2O_2]^+$, 269 (5.3%) $[C_{16}H_{10}N_2O]^+$, 165 (100%), $[C_7H_5N]^+$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): $2CH_2-N$ (4H, s, 3.11–3.43), $2N = CH$ (2H, s, 4.50–4.65), H_{arom} (8H, 7.42–6.97).

2.4. Fluorescence based recognition of HSO_4^- by $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$

The following studies were performed for the recognition of HSO_4^- specifically by $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$: (i) anion binding analysis, (ii) interference of other ions during the detection of particular anion, i.e., competitive binding studies, and (iii) titration studies of specific analytes (guest moiety) vs. host molecule. Generally, in the anion binding

experiment, a fixed amount of particular tetrabutylammonium salts of anion (25 μ L, 0.1 mM) was added to a standard solution of $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$ (2.5 mL, 1.0 mM) dissolved in H_2O (100%), and analyzed the fluorescence behavior (280–560 nm) of the indium complex. The complex was excited at 309 nm, and the corresponding fluorescent emission was observed at 409 nm. If there is a significant change in the characteristic of fluorescence signals of $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$, then it would be seen as an indicator for anion binding. The recognition behavior of indium complex was also studied in different solvents [H_2O (100%), CH_3OH/H_2O (80%:20%), CH_3CN/H_2O (50%:50%)] in order to understand whether the anion binding capability of the complex is being influenced by the change of solvents. In the interference study, exclusively, in a competitive medium, the sensing capability/sensitivity of host $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$ as receptor for guest donor HSO_4^- was examined along with coexisting other anions containing same concentration. In the titration of particular anion HSO_4^- i.e., tetrabutylammonium salt of HSO_4^- was added to 10 mL volumetric flask having standard solution of receptor $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$, and analyzed the fluorescence behavior for the mixture by plotting the concentration of anion against the intensity. All the experiments were performed in triplicate form at room temperature for the consistency of results. The binding ratio of the complex with the anion was analyzed with using Job's plot by obtaining the stoichiometry ratio as reported elsewhere [26,27]. Thus, a set of solutions of host $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$, and guest HSO_4^- ion were prepared having a constant total concentration of host-guest molecules, and determined a maximum or minimum spectral intensity for the plot of fluorescence intensity vs. $[HSO_4^-]/[HSO_4^-] + [complex]$.

2.5. Interaction of red blood cells with indium complex

Human blood sample (O^+ group) was collected from Blood donation center, Faculty of Chemistry, UNAM, keeping at vacuum, and EDTA was used as anticoagulant agent, then it was centrifuged at 3000 rpm for 10 min (Suppl. Mat. Fig. S2). The collected cell pellets (erythrocytes) were washed three consecutive times with phosphate buffer solution (PBS, pH = 7.4) to obtain red blood cells, which were then finally diluted to 1:10 with isotonic sterile water. The toxicity performance of each xenobiotic (HSO_4^- , In^{3+} , salen, $[InL^1(H_2O)(NO_3)]$ and $[InL^1(H_2O)(NO_3)]/HSO_4^-$) was evaluated by adding of those solution (50 μ L of 0.1 mM) slowly into 100 μ L of erythrocyte suspension. The whole mixture of red blood cells was treated with each of above sample, allowing to react for 15 min, and analyzed the performance of hemolysis by hypertonicity. With using the stock solution of indium complex (22.7 mg, 1.0 mM, 50 mL), standard solutions of different concentrations of the complex (5.0 μ M, 10.0 μ M, 20.0 μ M, 30.0 μ M, 40.0 μ M, 60.0 μ M, 70 μ M, 80 μ M, 90 μ M, and 100 μ M) were prepared, and measured the UV-Vis absorption for all solutions. The calibration curve was drawn by using the absorption against the concentrations (see Suppl. Mat. Fig. S3). Negative control (red blood cells + 1.0 mL of PBS buffer) and positive control (red blood cells + 1.0 mL of 0.1% Na_2CO_3 solution) were also prepared. The hemolysis was performed for red blood cells in aqueous suspension (1.0 mL, 2%) with using the indium complex (1.0 mL) in different concentrations (5.0, 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 100 μ M) and allowed for the process for 30 min. After treating the cells by the complex, the samples were first centrifuged at 3000 rpm for 10 min., to remove the residue, and UV Visible absorption spectra were recorded for the treated blood cells, and the intensity of the peak was measured at 525 nm. The percentage of hemolysis was calculated (% Hem.) through the following equation.

$$\% \text{Hemolysis} = \frac{A_M - A_{CN}}{A_{CP} - A_{CN}} * 100$$

A = absorbance of sample, A_M = absorbance of samples at different concentrations, A_{CN} = absorbance for control negative, A_{CP} = absorbance for positive control

The performance of the complex on red blood cells was observed under the light microscope and atomic force microscope (AFM).

2.6. Computational analysis of the indium complex

The structural and electronic properties of L^1 and its indium complexes were studied by deriving different combination of anions such as $[\text{In(I)L}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]^{2-}$, $[\text{In(II)L}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]^-$, $[\text{In(III)L}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, $[\text{In(III)L}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{In(III)L}^1(\text{HSO}_4)(\text{NO}_3)]^-$, $[\text{In(III)L}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, $[\text{In}^{3+}\text{L}^1(\text{NO}_3)_2]^-$, $[\text{In(III)L}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$ and $[\text{In(III)L}^1(\text{HSO}_4)(\text{CH}_3\text{COO})]^-$. The structures were optimized by Density Functional Theory (DFT) employing Gaussian-09 [28] where the fully optimized structural data of the ligand were considered as input for the geometrical optimization of complex (Suppl. Mat. Fig. S4 and S5). In the calculation, the B3LYP as exchange correlation functional with basis sets 6-31G** for C, N, and H atoms and DGDZVP for In^{3+} were used [29–31]. The same exchange correlation functional and basis sets were used for the analysis of the electronic properties, especially, for the energies of the frontier molecular orbitals, viz., the highest occupied molecular orbitals (HOMOs) and also the lowest unoccupied molecular orbitals (LUMOs). With considering Natural Population Analysis (NPA), the charge distribution among the structural atoms was examined.

