



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in CHIMICA E TECNOLOGIE SOSTENIBILI
(ordinamento ex D.M. 270/2004)

Tesi di Laurea

**Sintesi di nuovi complessi
palladaciclopentadienilici con leganti carbenici
N-eterociclici a struttura purinica e loro impiego
come agenti antitumorali**

Relatore

Prof. Fabiano Visentin

Correlatori

Dott. Thomas Scattolin

Prof.ssa Ilaria Lampronti

Laureanda

Sonia Giust

Matricola

834827

Anno Accademico

2016 / 2017

INDICE

1. INTRODUZIONE	p.	1
1.1. IL CANCRO	p.	1
1.1.1. Cos'è il cancro?	p.	1
1.1.2. Cenni sulla regolamentazione del ciclo cellulare e apoptosi	p.	4
1.1.3. Il cancro ovarico	p.	9
1.2. IL PERCORSO TERAPEUTICO	p.	15
1.2.1. Chirurgia	p.	15
1.2.2. Radioterapia	p.	16
1.2.3. Immunoterapia	p.	18
1.2.4. Terapia fotodinamica	p.	19
1.2.5. Terapia foto- e magneto-termica	p.	20
1.2.6. Chemioterapia	p.	23
1.3. COMPOSTI INORGANICI COME FARMACI PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO	p.	26
1.3.1. Cisplatino: il pioniere tra gli agenti chemioterapici	p.	26
1.3.2. Lo sviluppo di farmaci di nuova generazione a base di platino	p.	30
1.3.3. Nuove frontiere in chemioterapia: dal Rutenio al Palladio	p.	33
1.3.4. Complessi di Rutenio	p.	33
1.3.5. Palladio	p.	36
1.4. BASI PURINICHE	p.	40
1.5. LEGANTI SPETTATORI CARBENICI N-ETEROCICLICI (NHCs)	p.	42
1.6. LEGANTI SPETTATORI FOSFINICI E ISONITRILICI	p.	46
1.7. I COMPLESSI PALLADACICLOPENTADIENILICI	p.	47
2. SCOPO DELLA TESI	p.	49

3. RISULTATI E DISCUSSIONE	p.	51
3.1. PARTE CHIMICA	p.	51
3.1.1. Sintesi di N-1 e N-7 alchil-xantine	p.	51
3.1.2. Sintesi dei Sali d'imidazolio a struttura purinica	p.	54
3.1.2.1. Composti 2a-c	p.	54
3.1.2.2. Composti 3a-c	p.	58
3.1.3. Sintesi dei complessi d'argento (I) a struttura purinica	p.	60
3.1.4. Sintesi dei complessi palladaciclopentadienilici	p.	65
3.1.4.1. Complessi biscarbenici a struttura purinica	p.	66
3.1.4.2. Complessi misti NHC / PPh ₃	p.	71
3.1.4.3. Complessi misti NHC / PTA	p.	79
3.1.4.4. Complessi misti NHC / DIC	p.	84
3.2. PARTE BIOLOGICA: ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA	p.	90
3.2.1. Attività citotossica dei complessi ciclopalladati	p.	90
4. CONCLUSIONI	p.	103
5. PARTE SPERIMENTALE	p.	105
5.1. PARTE CHIMICA	p.	105
5.1.1. Solventi e reagenti	p.	105
5.1.2. Strumentazione	p.	105
5.1.3. Sintesi dei precursori di palladio	p.	106
5.1.4. Basi naturali xantiniche commerciali di partenza	p.	108
5.1.5. Funzionalizzazione delle basi xantiniche	p.	110
5.1.6. Sintesi dei Sali d'imidazolio a struttura purinica	p.	112
5.1.7. Sintesi dei complessi d'argento (I) a struttura purinica	p.	110
5.1.8. Sintesi dei complessi palladaciclopentadienilici a struttura purinica	p.	121
5.1.8.1. Sintesi dei complessi biscarbenici	p.	121
5.1.8.2. Sintesi dei complessi misti NHC / PPh ₃	p.	127
5.1.8.3. Sintesi dei complessi misti NHC / PTA	p.	133
5.1.8.4. Sintesi dei complessi misti NHC / DIC	p.	139

5.2. PARTE BIOLOGICA	p. 145
5.2.1. Solventi e additivi biologici	p. 145
5.2.2. Strumentazione	p. 146
5.2.3. Scongelo / congelamento linee cellulari	p. 146
5.2.4. Passaggi cellulari	p. 147
5.2.5. Analisi dell'attività antiproliferativa	p. 149
5.2.6. Effetto citotossico del solvente	p. 151
6. APPENDICE	p. 153
6.1. INCIDENZA, MORTALITÀ E FATTORI DI RISCHIO DELLA MALATTIA	p. 153
6.2. I NUMERI DEL CANCRO IN ITALIA	p. 158
6.3. LA PREVENZIONE TRAMITE SEMPLICI TEST DI <i>SCREENING</i>	p. 160
6.4. L'EVOLUZIONE DELLA DIAGNOSI PRECOCE MEDIANTE TECNICHE DI <i>IMAGING</i>	p. 162
7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	p. 167

CAPITOLO 1

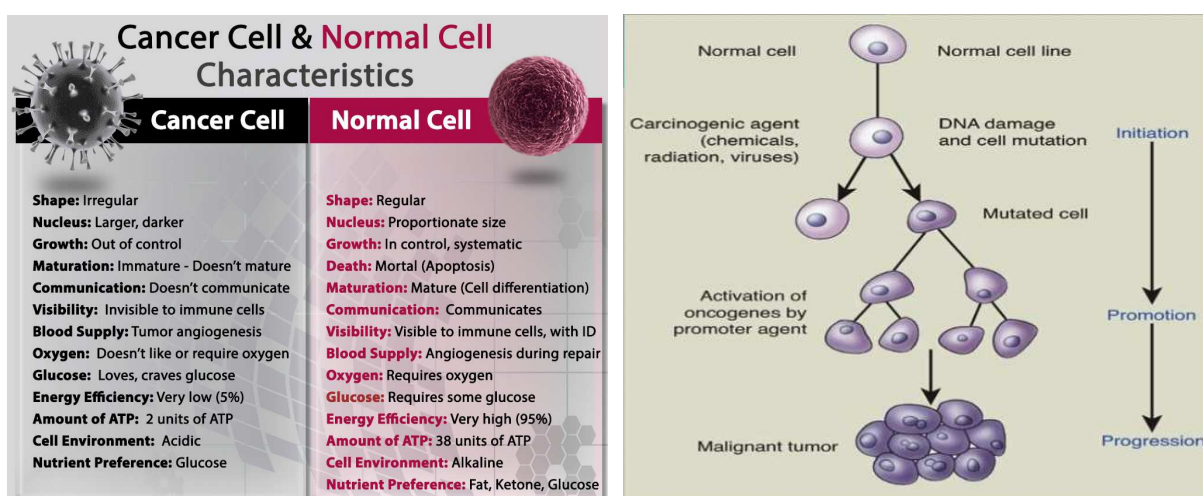
INTRODUZIONE

1.1. IL CANCRO

1.1.1. COS'È IL CANCRO?

L'introduzione della parola "cancro" viene attribuita al padre della medicina Ippocrate, il quale ha coniato il termine "carcinoma" derivandolo da *karcinos*, che in greco significa "granchio". Questa analogia è dovuta al fatto che spesso i tumori si presentano come una massa centrale da cui si sviluppano delle estensioni, forma che ricorda l'aspetto di un crostaceo [1].

In gergo tecnico, parlando di cancro, ci si riferisce genericamente ad una classe di patologie caratterizzate dalla crescita abnorme ed incontrollata di cellule, svincolata dai normali meccanismi di controllo dell'organismo. Il processo di trasformazione di una cellula normale in una neoplastica avviene in più stadi ed è il risultato di un accumulo di anomalie genetiche, funzionali e morfologiche (Figs. 1 e 2).



Figs. 1 e 2 Principali differenze tra cellule tumorali e cellule sane [2], tappe del processo di cancerogenesi [3]

La proliferazione cellulare è un processo fisiologico che ha luogo in quasi tutti i tessuti e in innumerevoli circostanze: normalmente esiste un delicato equilibrio tra divisione cellulare e apoptosi (morte programmata). Le mutazioni nel DNA che conducono al cancro portano alla distruzione di questi processi ordinati e una caratteristica peculiare delle cellule cancerogene è la capacità di dividersi in modo estremamente veloce, dando origine ad ammassi chiamati appunto tumori.

Un processo neoplastico per avviarsi abbisogna di molteplici mutazioni che generalmente interessano i geni deputati al controllo dei processi di riparazione del DNA, di morte e di divisione cellulare. In particolare, ci si riferisce all'attivazione degli oncogeni, i quali promuovono la crescita cellulare e l'inattivazione dei geni che la inibiscono, meglio noti come oncosoppressori. L'organismo umano è in grado, attraverso meccanismi di riparazione e di attivazione del sistema immunitario, di contrastarne i processi di trasformazione, ma quando questa capacità viene meno, la cellula normale si trasforma in tumorale.

La cancerogenesi (Fig. 2) è un processo lungo e complesso e, come già accennato, raramente una singola alterazione genetica è sufficiente allo sviluppo del tumore. In genere, un agente cancerogeno agisce sul DNA cellulare e provoca un processo di iniziazione (rapido e reversibile), seguito da una fase di promozione della crescita neoplastica (lenta ed irreversibile). Altri fattori devono intervenire per favorire la progressione della malattia e, nella maggior parte dei casi, questi processi richiedono anni.

Per la crescita tumorale un fattore critico è rappresentato dal microambiente circostante, cioè tutto ciò che si trova attorno alla massa neoplastica: vi si possono rinvenire tipi di cellule che favoriscono la crescita di quelle cancerogene o al contrario altre in grado di fagocitarle e distruggerle.

Un altro evento cruciale per la progressione della malattia è il cosiddetto *switch* angiogenico. Il tumore, infatti, può rimanere "dormiente" per molto tempo fino a che non si "accende una lampadina", appunto lo *switch* angiogenico, ovvero la capacità del tumore di generare i propri vasi sanguigni e poter così crescere autonomamente [4].

A seconda del tipo di evoluzione si possono individuare tumori benigni che crescono, ma rimangono localizzati, o maligni, capaci invece di diffondere nei tessuti circostanti fino ad arrivare a quelli più distanti, originando così tumori secondari in un processo chiamato metastasi (Fig. 3).

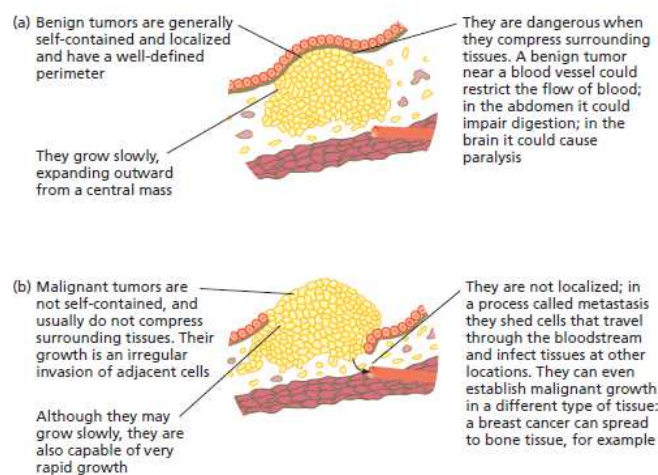


Fig. 3 Differenza tra tumori benigni e maligni [1]

Sono state identificate più di cento tipologie di tumore, distinguibili in base alla causa scatenante e ai sintomi correlati, ma le categorie predominanti sono due:

- il carcinoma, che costituisce approssimativamente il 90% dei tumori umani e che colpisce l'epitelio degli organi interni, delle ghiandole e delle cavità. Questa patologia è comune in seno, colon, polmoni, prostata e ovaie
- il sarcoma, che causa la trasformazione delle cellule del tessuto connettivo come cartilagine, ossa, muscolo oppure grasso. Esistono varie sottocategorie di sarcoma che si differenziano a seconda delle parti del corpo in cui si localizzano, ma principalmente la patologia interessa gli arti superiori ed inferiori.

Esistono anche tipologie di cancro che non portano alla formazione di masse solide discrete (tumori in senso stretto) e tra queste vanno menzionati il linfoma, patologia legata al sistema linfatico, e la leucemia, che attacca il midollo osseo portando alla sovrapproduzione e al rilascio precoce di leucociti immaturi.

In sintesi, all'origine di tutti i tumori vi sono delle mutazioni che si accumulano nel DNA di una singola cellula causandone un funzionamento anormale, fenomeno che si estende poi alle sue progenie.

Ad oggi, il 90-95% delle diagnosi di cancro è attribuibile ad alterazioni sporadiche del DNA che avvengono spontaneamente nel corso della vita della cellula per varie ragioni: ad esempio possono essere la conseguenza di un errore nella copia del DNA in una fase antecedente alla divisione cellulare, possono essere dovute alla non corretta riparazione di una molecola di DNA danneggiato oppure possono derivare da modificazioni chimiche del DNA.

Di minore impatto sono invece le mutazioni di tipo ereditario, presenti nell'informazione genetica di sperma e ovuli al momento del concepimento.

A prescindere dal fattore scatenante, il risultato finale è un'alterazione nell'espressione di alcuni geni che interferisce con il normale funzionamento delle cellule.

Dalla comparazione tra il DNA contenuto in un campione di tessuto prelevato da un paziente (e da membri di famiglie con un'alta incidenza verso un particolare tipo di tumore) e quello presente in un individuo sano è possibile individuare i geni interessati dalla mutazione e correlare quel tipo di alterazione ad una specifica tipologia di tumore.

Questo approccio scientifico permette di diagnosticare la malattia in una fase precoce e di individuare un percorso terapeutico adeguato al fine di massimizzare le probabilità di sopravvivenza.

1.1.2. CENNI SULLA REGOLAMENTAZIONE DEL CICLO CELLULARE E APOPTOSI

La crescita a livello cellulare è caratterizzata da un aumento nelle dimensioni della cellula stessa, causato da un incremento sia della quantità delle proteine, dei carboidrati e dei lipidi in essa contenuti che della dimensione o del numero degli organelli presenti.

Una cellula si sviluppa attraverso diversi stadi proprio come accade ad una persona. Il processo di crescita e sviluppo cellulare è noto come ciclo cellulare ed è costituito da 5 fasi: G0, G1, S, G2 ed M [1].

Le prime quattro tappe costituiscono l'interfase, il periodo in cui la cellula porta avanti le sue normali funzioni o si prepara alla successiva divisione che avviene nell'ultima tappa per meiosi o mitosi, a seconda del tipo di cellule coinvolte nel processo, rispettivamente germinali o somatiche.

Nella maggior parte dei casi le cellule somatiche sono in grado di dividersi, ma lo fanno solo quando è necessario per rimpiazzare cellule danneggiate o morte; diversamente permangono negli stadi G1 o G0. Le cellule entrano nella fase G0 laddove non vi sia un'immediata necessità di dividersi e sostanzialmente arrestano la loro crescita (quiescenza). Quelle che sono in grado di dividersi escono dalla fase G0 ed entrano nella G1, la prima tappa di crescita, dove possono rimanere, a seconda del tipo di cellula, per qualche minuto o per diverse ore.

In preparazione alla divisione, la cellula passa dallo stadio G1 all'S che consiste nella replicazione del DNA (duplicazione dei cromosomi). A questo punto la cellula procede in G2, la seconda fase di crescita, aumentando le sue dimensioni ed il numero di componenti.

Seguendo la progressione, si passa quindi al periodo contraddistinto con M, in cui la cellula si divide producendo due cellule figlie, le quali entrano immediatamente in G1. L'intero ciclo dura in media 12-24 ore, di cui la fase M occupa solo, approssimativamente, dai 30 ai 60 minuti [1].

Nella pelle, nel tratto digestivo e nel sangue si osserva un elevato ricambio cellulare con velocità di *turnover* relativamente alte, mentre le cellule mature ed altamente differenziate (ad esempio quelle nei muscoli e nei nervi) si mantengono quasi esclusivamente in G0 e solo raramente mostrano la capacità di rientrare nel ciclo cellulare e dividersi.

Il tempo e la velocità con cui una cellula progredisce nel ciclo cellulare devono essere accuratamente controllati al fine di preservare l'integrità strutturale e funzionale di tessuti, organi, apparati e, in ultima battuta, della persona stessa.

La regolazione del ciclo cellulare dipende dall'appropriata interazione di proteine prodotte da due tipologie di geni: i proto-oncogeni e gli oncosoppressori, i quali rispettivamente promuovono e inibiscono l'avanzamento di tale processo [1]. Nell'insieme, l'attività antagonista di queste

proteine origina un sistema di controllo e bilanciamento che, in ultima analisi, determina se la cellula andrà incontro alla divisione o alla morte; l'abilità di un tipo di proteine di sovrastare le altre dipende in maggior parte dal tipo di segnali che una cellula riceve o meno.

Ogni fase del ciclo cellulare contiene quindi dei “*checkpoints*” dove il processo viene temporaneamente arrestato fino a che non si presenta un set di condizioni adeguate. Vi sono due punti di controllo nella fase G₁, il primo dei quali è un punto di restrizione largamente controllato da fattori di crescita esterni, in assenza dei quali la cellula non prosegue oltre o rimane segregata nella precedente G₀. La maggior parte delle cellule del corpo possiede dei recettori per questi fattori di crescita che permettono il superamento di questo posto di blocco.

Un secondo *checkpoint* in G₁ e quello in S permettono alla cellula di stabilire se vi siano o meno alterazioni del DNA: in caso di danni il ciclo cellulare viene interrotto temporaneamente per permetterne la riparazione. Sarebbe, infatti, uno spreco di risorse e di energia, ma soprattutto una potenziale fonte di rischio per l'organismo, permettere ad una cellula con DNA danneggiato di superare la fase G₁ ed entrare nella S, replicando informazioni contenute in cromosomi modificati. Laddove il danno si presenti troppo esteso, la cellula può intraprendere un percorso di morte programmata, definita apoptosi. Si può pensare a questo fenomeno come ad un atto altruistico a beneficio dell'intero organismo: cellule che non sono più in grado di svolgere le loro funzioni, a causa di una corrotta informazione genetica, vanno incontro alla morte piuttosto che mettere a rischio la salute del sistema.

Successivamente, nella fase G₂, viene controllato che il DNA non solo sia intatto, ma sia stato anche interamente replicato, al fine di permettere l'entrata in M di una cellula con due set di cromosomi completi. La progressione attraverso M viene infine bloccata se i cromosomi non mostrano le adeguate caratteristiche per la divisione, come ad esempio un perfetto allineamento al centro della cellula (*Fig. 4*).

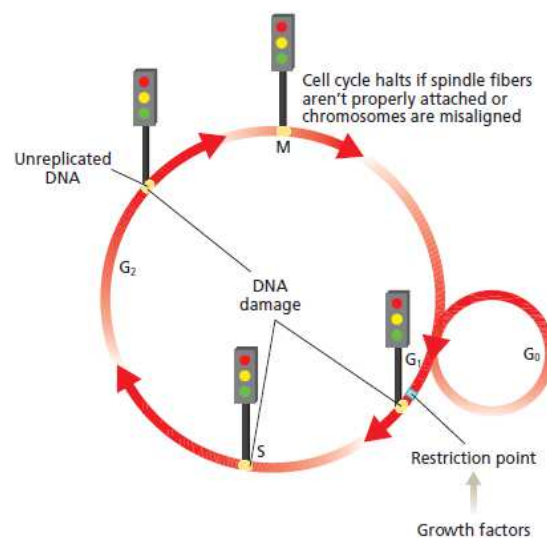


Fig. 4 Ciclo cellulare e checkpoints in esso presenti [1]

Le anomalie presenti nelle cellule tumorali permettono spesso a queste ultime di progredire all'interno del ciclo cellulare superando i suddetti "semafori" nonostante la luce non sia "verde"; una perdita di efficacia nei punti di controllo permette al tumore di accumulare mutazioni nei cromosomi che non sarebbero tollerate nella normalità.

I tumori comunemente contengono cellule con una varietà di differenti anomalie genetiche, le quali si riflettono in diverse caratteristiche di crescita e/o di risposta al farmaco.

I proto-oncogeni sono necessari per il normale funzionamento delle cellule ed è solo quando questi geni mutano in una specifica maniera, diventando oncogeni, che possono contribuire all'evoluzione maligna delle cellule. Tali alterazioni aumentano le funzioni di proteine che promuovono il passaggio attraverso il ciclo cellulare, incrementando i segnali intracellulari che portano alla divisione ed alla sopravvivenza.

In *figura 5* è riportata la lista di alcuni oncogeni per cui è stato appurato un ruolo nello sviluppo di tumori umani.

Oncogene	Type of cancer
<i>ERBB2 (a.k.a. Her-2/neu)</i>	Brain, breast, lung, ovarian, stomach
<i>KRAS</i>	Colorectal, lung, pancreatic
<i>HRAS</i>	Bladder, kidney, thyroid
<i>NRAS</i>	Leukemias, thyroid
<i>BRAF</i>	Colorectal, melanoma, ovarian, thyroid
<i>SRC</i>	Colorectal
<i>BCR-ABL</i>	Chronic myelogenous leukemia
<i>C-MYC</i>	Breast, Burkitt's lymphoma, lung
<i>L-MYC</i>	Small cell lung cancer
<i>N-MYC</i>	Lung, neuroblastoma
<i>CYCD1</i>	Breast, lymphomas
<i>CDK4</i>	Glioblastoma, melanomas, sarcomas
<i>BCL2</i>	Non-Hodgkin's lymphoma
<i>MDM2</i>	Sarcomas

Fig. 5 Esempi di oncogeni e corrispondenti categorie di tumori [1]

L'attività delle proteine codificate dai proto-oncogeni è controbilanciata da quella di un'altra serie di proteine codificate dagli oncosoppressori, che sono invece deputate ad inibire la proliferazione e a promuovere la morte cellulare. Anche questa seconda categoria di geni può subire delle mutazioni che alterano la struttura delle corrispondenti proteine in modo tale da indebolirne la capacità di svolgere la funzione cui sono deputate. La conseguenza ultima è la mancanza della regolazione del ciclo cellulare che può comportare la diminuzione o la completa mancanza di avvio sotto predeterminate condizioni dell'apoptosi.

Esiste un'ampia gamma di tumori associata alla mutazione di specifici oncosoppressori (Fig. 6).

Genes	Type of cancer
Gatekeeper genes	
<i>APC</i>	Colorectal
<i>RB1</i>	Bladder, breast, lung, melanoma, retinoblastoma, osteosarcoma
<i>p53</i>	Brain, breast, colorectal, esophageal, liver, lung, sarcomas, leukemias, lymphomas
Caretaker genes	
<i>ATM</i>	Bladder, breast, ovarian, pancreatic, stomach
<i>BRCA1</i>	Breast
<i>BRCA2</i>	Breast, melanoma, ovarian, pancreatic, prostate

Fig. 6 Esempi di oncosoppressori e corrispondenti categorie di tumori[1]

Si individuano due tipi di geni oncosoppressori: una prima categoria è deputata al mantenimento dell'integrità del genoma e codifica proteine in grado, ad esempio, di riparare i danni strutturali ai cromosomi, mentre una seconda famiglia di geni produce delle proteine che esplicano un ruolo di controllo nei *checkpoints*. Queste ultime non consentono di procedere oltre nel ciclo cellulare se tutte le condizioni necessarie non sono rispettate.

È stimato che in più del 50% dei tumori sia presente una variazione nel gene *p53*, deputato alla codifica della corrispondente proteina che agisce sia nei punti di controllo in G1, S e G2 che nella regolazione dell'espressione di molti altri geni, i quali promuovono a loro volta l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA e l'apoptosi [1].

La conseguenza ultima, di una serie di eventi a cascata, è la potenziale divisione senza controllo di cellule anomale, con formazione di neoplasia.

Si può pensare all'apoptosi come ad una normale "routine suicida" fisiologica che attiva una serie di modificazioni biochimiche che a loro volta causano la morte programmata della cellula.

Questo fenomeno può anche essere innescato come meccanismo di difesa in risposta a situazioni biologiche che rappresentano una minaccia per l'organismo: mutazioni o danneggiamento del DNA che, come già ampiamente descritto, possono portare a tumori, ma anche infezioni virali o condizioni di stress ambientale, come ad esempio stress termico, osmotico, da irradiazione da luce UV o da radiazioni γ .

Queste premesse mostrano l'importanza della presenza nelle cellule eucariote di un programma di morte che deve essere controllato ed innescato in ben determinate condizioni e per specifici tipi di cellule. L'attivazione e la regolazione del processo di apoptosi possono essere scatenate

sia da segnali estrinseci che intrinseci e richiedono il coinvolgimento di proteine che partecipano alla regolazione del ciclo cellulare.

La via estrinseca dell'apoptosi parte da segnali esterni alla cellula, i quali interagiscono con specifici recettori proteici che attraversano la membrana in tutto il suo spessore o che si trovano liberi nel citosol delle cellule da eliminare, attivando una via di trasduzione del segnale che porta alla morte della cellula. Questa interazione porta, infatti, ad una modificazione conformazionale del recettore che può così formare un complesso multi proteico con altre proteine citosoliche tra cui le caspasi (cisteina-aspartato proteasi), capaci di idrolizzare legami peptidici cui partecipa un residuo di acido aspartico. Le caspasi, di per sé inattive, vengono attivate con un meccanismo a catena ed il risultato finale è la degradazione del DNA intranucleosomico, portando alla morte cellulare [5].

La via intrinseca dell'apoptosi parte invece dai mitocondri e l'evento centrale è la fuoriuscita del citocromo c nel citosol, qui esso forma un complesso con altre proteine citosoliche e nuovamente vengono coinvolte ed attivate le caspasi.

L'atto finale dell'apoptosi è la degradazione dei costituenti cellulari delle cellule morte, soprattutto proteine e DNA. Ciò avviene in gran parte nei macrofagi, cioè "cellule spazzino" dell'organismo, i quali fagocitano le cellule in apoptosi riconoscendone uno specifico segnale di membrana (fosfatidilserina) [5].

I prodotti della digestione compiuta dai macrofagi vengono rilasciati nello spazio extracellulare da dove sono in gran parte recuperati dalle cellule vicine: vengono così eliminate delle cellule, recuperandone, però, i costituenti.

1.1.3. IL CANCRO OVARICO

“Ho il cancro. Non essere triste. Parla e ridi con me. Celebra la vita con me.”

Barbara Kennedy, paziente affetta da cancro ovarico [1]

Una generica classificazione dei tumori viene fatta associando la malattia alla parte del corpo in cui essa si è originata. A titolo di esempio, sono riportate nell'immagine sottostante alcune tipologie di neoplasia accorpate all'interno delle macrocategorie presentate in precedenza (Fig. 7).

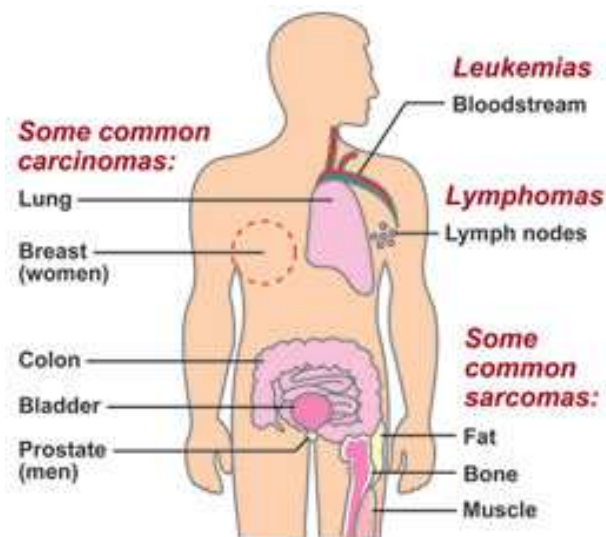


Fig. 7 Classificazione dei tumori in base alla zona del corpo umano che essi interessano [6]

Un'altra distinzione viene fatta sulla base dello stadio di avanzamento della patologia, ovvero la valutazione delle dimensioni del tumore, dell'invasione di tessuti adiacenti, dell'interessamento di linfonodi e della presenza o meno di metastasi.

In questo caso vengono attribuiti dei numeri crescenti da 0 a IV, cui corrispondono rispettivamente le situazioni limite di un tumore *in situ*, che si manifesta in un singolo gruppo di cellule senza penetrare la membrana basale, e di un cancro metastatico, il quale è migrato dalla sua locazione iniziale fino a compromettere le funzionalità di uno o più organi aggiuntivi [1].

Il cancro ovarico è un tumore maligno che si sviluppa nei tessuti delle ovaie, organi riproduttivi della donna nei quali si formano gli ovuli e dove vengono prodotti gli ormoni femminili.

Quando il cancro è originato dalle cellule presenti sulla superficie dell'ovaio viene denominato tumore epiteliale dell'ovaio (carcinoma ovarico), il quale costituisce il 90% dei tumori primari dell'ovaio mentre, quando la patologia nasce da altri tessuti all'interno dell'ovaio, è detto tumore non epiteliale dell'ovaio; entrambi i termini si riferiscono ad un gruppo molto eterogeneo di differenti sottotipi di neoplasia.

In particolare, le principali tipologie di cancro ovarico non epiteliale comprendono i rari tumori maligni delle cellule germinali e quelli dello stroma e dei cordoni sessuali.

L'incidenza globale del tumore ovarico mostra una forte variabilità geografica, con i valori inferiori registrati nei paesi in via di sviluppo [7].

Circa la metà delle donne a cui viene diagnosticato il cancro ovarico ha un'età pari o superiore ai 60 anni, tuttavia anche donne giovani possono essere colpite dalla neoplasia. I tumori germinali, ad esempio, sono particolarmente ricorrenti nelle prime due decadi di vita, mentre i tumori dello stroma e dei cordoni sessuali sono diffusi nelle donne adulte.

Evidenze scientifiche identificano la presenza di 3 principali categorie di fattori di rischio: ormonali, ambientali ed eredo-familiari, correlate in modo specifico alle varie sottocategorie di cancro ovarico presentate in precedenza.

Fino al 90% dei casi di cancro ovarico sono definiti come forme sporadiche, ovvero non associabili a mutazioni genetiche ereditarie (cioè alterazioni che si verificano nelle cellule destinate a diventare ovuli e che si trasmettono poi da genitore a figlio), mentre il 10% è legato ad una storia familiare di cancro dell'ovaio o della mammella, per i quali esiste una correlazione tra la probabilità d'insorgenza della malattia e la presenza di mutazioni nei geni BRCA1 e/o BRCA2.

Oltre all'invecchiamento, un ulteriore fattore di rischio è l'etnia in quanto è stato osservato che donne bianche (caucasiche) presentano un rischio di contrarre la malattia del 30-40% maggiore rispetto a donne nere o ispaniche. D'altra parte l'allattamento, la multiparità, l'uso di contraccettivi orali e la chirurgia ginecologica (legatura delle tube, isterectomia e ovariectomia) sono associati ad una minore probabilità d'insorgenza della neoplasia [1].

Il sospetto di cancro ovarico può nascere sulla base di alcune avvisaglie specifiche avvertite dalla donna o durante una visita di controllo routinario, quando l'esame clinico evidenzia la presenza di una massa nella cavità addominale, causa dei principali sintomi del tumore ovarico.

Si tratta di segnali del tutto generici come ad esempio inappetenza, dolore nelle pelvi, alterazioni delle abitudini intestinali e minzionali che, sebbene possano degenerare con l'avanzamento della malattia e portare a nausea, ascite, ostruzione intestinale e versamento pleurico, risultano associabili anche ad altre patologie.

Il tumore ovarico maligno può produrre invece sostanze ormonali che portano alla comparsa di sintomi specifici e questo si osserva con maggiore frequenza nei tumori dello stroma e dei cordoni sessuali.

Ad esempio, una produzione eccessiva di estradiolo può provocare un inizio precoce della pubertà in ragazze giovani, irregolarità del ciclo mestruale in donne in premenopausa e

sanguinamento uterino postmenopausale in soggetti in postmenopausa, mentre una produzione eccessiva di testosterone può portare a virilizzazione [1].

La diagnosi del cancro ovarico si basa sui seguenti esami, spesso eseguiti in modo congiunto al fine di avere maggiore certezza nell'esito:

- Esami clinici (generici o più specifici)
- Esami diagnostici per immagini (ecografia transvaginale, risonanza magnetica, TAC, PET)
- Marcatori tumorali (ad esempio antigene tumorale CA125)
- Esami di laboratorio che consentono di determinare le caratteristiche specifiche del tumore e definirne il tipo istologico secondo i criteri dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità). L'esame istologico viene effettuato anche per altri tessuti e organi in cui il tumore potrebbe essersi esteso e rientra in una procedura detta di "stadiazione chirurgica", conforme alle linee guida della FIGO (*International Federation of Gynaecology and Obstetrics*) e che include anche tecniche di laparotomia, laparoscopia e biopsia.

Sulla base dei risultati ottenuti, di tipo istologico e stadiazione del tumore (*Fig. 8*), interviene un'*equipe* multidisciplinare di professionisti medici che ha il compito di effettuare una valutazione ponderata, caso per caso, di benefici, rischi e controindicazioni al fine di stilare la pianificazione del percorso terapeutico più efficace, il quale, in genere, combina chirurgia e chemioterapia a vario titolo [7].