It is well known that several local and global descriptors [32–36] are being considered to determine the reactive site of any organic molecule. Since Condensed-to-Atom Fukui Index (CAFI) $f(r)$ is so efficient, it can be applied to identify the reactive sites of ligand L^1 as described in the method published elsewhere [33,37,38], and a suitable descriptor, Hirshfeld charge was employed to calculate the CAFI [65,66]. The reliable NPA charges at different basis sets (DGDZVP and 6-31G**) with B3LYP were determined. The electronic density $\rho(r)$ of molecular site in the ligand was obtained as a derivative function of the Fukui $f(r)$ with respect to the number of electrons N at a constant external potential $v(r)$:

$$f(r) = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]$$

The indexes f^{+k} , f^{-k} and f^k values are designated to the direction of the electron transfer [37] with the consideration of finite difference approximations in the population analysis of atoms in molecules. If the relaxation effect is not taken in to the consideration for the addition or removal of electronic charges on the molecule, then the following equations are to be employed:

$$f^+(r) \approx \rho_{LUMO}(r) \quad (1)$$

$$f^-(r) \approx \rho_{HOMO}(r) \quad (2)$$

$$f^0(r) \approx \frac{1}{2} [\rho_{HOMO}(r) + \rho_{LUMO}(r)] \quad (3)$$

$\rho_{LUMO}(r)$ = density of the first unoccupied molecular orbital;
 $\rho_{HOMO}(r)$ = density of the highest occupied molecular orbital [39].

$$f^+(r) \approx \rho_{LUMO}(r) \quad (4)$$

$$f^-(r) \approx \rho_{HOMO}(r) \quad (5)$$

$$f^0(r) \approx \frac{1}{2} [\rho_{HOMO}(r) + \rho_{LUMO}(r)] \quad (6)$$

For the electrophilic attack, $f_x^- = [q_x(N) - q_x(N-1)]$; for nucleophilic attack, $f_x^+ = [q_x(N+1) - q_x(N)]$, and for radical attack, $f_x^0 = \left[\frac{f_x^+ + f_x^-}{2} \right]$ are being considered. Note: q_x = charge on atom x in the molecule.

3. Results and discussion

3.1. Selective recognition studies of HSO_4^- by indium complex

Anion recognition tests:- With analyzing the fluorescence properties

of the complex $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, it has been tested as chemo-sensor for the recognition of anions. Different anions (Cl^- , Br^- , F^- , I^- , NO_3^- , ACOO^- , PO_4^{3-} , SCN^- , PF_6^- , HSO_4^-) in the form of tetra-butyl ammonium salts were added to the complex, and studied the performance of the complex in the fluorescence. For example, each solution of the above anion (25 μL , 0.1 M) was added into the complex $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (2.5 mL, 1.0 mM) dissolved in $\text{H}_2\text{O}/(100\%)$ through a micropipette, and observed the change of fluorescence emission (280–560 nm). Interestingly, only for the addition of HSO_4^- , a significant fluorescence change was noticed, and for other anions no such change was seen. All the solutions were excited at 309 nm and the corresponding emission was detected at 409 nm, observing that the intensity of fluorescence was quenched upon for the addition of HSO_4^- . So, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ behaves as chemo-sensor for the detection of HSO_4^- (see Fig. 1). The experiments were repeated several times, obtaining the same spectral behavior for the complex, and no appreciable change of the emission intensity was noticed. The solvent effect on the recognition was also analyzed by using different solvents [H_2O (100%), $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80%:20%), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50%:50%)], observing that no appreciable change in the performance of the complex was noticed.

3.2. Titration analysis of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ against HSO_4^-

The binding selectivity of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ against the concentration of HSO_4^- was studied, and the intensity of fluorescence was measured around 409 nm; for each subsequent addition of HSO_4^- (0.0 to 0.45 mM) to the complex (5.0 mL, 0.1 mM), the measured peak intensity was diminished linearly with the increasing concentration of HSO_4^- (Fig. 1b). It appears that interaction between the receptor complex and the anion HSO_4^- does not favored the excited state Photo Electron Transfer (PET), and preferred the transference of electron from HOMO (donor) to low-lying HOMO of the acceptor (fluorophore). This suggests that $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ can recognize HSO_4^- in aqueous solution through a quenching of fluorescence emission. It means, the photo-induced electron transfer from HOMO (donor) to fluorophore is being allowed to quench the fluorescence emission (Scheme 1).

3.3. Competitive binding studies

With the interference of other anions in the competitive medium, the binding selectivity of the complex with HSO_4^- was determined. The influence of fluorescence intensity from other anions during the detection of HSO_4^- by $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ was studied, showing that there is not a significant change in the intensity from the addition of other ions except acetate. The intensity observed for the complex with the addition of HSO_4^- maintains almost a constant, and only for acetate, the intensity was enhanced interfering in the determination. In the study, typically, different anions (Cl^- , Br^- , F^- , I^- , NO_3^- , ACOO^- , PO_4^{3-} , SCN^- , PF_6^- , HSO_4^-) were added to the mixture solution of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (0.1 mM, 2.5 mL) + HSO_4^- (25.0 μL , 100.0 mM) in H_2O (100%), and the final concentration was 16.0 mM. The whole solution has been first stirred for 15 min, then kept for 5 min. to attains an equilibrium before measuring the fluorescence emission. The results indicate that there is no significant interference from other anions during the detection of HSO_4^- through $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (Fig. 1c). After having studied the effect of pHs on the fluorescence intensity for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (0.1 mM, 2.0 mL), it was observed that at low or high pHs, a low fluorescence was detected, and only at neutral pH, a high intensity was observed (Fig. 2). This describes that the protonation and deportation of the complex influences the fluorescence intensity.

With employing Job's method, the ratio of the HSO_4^- interaction with the indium complex was estimated, showing that the ratio found to be 1: 1 (Fig. 1d). It means that the intensity of fluorescence quenches proportionally up to ~ 1.0 equivalents for the addition of HSO_4^- . The selective detection of different anions by employing indium complexes as chemo-sensor, compared with the present study (see Table 1).

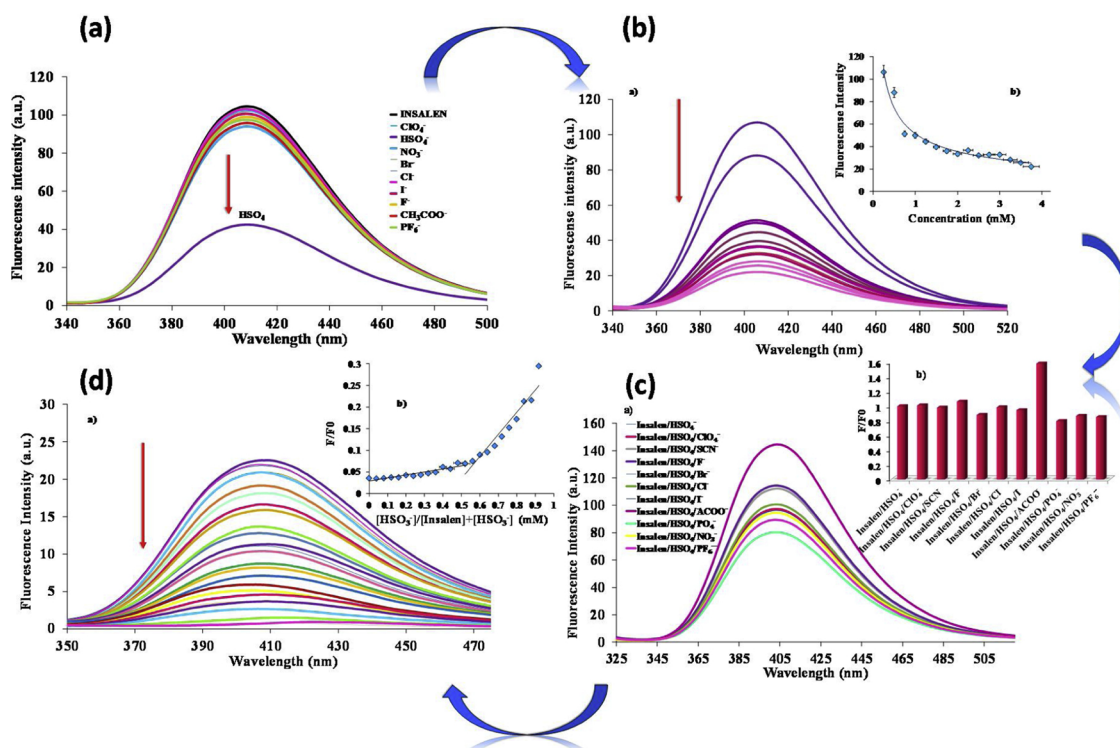
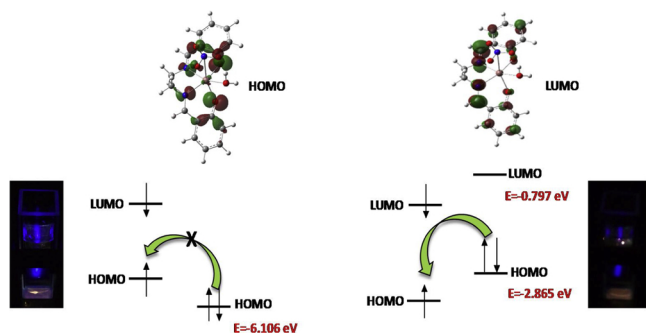