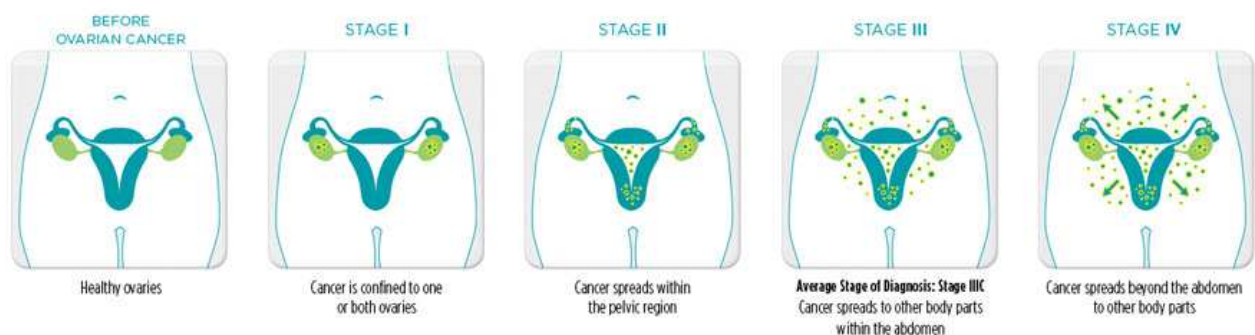


Fig. 8 Stadiazione del tumore ovarico [8]

Il trattamento chemioterapico del cancro ovarico si basa principalmente sull'uso del *cisplatino* (e del suo derivato carboplatino), ma una delle criticità maggiormente osservate consiste proprio nello sviluppo di resistenza al farmaco e pertanto sono in atto numerosi studi volti ad

incrementare l'azione di tale composto, previo accoppiamento, in specifica sequenza, con altre sostanze dalle note proprietà anticarcinogeniche [9].

La ricerca è stata recentemente indirizzata anche verso la sintesi di nuovi composti, principalmente composti di coordinazione e composti metallorganici che, sulla base della scelta oculata dei leganti e del centro metallico coinvolti, possano candidarsi quali potenziali agenti chemioterapici.

Il percorso che porta poi all'immissione sul mercato di un nuovo farmaco richiede molti anni e il superamento di ben determinati test appartenenti alle diverse fasi cliniche (Fig. 9).

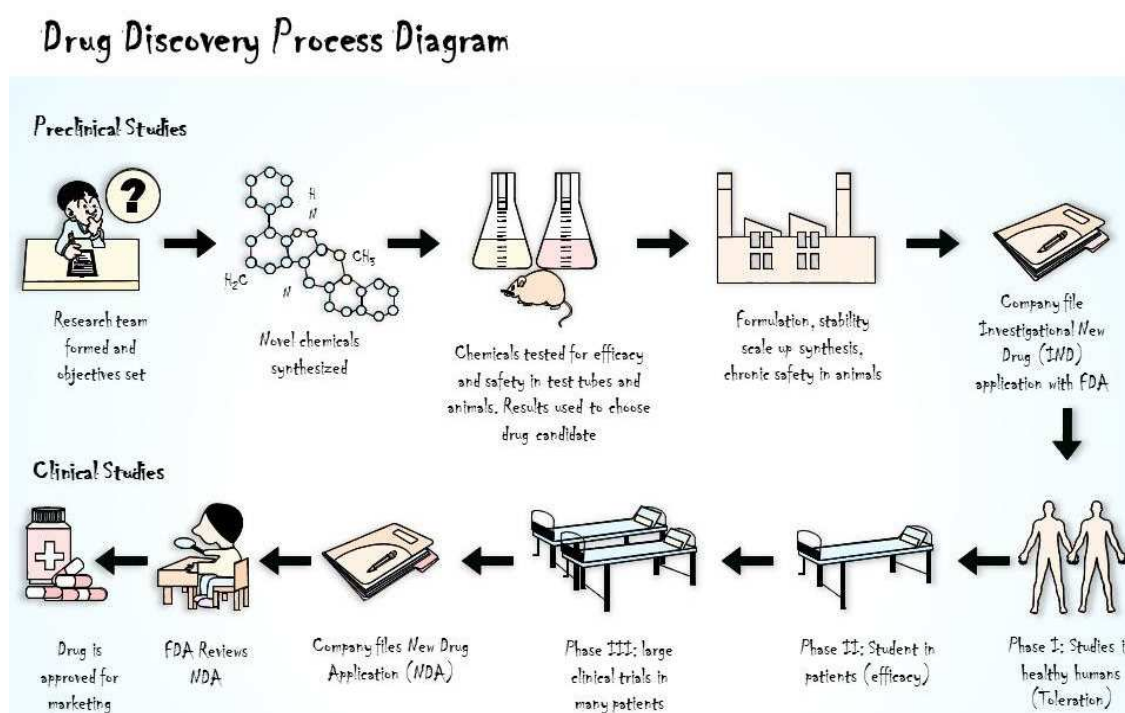


Fig. 9 Tappe che intercorrono tra la scoperta e la commercializzazione di un nuovo farmaco [10]

All'origine dell'iter vi sono esperimenti *in vitro*, in cui l'effetto citotossico dei composti sintetizzati viene generalmente saggiato su varie linee cellulari tumorali al fine di determinarne il valore di IC_{50} . Questo parametro è definito come la concentrazione del composto che porta all'inibizione del 50% della popolazione bersaglio e, tanto minore è il valore ottenuto, tanto migliore risulta l'azione del farmaco.

Successivamente, i complessi più performanti e promettenti vengono sottoposti ad analisi finalizzate a determinare se l'effetto citotossico possa essere correlato o meno all'innescarsi di ben determinati meccanismi di morte programmata, definita apoptosi.

Sulla base dei risultati ottenuti, si procede all'esecuzione di ulteriori prove volte ad indagare nel dettaglio il meccanismo d'azione del composto, generalmente basato su interazioni con specifici *target* biologici, e successivamente vengono condotti i test *in vivo* sugli animali.

In caso di esito positivo si procede con la fase clinica sull'uomo divisa in 3 stadi [11]:

- **FASE 1:** Condotta in pochi centri selezionati, su un numero limitato di volontari sani in età non avanzata, per i quali siano state documentate l'assenza e la non predisposizione a malattie. Lo scopo è valutare gli effetti collaterali che possono essere attesi in relazione a quanto emerso nelle precedenti sperimentazioni sugli animali, oltre a investigare la modalità di azione e distribuzione del farmaco nell'organismo.

Nel caso di gravi patologie (es. tumori e AIDS) questi studi possono essere condotti direttamente su pazienti che ne sono affetti.

Qualora il farmaco dimostri di avere un livello di tossicità accettabile rispetto al beneficio previsto, può passare alle successive fasi della sperimentazione.

- **FASE 2:** La sostanza è somministrata a soggetti volontari affetti dalla patologia oggetto di studio e vengono generalmente divisi in più gruppi, a ciascuno dei quali è somministrata una dose differente del farmaco e, se possibile, un placebo (sostanza priva di efficacia terapeutica). Per evitare che la somministrazione del placebo influenzi le aspettative, le valutazioni dei parametri di attività e sicurezza sono condotte senza che paziente e medico conoscano il tipo di trattamento ricevuto. Questa seconda fase, che dura circa due anni, è utile a dimostrare la non tossicità e l'attività del nuovo principio attivo sperimentale.

- **FASE 3:** La tipologia di studio di riferimento in questa fase è lo "Studio clinico controllato randomizzato".

Si tratta di un tipo di studio in cui ai pazienti viene assegnato casualmente il nuovo principio attivo o un farmaco di controllo (es. *cisplatino*). Tale studio è molto affidabile nel definire l'efficacia di un medicinale, infatti, l'attribuzione casuale del nuovo farmaco o del farmaco di controllo garantisce che i due gruppi siano simili per tutte le caratteristiche salvo che per il medicinale assunto. Dunque, alla fine della sperimentazione, sarà possibile attribuire ogni differenza nella salute dei partecipanti esclusivamente al trattamento e non ad errori o al caso.

Durante questa fase vengono controllate con molta attenzione l'insorgenza, la frequenza e la gravità degli effetti indesiderati. La durata della somministrazione del farmaco è variabile a seconda degli obiettivi che la sperimentazione si pone, ma in genere dura diversi mesi. Il periodo di monitoraggio degli effetti del farmaco è invece spesso più lungo, arrivando in qualche caso a 3-5 anni.

Ritornando ai test preliminari *in vitro*, oggetto di questo lavoro di tesi, le linee tumorali di cancro ovarico epiteliale generalmente impiegate sono:

- A2780
- SKOV-3
- OVCAR5

In particolare, le cellule A2780 derivano dal tessuto tumorale appartenente ad una paziente non sottoposta a terapia. Si tratta di cellule che crescono in adesione fino a formare un monostrato e dalle quali, mediante esposizione cronica a quantità crescenti di *cisplatin*, sono state ottenute le A2780*cis*. Queste ultime mostrano resistenza anche all'irraggiamento, al melfalan (agente alchilante) e all'adriamicina (antibiotico antineoplastico) [12a].

Vengono riportate in seguito delle immagini raffiguranti rispettivamente le cellule delle linee tumorali A2780 e A2780*cis*, derivanti dalle banche dati ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*) (Fig. 10).

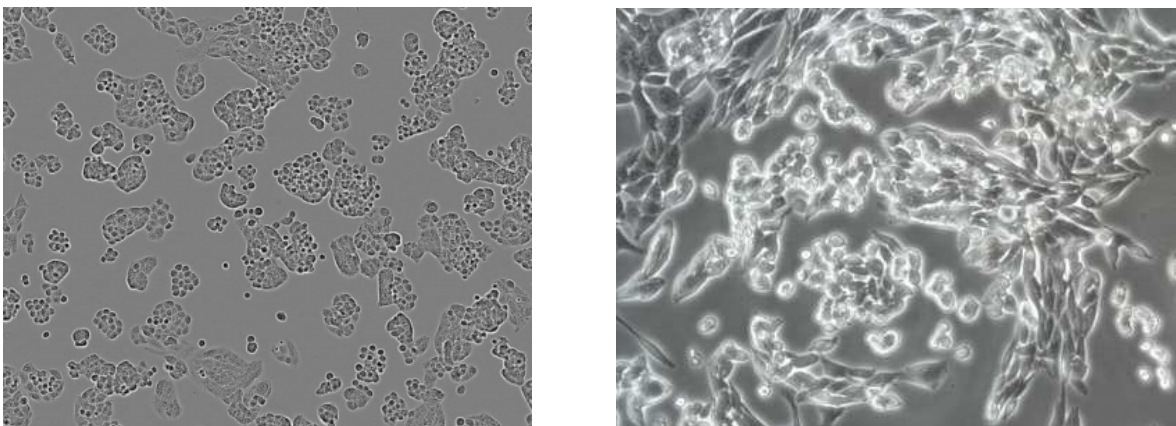


Fig. 10 Cellule A2780 a 48 ore dalla semina e A2780cis pronte per il passaggio cellulare osservate al microscopio [12a]

Per quanto concerne le SKOV-3, si tratta anche in questo caso di cellule di carcinoma ovarico che crescono in adesione, estratte dal fluido ascitico di una paziente caucasica di 64 anni [12a].

Infine, la linea cellulare tumorale OVCAR5 deriva da una donna caucasica di 67 anni, non precedentemente trattata con alcun farmaco [12b].

1.2. IL PERCORSO TERAPEUTICO

Il passo successivo alla diagnosi di una neoplasia consiste nell'individuare l'appropriato percorso terapeutico cui sottoporre il paziente al fine di curarlo.

Per raggiungere questo scopo è necessario ponderare molti fattori tra cui il tipo di cancro ed il suo stadio, la presenza di metastasi, l'età e le condizioni generali di salute del singolo individuo e, in alcuni casi, la presenza di specifiche mutazioni genetiche.

Laddove non sia possibile ottenere una remissione totale del tumore, l'obiettivo diventa convertire la malattia in una condizione cronica o perlomeno, nei casi peggiori, prolungare l'aspettativa di vita di una persona, minimizzando al contempo la sua sofferenza.

1.2.1. CHIRURGIA

L'intervento chirurgico è il metodo più antico, versatile e comunemente usato nel trattamento di tumori confinati in specifiche zone del corpo ed offre la maggior speranza di cura completa, tramite rimozione di una quantità di tessuto variabile a seconda della dimensione del tumore stesso [1].

La chirurgia è considerata un potente strumento *borderline* tra cura e prevenzione in quanto anche individui sani, ma in possesso di specifici alleli, per i quali si è accertata una predisposizione genetica allo sviluppo di determinate patologie, possono decidere arbitrariamente di sottoporsi a operazioni preventive, più o meno invasive, al fine di ridurre il rischio di future neoplasie maligne.

Ad esempio, donne con determinate variazioni dei geni BRCA1 o BRCA2, più soggette a contrarre cancro al seno e/o ovarico, possono valutare di effettuare una doppia mastectomia e/o la rimozione delle ovaie e successivamente possono ricorrere a interventi ricostruttivi per cercare di ripristinare l'aspetto iniziale del corpo.

In alcuni casi il tumore risulta collocato in una posizione tale da renderne impossibile la rimozione totale; diversamente, si potrebbe compromettere seriamente la funzione dell'organo malato o di quelli adiacenti. In questi casi, si procede alla rimozione parziale della massa tumorale al fine di ridurre le dimensioni e di massimizzare l'efficacia di altre tecniche terapeutiche coadiuvanti.

Infine, la chirurgia palliativa non ha intenti curativi, ma è finalizzata a diminuire la sintomatologia dolorosa, migliorando quindi la qualità della vita del paziente affetto da cancro.

Con il progredire della scienza e della tecnologia medica, la chirurgia si propone come strumento sempre meno invasivo e la ricerca è finalizzata a ridurre l'impatto di possibili effetti collaterali o complicanze.

Si inseriscono in questo contesto le tecniche che operano in laparoscopia e che richiedono solamente piccole incisioni per inserire il laparoscopio ed altri strumenti chirurgici necessari [1].

1.2.2. RADIOTERAPIA

Circa il 50% delle persone a cui viene diagnosticato il cancro viene sottoposto a radioterapia e pertanto esposto ad una radiazione ionizzante (dotata di energia sufficiente a strappare elettroni dagli atomi) somministrata sotto forma di particelle cariche o, più frequentemente, tramite fotoni ad alta energia come raggi γ generati dal decadimento di un elemento radioattivo (radio-farmaco terapeutico) o fasci di raggi X prodotti da un generatore e collimati con precisione sul tumore [1]. Indipendentemente dal metodo impiegato, l'obiettivo perseguito è quello di indurre gravi ed estesi danni nel DNA delle cellule tumorali fino a causarne la morte, sfruttando la minore capacità di riparazione che queste cellule mostrano rispetto a quelle sane nei confronti delle alterazioni indotte.

Idealmente, i farmaci dovrebbero essere in grado di localizzarsi sul sito malato in concentrazione sufficiente per fornire una quantità di radiazione tale da essere citotossica, ma dovrebbero in seguito allontanarsi rapidamente dal sangue; nella pratica, l'uso del radionuclide è vincolato all'impiego di un *targeting vector*, tipicamente un anticorpo, che ne aumenti la selettività (Fig. 11).

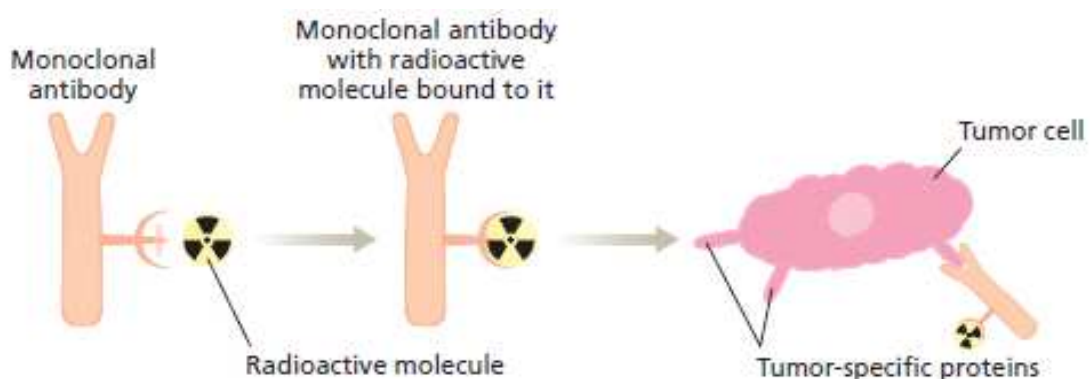


Fig.11 Isotopo radioattivo vincolato ad un anticorpo selettivo verso una proteina presente sulla superficie della cellula tumorale [1]

Questa strategia definisce il campo della radio-immunoterapia, la quale si avvale principalmente di radionuclidi emettitori di particelle β (tra cui ^{131}I , ^{90}Y e vari lantanidi) o α (^{212}Bi e ^{213}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{223}Ra e ^{212}Pb) [13].

Al paziente può essere somministrato un piccolo numero di dosi elevate di radiazioni o la stessa quantità può essere frazionata in più sedute: in quest'ultimo caso si osservano i migliori risultati in quanto viene massimizzata la differenza nella risposta al trattamento da parte delle cellule malate rispetto a quelle sane, dando modo a queste ultime di riprendersi.

In ogni caso, frequenza e dose vengono opportunamente modulate sulla base del tipo di cancro e dello stato di salute del singolo paziente al fine di ottenere un percorso terapeutico ottimale, in particolar modo la radioterapia si presta con successo alla cura di leucemie e di linfomi (caratterizzati da singole cellule tumorali in un fluido).

Normalmente, in seguito ai danni riportati al suo DNA, il ciclo vitale di una cellula viene arrestato in quanto vengono attivate una serie di reazioni che, nel complesso, incrementano la produzione della proteina p53 (proteina codificata dal gene oncosoppressore p53, la quale monitora l'integrità del DNA) e questo fornisce il tempo necessario alla riparazione dei cromosomi prima della loro replicazione. Tuttavia, se il danno è talmente grave da non potervi porre rimedio, la stessa proteina innesca il processo di apoptosi o morte programmata. Più della metà dei tumori umani possiedono, però, una mutazione del gene responsabile della produzione della p53 che non permette alla proteina stessa di funzionare adeguatamente e che si traduce in una particolare aggressività del tumore, il quale sviluppa una certa resistenza al trattamento [1].

Si deve anche considerare che i fotoni danneggiano il DNA in modo indiretto tramite generazione di ROS (*Reactive Oxygen Species*) e che molti tumori solidi hanno sviluppato una grande capacità di adattamento a condizioni ambientali avverse diventando ipossici.

Sia per questi motivi, che per la presenza di danni fisiologici collaterali a tessuti sani, spesso la radioterapia è considerata insoddisfacente, nonostante rientri tra le tecniche impiegate per ridurre le dimensioni del tumore prima della chirurgia (contributo neo-adiuvante) o per eliminare piccoli aggregati di cellule tumorali residui in fase post-operatoria.

Negli ultimi anni pertanto gli sforzi della ricerca sono rivolti ad aumentare l'efficacia di questo approccio terapeutico mediante uso di sensibilizzatori, ovvero di sostanze in grado di aumentare la predisposizione dei tessuti tumorali a subire danni irreparabili [13].

1.2.3. IMMUNOTERAPIA

Il corpo è dotato di una naturale abilità nel proteggersi da agenti infettivi, nel rivelare e distruggere le cellule cancerogene e nel mettere in atto meccanismi di riparazione dei danni provocati da varie tipologie di trattamenti o di sostituzione dei tessuti compromessi.

L'obiettivo che si pone la terapia biologica, meglio conosciuta come immunoterapia, è quello di incrementare questa intrinseca capacità dell'organismo stimolando il sistema immunitario in quanto un individuo affetto da neoplasia presenta, generalmente, anche una maggiore probabilità di contrarre infezioni.

Per fare questo vengono impiegati svariati metodi e farmaci [1]:

- interferoni, interleuchine e citochine, tutte molecole “messaggere cellulari” che, legandosi a recettori specifici ad alta affinità presenti sulle superfici cellulari, permettono la comunicazione tra i diversi sistemi dell'organismo, modulando crescita e differenziazione cellulare, riparazione e rimodellamento dei tessuti
- CFS (*Colony Stimulating Factors*) ovvero proteine in grado di promuovere la produzione di globuli rossi, bianchi e piastrine che aumentano l'apporto di ossigeno ai tessuti e incrementano le *performance* del sistema immunitario, permettendo al paziente di sopportare maggiori dosaggi di agenti chemioterapici
- anticorpi monoclonali che si legano in modo specifico a ben determinate proteine presenti sulla superficie delle cellule tumorali favorendone il riconoscimento da parte del sistema immunitario, il quale attiva di conseguenza dei meccanismi di difesa (*Fig. 12*)

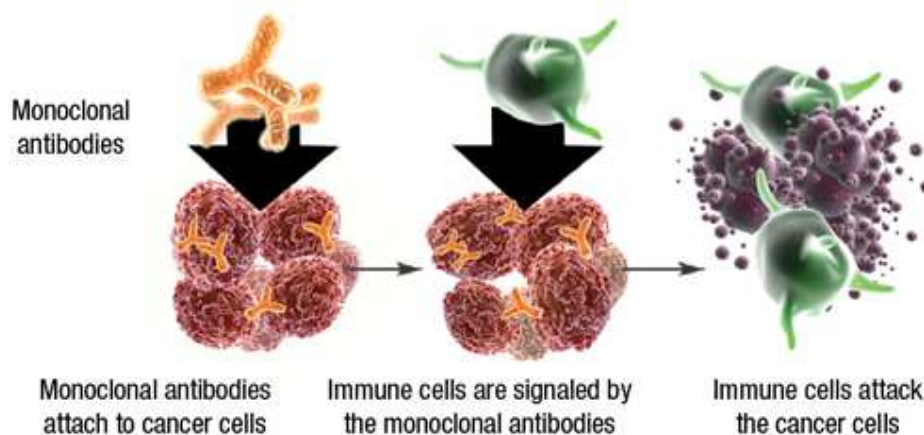


Fig. 12 Il legame tra un anticorpo ed una proteina presente sulla superficie della cellula tumorale attiva il sistema immunitario [14]

- vaccini profilattici o terapeutici, volti in particolare a prevenire tumori al collo dell'utero e al fegato o a trattare neoplasie in fase iniziale
- terapia genetica volta all'introduzione di molecole di DNA contenenti geni in grado di codificare specifiche proteine deputate ad interferire con le funzioni delle cellule tumorali o a migliorare il funzionamento del sistema immunitario nei tessuti sani.

1.2.4. TERAPIA FOTODINAMICA

La terapia fotodinamica (*Photo-Dynamic Therapy*, PDT) viene impiegata dagli anni '90 e sfrutta l'irraggiamento luminoso per contrastare le neoplasie della pelle, i tumori dei polmoni, della vescica, della prostata, dell'apparato urinario, dell'esofago e quelli oftalmici, purché siano localizzati e non radicati in profondità [13].

La PDT impiega dei foto-sensibilizzatori ovvero delle molecole in grado di assorbire la luce visibile in un intervallo opportuno per indurre la produzione di ROS, provocando citotossicità e portando infine alla morte delle cellule tumorali per apoptosi e necrosi (*Fig. 13*).

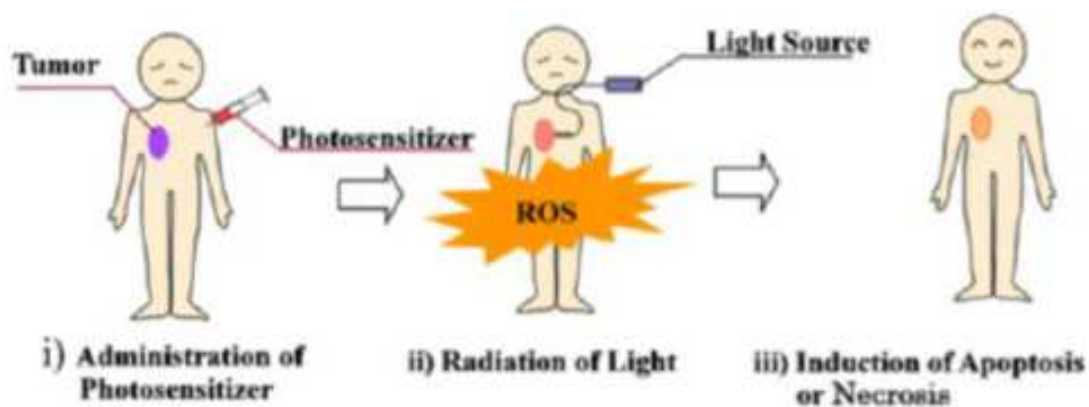


Fig. 13 Funzionamento di un foto-sensibilizzatore per PDT [13]

Un altro effetto della PDT è quello di danneggiare i vasi sanguigni del tumore, impedendo al cancro di reperire i nutrienti necessari alla sua crescita.

Questa tecnica consente un preciso controllo spazio-temporale del trattamento, che può anche essere ripetuto: il foto-sensibilizzatore viene attivato solamente nelle zone irraggiate permettendo, teoricamente, di distruggere il tessuto malato senza comportare gravi danni a quelli sani, inoltre consente di trattare zone non operabili chirurgicamente.

Idealmente, un foto-sensibilizzatore non deve essere tossico in assenza di luce e, una volta somministrato per via topica o endovenosa, deve essere in grado di accumularsi velocemente e

selettivamente nel tessuto tumorale. Le lunghezze d'onda sfruttabili per la sua attivazione sono comprese tra 600 e 900 nm (finestra terapeutica) in quanto, in questo intervallo, la radiazione non viene assorbita dai cromofori endogeni presenti nell'organismo (come ad esempio l'emoglobina) e risulta pertanto penetrante e sufficientemente energetica da formare i ROS.

Il primo prodotto approvato dalla FDA è stato il Photofrin, costituito da una miscela di dimeri e oligomeri di unità di tipo porfirinico e nel tempo sono stati sviluppati composti di seconda e terza generazione sfruttando rispettivamente correlazioni struttura-attività (razionalizzando la posizione di gruppi idrofobici e idrofilici all'interno della molecola) e accoppiando il fotosensibilizzatore a svariati *targeting vectors* biologici (in modo analogo a quanto descritto per la radioterapia) [13].

Nel caso delle porfirine è possibile sfruttare la loro emissione di fluorescenza e fosforescenza per definire il limite tra i tessuti malati e quelli sani; questa tecnica risulta dunque utile anche ai fini dell'*imaging* dei tumori e della cosiddetta "chirurgia guidata".

Gli sforzi della ricerca si stanno dirigendo nello studio dell'impiego in ambito biomedico della fotochimica di complessi metallici sfruttando due punti di vista: in un primo caso si parte da un complesso coordinativamente saturo dal quale si vogliono liberare uno o più siti di coordinazione per permettere al centro metallico di interagire con delle biomolecole, d'altra parte il frammento biologicamente attivo può essere costituito dal legante che viene rilasciato. In ogni caso l'irraggiamento con la luce provoca la trasformazione del pro-farmaco (stabile al buio) nella specie d'interesse [13].

1.2.5. TERAPIA FOTO- E MAGNETO-TERMICA

Nel campo biomedico, il settore che ha visto il maggior sviluppo dell'impiego delle nanoparticelle è indubbiamente quello del *drug delivery*.

Tuttavia, nel corso dell'ultimo decennio, si è cercato di investigare la possibilità di sfruttare le nanoparticelle non solo come *carrier*, ma come farmaco vero e proprio per favorire la regressione dei tumori solidi.

La terapia fototermica (PTT) prevede la somministrazione per via endovenosa o intratumorale di nanoparticelle che, una volta giunte nella zona di interesse e irraggiate con luce di frequenza opportuna, sviluppano calore mediante decadimento non-radiativo. In questo modo si ottiene un innalzamento della temperatura tale da provocare danni cellulari irreversibili.

Il vantaggio di questa tecnica rispetto al tradizionale trattamento di ipertermia sta nel fatto che il riscaldamento fototermico è localizzato nelle immediate vicinanze delle nanoparticelle (la

temperatura locale può salire di decine di gradi) senza comportare gravi danni ai tessuti sani circostanti, a patto che la localizzazione delle nanoparticelle stesse sia selettiva.

In *figura 14* sono riportati gli effetti causati alla materia vivente da temperature crescenti ed è possibile notare come, dopo alcuni minuti sopra i 48 °C, i danni riportati dalle cellule siano irreversibili; questo può essere vantaggiosamente sfruttato nel trattamento della neoplasia purché quest'ultima non abbia sviluppato dei meccanismi di resistenza, mediante sovra-espressione di proteine *heat shock* sulla sua superficie.

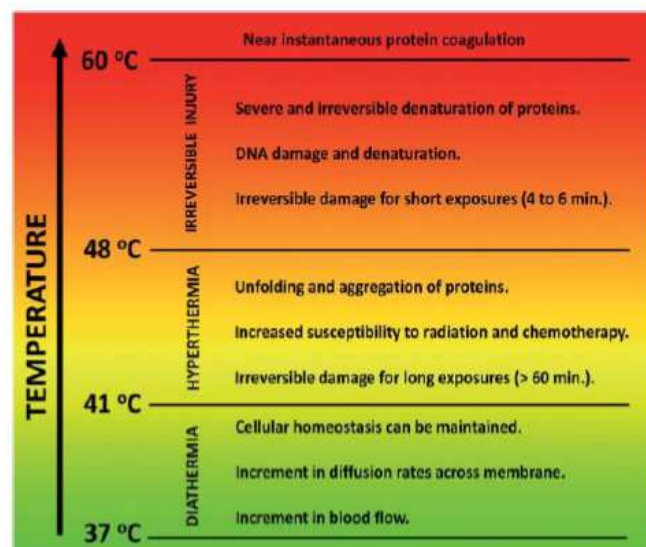


Fig. 14 Effetto dell'aumento della temperatura sulla materia vivente[13]

Nella progettazione delle nanoparticelle è importante assicurare che esse presentino minima tossicità e massima biocompatibilità, diametro fra 30 e 200 nm per garantire un lungo tempo di permanenza in circolo e per aumentare l'accumulo nel tumore e capacità di massimizzare la conversione di luce in calore.

Allo stato attuale, le nanoparticelle maggiormente avanzate verso l'applicazione clinica sono *nanoshell* costituite da un nucleo di silice ricoperto da uno strato di oro. Sono in corso due studi che utilizzano *nanoshell* per il trattamento di tumori solidi umani, rispettivamente alla testa e ai polmoni, con irraggiamento effettuato mediante laser a fibra ottica [13].

Al fine di massimizzare l'efficacia terapeutica e minimizzare gli effetti collaterali, è importante comprendere il meccanismo che induce alla morte cellulare.

Due sono i fenomeni da considerare:

- apoptosi, in cui la cellula mantiene integra la membrana e produce dei segnali chimici che ne "etichettano" la superficie esterna, portando alla sua fagocitosi, ma senza indurre infiammazione (*Fig. 15*)

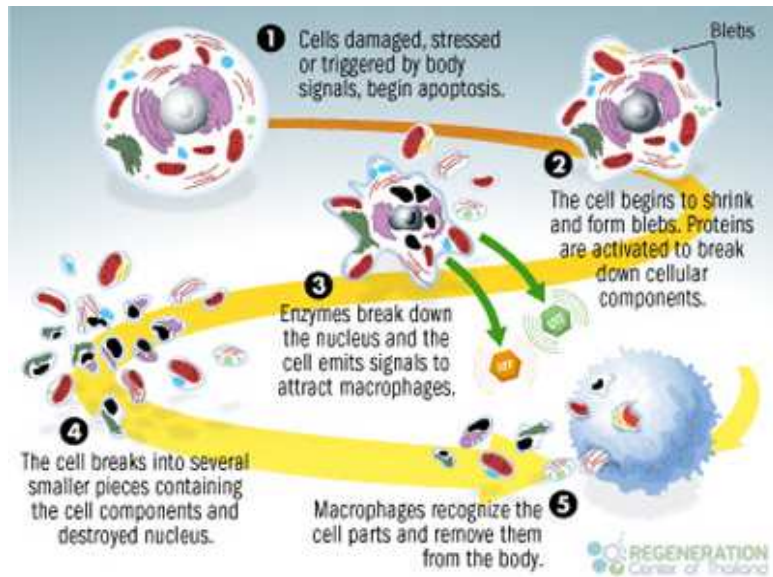


Fig. 15 Tappe del processo di apoptosi [15]

- necrosi, in cui la membrana perde la sua integrità e la cellula rilascia il suo contenuto nell'ambiente extracellulare generando infiammazione, la quale influisce negativamente sulla terapia. (Fig. 16)

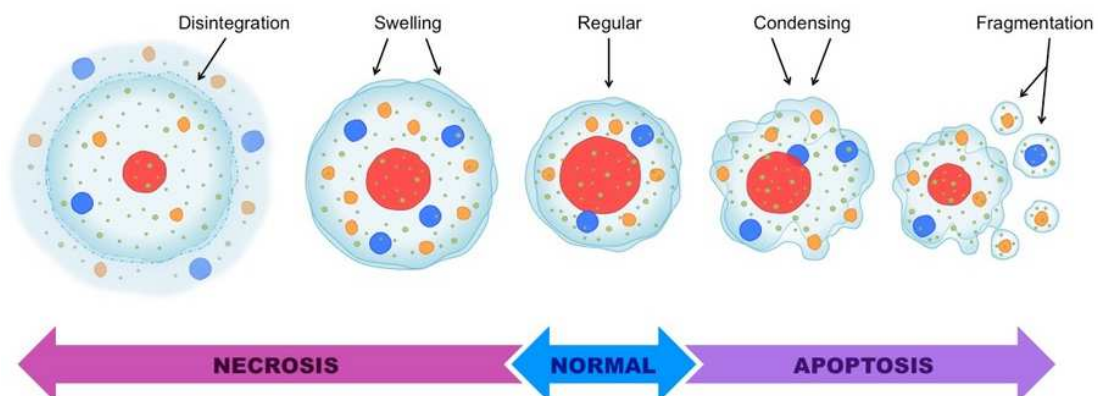


Fig. 16 Fenomeni che contraddistinguono la morte per necrosi e quella per apoptosi [16]

Negli esperimenti *in vitro* si è osservato come la PTT porti prevalentemente a questo secondo meccanismo, il più indesiderato, a meno che non venga utilizzata una potenza di irraggiamento più bassa, ma prolungata nel tempo.

In generale, si può concludere che i risultati ottenuti con questa terapia (ancor più della PDT) possono essere influenzati da numerosi fattori relativi non solo al *design* delle nanoparticelle stesse, ma anche alle condizioni di irraggiamento e del particolare sistema biologico cui si applica, pertanto si tratta di una tecnologia ancora sperimentale.

Analogamente, nella terapia magnetotermica, vengono sfruttate nanoparticelle magnetiche il cui riscaldamento è ottenuto mediante l'impiego di campi magnetici oscillanti [13].

1.2.6. CHEMIOTERAPIA

Accanto alle terapie per il trattamento localizzato di specifiche parti del corpo è possibile mettere in atto una strategia sistematica, impiegando farmaci che, mediante il sistema circolatorio, siano in grado di distribuirsi in tutto il corpo. Questo approccio, chiamato chemioterapia, si riferisce tecnicamente alla procedura volta a contrastare molteplici patologie mediante composti chimici che risultino citotossici e quindi in grado di inibire la crescita delle cellule o di causarne la morte, anche se, nell'immaginario comune, viene automaticamente associato alla lotta contro il cancro. Gli obiettivi che si pone la chemioterapia variano a seconda del tipo di neoplasia e del suo stadio d'avanzamento [1]:

- a) può essere mirata ad uccidere le cellule cancerogene portando così alla cura
- b) può essere impiegata in modo sinergico alla chirurgia per diminuire le probabilità di ricrescita del tumore primario e inibire la formazione di metastasi
- c) laddove non si possa ottenere guarigione, il suo impiego è finalizzato ad allungare la vita del paziente o a migliorarne, per quanto possibile, la qualità, previa valutazione da parte del personale medico specializzato.

Alla base del trattamento della malattia vi sono due approcci: il primo metodo mira ad interferire con la capacità delle cellule tumorali di dividersi, mentre il secondo sfrutta la minore abilità di queste cellule, rispetto a quelle sane, di riparare eventuali danni subiti (Fig. 17).

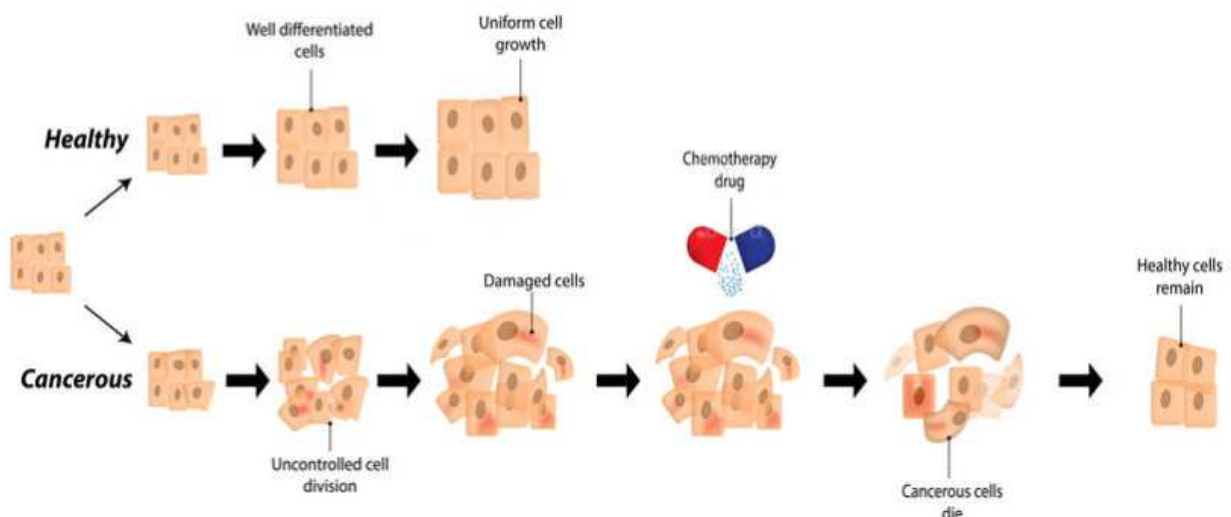


Fig. 17 Utilizzo di composti chimici in chemioterapia al fine di eliminare selettivamente le cellule tumorali [17]

Entrambe le strategie sono finalizzate ad eliminare le cellule cancerogene, ma non essendo in grado di discriminare perfettamente questo *target* dai tessuti sani, il paziente sottoposto ai trattamenti risente contestualmente di malesseri ed effetti collaterali, concentrati in particolare in parti del corpo che richiedono il costante ricambio cellulare, come ad esempio midollo osseo, pelle, apparato digerente, sangue e capelli.

Esistono molteplici chemioterapici, i quali sono classificati in base al meccanismo d'azione, al danno che provocano al DNA, al tipo di processo cellulare col quale interferiscono o alla fonte da cui derivano.

In particolare, i farmaci contenenti metalli si possono suddividere in cinque ampie categorie [18]:

- composti funzionali (pro-farmaci) il cui meccanismo d'azione principale prevede la coordinazione diretta del metallo ad una o più biomolecole bersaglio; esso deve pertanto possedere almeno un sito di coordinazione libero che viene reso disponibile dalla dissociazione *in vivo* di leganti labili. Possono essere anche sfruttate interazioni secondarie non coordinative come legami a idrogeno, interazioni idrofobiche e simili. Nel caso di dissociazione totale dei leganti iniziali, il metallo “nudo” potrebbe anche sostituire un metallo essenziale interferendo col metabolismo. L'attivazione delle specie funzionali sfrutta particolari condizioni chimico-fisiche ambientali presenti nel tessuto malato (ipossia, basso pH) oppure viene indotta da stimoli esterni
- composti strutturali in grado di esplicare la loro funzione mantenendo intatta la loro forma iniziale, interagendo con le biomolecole *target* tramite interazioni puramente di tipo supramolecolare (tra essi si ritrovano gli “intercalanti” del DNA). Questi complessi devono pertanto presentare elevata stabilità cinetica e termodinamica, quindi spesso contengono leganti multidentati chelanti e/o frammenti organometallici
- composti in cui il metallo si comporta da *carrier* nei confronti del legante attivo, eventualmente proteggendolo prima del *delivery*
- composti in cui il metallo è un catalizzatore volto ad accelerare, ad esempio, la formazione di ROS (*Reactive Oxygen Species*)
- composti contenenti un metallo fotoattivo che agisce da fotosensibilizzante (con successive applicazioni in PDT).

In ogni caso, una caratteristica molto importante per un chemioterapico è la selettività ovvero l'*uptake* preferenziale del composto nel tessuto/organo da trattare, la quale può essere spontanea o, più spesso, indotta, ma in ogni caso deve essere la più elevata possibile.

In particolare, il principale meccanismo di selettività passiva è l'EPR (*Enhanced Permeability and Retention*), basato sulla maggiore permeabilità dei vasi sanguigni dei tumori solidi nei confronti di macromolecole o nanoparticelle e sulla loro maggiore ritenzione dovuta a carenze nel drenaggio per la scarsa efficienza del loro sistema linfatico.

Per quanto concerne la selettività indotta, o attiva, questa viene ottenuta mediante funzionalizzazione del principio attivo (o della superficie della nanoparticella) con opportuni *targeting vectors* in grado di riconoscere selettivamente proteine sovra-esprese sulla superficie del tumore e di guidare pertanto l'accumulo del farmaco nei tessuti malati [13].

Possono anche essere usati più farmaci in combinazione tra loro in funzione di diversi fattori quali l'età del paziente ed il suo stato di salute generale, il tipo di neoplasia da contrastare, il suo stadio di avanzamento e la sua aggressività.

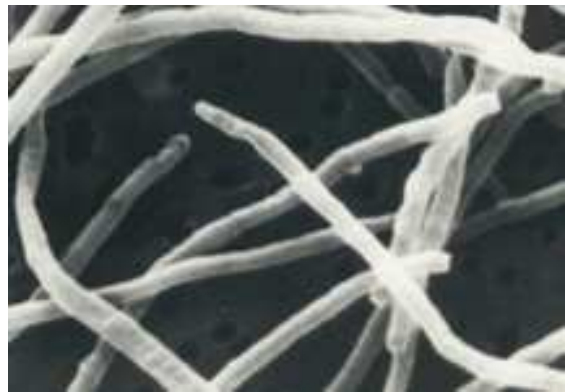
Per quanto riguarda specifici tumori ormone-dipendenti, come ad esempio quelli al seno e alla prostata, per i quali è stata accertata la stimolazione della crescita da parte di estrogeni ed androgeni, gli approcci volti a contrastarne lo sviluppo comprendono l'induzione all'arresto della produzione di tali ormoni o l'inibizione del legame che essi instaurano con i loro recettori, mediante uso di composti chimici di sintesi [1].

1.3. COMPOSTI INORGANICI COME FARMACI PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO

1.3.1. CISPLATINO: IL PIONIERE TRA GLI AGENTI CHEMIOTERAPICI

La scoperta dell'efficacia di alcuni composti di coordinazione del platino come agenti chemioterapici rappresenta uno dei più noti e fortunati esempi scientifici di *serendipity* ed ha rivoluzionato l'approccio terapeutico nei confronti delle patologie neoplastiche.

Nel corso dei suoi esperimenti, finalizzati a studiare l'effetto dei campi elettromagnetici sulla divisione cellulare, Barnett Rosemberg notò anomalie di morfologia e densità batterica nella crescita di *E. coli* in un brodo di coltura contenente sali d'ammonio e all'interno del quale erano immersi elettrodi di platino (Figs. 18 e 19).



Figs. 18 e 19 Crescita normale di *E. coli* (a sinistra) e sviluppo anomalo (a destra) indotto dal cisplatino nell'esperimento di Rosemberg [13]

In seguito ad analisi ed esperimenti approfonditi, Rosemberg fu in grado di individuare in soluzione numerose specie di platino e tra queste risultarono piuttosto abbondanti alcuni cloro-ammino complessi planari quadrati neutri di Pt(II).

Nello specifico, il *cis*-diclorodiamminoplatino (*cis*platino) risultò attivo nei confronti della crescita filamentosa dei batteri a concentrazioni sub-tossiche, mentre il suo isomero geometrico *trans*-diclorodiamminoplatino (*trans*platino) risultò inefficace e addirittura tossico ad alte concentrazioni [13].

Il *cis*platino, a differenza del *trans*platino, si dimostrò essere straordinariamente attivo contro linee tumorali di varia natura, tanto che il passo successivo fu la sperimentazione *in vivo* su animali e, sulla base degli esiti incoraggianti ottenuti, venne avviata la fase di studio clinico sull'uomo. A questo punto emersero delle indicazioni controverse in quanto alcuni pazienti risposero positivamente alla terapia, mentre altri mostrarono l'elevata tossicità del composto a danno di reni e sistema nervoso, congiunta a nausea, vomito e mielosoppressione. Con

l'introduzione di nuove procedure di somministrazione, le conseguenze a livello renale furono parzialmente superate, permettendo così l'impiego di un dosaggio più elevato di composto (≥ 50 mg/m²).

I migliori risultati si ottennero su individui affetti da cancro ai testicoli, per i quali il *cisplatino* risultò curativo, e questo portò alla sua approvazione da parte della FDA nel 1978 [13].

Dalla sua scoperta questo farmaco ha avuto sempre maggiore successo e, ad oggi, è impiegato in più del 50% dei regimi terapeutici da solo o, più spesso, in combinazione con altre medicine volte ad attenuarne gli effetti collaterali.

In particolare, è la neurotossicità a determinare la dose massima (*dose-limiting toxicity*): il *cisplatino* induce neuropatia periferica, tinnito (ronzio alle orecchie) e parziale perdita dell'udito, essa può essere reversibile sebbene il recupero sia spesso lento.

Questo chemioterapico risulta estremamente efficace anche contro il cancro alla vescica e alle ovaie, ma presenta attività minore nel carcinoma cervicale, nei tumori di testa e collo, nei melanomi e in particolari tipologie di tumori ai polmoni.

Per quanto concerne il meccanismo d'azione, il *target* del *cisplatino* è noto essere il DNA, con cui il composto è in grado di formare una serie di addotti di coordinazione [13].

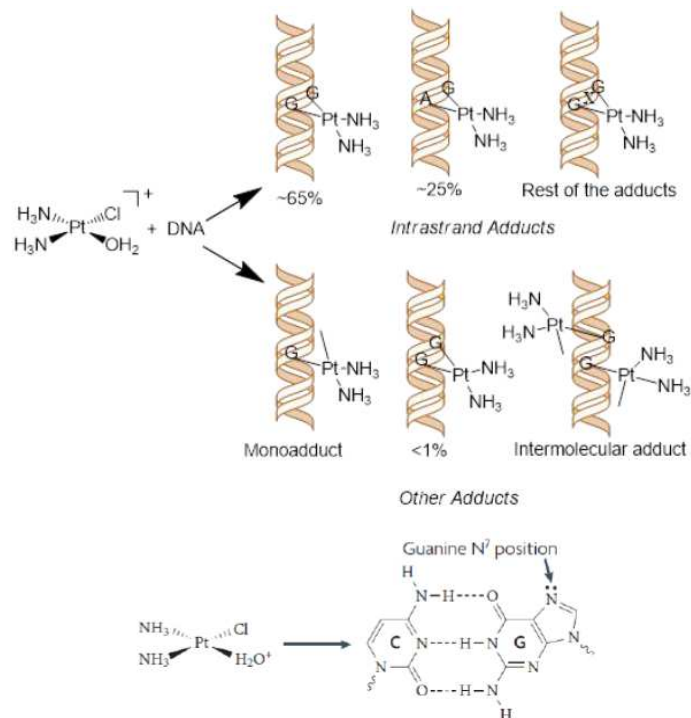
Tutto inizia nel sangue, dove l'elevata concentrazione di ioni cloruro presente preserva il complesso dalla dissociazione dei leganti, e il successivo *uptake* (in cellule tumorali e sane indistintamente) può avvenire per diffusione passiva oppure essere mediato dalla proteina transmembrana CRT1, responsabile del trasporto del rame [19].

Una volta giunto all'interno delle cellule, il *cisplatino* trova una concentrazione nettamente inferiore di ioni cloruro e subisce il processo di idrolisi con rilascio dei due cloruri presenti nella sfera di coordinazione.

Le acquo-specie che si originano possono interagire con le basi puriniche adenina e guanina del DNA, nucleofile grazie all'atomo di azoto N7 non impegnato nell'accoppiamento di Watson-Crick, esplicando così la loro azione citotossica (farmaco funzionale).

In particolare, il platino si coordina al DNA in modo preponderante mediante legami intracatena con due guanine contigue, una guanina ed una adenina adiacenti o con due guanine distanziate da una terza base intermedia, tutte opzioni difficilmente ottenibili con l'isomero *trans* e, in misura minoritaria, mediante legami intercatena con due guanine di filamenti diversi [19].

Sono possibili anche addotti monofunzionali o interazioni miste con DNA e proteine (*Figs. 20 e 21*).



Figs. 20 e 21 Principali addotti tra cisplatino e DNA (sopra) e sito nucleofilo della base guanina (sotto) [13]

La platinazione del DNA innesca una serie di eventi a cascata la cui conseguenza finale è la morte cellulare che può avvenire, come accennato in precedenza, mediante due meccanismi:

- necrosi, caratterizzata da rigonfiamento del citosol e rottura della membrana cellulare, preponderante nel caso di alte concentrazioni di farmaco
- apoptosi, la quale comporta riduzione del volume cellulare, condensazione della cromatina e frammentazione del DNA, associata all'uso di basse concentrazioni di composto

Nonostante i dettagli del processo di apoptosi non siano del tutto chiari, è stato osservato mediante spettroscopia NMR in soluzione e raggi X allo stato solido, come la formazione dell'addotto bifunzionale intracatena tra due guanine adiacenti ed il platino (*1,2-d(GpG) intrastrand crosslink*) porti ad una distorsione dell'angolo tra le due basi coinvolte, laddove solitamente queste si presentano parallele tra loro nel DNA.

Sono osservabili anche ulteriori modificazioni legate al piegamento ed allo svolgimento parziale della doppia elica in prossimità del sito di platinazione.

Queste alterazioni sono riconosciute da specifiche proteine, le quali possono intervenire arrestando il ciclo cellulare per tentare di riparare il danno e permettere così la sopravvivenza della cellula, oppure possono innescare il processo apoptotico irreversibile di morte programmata (Fig. 22).

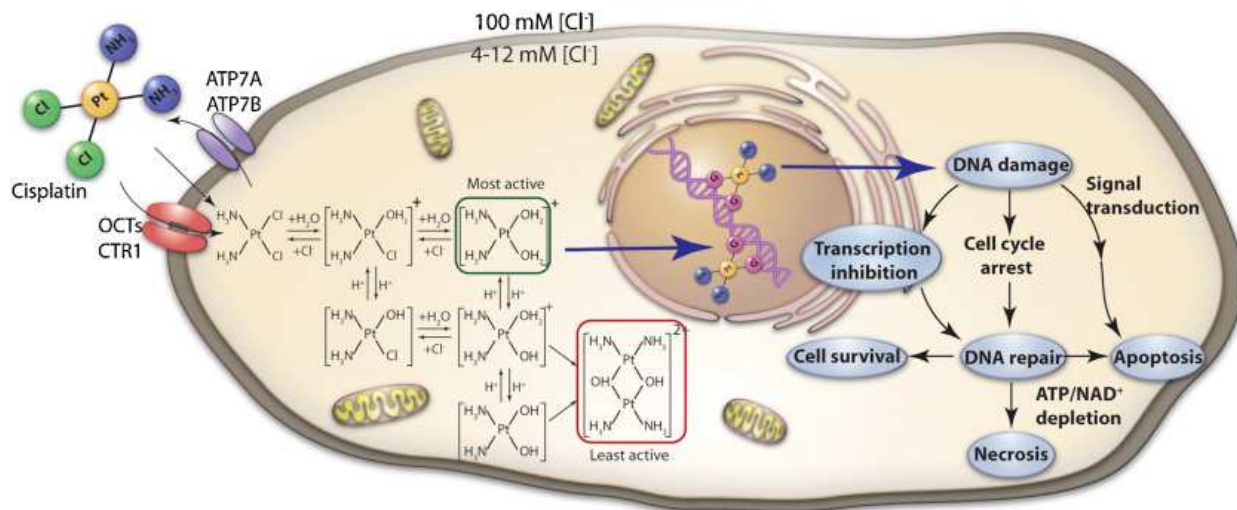


Fig. 22 Meccanismo d'azione del cisplatino [20]

Alcune patologie si dimostrano spontaneamente insensibili al farmaco, mentre accade piuttosto spesso che una neoplasia per la quale si era osservata una fase iniziale di remissione sviluppi resistenza dopo un certo numero di cicli di trattamento.

Sono stati effettuati numerosi studi al fine di individuare le origini di questo fenomeno e sono stati individuati quattro principali meccanismi schematizzati in figura 23:

1. diminuzione del livello di *cisplatin* nella cellula, dovuta ad un suo minore *uptake* e/o maggiore efflusso, mediato da proteine trans-membrana generiche o da ATP7A e ATP7B specifiche per la fuoriuscita del rame
2. aumento del contenuto di tioli biologici affini al platino, come ad esempio il glutatione, che si legano preferenzialmente ad esso formando complessi che vengono espulsi da specifiche pompe e preservando così le basi del DNA [21]
3. aumento della capacità di riparo e rimozione degli addotti *cisplatin*-DNA dovuta principalmente all'efficacia del NER (*Nucleotide Excision Repair*), un meccanismo che taglia un piccolo frammento oligonucleotidico e permette la sintesi di un nuovo frammento di DNA che poi viene legato al posto della porzione danneggiata. È anche possibile che la cellula sviluppi una certa tolleranza nei confronti del DNA danneggiato dovuta a carenze nel sistema di riparo MMR (*Mismatch Repair*) cui sono deputati numerosi enzimi e proteine
4. cambiamenti nelle catene di segnali che portano alla morte o alla sopravvivenza della cellula, in particolare, si può avere una diminuzione delle risposte apoptotiche e l'attivazione di *survival pathways*.

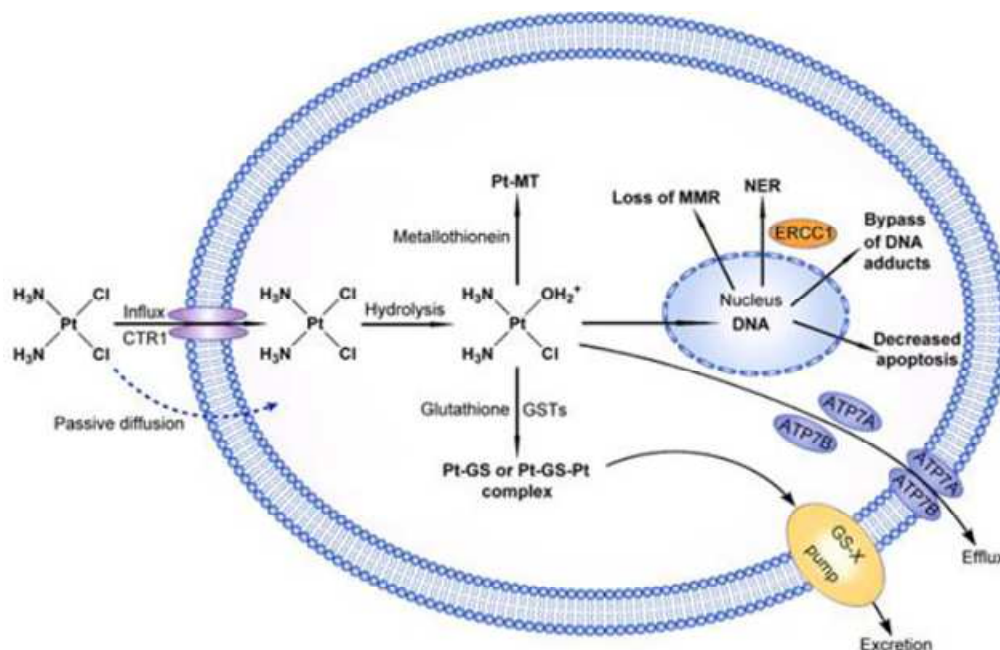


Fig. 23 Principali meccanismi di resistenza al cisplatino [13]

1.3.2. LO SVILUPPO DI FARMACI DI NUOVA GENERAZIONE A BASE DI PLATINO

A partire dalla sua scoperta, il *cisplatino* ha assunto un ruolo chiave nei regimi chemioterapici ed è stato ampiamente utilizzato da solo, in combinazione con altri agenti citotossici o accoppiato alla radioterapia [22].

Tuttavia, come accennato, esso si dimostra inefficace nei confronti di particolari neoplasie, le quali presentano una naturale o acquisita resistenza al farmaco, oltre a comportare non trascurabili effetti collaterali a tessuti ed organi sani [23].

Molte sono state le strategie intraprese per migliorarne le *performance*, tra cui il tentativo di guidarne l'accumulo selettivo nei tessuti tumorali mediante accoppiamento a *delivery systems*. Proprio su questo approccio si basa il Lipoplatin, una promettente formulazione oggetto di studi clinici, in cui il *cisplatino* (o un suo derivato) si trova incapsulato all'interno di liposomi, ovvero nanomicelle inverse che dovrebbero extravasare con relativa selettività nei tumori solidi, le cui cellule sono avidi di nutrienti, preservando in questo modo i tessuti sani [24].

In particolare, questo farmaco si è dimostrato attivo su più linee tumorali di cancro ovarico *cisplatino*-sensibili e resistenti, inducendo apoptosi.

Inoltre, studi *in vivo* condotti su topi hanno mostrato la sua capacità di inibizione della crescita tumorale anche successivamente alla sospensione del trattamento, mostrando al contempo minore citotossicità nei tessuti sani rispetto a quella indotta dal *cisplatino* [25].

I maggiori sforzi della ricerca, tuttavia, sono stati rivolti alla sintesi di nuovi complessi a base di platino e al loro *screening* come potenziali agenti chemioterapici mediante test di citotossicità verso numerose linee di cellule tumorali.

Questi studi hanno permesso di evidenziare alcune importanti correlazioni struttura-attività come riportato in *figura 24*.

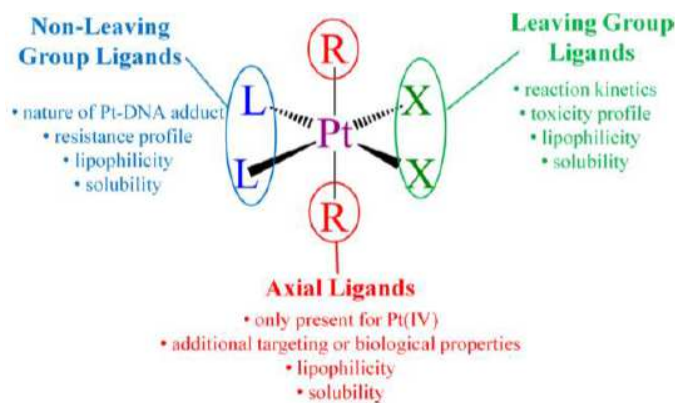


Fig. 24 Caratteristiche strutturali dei complessi di Pt usati a scopo chemioterapico [13]

In particolare, ai fini del loro utilizzo come chemioterapici, i complessi del platino devono possedere due gruppi uscenti in posizione *cis* tra loro ed una moderata velocità di idrolisi a carico di tali leganti. Questo serve, da un lato ad evitare reazioni collaterali indiscriminate con i molteplici *partners* biologici possibili (elevata tossicità) prima di raggiungere il *target*, dall'altro assicura un'interazione efficace con le cellule tumorali (una volta raggiunto il bersaglio complessi troppo stabili sarebbero inattivi).

I leganti in *trans* rispetto ai *leaving groups*, che si ritrovano nell'addotto tra il frammento attivo e il DNA, devono essere fortemente legati al centro metallico; tipicamente si tratta di sostituenti amminici con almeno un atomo di idrogeno residuo, verosimilmente in grado di dare legami a idrogeno con la molecola bersaglio [13].

Uno dei primi derivati del *cisplatin* a ricevere l'approvazione dell'FDA, il carboplatino, presenta un gruppo 1,1-ciclobutanodicarbossilato al posto dei due cloruri e risulta meno tossico del suo predecessore (velocità di idrolisi rispettivamente di 10^{-8} e 10^{-5} s^{-1}), con effetti collaterali generalmente meno marcati e meglio tollerati.

Contestualmente, il carboplatino risulta meno attivo del *cisplatin* e richiede pertanto maggiori dosaggi al fine di ottenere gli stessi risultati [13].

In particolare, viene preferito nel trattamento del cancro ovarico, mentre risulta meno attivo nel tumore ai testicoli, al collo e alla testa.

È stata anche investigata la variazione della natura del frammento attivo, mediante sostituzione dell'ammoniaca con differenti ammine, sia monodentate che chelanti, accoppiata all'introduzione dell'ossalato quale gruppo uscente, giungendo così allo sviluppo dell'ossaliplatino.

Questo complesso non presenta ototossicità e comporta minore nefrotossicità, presumibilmente correlata al lento rilascio dell'ossalato, ma provoca neuropatia.

Accanto a quelli appena descritti, esistono altri tre farmaci basati su addotti intracatena col DNA, i quali trovano applicazione clinica a livello nazionale in Asia (Fig. 25):

- nedaplatino, dieci volte più solubile del *cis*platino e meno nefrotossico sia rispetto al *cis*platino che al carboplatino
- lobaplatino ed eptaplatino per i quali è stata osservata, *in vitro*, attività verso linee cellulari *cis*platino resistenti

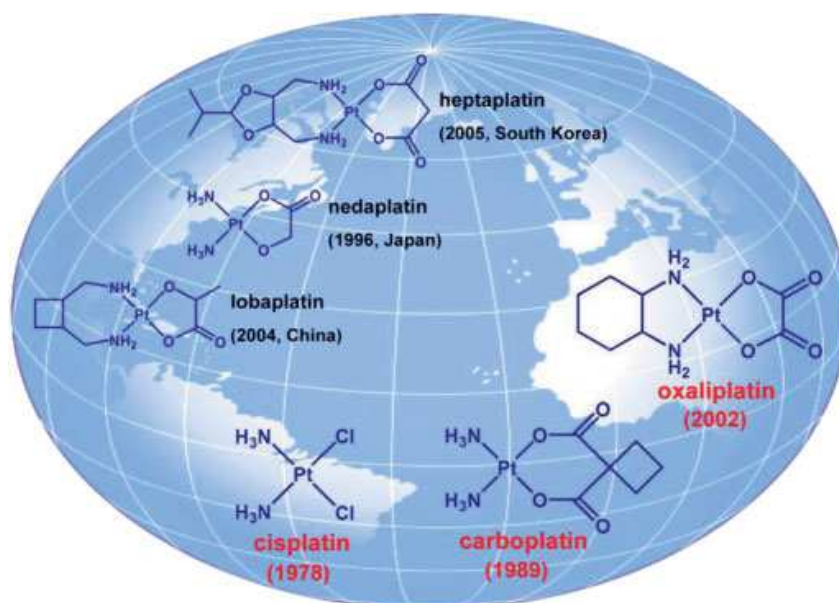


Fig. 25 *Cis*platino e i suoi derivati commerciali [13]

Accanto a questi composti ormai entrati nell'uso corrente, ve ne sono molti altri che non hanno superato la fase clinica per svariate ragioni come l'elevata tossicità, l'attività ridotta *in vivo* o la scarsa competitività in termini di rapporto costi/benefici rispetto ai chemioterapici già omologati. In definitiva, tra le migliaia di composti del platino testati, solo 23 sono stati portati in fase clinica e, tra questi, solo 2 (ossaliplatino e carboplatino) sono stati approvati dalla FDA [13].

1.3.3. NUOVE FRONTIERE IN CHEMIOTERAPIA: DAL RUTENIO AL PALLADIO

Come ampiamente descritto in precedenza, il *cisplattino* ed in misura minore i suoi derivati commerciali presentano serie limitazioni come gli effetti collaterali non trascurabili, una ristretta applicabilità a ben specifiche tipologie di tumore e lo sviluppo, da parte di questi ultimi, di meccanismi di resistenza al farmaco [26].

L'impiego di complessi con centri metallici alternativi al platino potrebbe risolvere parte di questi problemi. Infatti, in ragione della differente natura e reattività, questi composti potrebbero agire con meccanismi completamente diversi da quello proposto per il *cisplattino*, in particolare cambiando il *target* biologico la cui alterazione è responsabile della morte cellulare.

Meccanismi di azione alternativi potrebbero portare le cellule a non manifestare resistenza al farmaco e/o ad agire su tumori dove il *cisplattino* (e analoghi) è scarsamente attivo [27].

1.3.4. COMPLESSI DI RUTENIO

In quest'ottica, i primi composti investigati sono stati i cloro-complessi ottaedrici di Ru(III) nella forma di pro-farmaci, attivati *in vitro* mediante riduzione a Ru(II) e successiva dissociazione dei cloruri [13].

Verso la fine degli anni '80 venne così investigato il $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{dmsO-S})(\text{Im})]$, meglio noto come NAMI-A, un sale d'imidazolio solubile in acqua, stabile allo stato solido e riproducibile nella cristallizzazione (Fig. 26).

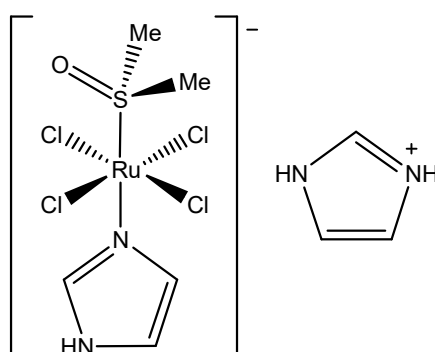


Fig. 26 Struttura NAMI-A

In condizioni fisiologiche tale complesso si comporta da pro-farmaco, venendo quantitativamente ridotto ad opera di riducenti biologici e, successivamente, dissociando almeno due clori e il dimetilsolfossido. Le evidenze sperimentali indicano che il *target* del NAMI-A non è il DNA, con cui si lega meno efficacemente rispetto al *cisplattino*.

Tuttavia, il NAMI-A interagisce molto velocemente con alcune proteine del plasma, come albumina e transferrina, le quali potrebbero avere anche un ruolo attivo nel suo trasporto all'interno del tessuto tumorale, spiegando la spiccata attività antimetastatica evidenziata nei test preliminari (*in vivo* sugli animali).

Nonostante le elevate aspettative riposte, questo composto non è tuttavia riuscito a superare la FASE CLINICA 2 a causa degli effetti collaterali che induce e ad altre problematiche ausiliarie [19].

Nello stesso periodo è stato testato anche il complesso $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{Ind})_2]$ ((N)KP1339), la cui elevata citotossicità verso una tipologia di tumore colo-rettale *cisplatin*-resistente suggerisce un meccanismo d'azione totalmente diverso, in base al quale il composto sarebbe in grado di promuovere un'alterazione della funzionalità mitocondriale. (Fig. 27)

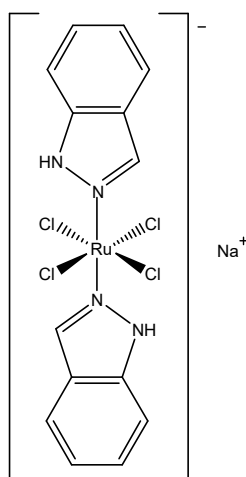


Fig. 27 Struttura (N)KP1339

Recentemente, l'attenzione è stata focalizzata su complessi *half-sandwich* di Ru(II), in cui la presenza dell'arene, legato stabilmente al centro metallico, conferisce un carattere lipofilo alla molecola e ne favorisce inoltre il comportamento come intercalante nei confronti del DNA.

Variando la tipologia di leganti sugli altri tre siti disponibili sono stati sintetizzati molteplici complessi, uno dei quali è siglato come RM175 (Fig. 28).

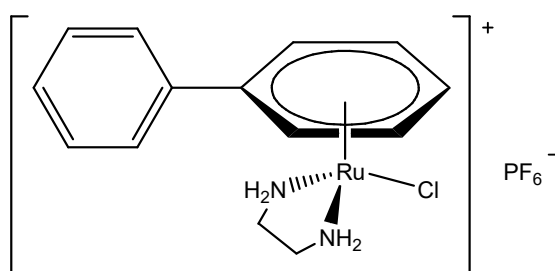


Fig. 28 Struttura RM175

In RM175 si ritrova un solo legante labile (Cl) la cui dissociazione permette la formazione di addotti monofunzionali con il DNA, stabilizzati da ulteriori interazioni a idrogeno promosse dal chelante etilendiammina.