Fig. 1. a) Anion binding study: the change fluorescence behavior during the addition of different anions (0.1 M) to $[\text{InL}^{\text{I}}(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (1.0 mM); b) a decrease of fluorescence intensity for the complex (1 mM) for the successive addition of HSO_4^- (0.0 - 0.1 mM) in H_2O ; c) the interference study of anions during the detection of HSO_4^- by the complex; d) Job's plot of fluorescence intensity vs. concentration of anion, sensing of HSO_4^- with receptor complex (0.1 mM) in the presence of an equimolar amount of anion in aqueous medium.

3.4. Hemolytic activity of the indium complex on human erythrocytes

Hemolysis is generally occurred if antibodies adhere to Red Blood Cells (RBC) tearing the membrane of the cells through physical or chemical process and it alters immune reactions [53] and oxidative stress [54–56]. However, the mechanism of hemolysis process caused by exogenic agents is not fully understood although there are multiple proposals such as conjugation of a hemolytic agent, inflammatory process and immune triggered response. In the present study, the hemolysis of blood cells was studied by using the indium complex in the presence of HSO_4^- and acetate ions. The results show the existence of a strong hemolysis by the complex; this means that indium cation can coordinate strongly with carboxylic residue from hemoglobin (Fig. 3), affecting biological function of hemoglobin. Erythrocytes present in round shaped one with diameter ranging of 7–10 μm , so that hemoglobin and other components can migrate from the cell boundaries through osmotic effects, leaving the membranous structures flattened one (Scheme 2).



Scheme 1. Illustration of PET mechanism not favoring for the excited state the transferring of electron for the interaction of $[\text{InL}^{\text{I}}(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ with HSO_4^- .

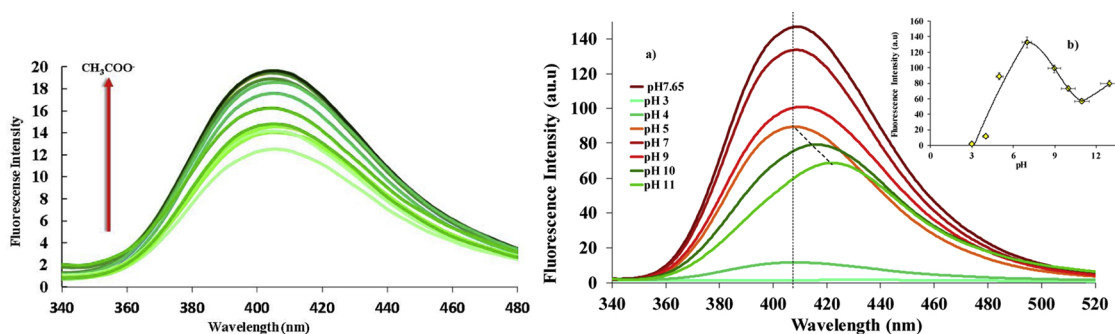


Fig. 2. a) Titration of the complex with HSO_4^- vs. acetate; b) Plot of fluorescence intensity vs. pH.

Table 1

UV–vis and fluorescence spectral data for the recognition of different Indium complexes collected from literature.

Indium complexes	Wavelength (λ_{abs} , nm)	Excitation (λ_{exc} , nm)	Emission (λ_{em} , nm)	Ref.
$[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ L = N, N'-bis(salicylidene)ethylenediamine		309	405	This work
$[\text{In}_2(\text{OH})_2(1,3\text{-BDC})_2(2,2'\text{-bipy})_2]$ 1,3-BDC = 1,3-benzenedicarboxylate bipy = 2,2'-bipyridine	340	340	520	[40]
In(III)-bis(thiosemicarbazonato)	355, 440	488	540	[41]
$[\text{In}(\text{cis-1,4-pda})_2]$ (1,4-H ₂ pda) = 1,4-phenylenediacetic acid	356	356	428	[42]
$\text{HIn}(1,3\text{-bdc})_2\text{-2DMF}$ 1,3-H ₂ bdc = 1,3-benzenedicarboxylic acid	363	363	398	[42]
$\text{In}(\text{OH})(\text{trans-1,4-chdc})$ 1,4-H ₂ chdc = 1,4-cyclohexanedicarboxylic acid	264	264	324420	[42]
$[\text{In}(\text{E/Z})\text{-3-}[(3\text{-Hydroxypropylamino})\text{-phenylmethylidene}]\text{-1,3-dihydro-2H-1-phenylpyrido}[2,3\text{-b}]\text{pyrrolo}[2,3\text{-e}]\text{pyrazin-2-one}]$	407	425	480	[43].
Tris(dipyrrinato)indium(III)	570	459	592	[44]
$\{[\text{InL}(\text{NO}_3)(\text{OH})]\text{NO}_3\text{CH}_3\text{OH}\}_2$ L = N,N'-bis(2-pyridinylmethylene) cyclohexane-1,2-diamine	237	467	520 650	[45]
$\text{In}_3(2,6\text{-pydc})_3(1,4\text{-bda})1.5(\text{H}_2\text{O})_6$ 2,6-H ₂ pydc = Pyridine-2,6-dicarboxylic acid (1,4-bda) = <i>cis</i> -2-butene-1,4-dial	–	260	351 421	[46]
$[\text{In}(\text{phen})_2\text{Cl}_2](\text{H}_4\text{bptc})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$ phen = phenanthroline H ₄ bptc = bipyridine-tricarboxylic acid	398	420	494	[47]
$[\text{In}(\text{Tab})_2]$ Tab = 4-Trimethylammonio)benzene thiolate	272	415	515	[48]
$[\text{In}(\text{Tab})_4(\text{Phen})](\text{OAc})_3$ Tab = 4-Trimethylammonio)benzene thiolate Phen = 1,10-Phenanthroline	266	415	515	[48]
$[\text{In}(\text{Tab})_2(\text{Dpphen})_2](\text{PF}_6)_3$; Tab = 4-(Trimethylammonio)benzene thiolate, Dpphen = 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline	284	415	515	[48]
$[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_2]_2[\text{In}_2(\text{BDC})_3\text{Br}_2]$ BDC = 1,4-benzenedicarboxylate	–	270	420	[49]
$[\text{In}(\text{L})_2]\text{NO}_3$ (L = 2-benzoylpyridine N(4)-cyclo-hexylthiosemicarbazone)	302 398	361	508	[50]
$[\text{InCl}(\text{Hphth})(\text{nia})(\text{H}_2\text{O})_2]$ Hphth = phthalic acid nia = nicotinic acid	218 267 310	320	339	[51]
$[\text{InCl}(\text{nia})_2(\text{Hox})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (nia) = nicotinic acid Hox = oxalic acid	216 263 295	320	374	[51]
In(III) based on a phosphoserine as a receptor with a pyrene fluorophore using solid phase	–	342	476 480	[52]