L'introduzione di un particolare legante spettatore fosfinico, quale il PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano), conferisce invece ai complessi neutri tipo RAPTA (*Ruthenium Arene PTA*) un carattere idrosolubile. Vi sono inoltre evidenze che sembrano indentificare le proteine degli istoni della cromatina quali *targets* di questa tipologia di composti (Fig. 29).

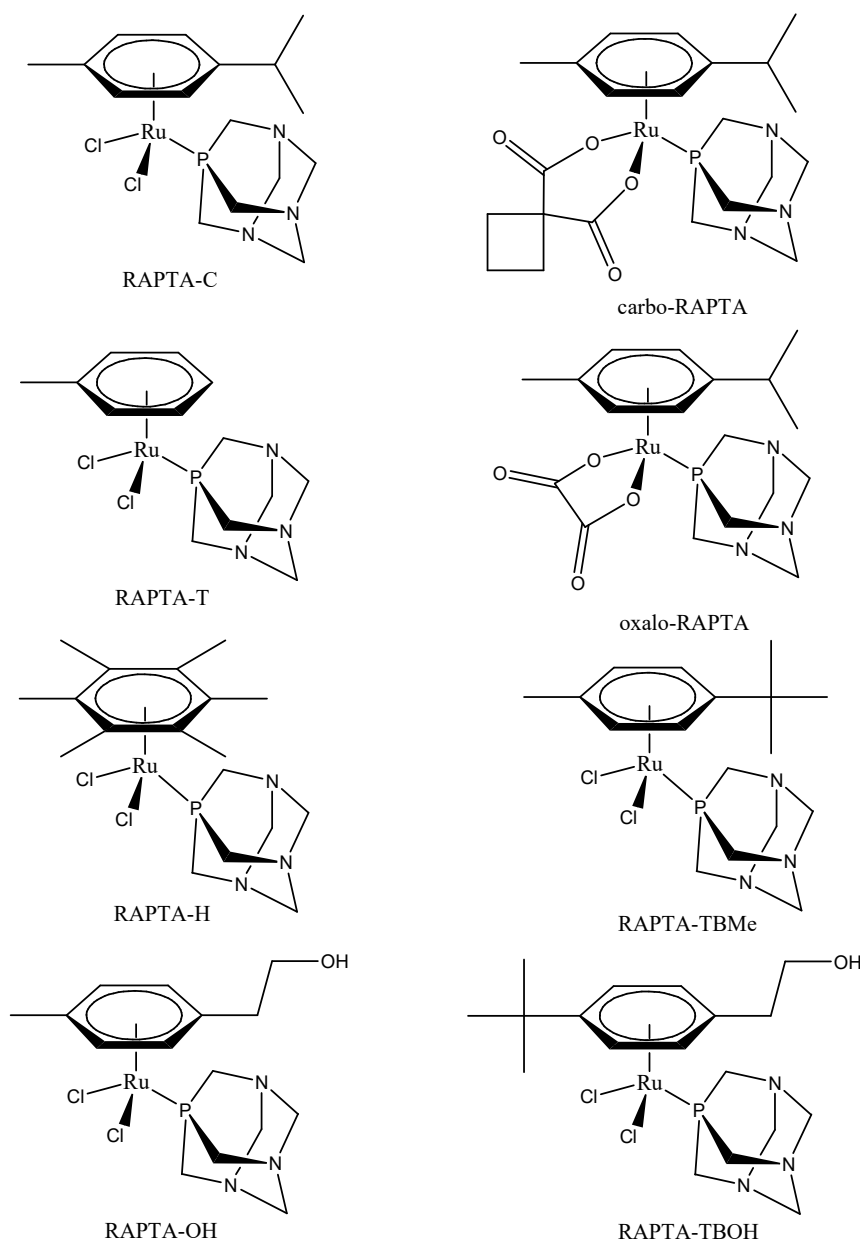


Fig. 29 Composti appartenenti alla famiglia dei RAPTA

1.3.5. PALLADIO

In virtù delle analogie che lo legano al platino, appartenente alla stessa triade, il palladio ha recentemente suscitato un notevole interesse nel campo degli agenti antitumorali. Questo elemento, di cui ormai è nota ed ampiamente sfruttata l'attività catalitica [28], è stato finora poco esplorato in campo biologico, soprattutto se confrontato col platino, il cui mercato sembra, però, aver ormai raggiunto la saturazione.

Così, in tempi relativamente recenti, sono stati portati avanti degli studi interessanti ed alcuni complessi di palladio hanno evidenziato una promettente attività citotossica in test *in vitro* e *in vivo* nei confronti di diverse tipologie di linee tumorali [27a, 29].

Curiosamente, per i composti del palladio, a differenza di quelli del platino, vi sono evidenze di una maggior attività citotossica degli isomeri *trans* rispetto agli omologhi *cis*, questo vale ad esempio per i composti di formula generica L_2PdCl_2 [30].

Questa conclusione sperimentale ha portato alla sintesi di numerosi composti di Pd(II), per i quali sono state accuratamente modulate le proprietà elettroniche, la solubilità e la capacità di *uptaking* selettivo mediante l'introduzione di opportuni leganti tra cui piridine sostituite [31], fosfine idrosolubili e gruppi glucopiranosidici [32], ottenendo in alcuni casi incoraggianti risultati nei successivi test *in vitro* su molteplici linee tumorali (Fig. 30).

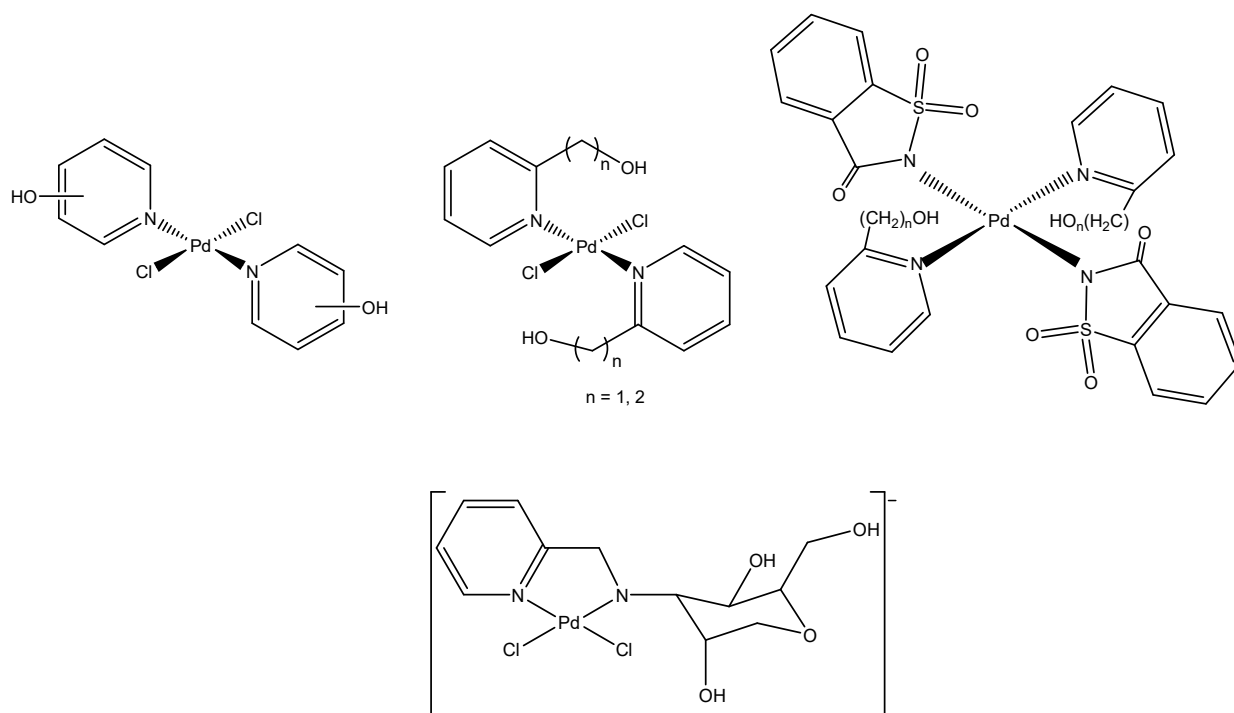


Fig. 30 Esempi di complessi di Pd(II) saggianti *in vitro* come antitumorali

Ad esempio, sono riportati in letteratura complessi di Pd(II) contenenti il PTA (*Fig. 31*) per i quali sono stati ottenuti valori di IC₅₀ paragonabili a quello del *cisplatin* su cellule tumorali A2780 (carcinoma ovarico *cisplatin*o sensibile), mostrando al contempo alta citotossicità sulla linea A2780*cis* (*cisplatin*o resistente) [33].

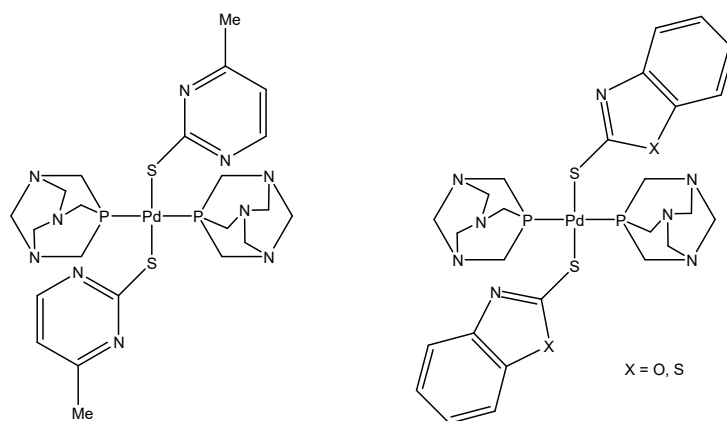


Fig. 31 Esempi di complessi contenenti il PTA testati sulle linee A2780 e A2780*cis*

A dispetto delle caratteristiche elettroniche e strutturali simili, i complessi di Pd(II) rispetto agli omologhi di Pt(II) mostrano, a parità di sostituenti, una migliore solubilità in acqua ed una reattività molto maggiore nelle reazioni di sostituzione (pari a circa 10⁴ - 10⁵ volte) [29, 34].

Questa maggiore labilità dei leganti coordinati al centro metallico rende più facili i processi di idrolisi in ambiente biologico, comportando talora il sequestro del metallo ad opera di molteplici bio-leganti *soft*, per lo più di natura proteica. Tutto ciò riduce la possibilità del composto di raggiungere selettivamente il *bio-target* e ne aumenta in generale la tossicità [35]. Va sottolineato che il *bio-target* potrebbe non essere il DNA, infatti, è stato ad esempio dimostrato sperimentalmente che alcuni composti di Pd(II) contenenti fosfine organiche interagiscono con i gruppi tiolici delle proteine di membrana dei mitocondri [36].

Tutte queste criticità suggeriscono come un'oculata scelta dei leganti da coordinare al centro metallico rivesta un ruolo chiave nella progettazione dei complessi strutturali di Pd(II) da testare come chemioterapici. In particolare, la strategia più promettente sembra essere quella di impiegare leganti polidentati o/e strutture organometalliche in cui il forte legame carbonio-palladio permetta di evitare o rallentare processi di idrolisi.

Recentemente, infatti, sono stati sintetizzati numerosi complessi ciclopalladati mono- e dinucleari contenenti forti legami σ Pd-N, Pd-C, Pd-S e Pd-P, utilizzando leganti come biperidina e fenantrolina, etilendiammine modificate, ditiocarbammati e difosfine (*Fig. 32*) [37].

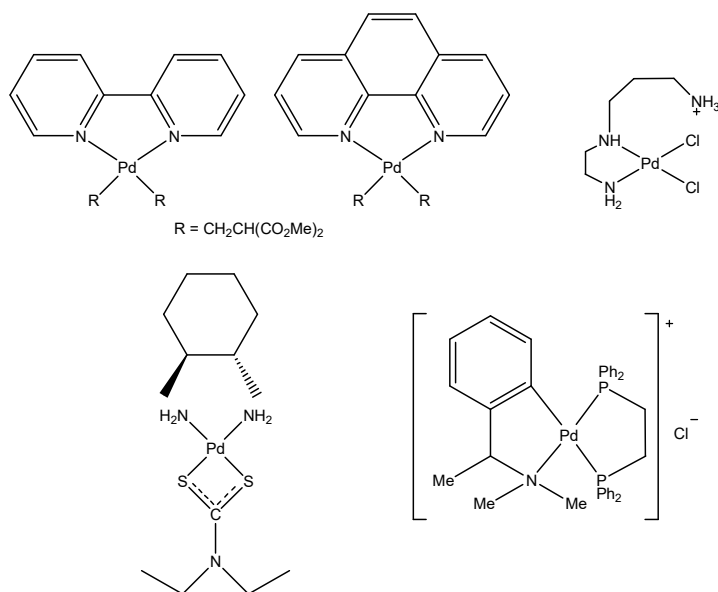


Fig. 32 Esempi di complessi ciclopalladati mononucleari contenenti legami σ Pd-N, Pd-C, Pd-S e Pd-P

Un'altra classe di leganti forti e generalmente ingombranti è costituita dai carbeni *N*-eterociclici (NHCs), i quali hanno trovato recentemente applicazioni in campo biomedico; in particolare, l'attenzione è stata focalizzata su complessi contenenti Au, Ru, Ag, Cu, Pt, Ni e appunto il Pd [38] (Fig. 33).

Uno studio condotto recentemente ha evidenziato come complessi del tipo (NHC)Pd(piridina)Cl₂ e (NHC)₂PdCl₂, sempre riportati in figura 33, presentino buona attività antitumorale e siano in grado di innescare meccanismi apoptotici nelle cellule cancerogene [39].

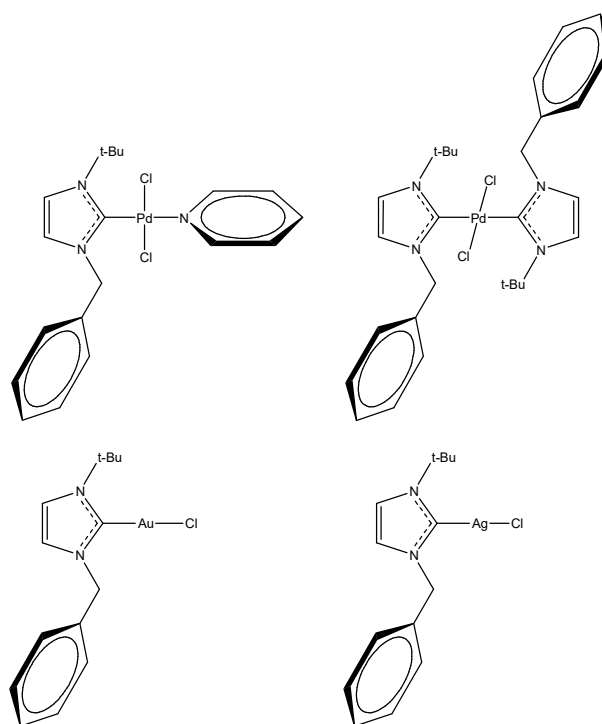


Fig. 33 Esempi di complessi contenenti leganti carbenici *N*-eterociclici studiati per applicazioni biomediche

In un altro lavoro sono stati riportati esempi di complessi ciclometallati di Pd(II) con leganti NHCs (*Fig. 34*) dotati di elevata stabilità in presenza di tioli biologici, come il glutatione, e di notevole attività citotossica verso diverse linee tumorali combinata con una minore invasività nei confronti di cellule sane (fibroblasti).

Tali composti inducono prevalentemente alterazioni a livello mitocondriale (inibizione della catena respiratoria) portando alla morte cellulare mediante apoptosi. Questi promettenti risultati *in vitro* sono stati preliminarmente confermati anche *in vivo* [40].

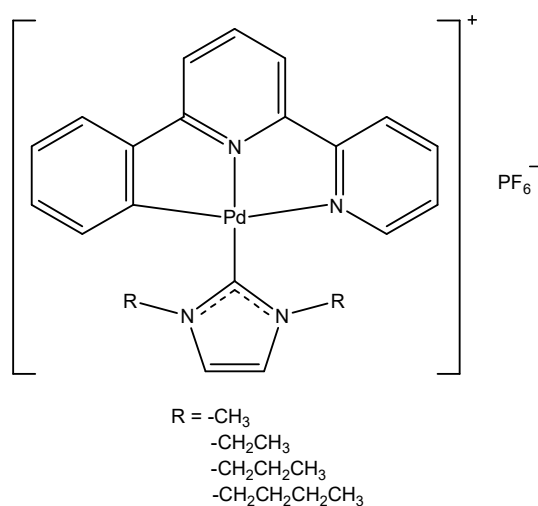


Fig. 34 Esempi di complessi ciclometallati di Pd(II) con leganti NHCs dotati di elevata stabilità in presenza di tioli biologici

1.4. BASI PURINICHE

Le basi puriniche costituiscono una famiglia di composti organici formati dalla condensazione di un anello pirimidinico con uno imidazolico (rispettivamente a 6 e 5 termini) e devono il loro nome alla purina, la cui struttura è riportata in *figura 35* [41].

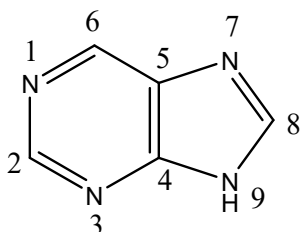


Fig. 35 Struttura della purina

Queste molecole possono essere raggruppate in due sottocategorie: adenina e guanina costituiscono le basi degli acidi nucleici, mentre caffeina, teofillina e teobromina sono riconducibili al gruppo della xantina (*Fig. 36*).

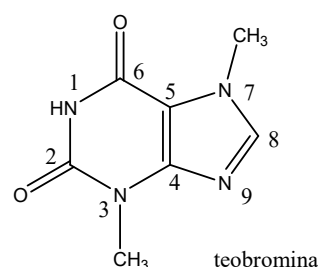
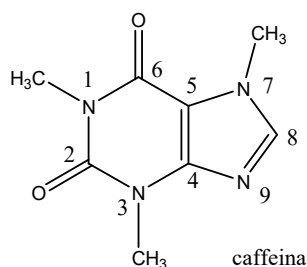
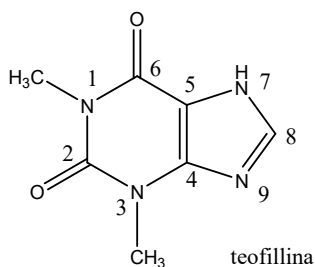
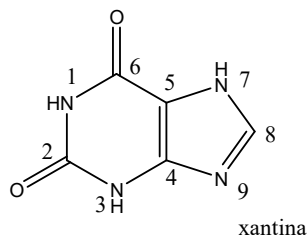
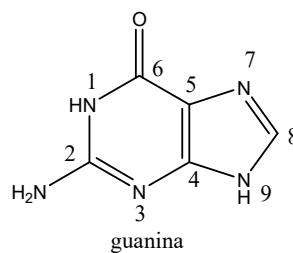
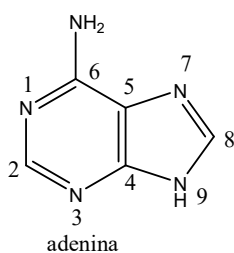
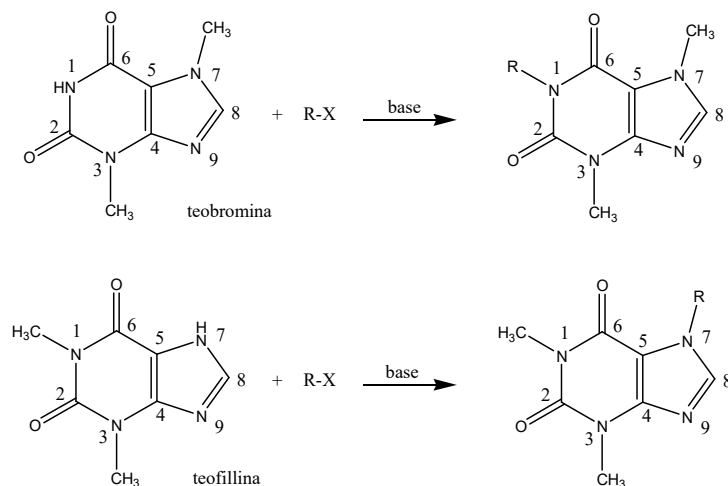


Fig. 36 Strutture delle basi degli acidi nucleici e delle basi derivate dalla xantina

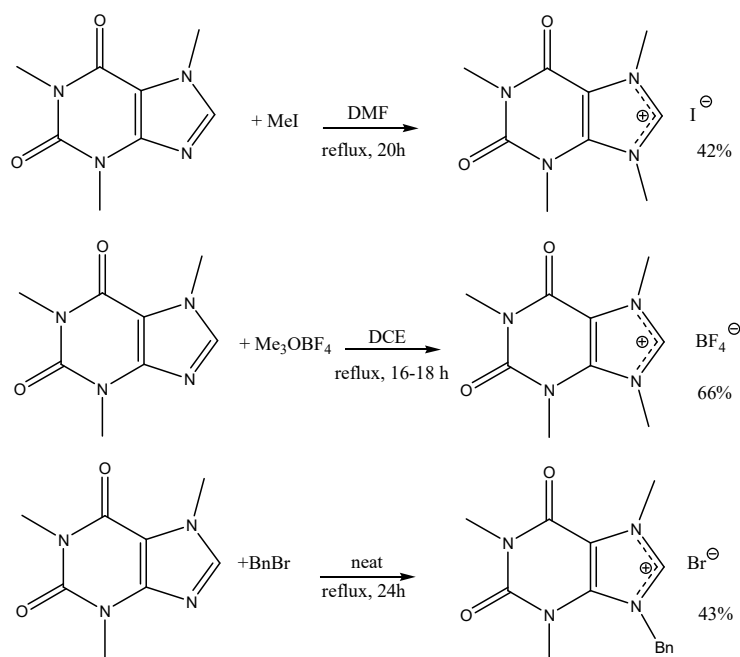
Con riferimento a queste ultime, si tratta di composti commerciali di origine naturale estratti rispettivamente dai semi di *Coffea Arabica*, dalle foglie di *Thea Sinensis* e dai semi di *Teobroma Cacao* e presenti, come intuibile, in bevande ed alimenti di largo consumo. Caffeina e teobromina presentano note proprietà stimolanti [42] mentre la teofillina è un antiasmatico [43].

Generalmente i derivati sintetici di tipo xantinico si preparano a partire da teofillina o teobromina, le quali presentano un gruppo NH, rispettivamente in posizione 7 o 1, che può essere facilmente funzionalizzato impiegando un generico agente alchilante del tipo R-X, in presenza di una base (*Schema 1*).



Schema 1 Generica funzionalizzazione di teobromina e teofillina in posizione rispettivamente 1 e 7

La funzionalizzazione dell'azoto in posizione 9, procedura comune alle tre basi xantiniche naturali, risulta purtroppo limitata all'introduzione dei soli gruppi metilico [44], etilico [45] o benzilico [46]. Questo processo richiede tra l'altro condizioni sperimentali drastiche e rese poco soddisfacenti, come nell'esempio riportato nello *schema 2* riferito alla caffeina.



Schema 2 Condizioni sperimentali di funzionalizzazione della caffeina in posizione 9

I derivati xantinici in questo lavoro di tesi rappresentano i precursori dei carbeni *N*-eterociclici, un'importante classe di leganti σ -donatori, che verrà descritta nel paragrafo successivo.

1.5. LEGANTI SPETTATORI CARBENICI N-ETEROCICLICI (NHCs)

Nel 1991 il gruppo di ricerca di Arduengo riuscì ad isolare in forma stabile il primo carbene [47] appartenente alla famiglia di leganti denominati carbeni *N*-eterociclici (*N-Heterocyclic Carbenes*, NHCs), caratterizzati dalla presenza di un anello imidazolico a 5 termini recante due atomi di azoto adiacenti al carbonio carbenico (Fig. 37).

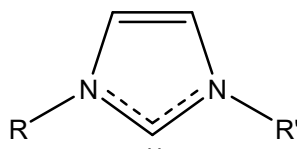
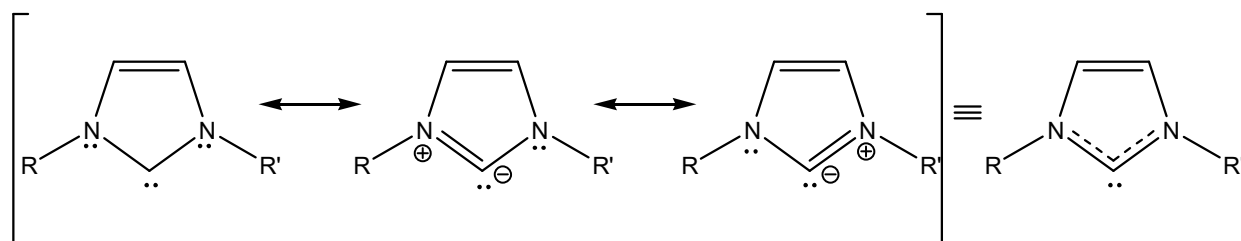


Fig. 37 Generica struttura di un carbene *N*-eterociclico

Si tratta di una sottocategoria dei carbeni di Fischer, la cui stabilità è imputabile sia all'ingombro sterico, introdotto mediante un'oculata scelta dei sostituenti R presenti, sia all'esistenza di più forme limiti di risonanza, promosse dal carattere π -donatore dei due atomi di azoto (Schema 3).



Schema 3 Forme limiti di risonanza dei carbeni *N*-eterociclici e ibrido di risonanza

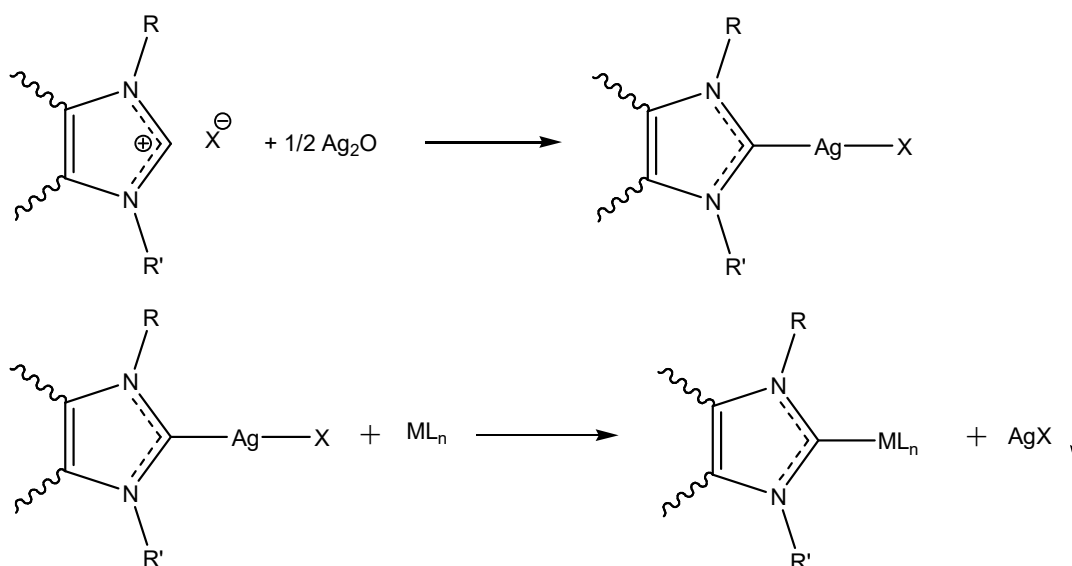
Questi due aspetti portano da un lato a scongiurare la reazione parassita di dimerizzazione, dall'altro comportano una minore propensione del carbene ad accettare la π -retrodonazione da parte del centro metallico. Ne consegue che questi leganti risultano quasi esclusivamente σ -donatori.

Analogamente alle fosfine, i leganti del tipo NHC presentano la possibilità di modulare l'ingombro sterico, ma sono dotati di minore versatilità per quanto concerne le proprietà elettroniche (i gruppi R non sono legati direttamente al carbonio carbenico). D'altra parte, risultano molto più resistenti alle ossidazioni dei leganti fosfinici e pertanto i loro complessi possono generalmente essere utilizzati in condizioni operative più drastiche senza pregiudicarne la stabilità.

Tipicamente, il protocollo di sintesi dei carbeni *N*-eterociclici prevede la deprotonazione dei corrispondenti sali d'imidazolio ad opera di una base forte [47], ma laddove siano presenti altri gruppi funzionali suscettibili di modificazioni, questa strategia non è applicabile.

In alcuni casi è possibile ovviare al problema impiegando l'ossido d'argento, il quale consente di deprotonare il sale d'imidazolio precursore e allo stesso tempo fornisce il centro metallico in grado di stabilizzare il carbene tramite coordinazione [48].

A questo punto è possibile sintetizzare una vasta gamma di complessi mediante reazione di transmetallazione in cui il frammento carbenico viene trasferito sul metallo d'interesse sfruttando la precipitazione di alogenuri d'argento insolubili quale *driving force* del processo (Schema 4).



Schema 4 Deprotonazione del sale d'imidazolio e transmetallazione

A tale proposito sono noti in letteratura numerosi esempi di carbeni *N*-eterociclici con vari metalli di transizione quali Rh, Ru, Cu, Pd, Pt e Au impiegati in molteplici applicazioni nel campo della catalisi [49].

I carbeni *N*-eterociclici sono diventati oggetto d'interesse per un futuro impiego anche in ambito biomedico, in complessi con vari metalli di transizione potenzialmente attivi come agenti chemioterapici [50].

In particolare, se consideriamo solo i carbeni a struttura purinica, sono noti numerosi esempi di complessi con vari *late transition metals* come Ir [44b], Rh [44b, 51], Ru [51], Ag [52], Cu [53], Pt [54] e Au [55], i quali hanno applicazioni in campo biomedico (Fig. 38).

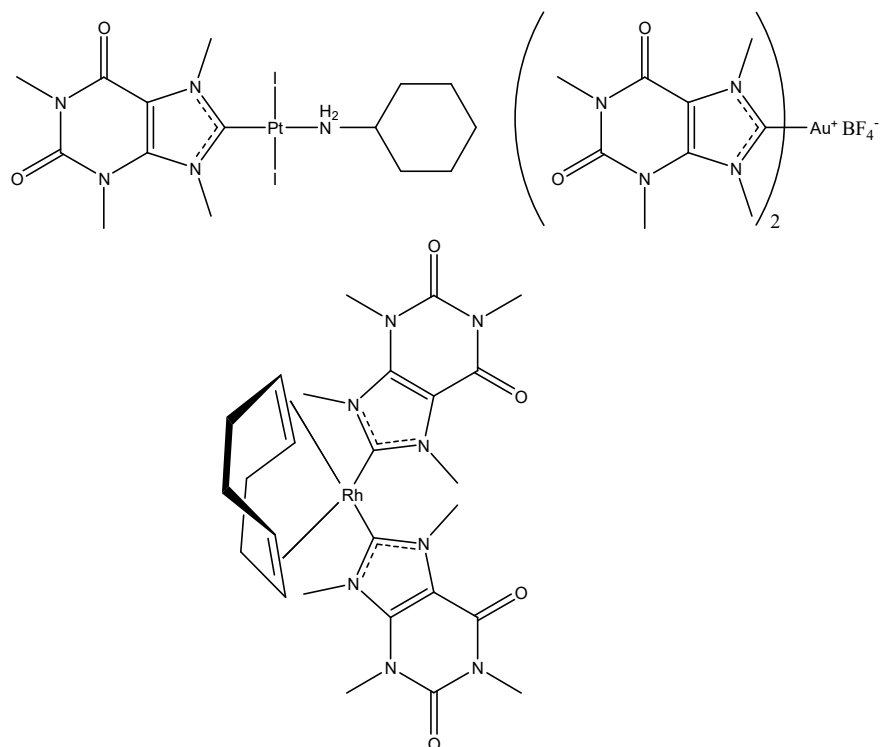


Fig. 38 Esempi di complessi carbenici N-eterociclici a struttura purinica di alcuni late transition metals

Per quanto riguarda il palladio, nonostante l'enorme mole di composti descritti in letteratura, vi sono pochissimi esempi di complessi carbenici N-eterociclici a struttura purinica [46, 56] (Fig. 39 - Schema 5).

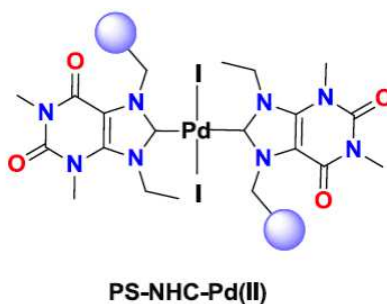
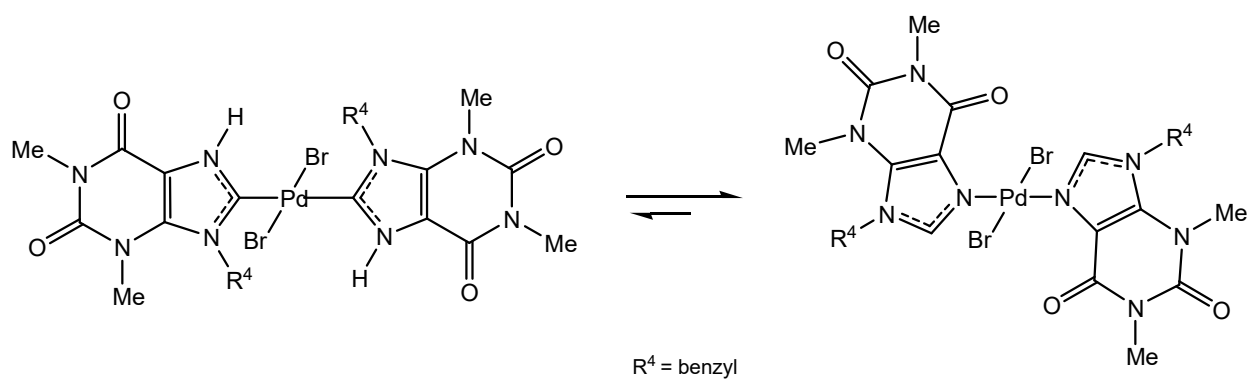


Figura 39 Esempio di complesso carbenico N-eterociclico polimerico di Pd(II)



Schema 5 Esempio di complesso carbenico N-eterociclico di Pd(II)

Recentemente, il gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta l'attività di tirocinio ha focalizzato il suo interesse sulla sintesi di complessi allilici di Pd(II) con leganti carbenici a struttura purinica (Fig. 40). Una volta caratterizzati, tali composti sono stati impiegati sia in qualità di catalizzatori per reazioni di Suzuki-Miyaura in acqua [57] sia come possibili agenti chemioterapici, indagandone l'effetto su alcune linee tumorali di carcinoma ovarico.