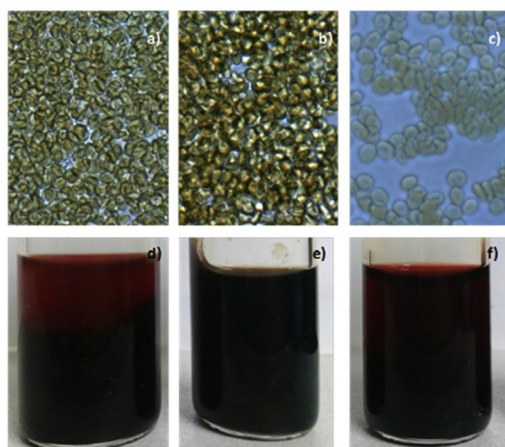


Fig. 3. Inverted optical microscope micrographs Healthy erythrocytes (a, d), Erythrocytes with indium complex (60 μM) (b, e), and erythrocytes with indium complex and HSO_4^- (60 μM) (c, f).

In the optical microscopy study, the samples were prepared as follows: (1) control (red blood cells, 30 μL); (2) red blood cells (30 μL) + 15 μL of indium complex; (3) 30 μL of red blood cells + 15 μL of indium / bisulfate complex. After allowing the samples for the reaction, the physical damage on the shape of red cells was observed and the change of color of the cells to an intense red-brown was also seen in the presence of indium complex, and the size of the cells was increased by

hemolysis. However, for the system (30 μL of red blood cells + 15 μL of indium / bisulfate complex), only a change of color of erythrocytes from red to white was observed without altering shape of the cells, showing that the cells have not suffered by lyses.

3.5. AFM studies

The surface performance of blood cells after treating with indium complex was analyzed through 15 μm^2 scanning by AFM (Fig. 4). Erythrocytes were treated with $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (Fig. 4e and d) and $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]/\text{HSO}_4^-$ (Fig. 4e and f). In the control sample (erythrocytes), a regular round shaped RBCs with diameter ranging from 7–10 μm were observed [57] in addition to a central depression which typically found in human erythrocytes (Fig. 4b) [58,59]. If erythrocytes were treated with $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, most of the cells undergo lytic harmfulness suggesting that the complex can damage the functioning of cells affecting the shape and sizes. However, the complex $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, in the presence of bisulfate ion, a considerable decrease in the degree of cell lysis was observed, indicating that HSO_4^- binds strongly with the complex, hindering the effect of cell lysis. So, a possible explanation is that the complex has a tendency to interact with acetate group that presents in hemoglobin that causing a severe damage on the surface of the red blood cells [60]. In contrast, in the presence of HSO_4^- which directly interacts with the complex and not allowing the complex to bind with hemo moiety, subsequently, RBC lysis is being reduced (Table 2). This is a good agreement with anion binding test, where the interference of acetate was found during the detection of HSO_4^- by the complex (Scheme 2).

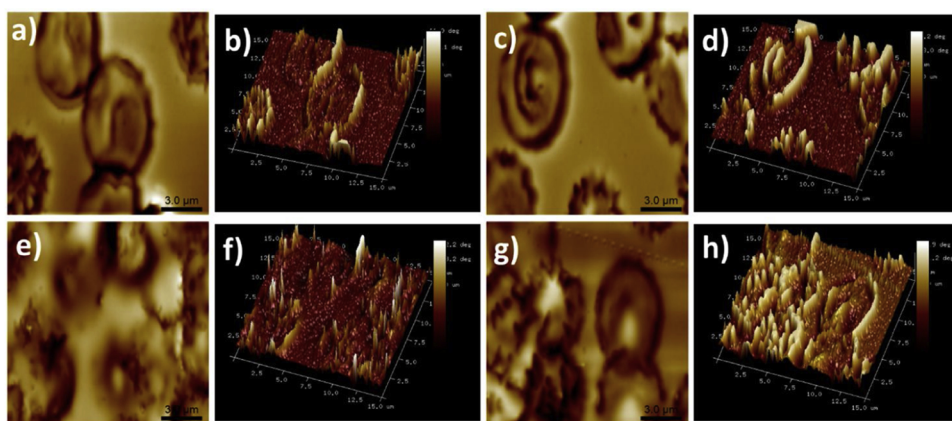
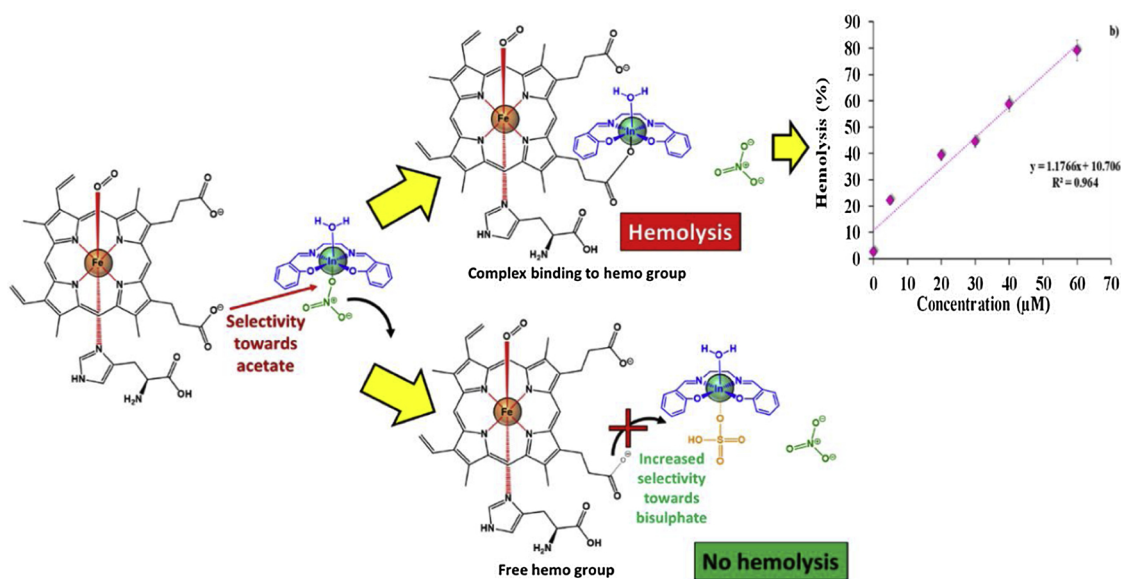


Fig. 4. AFM analysis of erythrocytes in the presence of different xenobiotics: a) control; b) control in 3D topographical analysis; c) HSO_4^- ; d) HSO_4^- in 3D topographical analysis; e) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$; f) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ in 3D topographical analysis; g) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]/\text{HSO}_4^-$; h) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]/\text{HSO}_4^-$ in 3D topographical analysis.

Table 2
Hemolysis studies for toxicity of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$.

System	Hemolysis
Control	No
HSO_4^-	No
Complex	Yes
Complex + HSO_4^-	No

trans bonded angles resulted for the metal center are: 156.0° for O1-In1-N2, 158.5° for N1-In1-(OH₂)1, and 149.2° for O2-In1-(ONO₂) and other bond angles fall in the range of 73.9 – 118.8° . This observation is consistent with those reported for other In(III) complexes [38,41]. In addition, the structure of the complex at different oxidation states has been optimized in order to understand how the structure undergoes a significant change when the oxidation state of metal has been changed (Suppl. Mat. Table S1). It has been observed that the axial interaction of



Scheme 2. The proposed hemolysis mechanism for the interaction of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ with blood cells.

3.6. Theoretical studies

In the optimized structure of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, the presence of intermolecular hydrogen bonds between terminal O1W (water molecule) and O1 (nitrate) (Fig. 5), such as HO-H-ONO₂ (1.655 Å) was observed, stabilizing the structure of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$. This observation is consistent with those reported for other related In(III) complexes [41].

After having analyzed the optimized structure, it is found that ligand L¹ coordinates suitably with In(III) to exhibit a distorted octahedral geometry where the equatorial plane is formed with N(1), N(2), O (2) and O(1) atoms; the resulting bond lengths are 2.275 Å, 2.248 Å, 2.125 Å and 2.108 Å, respectively. The axial bonds are In(III)-ONO₂ (2.261) and In(III)-(H₂O)] (2.273 Å) (Suppl. Mat. Fig. S5, Table S1). The

H₂O molecule is so weak if In(III) is reduced to In(II), then to In(I); this is probably, there is present the HSAB concept as In(III) prefers to coordinate with hard nature H₂O, favoring an interaction with In(III) ion, but disfavors with soft In(I). However, there is not a considerable change in the NO₃ interaction with metal ion. The complex in different oxidation states against charge densities follows a straight line, showing that there is a strong relationship between charge density around the metal with the oxidation states (see inset, Scheme 3). Since the experimental results indicate that the indium complex actively performs as sensor for the detection of HSO_4^- with the interference of acetate ion, we have also structurally optimized replacing NO₃⁻ by HSO₄⁻ and also H₂O by acetate and analyzed the structural impacts with electronic properties (Scheme 3).

The hardness (η) and softness (σ) of each optimized structure were

calculated in order to understand the performance of electron density, and its distribution over the systems [68, 69]. $\eta = (\text{LUMO} - \text{HOMO})/2 =$ the global hardness (η) of the complex: 0.406, 1.705, 1.933, 1.621, 1.034, 0.411, 1.881, and 1.888 eV for $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$, and $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$, respectively. The softness (σ) was determined using $\sigma = 1/\eta$, yielding $\sigma = 0.586, 0.517, 0.617, 0.967, 2.433, 0.532$ and 0.529 eV for $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$, and $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$, respectively at gaseous state (Suppl. Mat. Table S2).

The following equation was used to calculate ΔE and μ for the complexes.

$$\Delta E = \frac{\mu^2}{2\eta} \text{ and } \mu = \frac{I + A}{2}$$

I = ionization potential (IP); A = electron affinity (EA), and μ = chemical potential; η = chemical hardness of the ligand.

The results are: $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ ($\Delta E = 1.685$ eV) < $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]^-$ ($\Delta E = -0.322$ eV) < $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ ($\Delta E = -1.901$ eV) < $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]^-$ ($\Delta E = -2.811$ eV), indicating that the oxidation state of the metal ion increases with decreasing global hardness of the complexes; this shows that $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ is more reactive than other complexes, which is consistent with the reported observation that if $\eta < 0$ and $\Delta E < 0$, the charge transfer is energetically favorable [61].

After analyzing the charge distribution of hetero atoms in the ligand (imine nitrogen and hydroxyl oxygen), it was observed an excess electron density on the hetero atoms, and it facilitates a bond formation with the metal ion (Suppl. Mat. Table S5 and S6). As expected, a considerable change in the charge density for the donor atoms was obtained if the ligand forms the complex (charge transfer from hetero atoms to the metal); this is consistent with the Mulliken charge analysis. For instance, the charge densities detected for the ligand were: O1, O2 (-0.550), N1, N2 (-0.317); but these values were forced to change as -0.602, 598 and -0.301, 302 after its complex formation with In(III) owing to the ligand charge transfer to the metal. Molecular orbital (MO) study establishes the formation of a strong bond through overlapping of the ligand orbital with those of metal, stabilizing the energy between indium(III) and the ligand. For instance, for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, the HOMOs orbitals were resulted through the overlapping of d [In(III)] with the π/p orbitals of L^1 , yielding following molecular orbitals: HOMO to HOMO-X; $X = 0-6, 10, 12$ (Suppl. Mat. Fig. S6a). In addition, the presence of π -character of the imine moiety is corroborated by observing the presence of HOMO, and other low-lying orbitals (HOMO-x ($x = 0-3$)) for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (Suppl. Mat. Fig. S6c). For the case of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, where NO_3 is substituted by HSO_4^- as the complex recognizes selectively acetate ion, the following orbitals: HOMO to HOMO-X ($X = 0, 1, 2, 4, 6$) were obtained while for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, HOMO to HOMO-X ($X = 0-6$) (Suppl. Mat. Fig. S6e) are resulted. The LUMO is being obtained due to the mixture with the orbitals of atoms [N(1), N(2) (12), O(1), O(2) and N(1)], confirming the existence of a In-O bond in the geometry.

Reactivity of ligand:- With using the descriptors Hirshfeld analysis and natural population analysis (NPA), we analyzed the reactivity of the ligand as to understand intra- and intermolecular interactions describing orientation of the molecules in the neighborhood and the nature of atoms that make close contacts in the selected molecule [62]. The results show that the Hirshfeld population analysis and natural population analysis (NPA) predict positive values for all atoms in the ligand. In the Fukui function analysis, where there largest Fukui value (most reactive site) such as O2, N2imine, C1, C2, C6, C7 and C8 are considered as $f^-(r)$ electrophilic attack, while for $f^+(r)$ nucleophilic attack, the more reactive sites are all the atoms (O1, O2, N1imine, N2imine, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8) (Suppl. Mat. Table S4, Fig. S7).