In particolare, alcune categorie di complessi hanno mostrato risultati paragonabili o migliori a quelli registrati col *cisplatin*o, in termini di attività antiproliferativa e test di apoptosi [58].

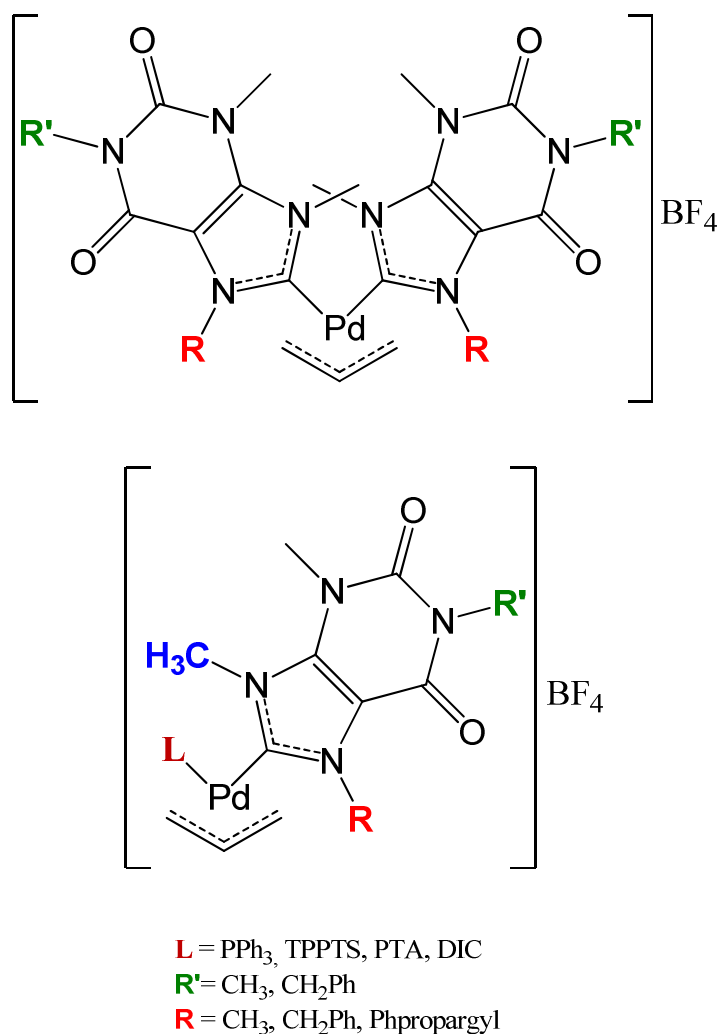


Fig. 40 Complessi allilici di Pd(II) con leganti carbenici N-eterociclici a struttura purinica sintetizzati in precedenza dal gruppo di ricerca

1.6. LEGANTI SPETTATORI FOSFINICI E ISONITRILICI

Nel campo della chimica di coordinazione i leganti spettatori occupano una posizione di rilievo in quanto, sebbene non subiscano modificazioni e non rivestano un ruolo attivo nelle reazioni in cui è coinvolto il complesso, risultano in grado di influenzare significativamente il decorso di tali processi, modulando la reattività del metallo cui sono legati.

Un'importante classe di leganti ancillari è costituita dalle fosfine terziarie (PR_3), le quali sono estremamente versatili dal momento che un'opportuna variazione dei sostituenti R legati direttamente al fosforo permette di modificarne le proprietà elettroniche e di ingombro sterico [59], caratteristica che ha portato al loro impiego in molte applicazioni nei campi della chimica metallorganica e della catalisi omogenea [60].

Per quanto riguarda le alchilfosfine, l'interazione col centro metallico avviene mediante σ -donazione del doppietto elettronico libero presente sull'atomo di fosforo.

L'introduzione di sostituenti arilici, dimetilamminici e alcossidici implica una crescente acidità che diventa addirittura paragonabile a quella del CO nel caso limite di un gruppo PF_3 ed è dovuta alla π -retrodonazione da parte del metallo su orbitali di antilegame $\sigma^*(\text{P-X})$ di opportuna simmetria [59].

Tra le fosfine impiegate in questo lavoro di tesi vi è il PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano), il cui carattere idrosolubile viene in genere trasferito anche ai complessi che forma con svariati centri metallici, consentendo di estenderne il *range* di applicazioni soprattutto in campo biologico (Fig. 41).

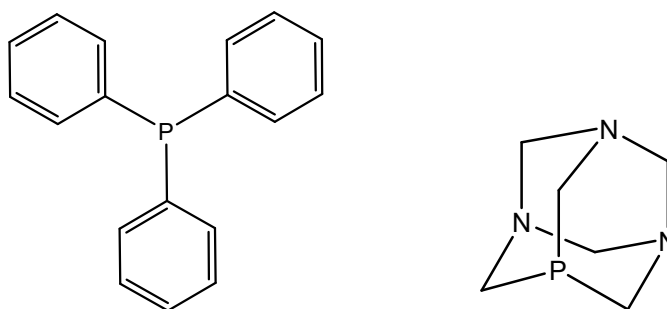


Fig. 41 Strutture delle fosfine impiegate nel lavoro di tesi: trifenilfosfina (a sinistra) e PTA (a destra)

Un'altra tipologia di leganti ancillari ricorrenti sono gli isonitrili ($:\text{CN-R}$), la cui struttura è esaustivamente descritta mediante le due formule di risonanza riportate nello Schema 6.



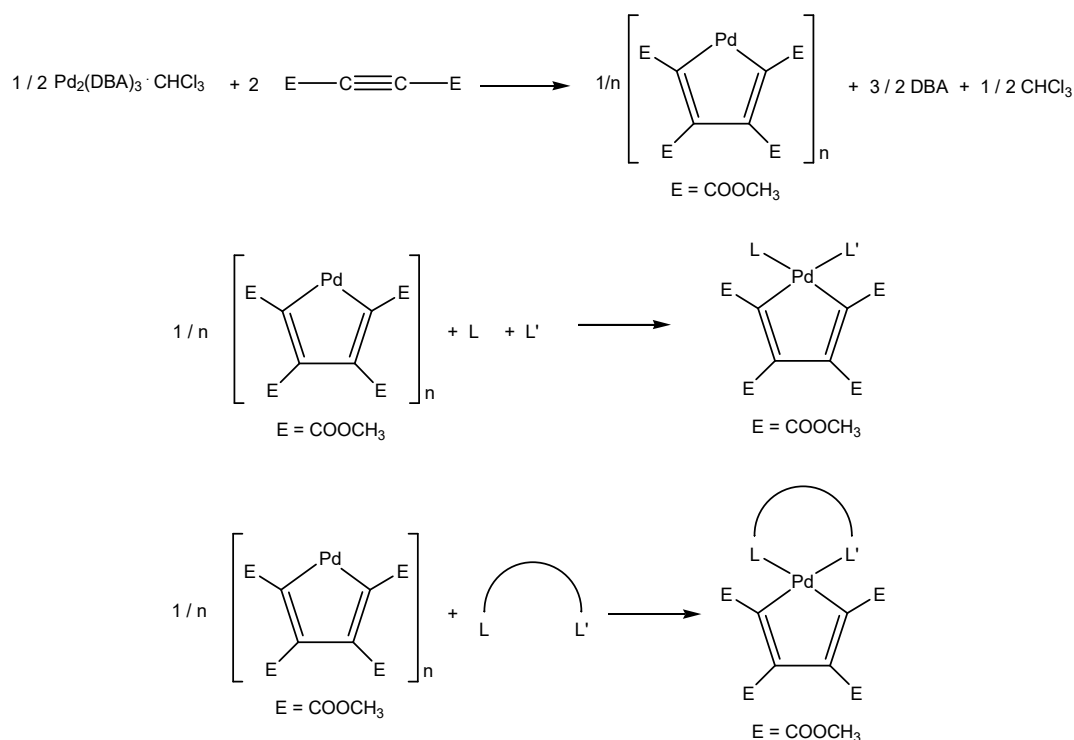
Schema 6 Strutture limite di risonanza di un generico isonitrile

Si tratta di specie isoelettroniche al CO e, come questo, di carattere sostanzialmente elettron-attrattore come conseguenza del prevalere della π -retrodonazione rispetto alla σ -donazione. Tuttavia, questa caratteristica può essere modulata in qualche misura mediante una scelta mirata del sostituente R [59].

1.7. I COMPLESSI PALLADACICLOPENTADIENILICI

Il primo esempio di composto palladaciclopentadienilico $[\text{PdC}_4(\text{COOCH}_3)_4]_n$ è di natura polimerica e venne sintetizzato da Maitlis negli anni '70 per reazione di accoppiamento ossidativo tra $\text{Pd}_2\text{DBA}_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (DBA = dibenzilidenacetone) e dimetilacetilenedicarbossilato (DMA) in diversi solventi [61].

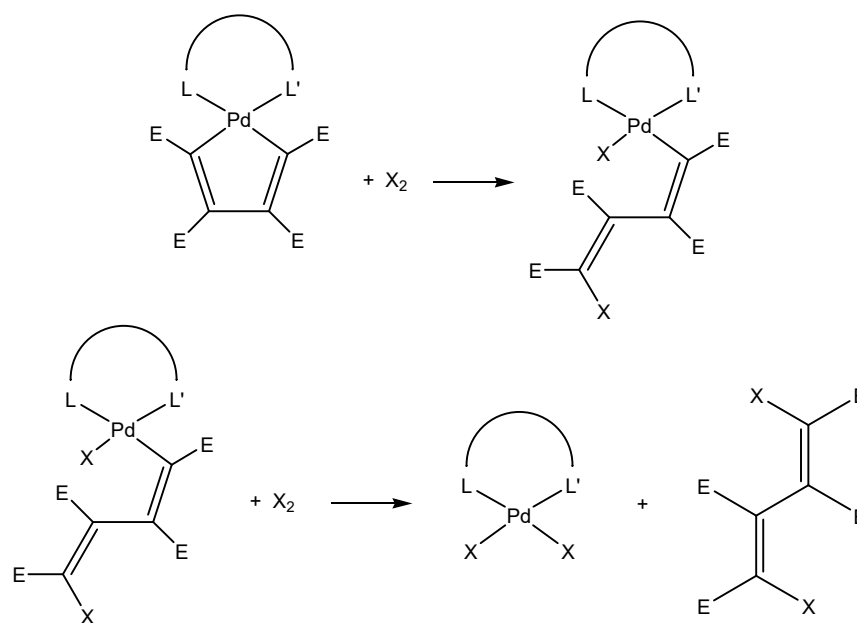
Successivamente si notò che la labilità dei ponti tra le unità monomeriche poteva essere sfruttata per sintetizzare un'ampia gamma di complessi mononucleari di palladio mediante reazione con leganti mono- o bi-dentati (Schema 7).



Schema 7 Sintesi del precursore $[\text{PdC}_4(\text{COOCH}_3)_4]_n$ e sua reattività con leganti mono- e bi-dentati

Studi successivi hanno evidenziato la capacità dell'unità $\text{PdC}_4(\text{COOCH}_3)_4$ di comportarsi da legante attore e subire attacco da parte di alogeni o alogenuri alchilici/arilici per dare i corrispondenti complessi butadienilici di Pd(II), in un processo costituito da un'addizione ossidativa e da una successiva eliminazione riduttiva stereospecifica verso l'ottenimento dell'isomero a geometria Z/Z.

Il frammento butadienilico può essere poi rilasciato dal centro metallico tramite un'ulteriore successione di addizione ossidativa ed eliminazione riduttiva consecutive (*Schema 8*) [62].



*Schema 8 Attacco di un alogenuro nei confronti del PdC₄(COOCH₃)₄
(dove E = COOCH₃)*

Il gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta l'attività di tirocinio si occupa da qualche anno della reattività dei complessi palladaciclopentadienilici, studiando l'influenza di un'ampia gamma di leganti spettatori mono- e bi-dentati, tra cui i carbeni *N*-eterociclici, notando l'ottenimento di differenti tipologie di prodotti, di cui alcune decisamente inedite [63].

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Scopo del presente lavoro di tesi è quello di sintetizzare e caratterizzare nuovi complessi palladaciclopentadienilici contenenti almeno un legante carbenico *N*-eterociclico a struttura purinica, con la speranza che la struttura di questi derivati naturali renda i nostri complessi organometallici più compatibili con l'ambiente biologico in cui si troveranno ad agire.

In modo particolare, verrà presa in considerazione la sintesi di complessi ciclopalladati con due leganti carbenici (biscarbeni) o con un legante carbenico e un legante spettatore di differente natura (fosfina alchilica e arilica, isonitrile).

Sulla base dei risultati incoraggianti ottenuti per i complessi allilici di Pd(II) contenenti gli analoghi leganti carbenici a struttura purinica [58], la seconda parte dell'attività sperimentale sarà rivolta allo studio della possibile attività citotossica dei nuovi composti ciclometallati su linee tumorali umane di carcinoma ovarico.

CAPITOLO 3

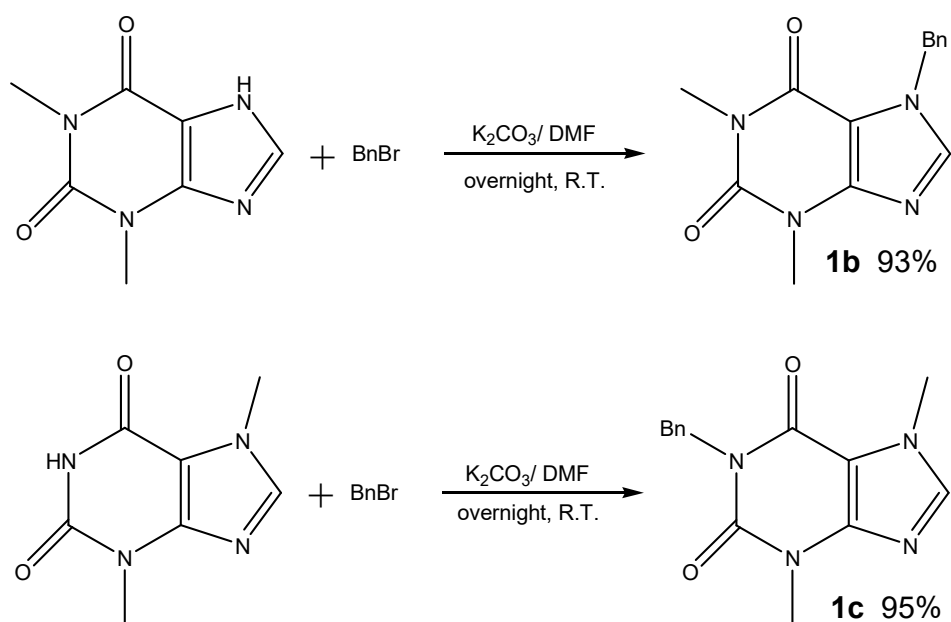
RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. PARTE CHIMICA

3.1.1. SINTESI DI N-1 E N-7 ALCHIL-XANTINE

Come già enunciato nella parte introduttiva di questo lavoro di tesi, i leganti carbenici *N*-eterociclici utilizzati sono caratterizzati da uno scheletro purinico. In due dei tre casi descritti, i substrati di partenza per sintetizzarli sono stati la teofillina e la teobromina e la prima reazione a cui tali precursori sono stati sottoposti è una benzilazione; tale processo ci ha consentito di ottenere rispettivamente i composti **1b** e **1c**. La procedura è stata condotta secondo un protocollo già noto in letteratura [64] che prevede di aggiungere alla xantina di partenza 2 equivalenti di benzilbromuro e 1.5 equivalenti di K_2CO_3 in DMF (*Schema 9*).

In entrambi i casi, dopo circa 12 ore di reazione a temperatura ambiente, il derivato xantinico è stato precipitato dalla miscela finale mediante aggiunta di acqua e separato quindi per filtrazione.



Schema 9 Reazione di benzilazione di teofillina e teobromina a dare i composti **1b** e **1c**

Dagli spettri 1H -NMR (*Fig. 42*) risulta evidente la comparsa di due serie di segnali attribuibili al gruppo benzilico, vale a dire il singoletto localizzato tra 5 e 6 ppm, riconducibile al gruppo N - CH_2 , ed i picchi dei protoni aromatici tra 7.20 e 7.60 ppm.

Il buon esito della reazione è inoltre testimoniato dalla scomparsa del largo picco situato tra 12 e 13 ppm del gruppo NH caratterizzante i prodotti di partenza, nonché dalla leggera variazione di *chemical shift* dei picchi attribuibili ai gruppi NCH₃ e NCHN.

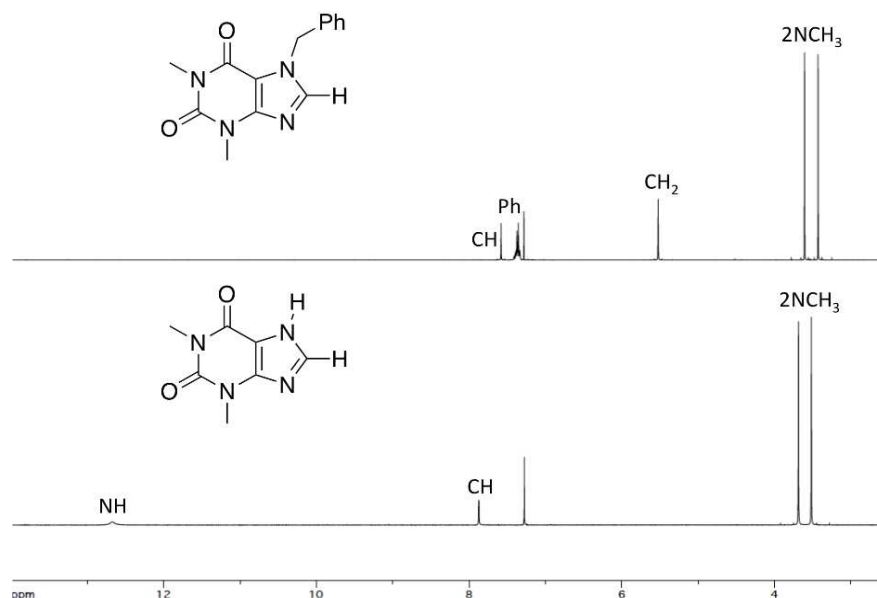


Fig. 42 Spettri ¹H-NMR appartenenti al composto **1b** ed alla teofillina ($T = 298K$, $CDCl_3$)

Lo spettro ¹³C{¹H}-NMR del composto **1b** (Fig. 43) mostra i picchi relativi ai gruppi NCH₃ ed NCH₂ nella zona 28-50 ppm e quelli dei carboni C⁵ e C⁴ rispettivamente a 107 e 149 ppm circa. Sono inoltre visibili i segnali dei carboni aromatici tra 127 e 137 ppm, del carbonio imidazolico NCHN a 141 ppm e quelli dei gruppi carbonilici fra 151 e 156 ppm.

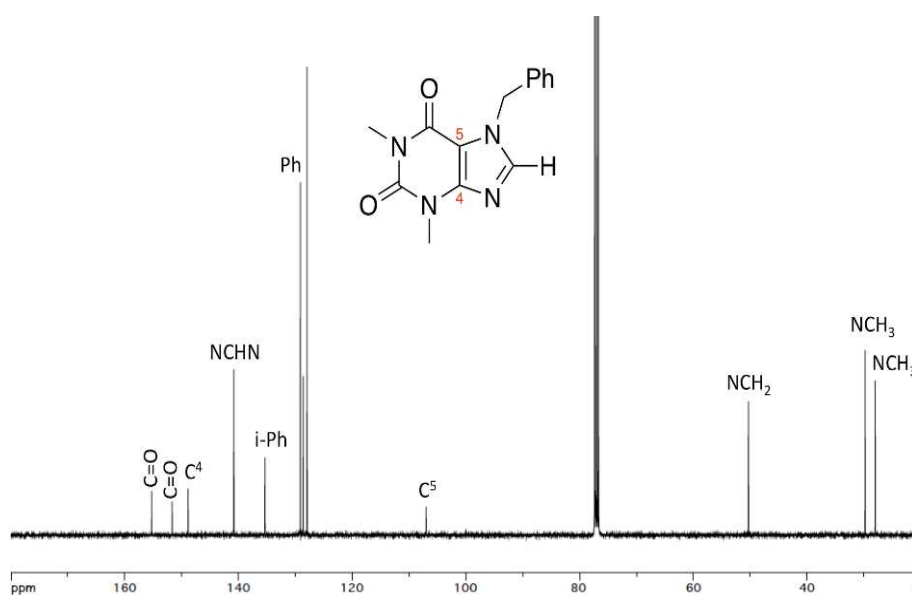


Fig. 43 Spettro ¹³C{¹H}-NMR del composto **1b** ($T = 298K$, $CDCl_3$)

L'attribuzione dei segnali relativi al composto **1b** è stata possibile mediante acquisizione ed interpretazione degli spettri NMR bidimensionali HSQC (Fig. 44) ed HMBC (Fig. 45). Considerazioni del tutto analoghe a quelle riportate per tale composto sono valide anche per il derivato della teobromina **1c**.

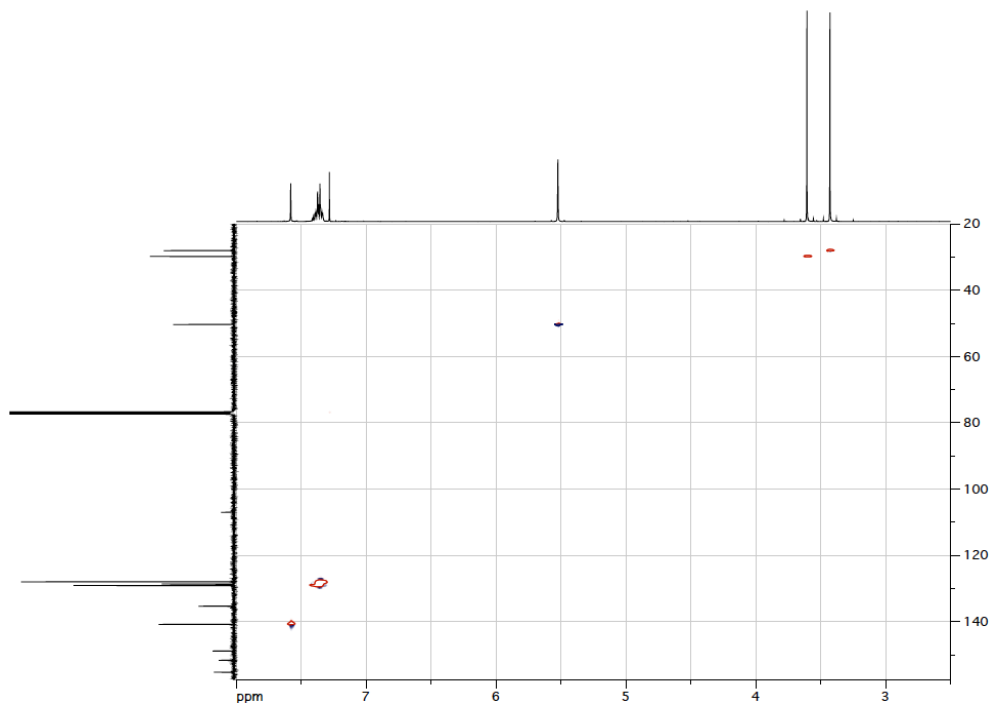


Fig. 44 Spettro HSQC del composto **1b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

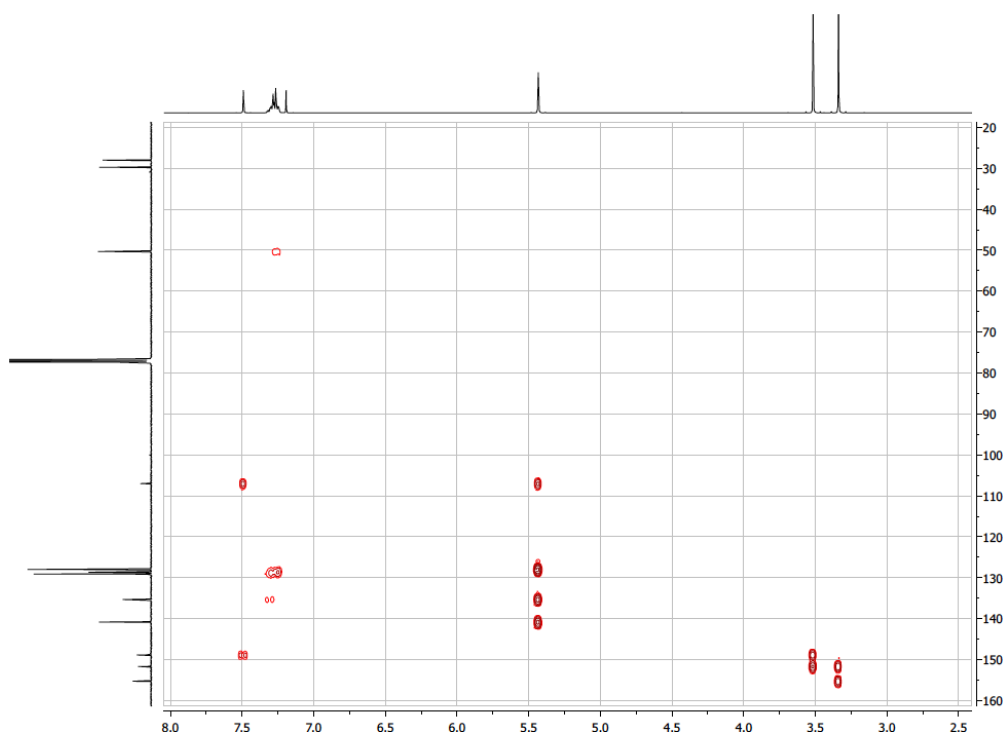


Fig. 45 Spettro HMBC del composto **1b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

3.1.2. SINTESI DEI SALI D'IMIDAZOLIO A STRUTTURA PURINICA

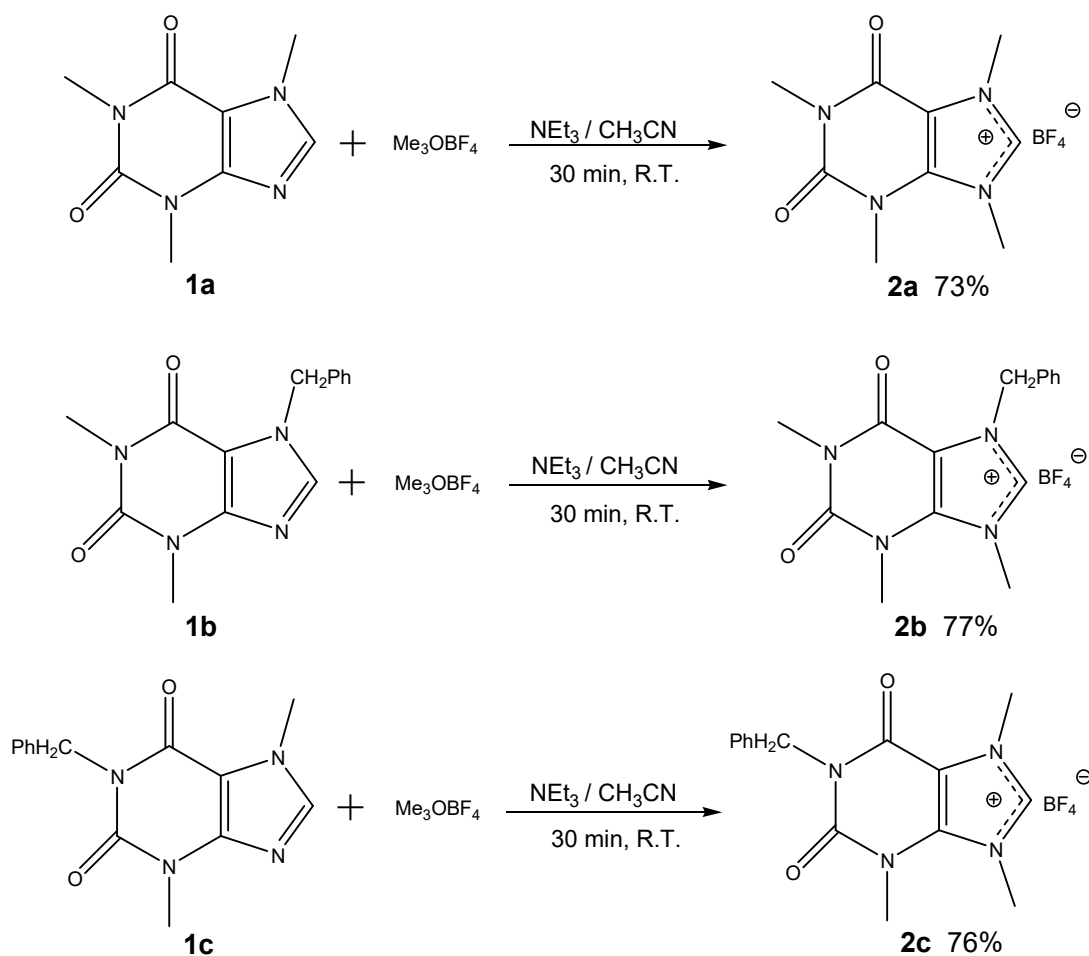
3.1.2.1. COMPOSTI 2a-c

Come anticipato nell'introduzione, la caffeina (**1a**) e i derivati xantini sintetici **1b** e **1c** contengono, in posizione 9, un atomo di azoto sp^2 il quale può subire attacco solo da un numero limitato di reagenti elettrofili, oltretutto operando in condizioni drastiche ed ottenendo generalmente rese non particolarmente soddisfacenti.

Seguendo una metodica migliorativa, messa a punto dal gruppo di ricerca presso il quale si è svolta l'attività di tirocinio, è stato possibile ottenere la metilazione dei composti **1a-c** per preparare i corrispondenti sali d'imidazolio **2a-c**, con esiti sicuramente più incoraggianti [65].

In particolare, il protocollo prevede di far reagire il substrato prescelto con un leggero eccesso di Me_3OBF_4 in acetonitrile, aggiungendo successivamente trietilammina.

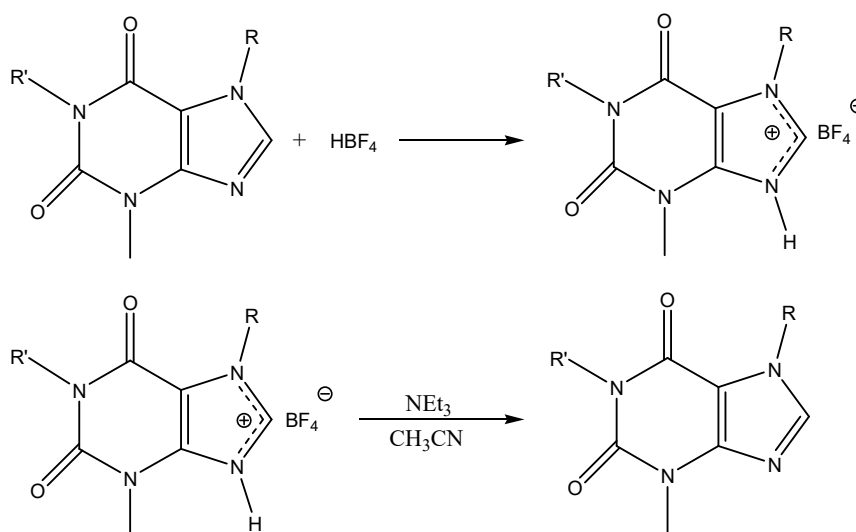
I prodotti di metilazione si separano per rimozione del solvente, trasferimento su gooch e successivi lavaggi con diclorometano/dietilere in rapporto 1:1 (*Schema 10*).



Schema 10 Reazioni di metilazione dei composti **1a-c** a dare i relativi sali d'imidazolio **2a-c**

Tale procedura presenta alcuni significativi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali riportati in letteratura [44]:

1. la sostituzione del metilioduro e del dimetilsolfato col sale di Meerwein (Me_3OBF_4), un solido più facilmente maneggiabile e meno tossico degli altri due agenti metilanti
2. l'utilizzo di un solvente polare in grado di favorire le reazioni di attacco elettrofilo, permettendo così di operare in condizioni di reazione blande (all'aria, a temperatura ambiente e con tempi di reazione molto ridotti)
3. l'impiego di una base che consente di deprotonare il sottoprodotto derivante dalla reazione parassita tra l'imidazolo iniziale e l' HBF_4 , (formatosi a sua volta da tracce di acqua presenti per l'igroscopicità del sale di Meerwein) rigenerando il reagente di partenza. Inoltre, la trietilammina e l'eventuale suo omologo protonato o metilato, come anche il substrato di partenza, risultano solubili in diclorometano (o miscela diclorometano/etere dietilico) e sono pertanto facilmente separabili in fase di purificazione (*Schema 11*).



Schema 11 Reazione parassita del substrato **1b** e il suo ripristino mediante deprotonazione

Dal confronto tra gli spettri $^1\text{H-NMR}$ delle specie iniziali e finali (*Fig. 46*) risulta evidente il buon esito della reazione di metilazione; infatti, oltre alla comparsa di un nuovo segnale nella zona dei gruppi NCH_3 , gli spettri dei composti **2** mostrano la contestuale variazione di *chemical shift* dei picchi relativi ai sostituenti già presenti nei precursori **1**. Nei sali d'imidazolio, infatti, tali gruppi risentono della presenza di una carica positiva in grado di drenare densità elettronica e pertanto si spostano verso campi più bassi. Particolarmente marcato è l'effetto deschermante sul

protoni imidazolico NCHN che assume carattere acido ed il cui segnale risulta traslato di circa 1 ppm.

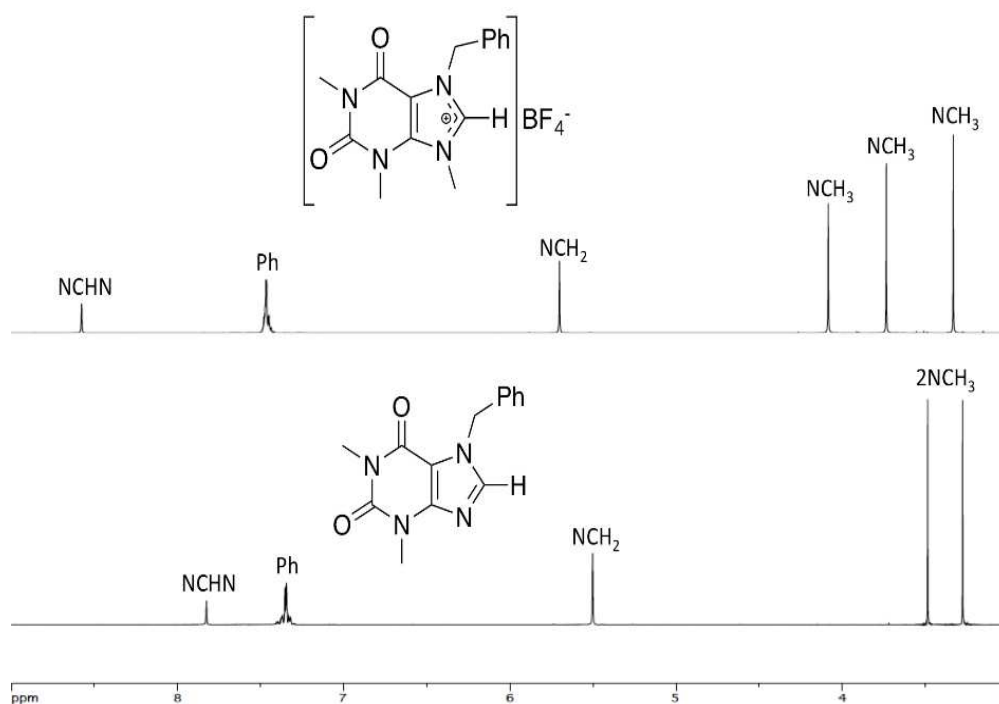


Fig. 46 Spettri ^1H -NMR rispettivamente appartenenti ai composti **2b** e **1b** ($T = 298\text{K}$, CD_3CN)

Ad ulteriore conferma dell'ottenimento dei prodotti è possibile osservare in tutti i casi negli spettri $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (Fig. 47) la comparsa di un nuovo segnale NCH₃ nella zona compresa tra 28 e 38 ppm.

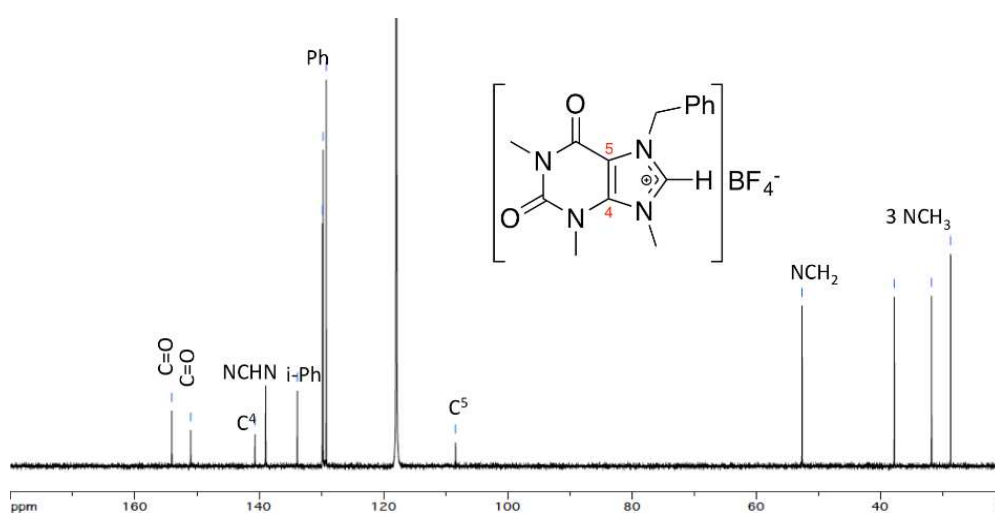


Fig. 47 Spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR del composto **2b** ($T = 298\text{K}$, CD_3CN)

Nelle figure 48 e 49 sono riportati gli spettri bidimensionali HSQC e HMBC di uno dei prodotti ottenuti (**2b**), spettri che ci hanno consentito un'assegnazione univoca di tutti i picchi.

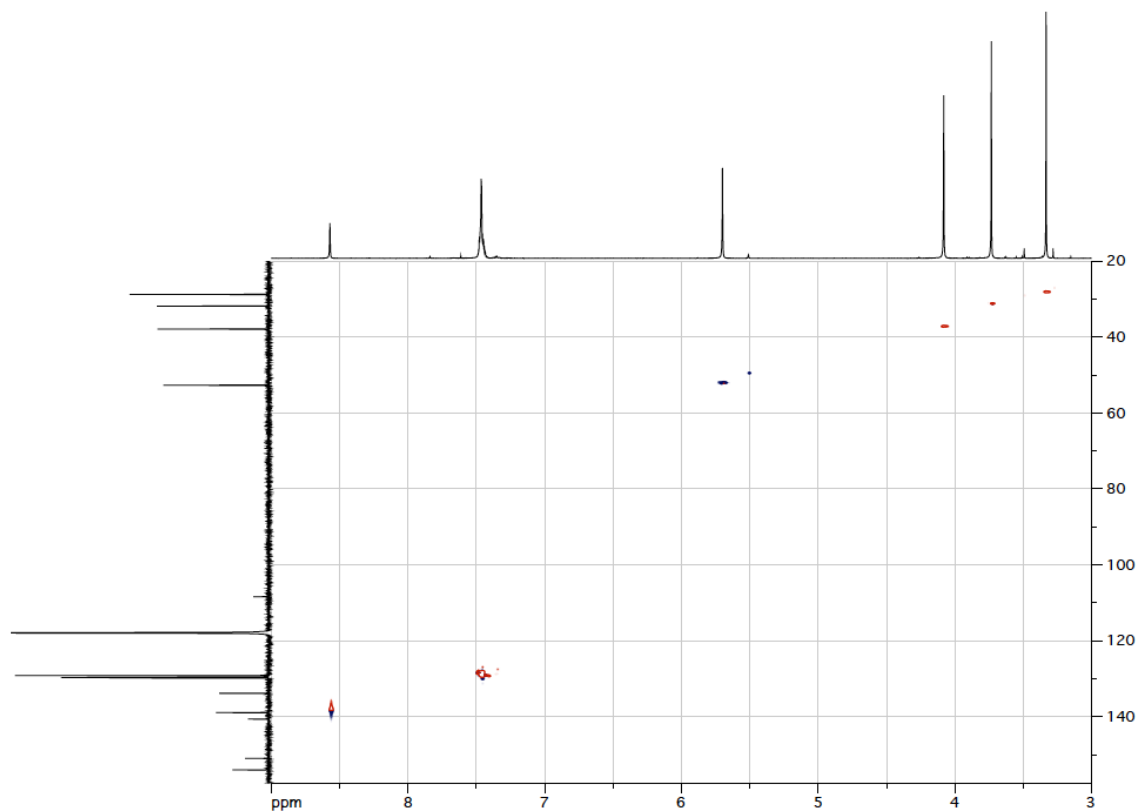


Fig. 48 Spettro HSQC del composto **2b** ($T = 298K$, CD_3CN)

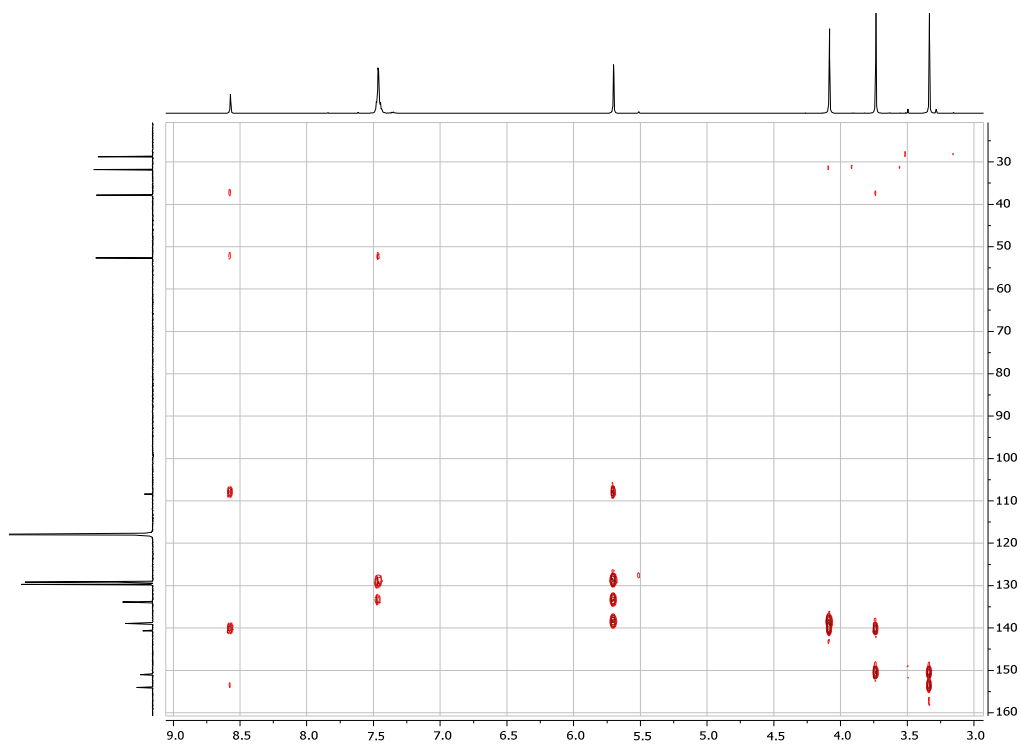


Fig. 49 Spettro HMBC del composto **2b** ($T = 298K$, CD_3CN)

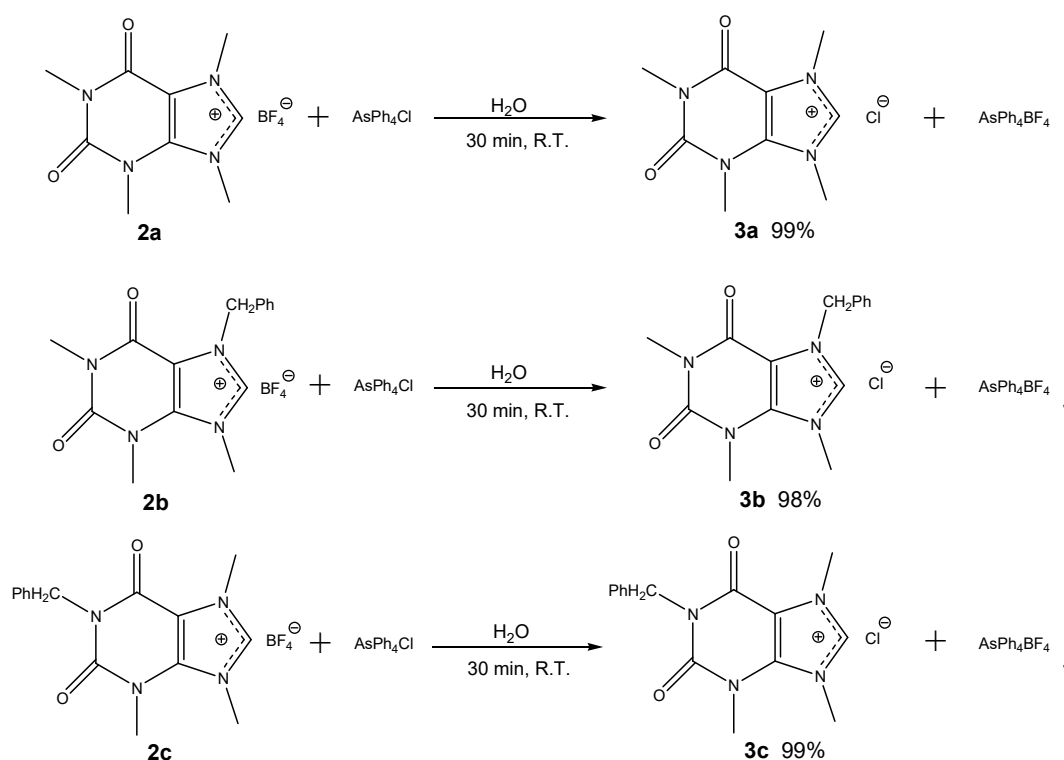
3.1.2.2. COMPOSTI 3a-c

Prima di procedere alla sintesi dei complessi d'argento è stata eseguita una reazione di scambio che, a partire dai sali d'imidazolio **2a-c** contenenti BF_4^- come controione, ha permesso di ottenere i corrispondenti composti **3a-c**, la cui carica positiva è bilanciata dal nuovo anione Cl^- .

Questo passaggio intermedio si è reso necessario per ottenere nello stadio sintetico successivo complessi di Ag(I) che, se fatti reagire con il precursore di Pd(II) , possano dare facilmente transmetallazione con precipitazione di AgCl .

Un metodo classico per effettuare lo scambio prevede l'impiego di AsPh_4Cl [66], un composto solubile in acqua che, dopo aver scambiato il cloruro con il tetrafluoroborato, precipita come AsPh_4BF_4 , un solido bianco facilmente separabile. In tal modo si garantisce lo spostamento dell'equilibrio verso la formazione selettiva e quantitativa del sale d'imidazolio desiderato.

Nello specifico, l'aggiunta di un equivalente di AsPh_4Cl ad una soluzione acquosa dei composti **2a-c**, ha portato alla formazione praticamente istantanea dei prodotti **3a-c** in forma pura e con rese praticamente quantitative (*Schema 12*).



Schema 12 Reazioni di scambio anionico per l'ottenimento dei sali d'imidazolio **3a-c**

Dal confronto tra gli spettri $^1\text{H-NMR}$ relativi al sale d'imidazolio **3a** e al suo precursore **2a** (*Fig. 50*), è possibile notare come la sostituzione del controione iniziale BF_4^- con Cl^- si ripercuota leggermente sui *chemical shifts* dei protoni più vicini a dove è localizzata la carica positiva del composto. Tale influenza appare particolarmente marcata nel caso dei gruppi metilici del sistema

imidazolico presenti nella zona tra 3.4 e 4.2 ppm, con lo sdoppiamento di due picchi che prima apparivano sovrapposti. Inoltre, nonostante l'acidità del protone imidazolico non consenta di considerare la posizione del suo segnale come particolarmente diagnostica, si deve annotare anche in questo caso uno spostamento verso campi più bassi, con un $\Delta\delta$ pari a circa 1.5 ppm.

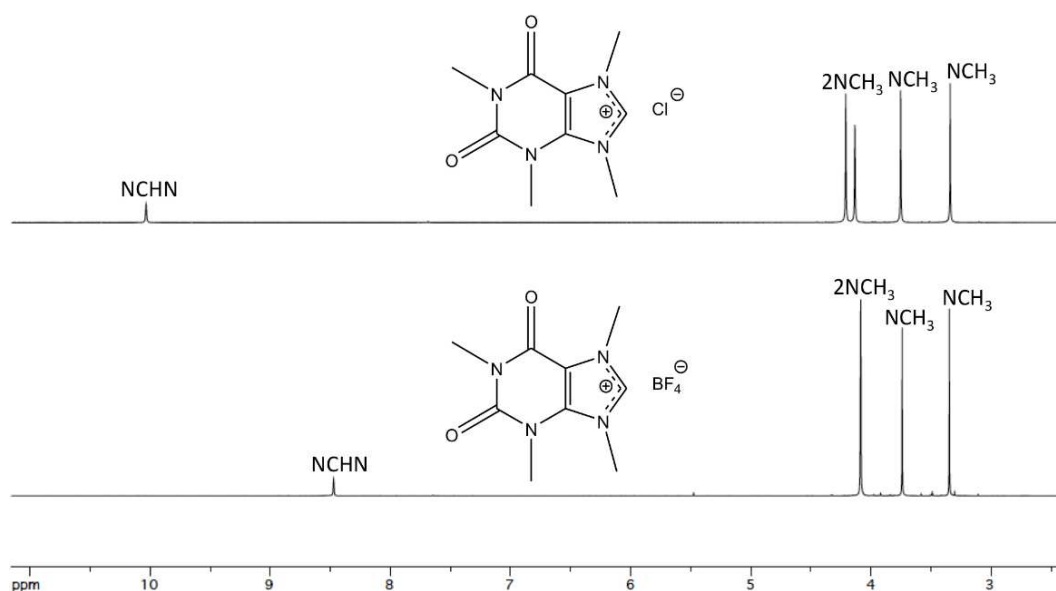


Fig. 50 Spettri ^1H -NMR rispettivamente appartenenti ai sali d'imidazolio **3a** e **2a** ($T = 298\text{K}$, CD_3CN)

Di seguito viene riportato anche lo spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR relativo al composto **3a** (Figura 51). Considerazioni analoghe a quelle esposte per il prodotto **3a** si possono estendere ai composti **3b** e **3c**.

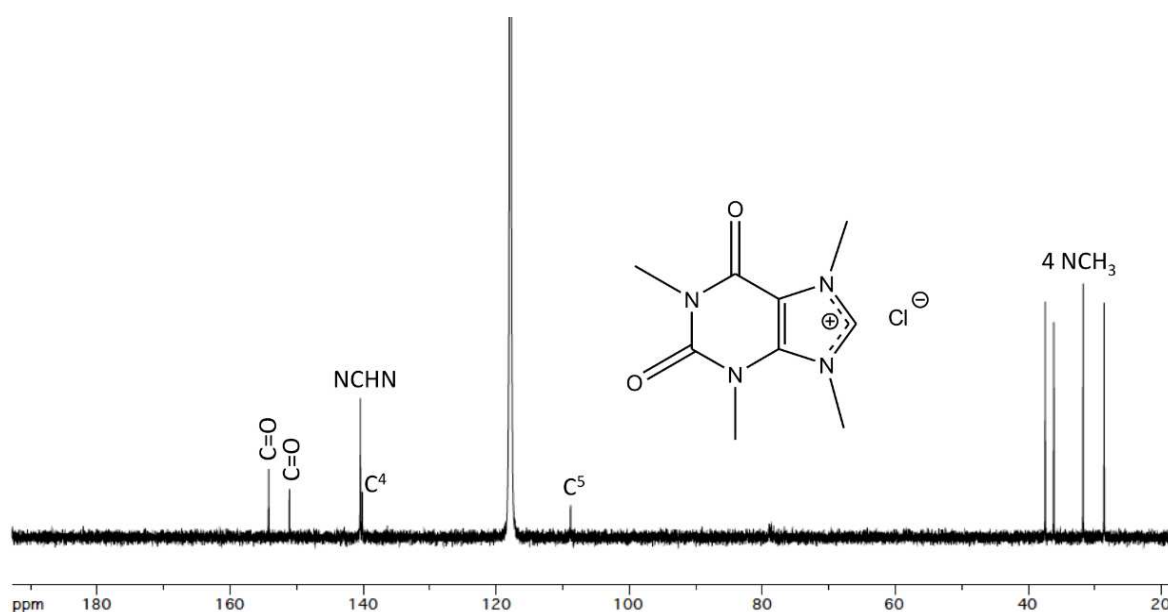


Fig. 51 Spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR appartenente al composto **3a** ($T = 298\text{K}$, CD_3CN)

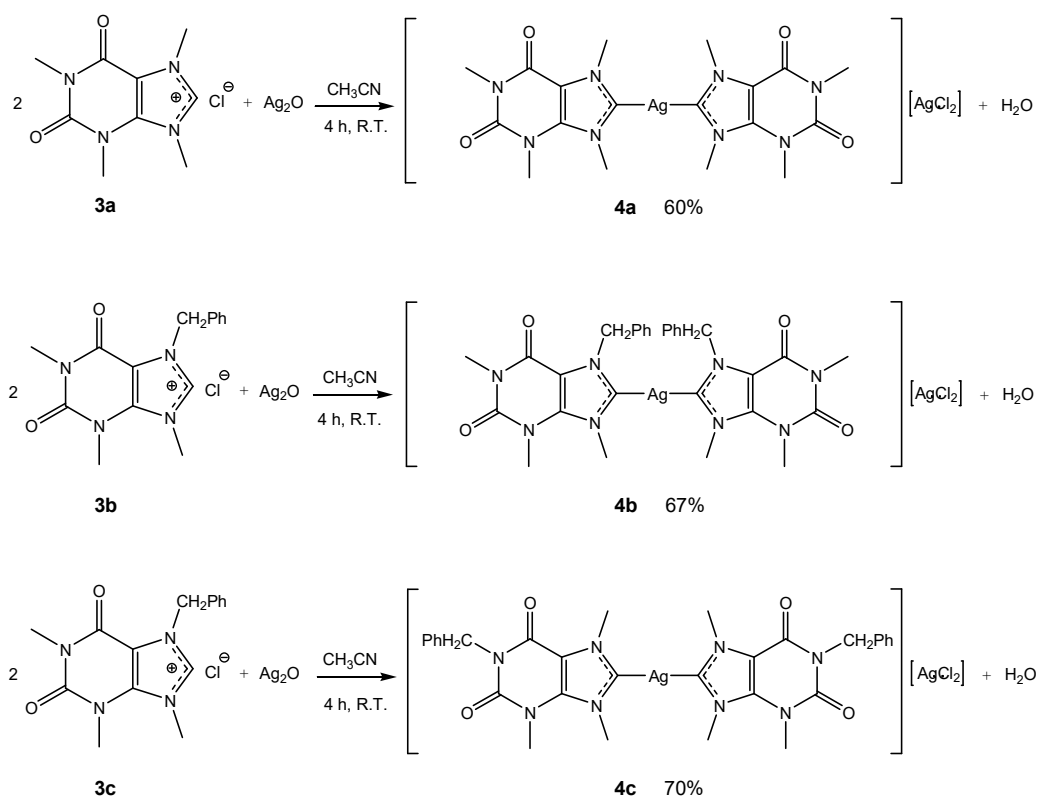
3.1.3. SINTESI DEI COMPLESSI D'ARGENTO(I) A STRUTTURA PURINICA

Al fine di deprotonare i sali d'imidazolio **3a-c** precedentemente descritti e formare la specie carbenica di interesse, è stato impiegato un leggero eccesso di una particolare base inorganica quale l'ossido d'argento. Tale composto presenta il doppio vantaggio di non interagire con altri gruppi funzionali presenti nella molecola e di fornire al contempo un centro metallico in grado di stabilizzare i carbeni liberatisi.

In particolare, aggiungendo ad una soluzione dei composti **3a-c** un leggero eccesso di Ag_2O rispetto allo stechiometrico, è stato possibile sintetizzare i corrispondenti complessi di Ag(I) **4a-c**.

Dato il carattere fotosensibile dei sali d'argento, le reazioni sono state condotte al buio e l'avanzamento delle stesse è stato monitorato nel tempo, osservando la progressiva dissoluzione dell'ossido d'argento e la simultanea precipitazione dei prodotti sotto forma di solidi bianchi, in ragione della loro insolubilità nell'acetonitrile impiegato come solvente.

I complessi finali sono stati separati per filtrazione, ripresi in diclorometano e filtrati su millipore allo scopo di eliminare l' Ag_2O residuo. Dalle soluzioni risultanti ridotte a piccolo volume i prodotti **4a-c** sono stati ottenuti in forma pura mediante precipitazione con dietilere (*Schema 13*).



Schema 13 Reazioni di sintesi dei complessi di Ag(I) **4a-c** a partire dai sali d'imidazolio **3a-c**

Anche in questo caso, la conferma della natura dei prodotti ottenuti è stata possibile grazie all'analisi dei loro spettri ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR.

A titolo di esempio, sono stati selezionati gli spettri ^1H -NMR relativi rispettivamente alle specie **4a** e **3a**, dai quali è possibile notare come i segnali dei gruppi alchilici ed arilici del prodotto risultino tutti leggermente spostati rispetto agli omologhi del corrispondente sale d'imidazolio iniziale; questa è ovviamente una conseguenza della coordinazione sul centro metallico (Fig. 52).

Particolarmente diagnostica è inoltre la scomparsa nello spettro del complesso d'argento del segnale relativo al protone imidazolico NCHN rimosso dall' Ag_2O .

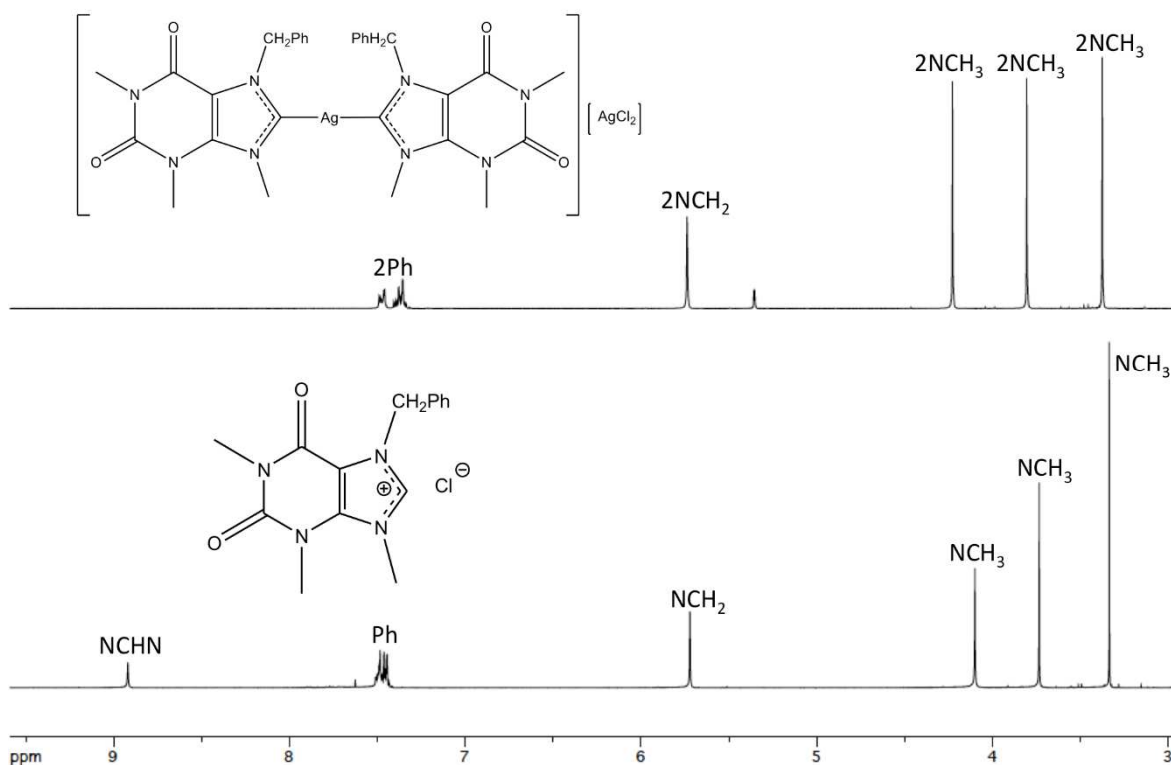


Fig. 52 Spettri ^1H -NMR rispettivamente appartenenti ai composti **4a** e **3a** ($T = 298\text{K}$, CD_2Cl_2 e CD_3CN)

Vengono di seguito riportati lo spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (Fig. 53) e i bidimensionali HSQC ed HMBC (Fig. 54 e 55) che consentono un'assegnazione puntuale dei picchi del complesso d'argento **4a**.

Valutazioni analoghe a quelle illustrate per il prodotto **4a**, scelto come esempio, si possono applicare ai composti **4b** e **4c**.

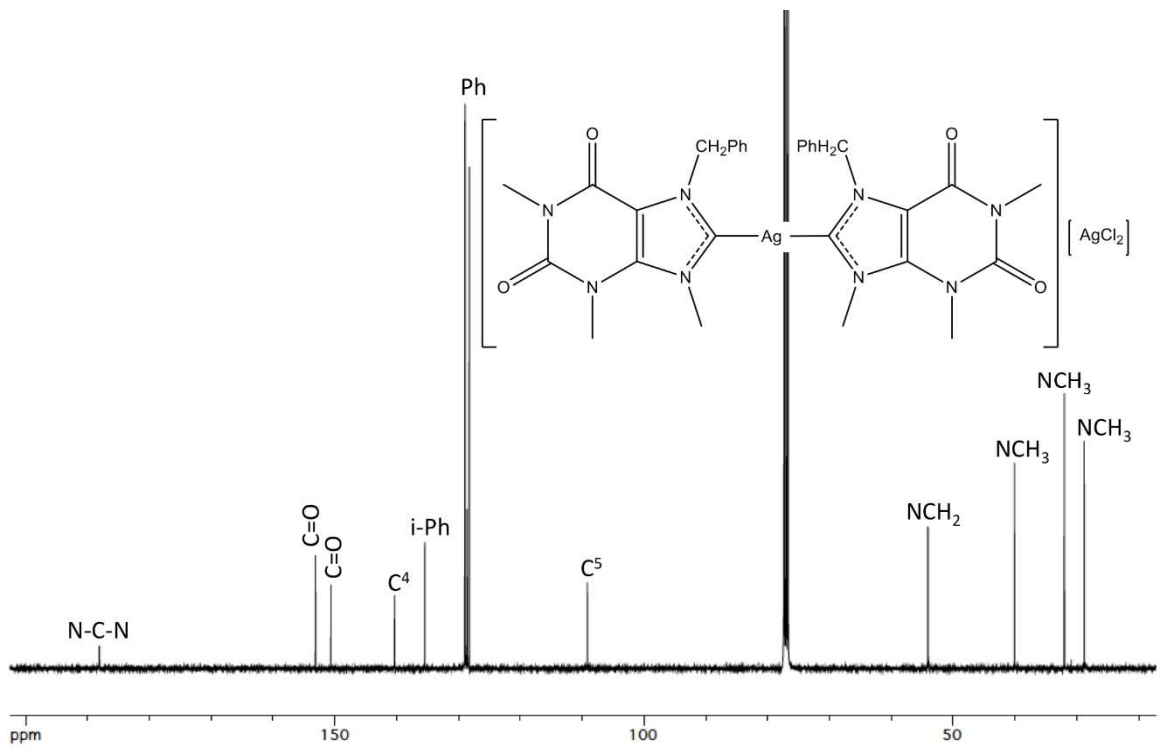


Fig. 53 Spettro $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ -NMR appartenente al composto **4a** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

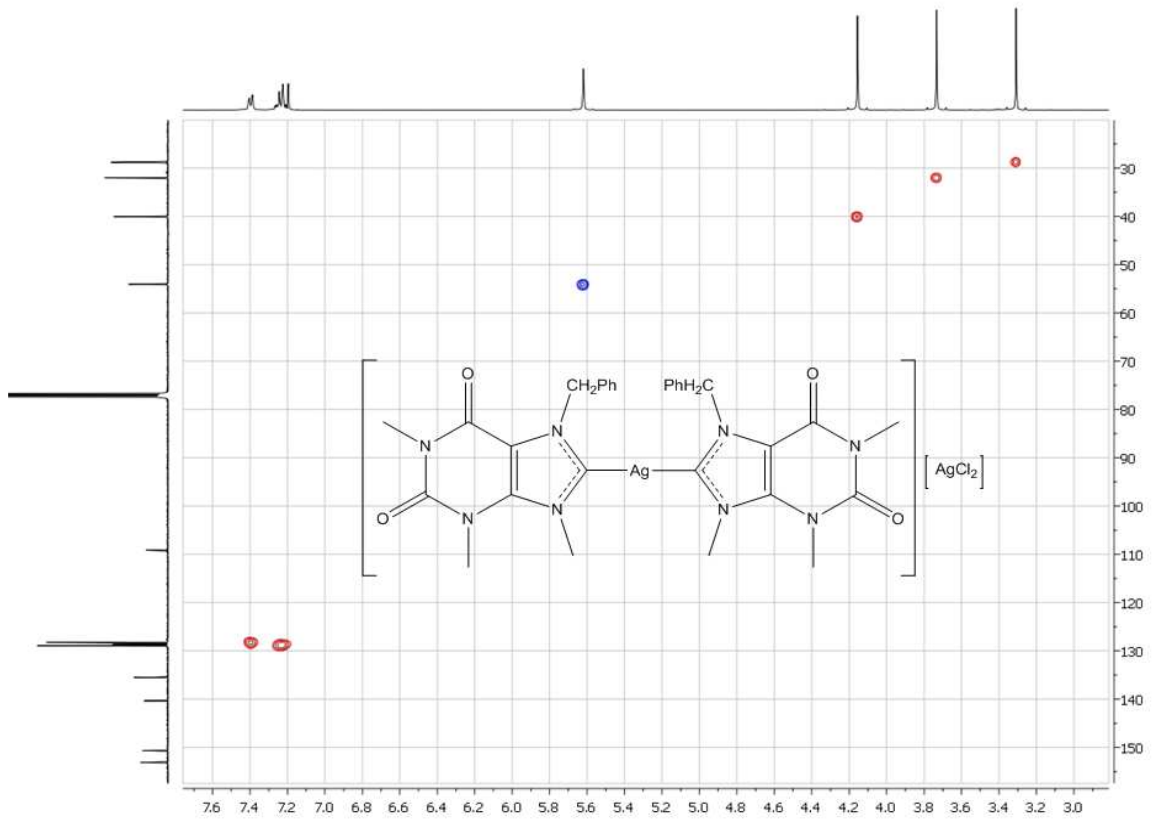


Fig. 54 Spettro HSQC del composto **4b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

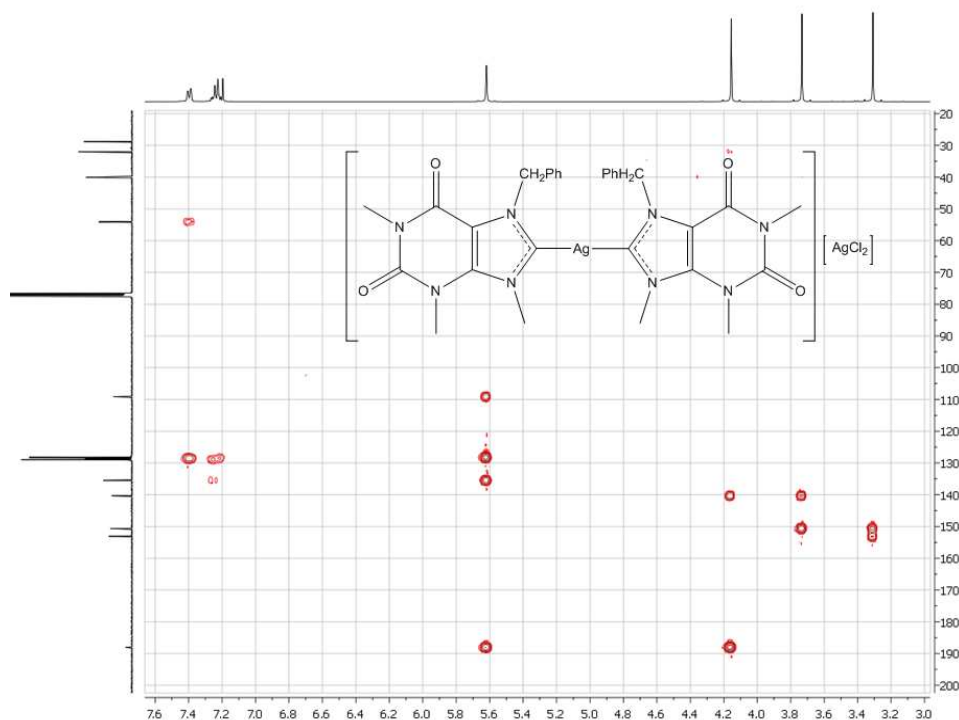


Fig. 55 Spettro HMBC del composto **4b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Sulla base della stechiometria imposta in sede di sintesi è stata inizialmente ipotizzata, per i complessi di Ag(I) preparati, la formulazione più semplice $[(\text{NHC})\text{-Ag-Cl}]$.