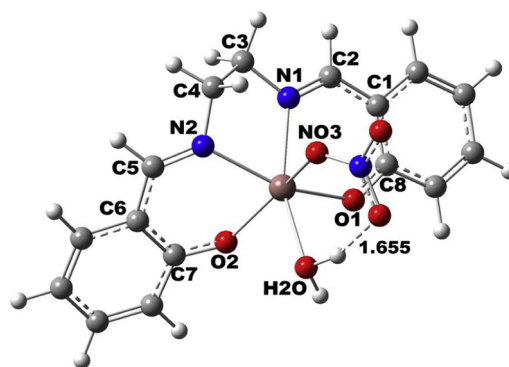
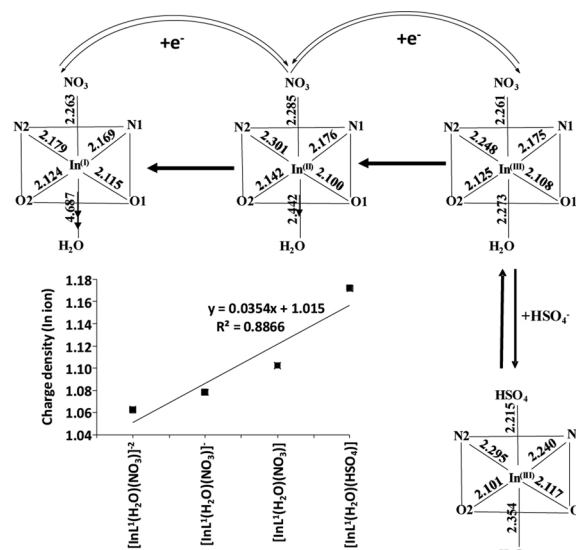


Fig. 5. Optimized structure of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ in the gaseous state.



Scheme 3. The variation of bond distances (axial and equatorial) during the change oxidation state in $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ to $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]^+$ in methanol. (insert: different oxidation states against charge densities).

3.7. Electronic spectra

Electronic spectrum was recorded for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ in different solvents, exhibiting absorption bands 256, 282 and 322 nm in aqueous medium; in the solvent mixture ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$), the bands were 256, 286 and 324 nm, and in $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, they were 256, 286 and 321 nm. This shows that the electronic bands do not undergo any significant change with the solvent effect (See Fig. 6). Since the complex recognizes HSO_4^- in aqueous medium, the addition of HSO_4^- to the complex was studied, observing only a small change in the intensity of absorbance.

High energy bands (282 and 325 nm) in UV region are assigned to $\pi-\pi^*$ transitions, and low-energy absorption bands (390–540 nm) are attributed to the metal- to- ligand charge transfer (MLCT or LMCT) such as $\text{In(III)}(d\pi) \rightarrow (\pi^*)\text{Nimine}$; $\text{In(III)}(d\pi) \rightarrow \text{O}$ water and N nitrate (π^*). Such a feature provides a good evidence for the chelation of the ligand to the metal centre. Furthermore, the orbital contribution to spectral bands was studied by the TD-DFT with using DFT at B3LYP/DGDZVP basis set; water is being considered as a solvent at PCM model. The TD-DFT spectra derived for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ is comparable with the experimental one (See Fig. 7b) ($\lambda_{\text{exp}} = 260, 309$ nm; $\lambda_{\text{calc}} = 282$ and 364 nm). As indicated above, the peak 282 nm is dominated by $\pi-\pi^*$ transitions, and the band 364 nm is originated from MLCT or LMCT [63–65] (Suppl. Mat. Table S5).

Since $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})\text{NO}_3]$ effectively recognizes HSO_4^- , TD-DFT spectra (Fig. 6b) were calculated for the possible interaction of the

anion, generating the following possible complexes: $[\text{In}(\text{I})\text{L}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, $[\text{In}(\text{II})\text{L}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[\text{In}(\text{III})\text{L}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{In}(\text{III})\text{L}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, $[\text{In}(\text{III})\text{L}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$, $[\text{In}(\text{III})\text{L}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, $[\text{In}(\text{III})\text{L}^1(\text{NO}_3)_2]^-$, $[\text{In}(\text{III})\text{L}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$ and $[\text{In}(\text{III})\text{L}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$, (Suppl. Mat. Fig. S5 and Table S5). The data show that $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ exhibits two bands with shoulder at gaseous phase (282 and 364 nm), agreeing approximately with the experimental spectrum [66]. For the case of $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, there a considerable solvent effect in the spectra with red-shifted bands (276 and 367 nm) in gaseous phase. The orbital contribution to the spectral bands resulted for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (282 and 364 nm) is also analyzed, and observed the transitions originated from the HOMO- x ($x = 0-6$) (In-Nimine) through overlapping with LUMO as follows: 1918.7, 1185.2, 375.3, 360.9, 346.1, 299.2, 294.9, 291.1, 288.7, 281.2 and 277.6 nm (see Suppl. Mat. Table S5). For $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, HOMO- x ($x = 0-6$) are coupled with the metal LUMO to exhibit electronic bands (378.9, 362.3, 294.4, 283.8, 279.2, 270.9, 262.9 and 258.3 nm). This indicates that the visible bands are derived from an excited state of mixed In(III)-N, i.e., HOMOs localized on the ligand, especially over imine and hydroxyl moieties, overlap considerably with the LUMO of metal ion through MLCT.

3.8. Theoretical analysis: interaction of HSO_4^- with $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$

The HSO_4^- and acetate in $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ by replacing H_2O or NO_3 was studied theoretically. It was seen that there is a decrease in axial bond length when acetate coordinates in the axial position, showing that the octahedral geometry is axially compressed in the coordination sphere. For example, for In(III)-ONO, the distance was 2.261 Å which decreases to 2.208 Å for In(III)-OAc. Furthermore, the band gap (HOMO-LUMO) obtained for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ was 3.866 eV and it was decreased to 2.068 for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$ (see Fig. 7, Suppl. Mat. Fig. S8 and S9).

While for the case of the HSO_4^- addition to the complex $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (3.866 eV, HOMO-LUMO), the band gap energy was increased to 4.233 eV for $[\text{InL}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$. As anticipated, the energy gap is significantly increased to 4.233 eV for $[\text{InL}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$. This observation is consistent with the experimental fluorescence results.

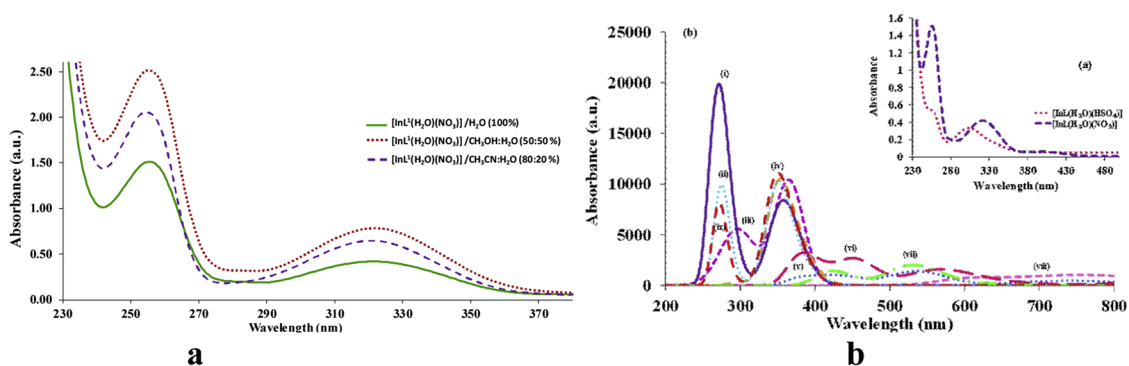


Fig. 6. a) Experimental absorption spectra in water; (b) TD-DFT spectra: (i) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{HSO}_4)]$, (ii) $[\text{InL}^1(\text{HSO}_4)_2]^-$, (iii) $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)_2]^-$, (iv) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$, (v) $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ and (vi) $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, (vii) $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$, (viii) $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]^-$ and $[\text{InL}^1(\text{CH}_3\text{COO})(\text{HSO}_4)]^-$ in gaseous state.

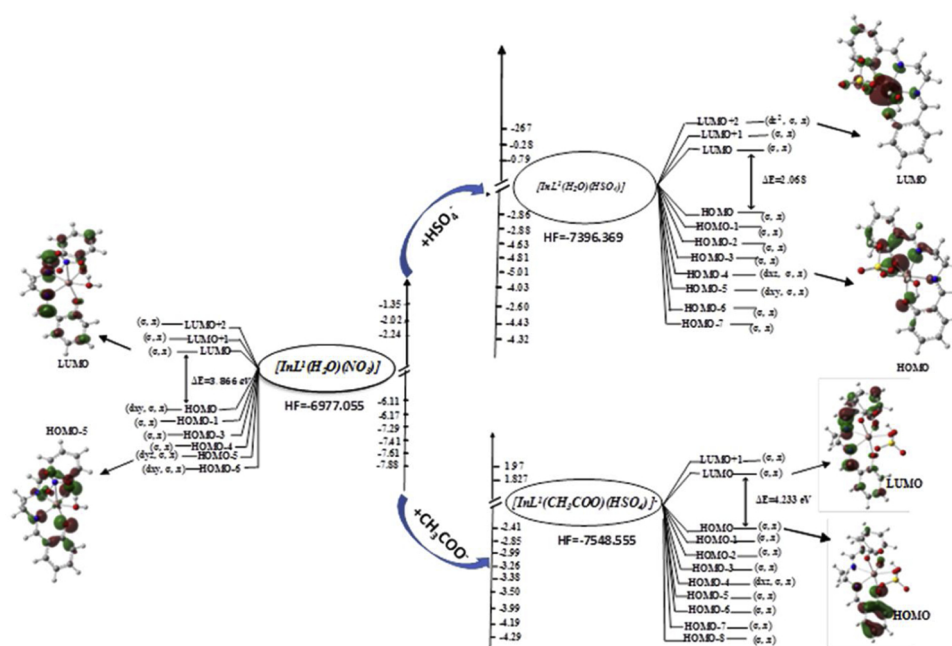


Fig. 7. Molecular orbital analysis of the indium complex during the interaction of bisulfite.

4. Conclusions

Indium(III) complex of N, N'-bis(salicylidene)ethylenediamine performs as fluorescence based chemo-sensor for the selective recognition of HSO_4^- after analyzing different anions, but in the presence of acetate, the intensity is enhanced interfering in the detection of HSO_4^- . Interestingly, the complex is efficiently involved in hemolysis of Red Blood Cells, evidenced by light microscopy and atomic force microscopy, where the cell walls were severely punched by the complex through interaction of carboxylic group of hemoglobin. But in the presence HSO_4^- , the complex is unable to involve the hemolysis because HSO_4^- binds strongly with the complex inhibiting its interaction with hemoglobin. This observation is consistent with anion interference study. Furthermore, the intensity of fluorescence of the complex is quenched if the solution contains HSO_4^- , so the molecular orbital analysis is used to explain how Photo Electron Transfer (PET) relates the HOMO energy of $[\text{InL}^1(\text{NO}_3)(\text{HSO}_4)]$ with the quenching of the intensity, while for $[\text{InL}^1(\text{H}_2\text{O})(\text{CH}_3\text{COO})]$, it is correlated for the enhancing of the intensity.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors acknowledge the General de Asuntos del Personal Académico (Project PAPIIT No. IN209616 and IN222419) for support of this work. The authors gratefully acknowledge the USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM) for analytical services and also thank DGSCA-UNAM for computation facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.011>.