L'acquisizione degli spettri ESI-MS (Fig. 56), segnalando la presenza dello ione molecolare $[(\text{NHC})\text{-Ag-(NHC)}]^+$, ha portato invece ad ipotizzare una struttura più complessa del tipo $[(\text{NHC})\text{-Ag-(NHC)}][\text{AgCl}_2]$.

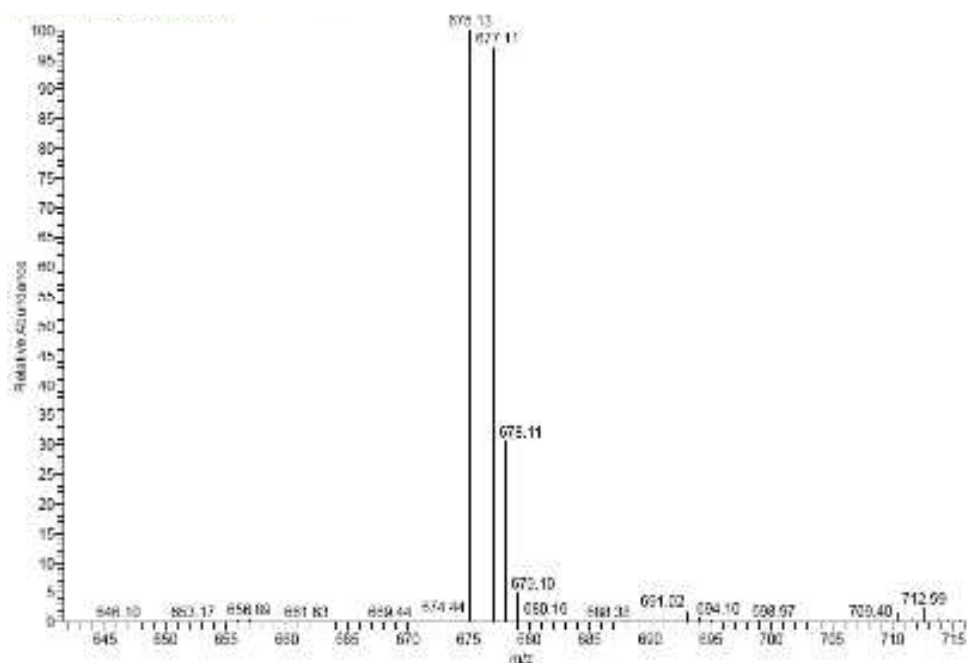


Fig. 56 Spettro ESI-MS del composto **4b**

È stata inoltre ragionevolmente esclusa la formazione della specie $[(\text{NHC})\text{-Ag}\text{-(NHC)}]\text{Cl} + \text{AgCl}$ in quanto i complessi **4a-c** sintetizzati non risultano soggetti a fotodegradazione e, nel caso specifico del composto **4b**, la specie risulta particolarmente solubile in diclorometano.

Queste assunzioni appaiono verosimili e trovano ulteriore supporto nella presenza in letteratura di esempi di complessi cationici biscarbenici di Ag(I) contenenti la specie $[\text{AgCl}_2]^-$ come controione (*Fig. 57*) [67, 48].

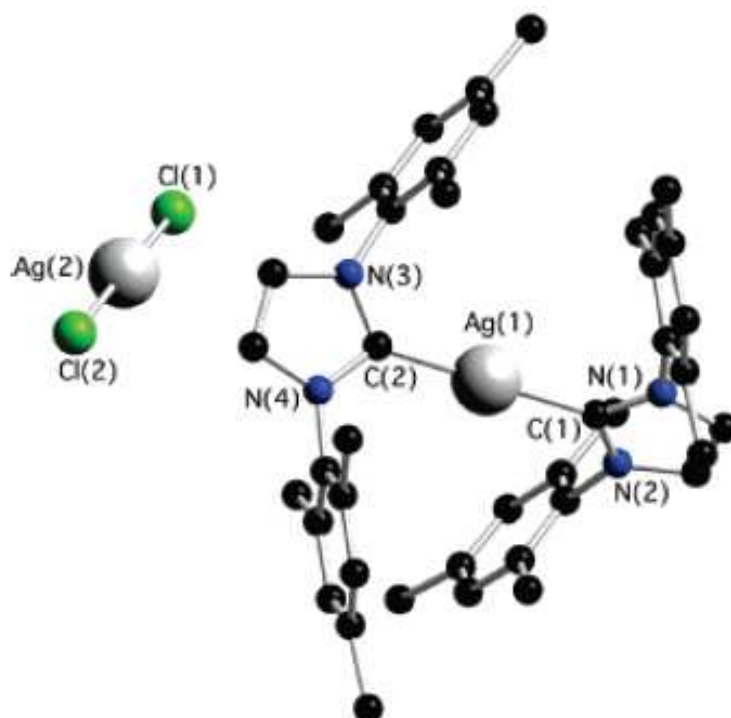
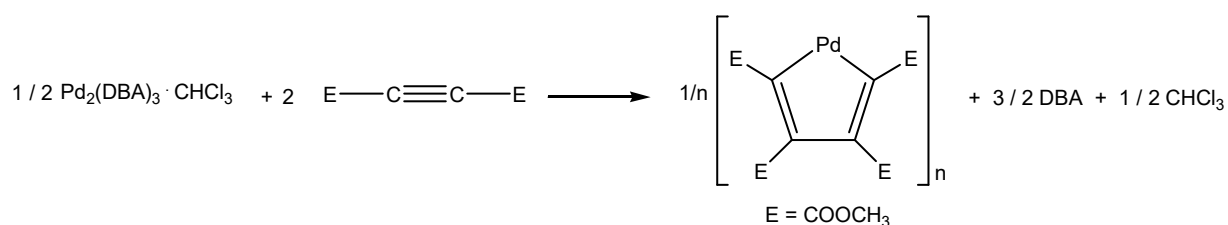


Fig. 57 Struttura del complesso $[(\text{IMes})_2\text{Ag}][\text{AgCl}_2]$ (modello ball and stick) [67]

3.1.4. SINTESI DEI COMPLESSI PALLADACICLOPENTADIENILICI

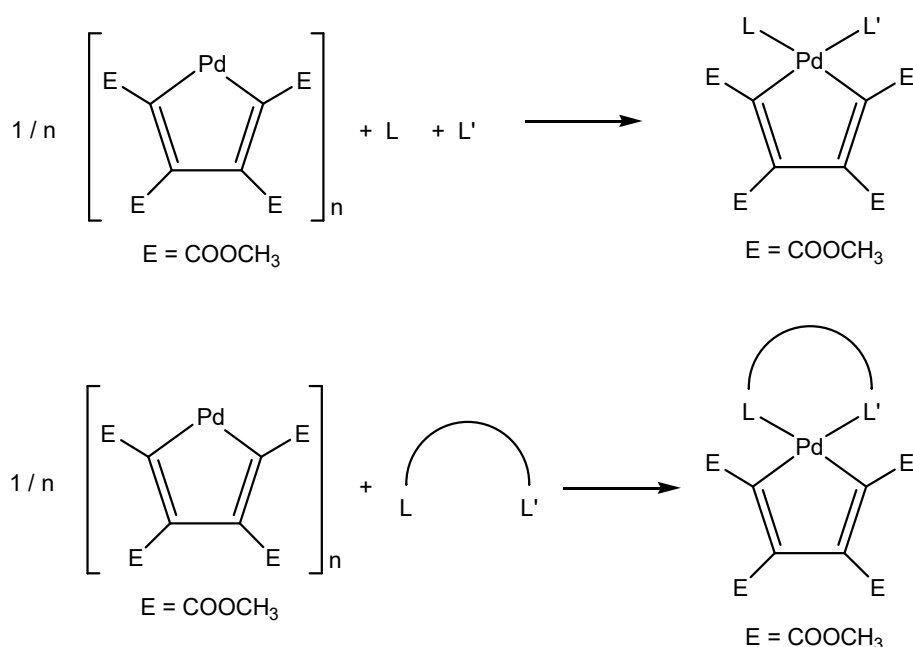
Per la sintesi dei complessi ciclopalladati, obiettivo finale del presente lavoro di tesi, è stato impiegato il precursore $[PdC_4(COOCH_3)_4]_n$, ottenuto mediante reazione di accoppiamento ossidativo tra il $Pd_2(DBA)_3 \cdot CHCl_3$ e l'alchino dimetilacetilendicarbossilato (DMA) (*Schema 14*).



Schema 14 Sintesi del precursore polimerico $[PdC_4(COOCH_3)_4]_n$

Questo polimero è un precursore ideale per la sintesi dei nostri complessi poiché la presenza dei ponti labili ad ossigeno consente un'agevole introduzione di due leganti spettatori monodentati (uguali o diversi) o di un legante bidentato.

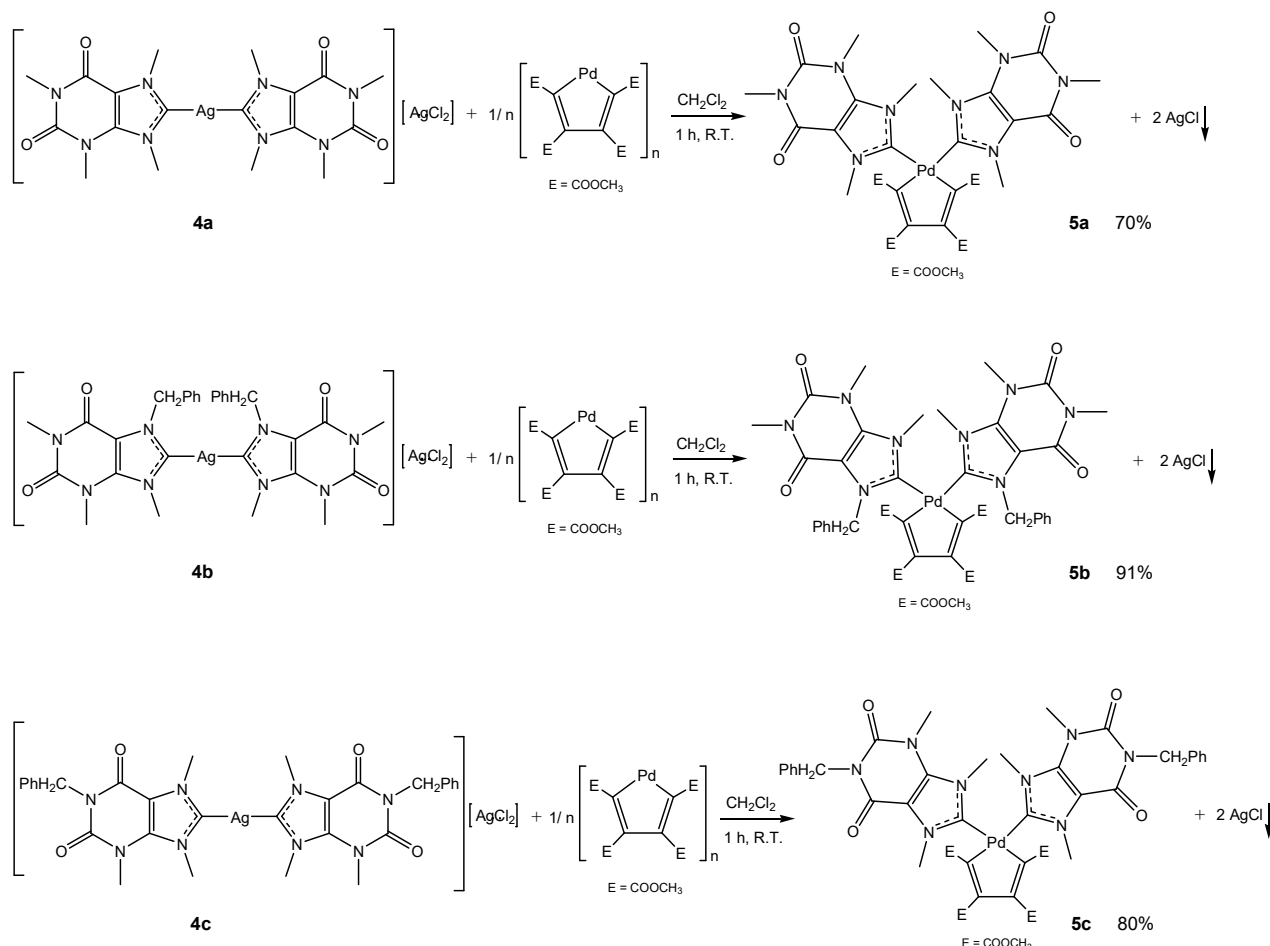
In linea generale, la strategia sintetica per ottenere questa categoria di composti può essere riassunta nello *schema 15*.



Schema 15 Strategia di sintesi dei complessi palladaciclopentadienilici

3.1.4.1. COMPLESSI BISCARBENICI A STRUTTURA PURINICA

La sintesi dei complessi palladaciclopentadienilici con due leganti carbenici a struttura purinica è stata condotta con successo secondo lo schema proposto di seguito (*Schema 16*).



Schema 16 Reazioni di sintesi dei complessi biscarbenici di Pd(II) **5a-c** a partire dai complessi biscarbenici di Ag(I) **4a-c**

Tali reazioni di transmetalazione sono altamente favorite dalla precipitazione del cloruro d'argento, che costituisce la vera e propria *driving force* del processo.

I prodotti finali sono stati isolati, dopo separazione su millipore dell'AgCl, inducendone la precipitazione con aggiunta di etere dietilico.

In precedenti studi si era potuta notare la criticità dei fattori sterici nella sintesi di questa classe di composti [63e].

In particolare si era osservato che, se il legante carbenico *N*-eterociclico presentava oltre ad un sostituente benzilico o simile, uno decisamente più ingombrato (mesitile oppure 2,6-diisopropilfenile), non era possibile, per l'eccessivo congestionamento sterico, introdurre sul frammento palladaciclopentadienilico due di questi leganti. Tale reazione dava invece buon esito

se il secondo sostituente era un gruppo metilico o un altro gruppo benzilico o affine [63e]. Considerando questi presupposti, si può spiegare l'esito positivo nel caso dei carbeni a struttura purinica da noi utilizzati, in quanto presentano due sostituenti metilici (**5a** e **5c**) o, nella peggiore delle ipotesi, un gruppo metilico e uno benzilico (**5b**).

I complessi **5a-c** sono stati caratterizzati mediante spettroscopie NMR ed IR.

Tutti gli spettri registrati evidenziano la presenza di 2 specie atropoisomeriche dovute all'asimmetria del legante carbenico ed alla rotazione impedita attorno al legame Pd-C (*Fig. 58*).

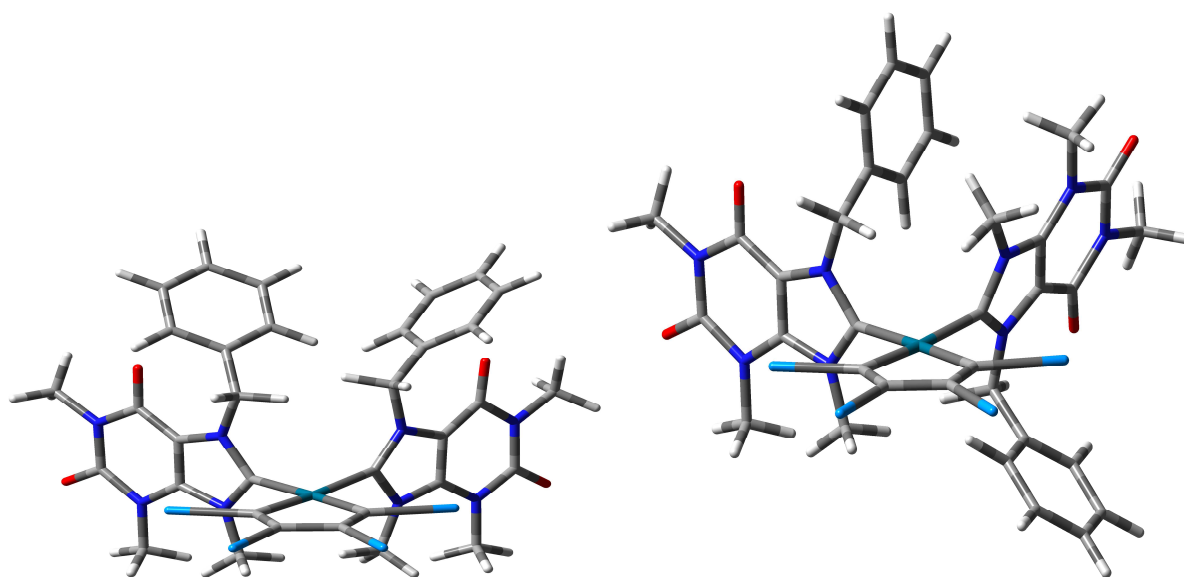


Fig. 58 Rappresentazione dei due atropoisomeri relativi al complesso 5b ottenuta mediante calcoli DFT (in forma semplificata con E = CN invece di COOCH₃)

Tali specie, nel caso del composto **5b** mostrato in *fig. 58*, possono avere i due sostituenti benzilici dalla stessa parte o da parti opposte rispetto al piano principale di coordinazione individuato dal frammento palladaciclico.

La presenza di due atropoisomeri si traduce in uno sdoppiamento di tutti segnali negli spettri NMR.

Negli spettri ¹H-NMR (*Fig. 59 e 60*) si può notare per ciascun atropoisomero:

- La presenza dei segnali relativi ai gruppi NCH₃ della base purinica risonanti a *chemical shifts* diversi rispetto al complesso di argento di partenza
- La presenza di due segnali attribuibili alle due distinte coppie di gruppi OCH₃
- La presenza nel caso dei composti **5b** e **5c** (*Fig. 60*), a circa 5-6 ppm, di un sistema AB relativo ai protoni metilenici dei gruppi benzilici (magneticamente non equivalenti a causa della rotazione impedita del carbene attorno al legame Pd-C).

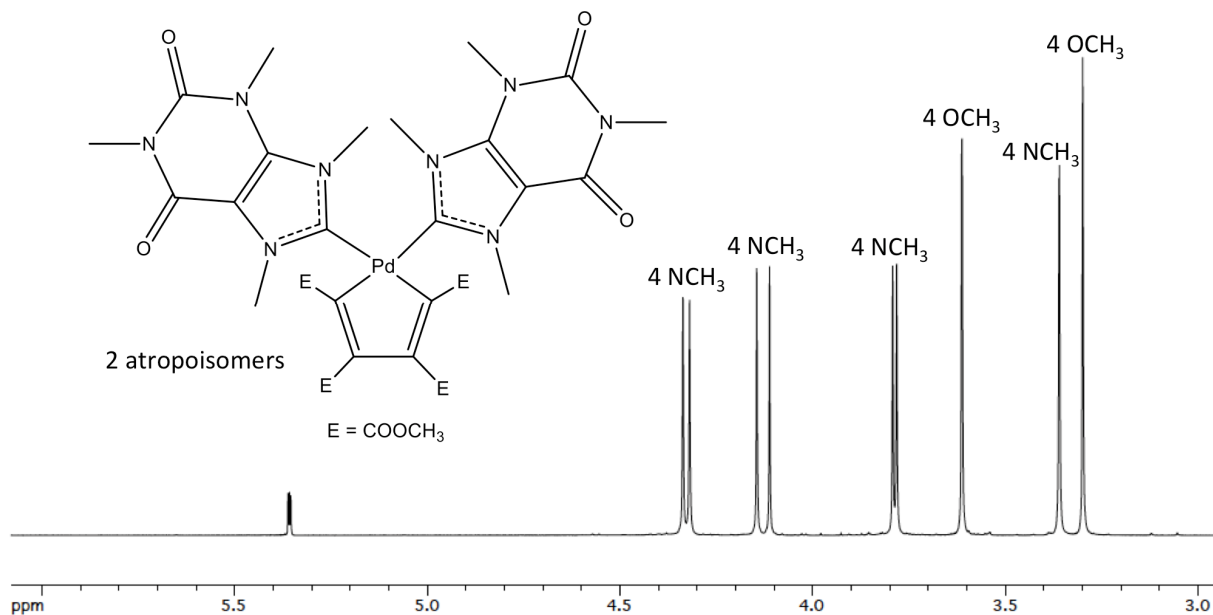


Fig. 59 Spettro ¹H-NMR del composto **5a** (T = 298K, CDCl₃)

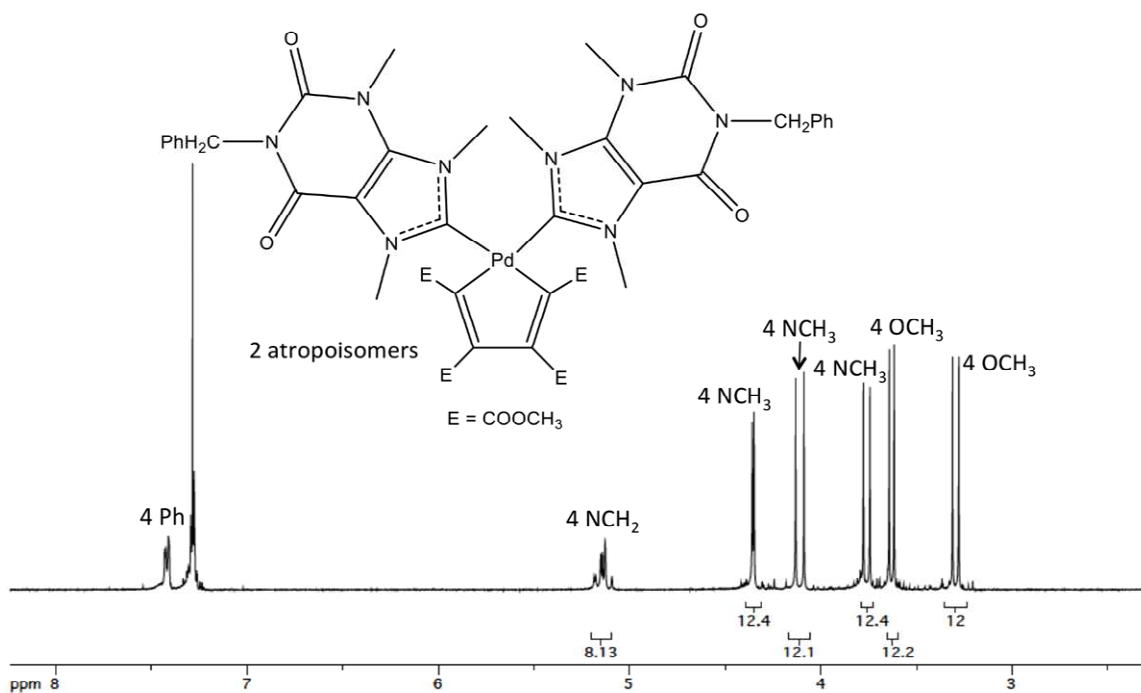


Fig. 60 Spettro ¹H-NMR del composto **5c** (T = 298K, CDCl₃)

Negli spettri ¹³C{¹H}-NMR (Fig. 61) sono individuabili, per ciascun atropisomero, i segnali delle due differenti coppie dei gruppi COOCH₃ e C(COOCH₃), nonché il segnale del carbonio carbenico coordinato a circa 188 ppm.

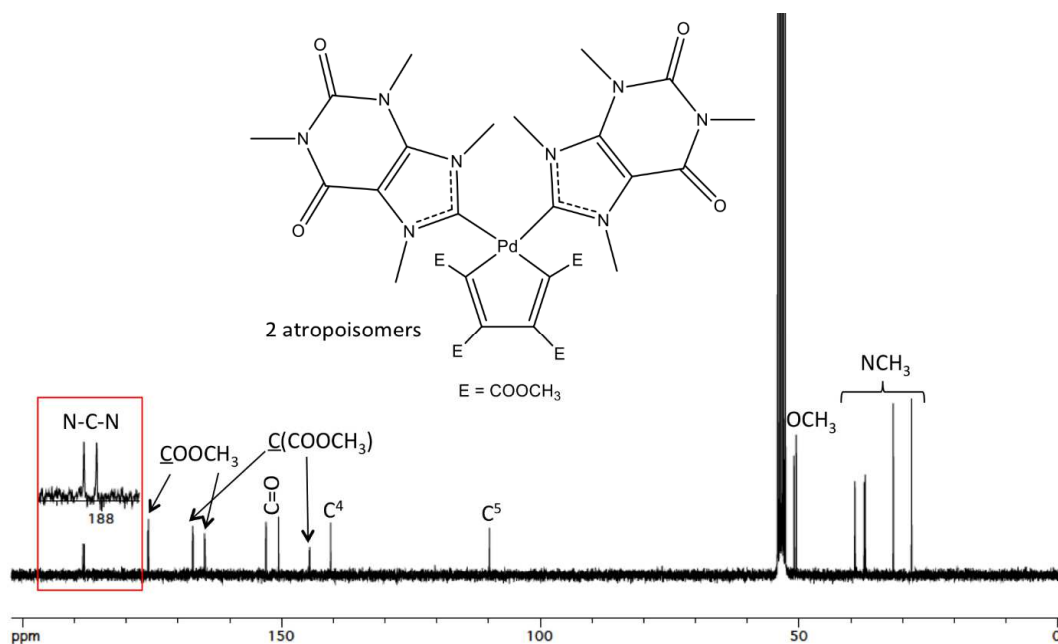


Fig. 61 Spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR del composto **5a** ($T = 298\text{K}$, CD_2Cl_2)

Tutti gli altri segnali, appartenenti sia al frammento palladaciclico che al legante carbenico, sono stati assegnati mediante registrazione ed interpretazione di spettri bidimensionali HSQC e HMBC (Fig. 62 e 63).

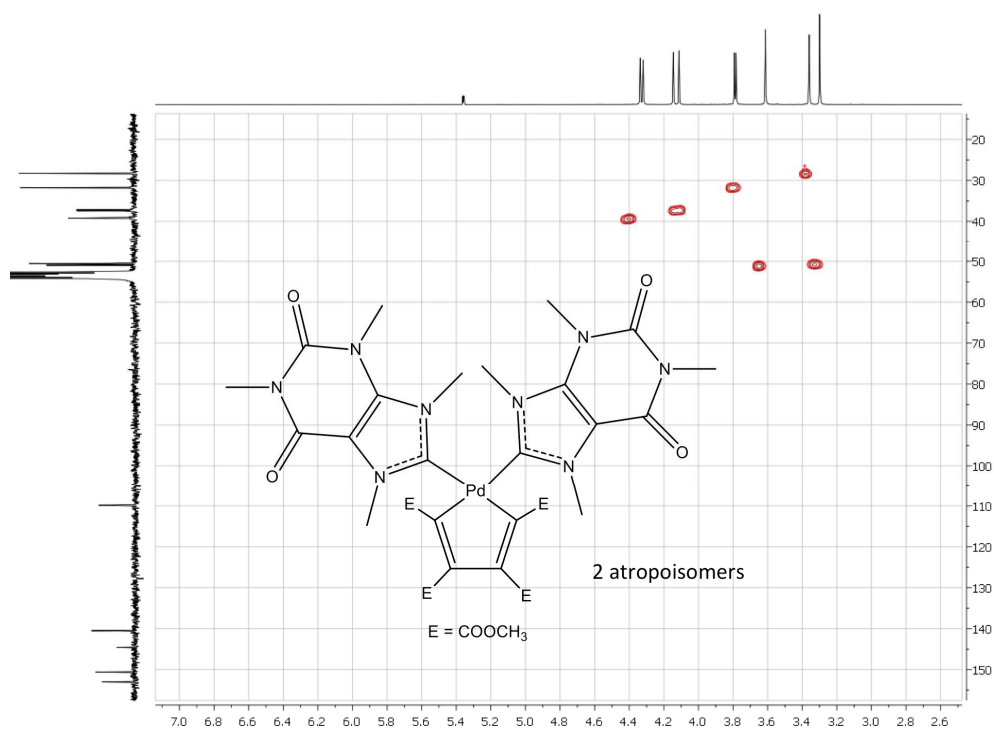


Fig. 62 Spettro HSQC del composto **5a** ($T = 298\text{K}$, CD_2Cl_2)

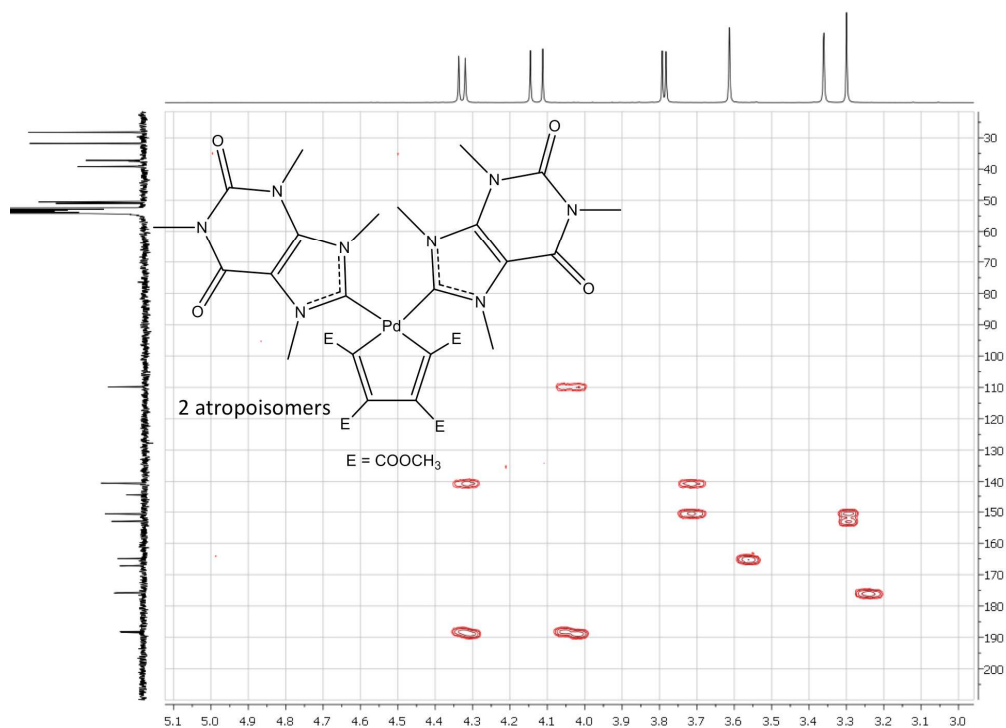


Fig. 63 Spettro HMBC del composto **5a** ($T = 298K$, CD_2Cl_2)

Lo spettro IR (Fig. 64) segnala infine la presenza dei vari gruppi carbonilici presenti nel complesso con delle bande intense tra 1710 e 1660 cm^{-1} .