References

- [1] K. Hyun, H. Jin, W.H. Woo, H. Shin, J.H. Lee, H. Hwang, M. Kim, K.M. Lee, M.H. Park, Y. Kim, *Dyes Pigm.* 158 (2018) 285–294.
- [2] D.R. Crapper, S.S. Krishnan, A.J. Dalton, *Science* 180 (1973) 511–513.
- [3] P. Nayak, *Environ. Res.* 89 (2002) 101–115.
- [4] J.R. Walton, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 1275–1284.
- [5] E. House, J. Collingwood, A. Khan, O. Korchazkina, G. Berthon, C. Exley, *J. Alzheimers Dis.* 6 (2004) 291–301.
- [6] C. Exley, L. Swarbrick, R.K. Gherardi, F.-J. Authier, *Med. Hypothes.* 72 (2009) 135–139.
- [7] S.N. Wang, *Coord. Chem. Rev.* 215 (2001) 79–98.
- [8] H.J. Rogers, C. Syngue, V.E. Woods, *Antimicrob. Agent. Chemother.* 18 (1980) 63–68.
- [9] S. David, V. Barros, C. Cruz, R. Delgado, *FEMS Microbiol. Lett.* 251 (2005) 119–124.
- [10] S. Lahiri, M. Maiti, K. Ghosh, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 297 (2013) 309–318.
- [11] C.S. Cutler, H.M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, S.S. Jurisson, *Chem. Rev.* 113 (2013) 858–883.
- [12] M. Neagu, C. Constantin, M. Tampa, C. Matei, A. Lupu, E. Manole, R.M. Ion, C. Fenga, A.M. Tsatsakis, *Oncotarget* 7 (2016) 69718–69732.
- [13] 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) 918–932.
- [14] 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) 5671–5677.
- [15] M.A. Soares, J.A. Lessa, I.C. Mendes, J.G. da Silva, R.G. dos Santos, L.B. Salum, H. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, J.L. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 3396–3409.
- [16] S.W. Kwak, H. Kwon, J.H. Lee, H. Hwang, M. Kim, Y. Chung, Y. Kim, K.M. Lee, M.H. Park, *Dalton Trans.* 47 (2018) 5310–5317.
- [17] J.A.O. Granados, J.G. Hernandez, C.A. Huerta-Aguilar, P. Thangarasu, *Sens. Actuators B Chem.* 270 (2018) 570–581.
- [18] H. Sharma, H.J. Guadalupe, J. Narayanan, H. Hofeld, T. Pandiyan, N. Singh, *Anal. Method.* 5 (2013) 3880–3887.
- [19] J.G. Hernandez, C.A. Huerta-Aguilar, P. Thangarasu, H. Hopfl, *New J. Chem.* 41 (2017) 10815–10827.
- [20] T. Gunnlaugsson, A.P. Davis, J.E. O'Brien, M. Glynn, *Org. Lett.* 4 (2002) 2449–2452.
- [21] D. Maity, T. Govindaraju, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 2098–2104.
- [22] P. Pfeiffer, E. Breith, E. Lubbe, T. Tsumaki, *J. Liebigs Ann. Der Chem.* 503 (1933) 84–130.
- [23] A. Stohr, M. Tabatabai, P. Favresse, K. Roland, H. Ritter, *Polymer Int.* 65 (2016) 544–550.
- [24] J.H. Cheng, Y.X. Li, R. Sun, J.Y. Liu, F. Gou, X.G. Zhou, H.F. Xiang, J. Liu, *J. Mater. Chem. C Mater. Opt. Electron. Devices* 3 (2015) 11099–11110.
- [25] M.R. Ganjali, M.R. Pourjavid, M. Rezapour, T. Poursaberi, A. Daftari, M. Salavati-Niasari, *Electroanal.* 16 (2004) 922–927.
- [26] P. Job, *Ann. Chim. France* 9 (1928) 113–203.
- [27] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703–2707.
- [28] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, G.N. Rega, A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T.Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, *Gaussian 03, Revision D.01*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [29] A.D. Becke, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098–3100.
- [30] C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [31] P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 299–310.
- [32] R.G. Parr, R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7512–7516.
- [33] R.G. Parr, W.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4049–4050.
- [34] W. Yang, R.G. Parr, R. Pucci, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 2862–2863.
- [35] S. Pal, K.R.S. Chandrakumar, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 4145–4153.
- [36] P. Perez, Y. Simon-Manso, A. Aizman, P. Fuentealba, R. Contreras, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 4756–4762.
- [37] W. Yang, W.J. Mortier, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 5708–5711.
- [38] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1793–1873.
- [39] F. Mendez, M. Galvan, A. Garritz, A. Vela, J. Gazquez, *Theochem-J. Mol. Struct.* 96 (1992) 81–86.
- [40] L.P. Wang, T.B. Zhang, L.L. Huang, J.N. Xu, G. Wang, H. Zhang, L. Wang, *J. Mol. Struct.* 975 (2010) 215–219.
- [41] R.L. Arrowsmith, P.A. Waghorn, M.W. Jones, A. Bauman, S.K. Brayshaw, Z.Y. Hu, G. Kociok-Kohn, T.L. Mindt, R.M. Tyrrell, S.W. Botchway, J.R. Dilworth, S.I. Pascu, *Dalton Trans.* 40 (2011) 6238–6252.
- [42] L.P. Wang, T.Y. Song, C. Li, J. Xia, S.Y. Wang, L. Wang, J.N. Xu, *J. Solid State Chem.* 190 (2012) 208–215.
- [43] K. Ostrowska, A. Kazmierska, M. Rapala-Kozik, J. Kalinowska-Thuscik, *New J. Chem.* 38 (2014) 213–226.
- [44] S. Kusaka, R. Sakamoto, H. Nishihara, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 3275–3277.
- [45] R.W. Huang, B. Li, Y.Q. Zhang, Y. Zhao, S.Q. Zang, H. Xu, *Inorg. Chem. Commun.* 39 (2014) 106–109.
- [46] X.M. Wang, R.Q. Fan, L.S. Qiang, P. Wang, Y.T. Yang, Y.L. Wang, *Dalton Trans.* 43 (2014) 16152–16155.
- [47] X.M. Wang, R.Q. Fan, L.S. Qiang, P. Wang, Y.L. Yang, Y.L. Wang, *Inorg. Chem. Commun.* 55 (2015) 73–76.
- [48] F.L. Li, S.P. Yang, W.H. Zhang, Q. Liu, H. Yu, J.X. Chen, J.P. Lang, *Chemistryselect* 1 (2016) 2979–2987.
- [49] P.P. Zhou, X.H. Li, Y.L. Dong, H.M. Liu, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Nano-Metal Chem.* 46 (2016) 783–786.
- [50] Y.X. Tai, Y.M. Ji, Y.L. Lu, M.X. Li, Y.Y. Wu, Q.X. Han, *Synth. Metal.* 219 (2016) 109–114.
- [51] L.J. Zhang, F.Y. Bai, X. Gao, N. Du, Y.H. Xing, L.X. Sun, *New J. Chem.* 41 (2017) 6883–6892.
- [52] P.K. Mehta, G.W. Hwang, J. Park, K.H. Lee, *Anal. Chem.* 90 (2018) 11256–11264.
- [53] W.A. Flegel, *Transfusion* 55 (2015) S47–S58.
- [54] E. Fibach, E. Rachmilewitz, *Curr. Mol. Med.* 8 (2008) 609–619.
- [55] K. Sudha, A.V. Rao, A. Rao, *Clin. Chim. Acta* 303 (2001) 19–24.
- [56] J. Fujii, T. Kurahashi, T. Konno, T. Homma, Y. Iuchi, *World J. Nephrol. Urol.* 4 (2015) 213–222.
- [57] F.A. Carvalho, S. Connell, G. Miltenberger-Miltenyi, S.V. Pereira, A. Tavares, R.A.S. Ariens, N.C. Santos, *ACS Nano* 4 (2010) 4609–4620.
- [58] M. Girasole, G. Pompeo, A. Cricenti, A. Congiu-Castellano, F. Andreola, A. Serafino, B.H. Frazier, G. Boumis, G. Amiconi, *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) – Biomembr.* 1768 (2007) 1268–1276.
- [59] M. Girasole, G. Pompeo, A. Cricenti, G. Longo, G. Boumis, A. Bellelli, S. Amiconi, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 6 (2010) 760–768.
- [60] D. Sanna, M. Serra, G. Micera, E. Garribba, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 1449–1464.
- [61] R.G. Parr, L. Von Szentpaly, S.B. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 1922–1924.
- [62] K. Sathya, P. Dhamodharan, M. Dhandapani, *J. Mol. Struct.* 1130 (2017) 414–424.
- [63] B.J. Coe, M.K. Peers, N.S. Scrutton, *Polyhedron* 96 (2015) 57–65.
- [64] F.X. Cheng, J.S. Chen, F. Wang, N. Tang, L.H. Chen, *Transition Metal Chem.* 36 (2011) 573–578.
- [65] M. Hirahara, S. Nagai, K. Takahashi, K. Saito, T. Yui, M. Yagi, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 7627–7635.
- [66] S. Ghosh, G.K. Chaitanya, K. Bhanuprakash, M.K. Nazeeruddin, M. Gratzel, P.Y. Reddy, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 7600–7611.