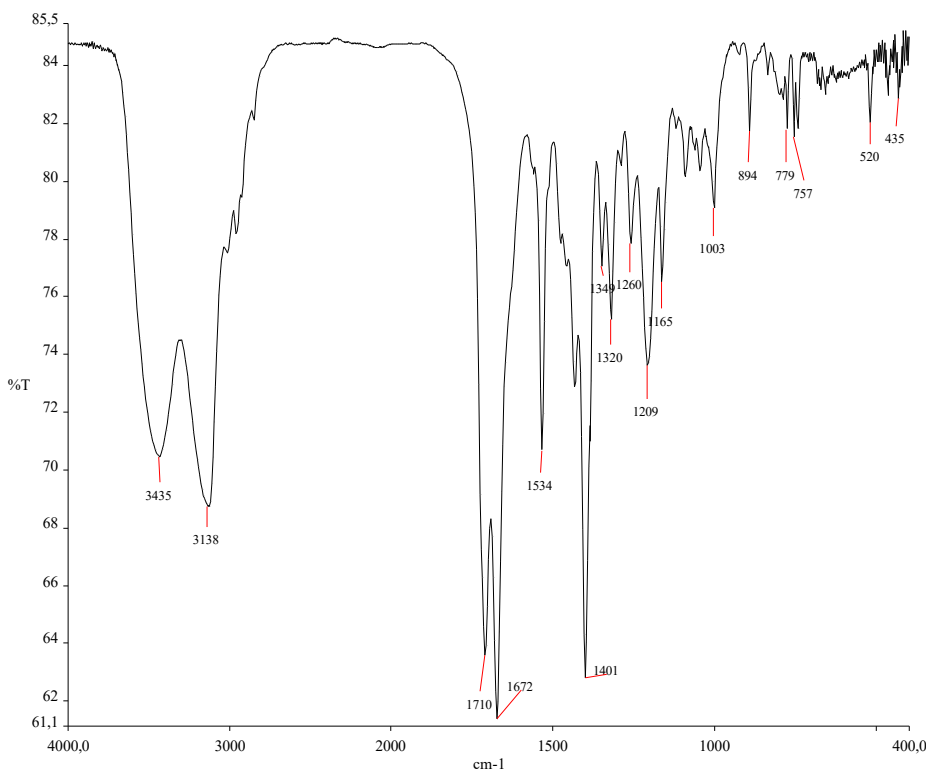
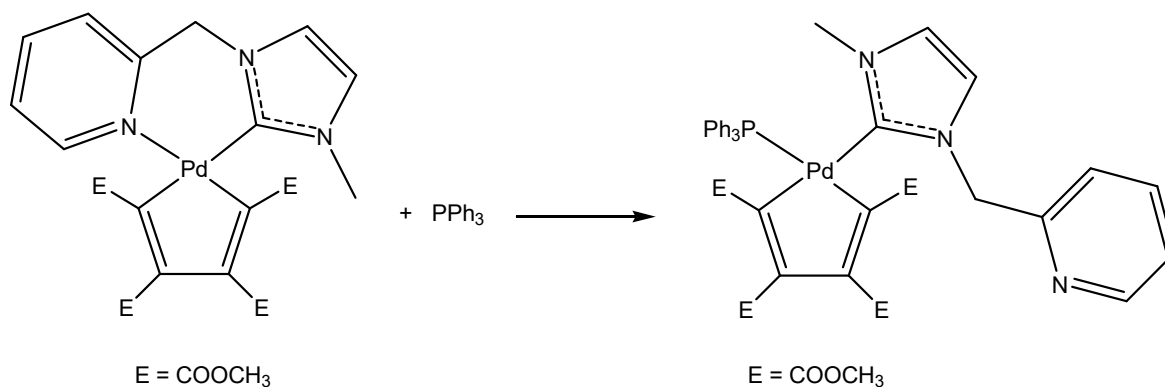


Fig. 64 Spettro IR in KBr del composto **5a**

3.1.4.2. COMPLESSI MISTI NHC / PPh₃

Questi composti sono stati sintetizzati per la prima volta con NHCs a struttura imidazolica, partendo da complessi chelati ed utilizzando il legante fosfinico, forte coordinante per il palladio, per aprire il dente più labile del legante bidentato (*Schema 17*).



Schema 17 Sintesi di complessi misti NHC / PPh₃ a partire da complessi chelati

Il gruppo di ricerca, presso il quale è stato svolto parte del periodo di tirocinio, ha presentato successivamente un approccio più generale che non richiedeva la preparazione preliminare di un complesso chelato e che consentiva pertanto l'utilizzo anche di carbeni *N*-eterociclici monodentati [63e]. La questione va posta in questi termini: l'aggiunta di un equivalente di trifenilfosfina e di un equivalente di legante carbenico al precursore polimerico [PdC₄(COOCH₃)₄]_n non garantisce, in linea di principio, l'esclusiva formazione del composto misto; infatti, si potrebbero contestualmente produrre anche i complessi "omoleptici" contenenti due leganti fosfinici o due leganti carbenici.

Calcoli teorici DFT hanno tuttavia dimostrato che la formazione esclusiva del derivato misto è favorevole dal punto di vista termodinamico (*Fig. 65*).

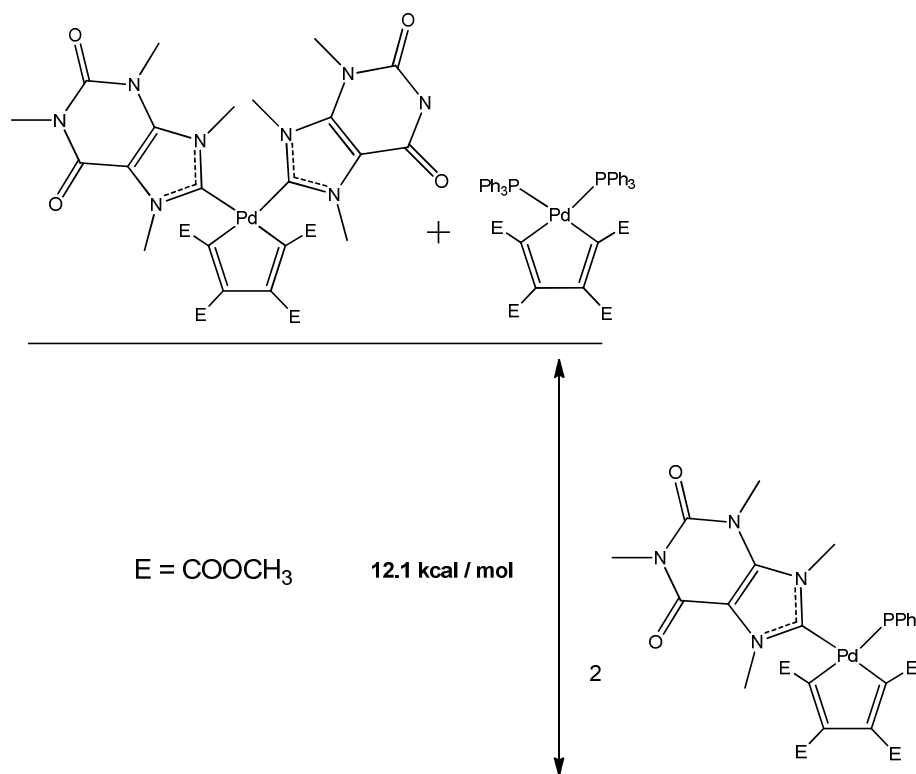


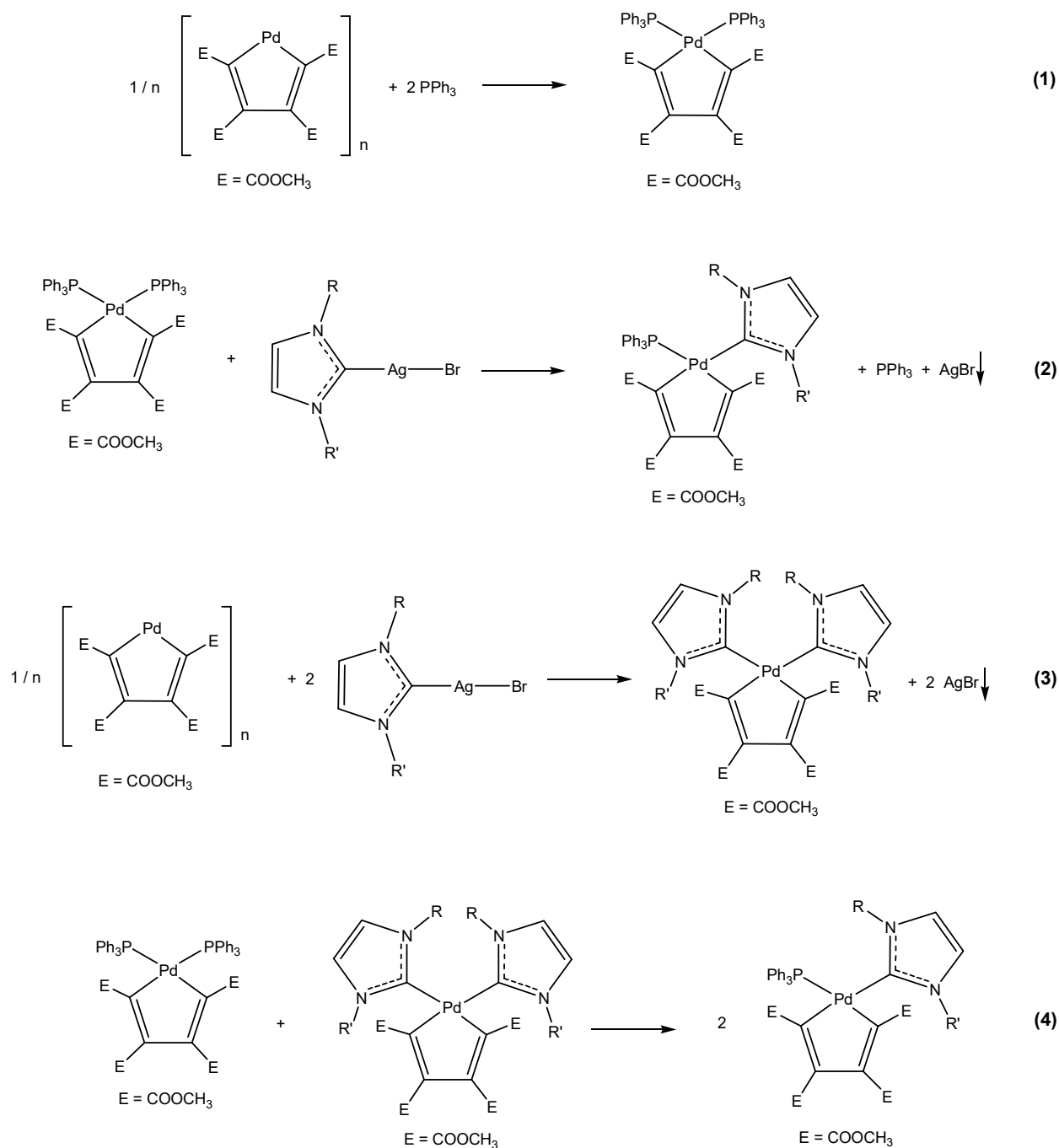
Fig. 65 Stabilità termodinamica del complesso misto NHC / PPh₃ rispetto ai complessi omoleptici

La possibilità che la reazione sia però sotto controllo cinetico richiede che le condizioni operative adeguate all'ottenimento selettivo delle specie miste vengano comunque ricercate sperimentalmente.

Una serie di prove preliminari ha consentito di ottenere quindi le seguenti indicazioni:

1. la selettività nell'ottenimento dei derivati misti si consegue aggiungendo alla soluzione del precursore $[\text{PdC}_4(\text{COOCH}_3)_4]_n$ una soluzione che contenga sia la trifenilfosfina che il complesso carbenico di argento. Una valida alternativa è rappresentata dall'aggiunta prima della trifenilfosfina e poi del complesso carbenico di argento
2. l'aggiunta sequenziale prima del complesso carbenico di argento e poi della trifenilfosfina porta invece alla formazione di una miscela dei due complessi omoleptici che solo molto lentamente e parzialmente (sopravvengono, infatti, anche processi decompositivi non facilmente controllabili) si trasformano nel prodotto misto.

L'effetto dell'ordine delle aggiunte sulla composizione della miscela finale è stato interpretato e descritto secondo lo schema di reazioni riportato di seguito (*Schema 18*).



Schema 18 Possibili processi competitivi coinvolgenti il precursore polimerico, il legante fosfinico e quello carbenico presenti nell'ambiente di reazione

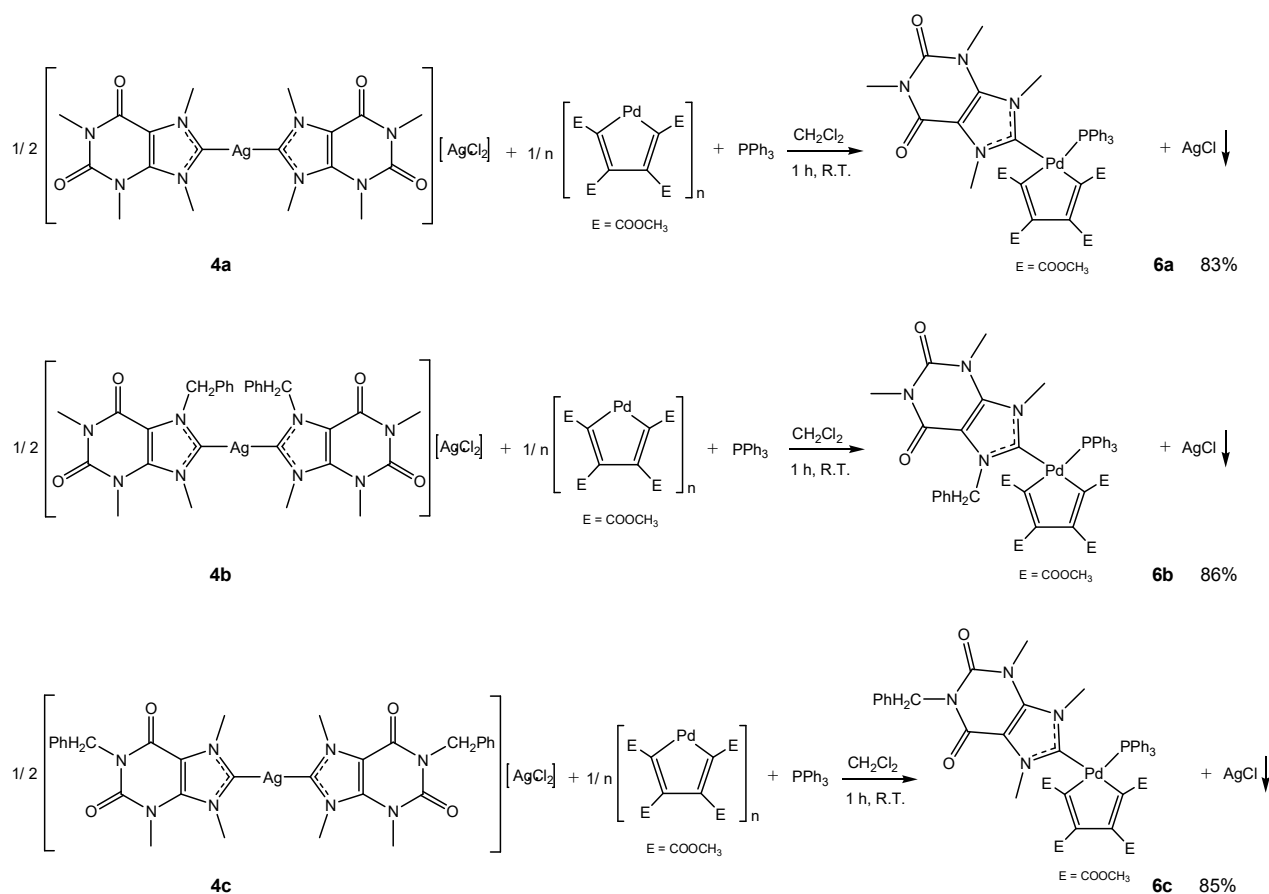
Per spiegare i risultati ottenuti, è necessario che i processi (1) e (2) risultino molto più veloci di quelli (3) e (4).

L'aggiunta preliminare della trifenilfosfina come tale o in una miscela con il complesso carbenico di argento, porta alla formazione del prodotto desiderato secondo le reazioni (1) e (2), senza che si attivi contemporaneamente il processo (3) significativamente più lento.

Se si aggiunge al precursore palladaciclico prima il complesso carbenico di argento si ottiene la specie biscalcarica (reaz. (3)); la successiva aggiunta di un equivalente di fosfina porta alla

formazione del complesso bisfosfinico per reazione con la quantità residua di palladaciclo (reaz.(1)). La conversione di questi due composti nel derivato misto è avversata dall'estrema lentezza della reazione (4).

A partire da queste premesse, sono stati sintetizzati con buone rese i complessi palladaciclopentadienilici contenenti un legante carbenico a struttura purinica e una trifenilfosfina (composti **6a-c**). La sintesi di tali composti è stata effettuata utilizzando come solvente il diclorometano e aggiungendo, alla soluzione contenente il precursore $[\text{PdC}_4(\text{COOCH}_3)_4]_n$, una miscela del complesso carbenico di argento e della trifenilfosfina. Il processo è relativamente veloce e richiede circa un'ora per ultimarsi (*Schema 19*).



Schema 19 Reazioni di sintesi dei complessi misti NHC / PPh₃ 6a-c a partire dai complessi biscarbenici di Ag(I) 4a-c

I complessi **6a-c** sono stati caratterizzati mediante spettroscopie NMR ed IR.

La formazione di una sola specie è attestata dalla presenza di un unico picco a circa 25-26 ppm negli spettri $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (*Fig. 66*). Inoltre, da tale spettro si può ragionevolmente affermare che la fosfina è coordinata al palladio dal momento che tali valori di *chemical shift* sono decisamente più alti di quelli della trifenilfosfina libera ($\Delta\delta \approx 30$ ppm).

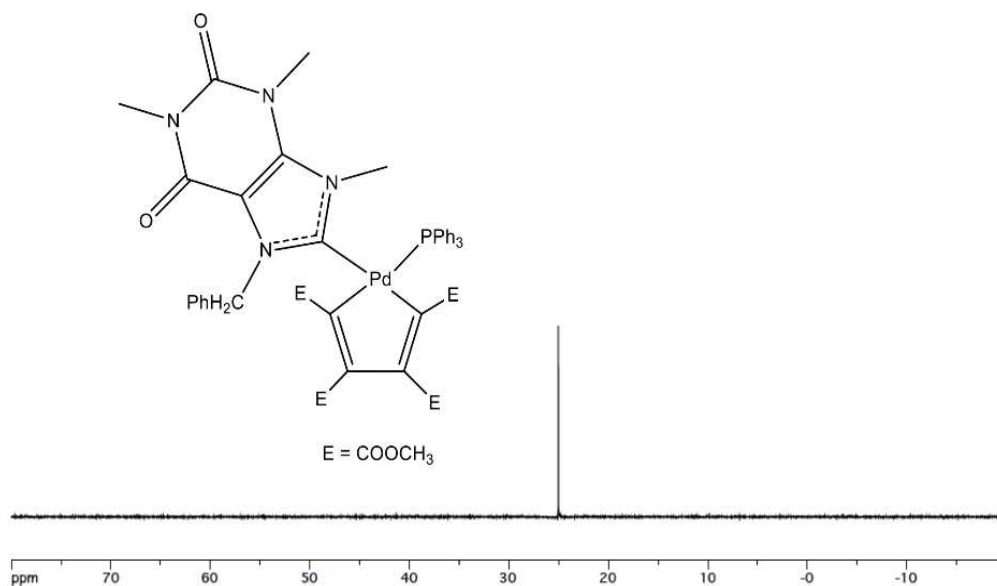


Fig. 66 Spettro $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR del composto **6b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

La natura del prodotto ottenuto è definitivamente chiarita dall'analisi degli spettri ^1H -NMR e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR; in essi osservano infatti i segnali corrispondenti a quattro diversi gruppi esterei COOCH_3 , evidenza che presuppone la presenza di due differenti leganti spettatori.

Riguardo al legante carbenico, oltre ai segnali dei gruppi NCH_3 , va rilevata per i composti **6b** e **6c**, la presenza dei due protoni metilenici NCH_2 che risuonano come due doppietti distinti (sistema AB), essendo magneticamente non equivalenti in ragione dell'impedita rotazione del legante carbenico attorno al legame Pd-C (Fig. 67).

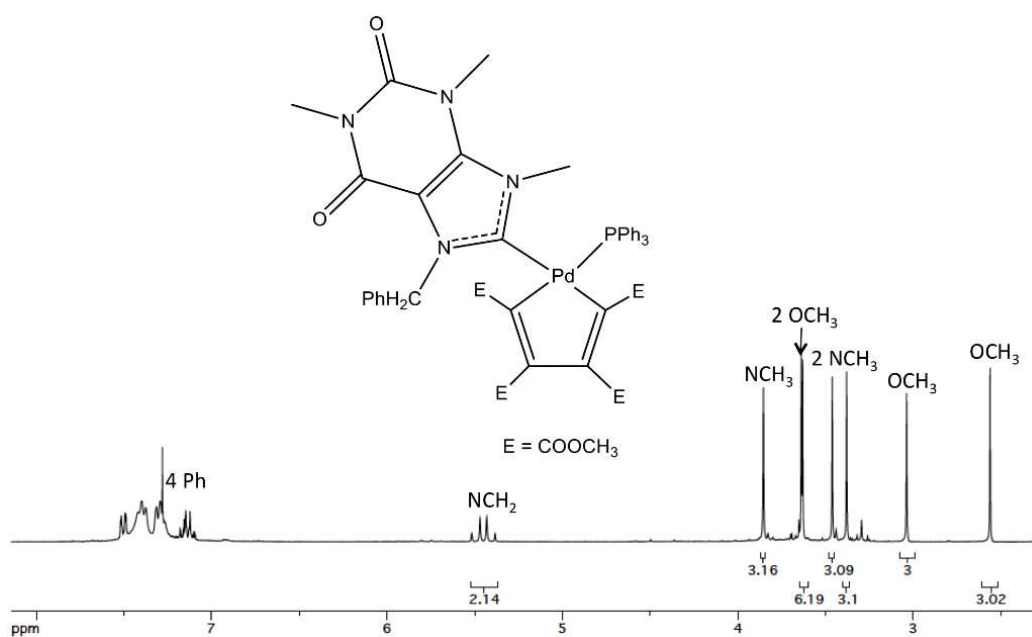


Fig. 67 Spettro ^1H -NMR del composto **6b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Negli spettri $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (Fig. 68) il segnale più importante, per tutti i composti sintetizzati, è localizzato a circa 190 ppm ed è attribuibile al carbonio carbenico; esso si presenta come un doppietto ($J_{\text{CP}} \approx 16$ Hz) in virtù dell'accoppiamento con il fosforo della trifenilfosfina.

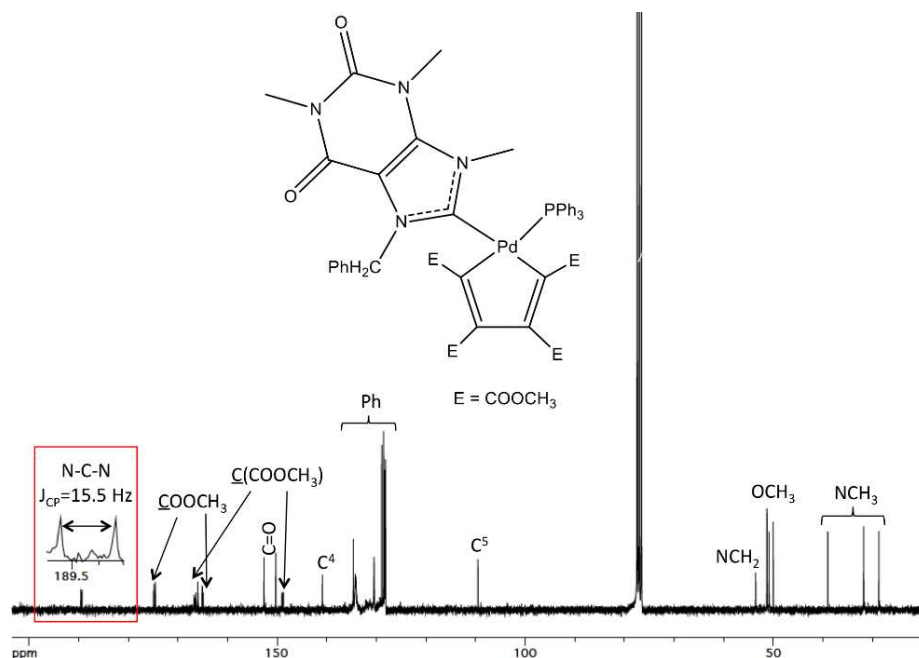


Fig. 68 Spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR del composto **6b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Al solito, l'assegnazione dettagliata dei segnali riconducibili sia ai leganti spettatori che al frammento palladaciclopentadienilico è stata effettuata con l'ausilio delle tecniche bidimensionali HSQC e HMBC (Figs. 69 e 70).

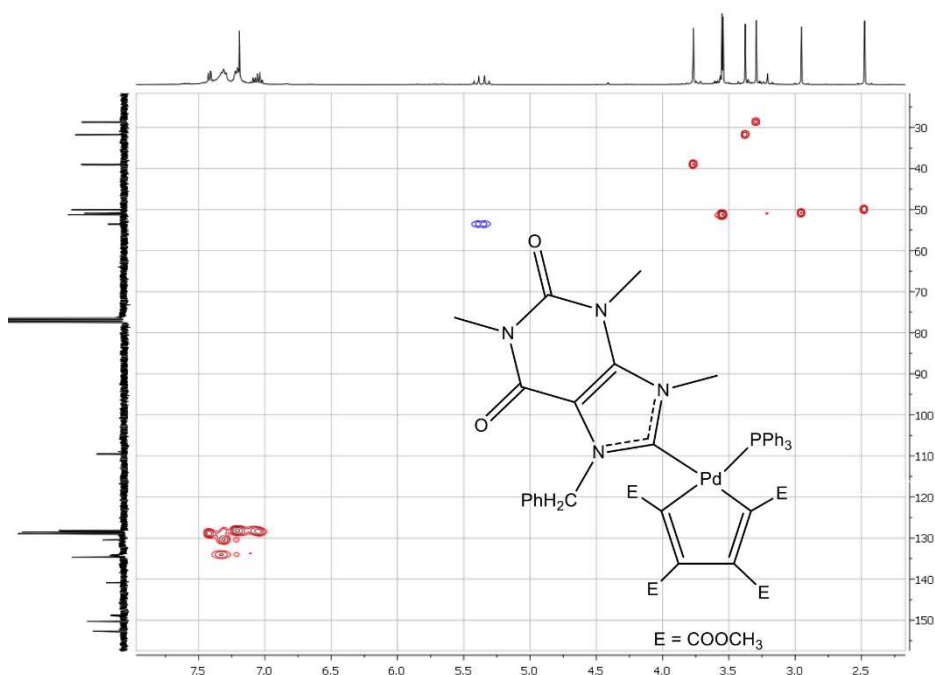


Fig. 69 Spettro HSQC del composto **6b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

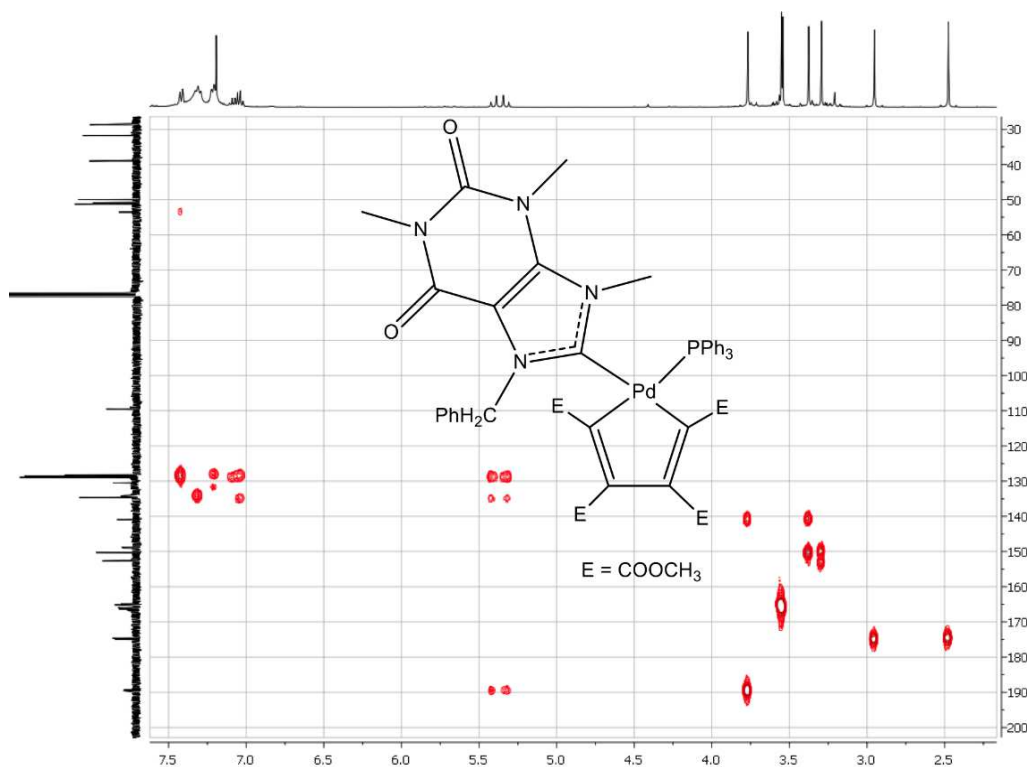


Fig. 70 Spettro HMBC del composto **6b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Le bande intense localizzate tra 1730 e 1670 cm^{-1} negli spettri IR (Fig. 71) testimoniano infine la presenza dei gruppi carbonilici, sia della struttura purinica che del frammento palladaciclopentadienilico.

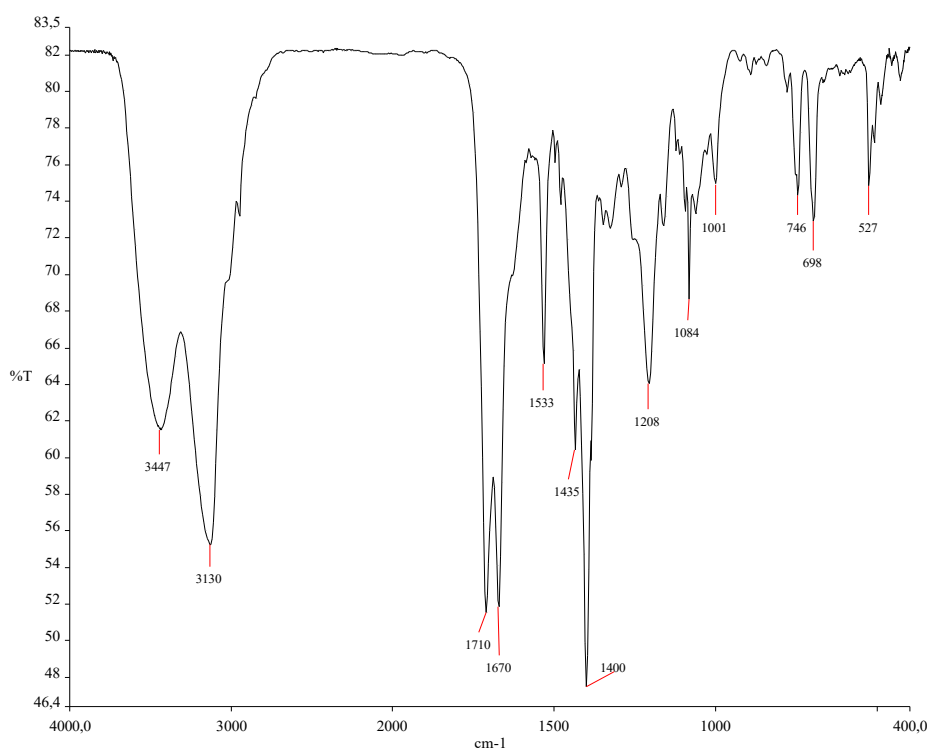


Fig. 71 Spettro IR in KBr del composto **6b**

Ad ulteriore e definitiva conferma delle conclusioni tratte dall'analisi degli spettri IR ed NMR, siamo in grado di mostrare, per il complesso **6b**, la struttura ottenuta per diffrazione ai raggi X (Fig. 72).

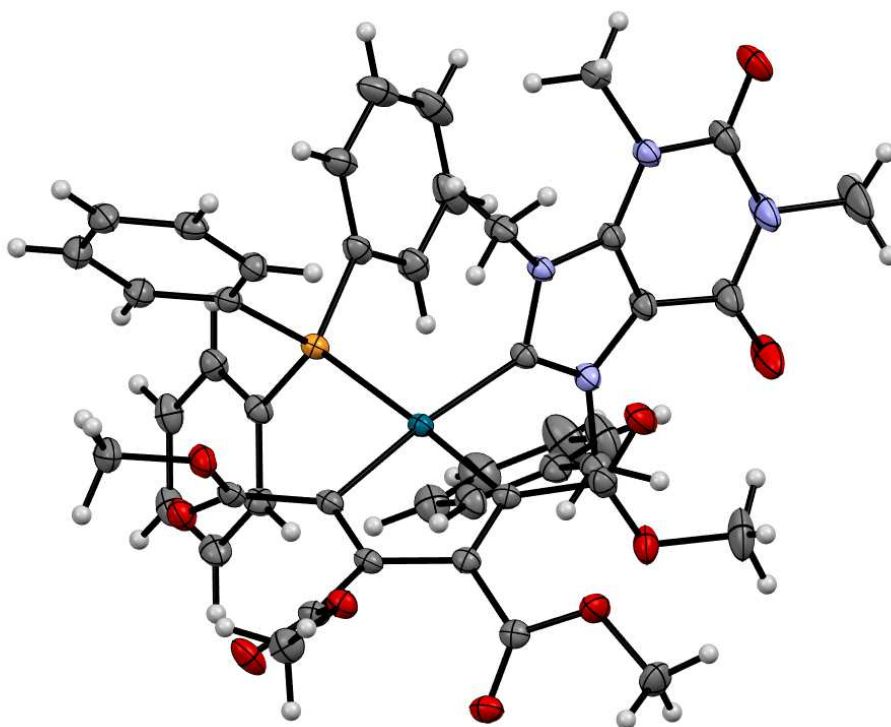
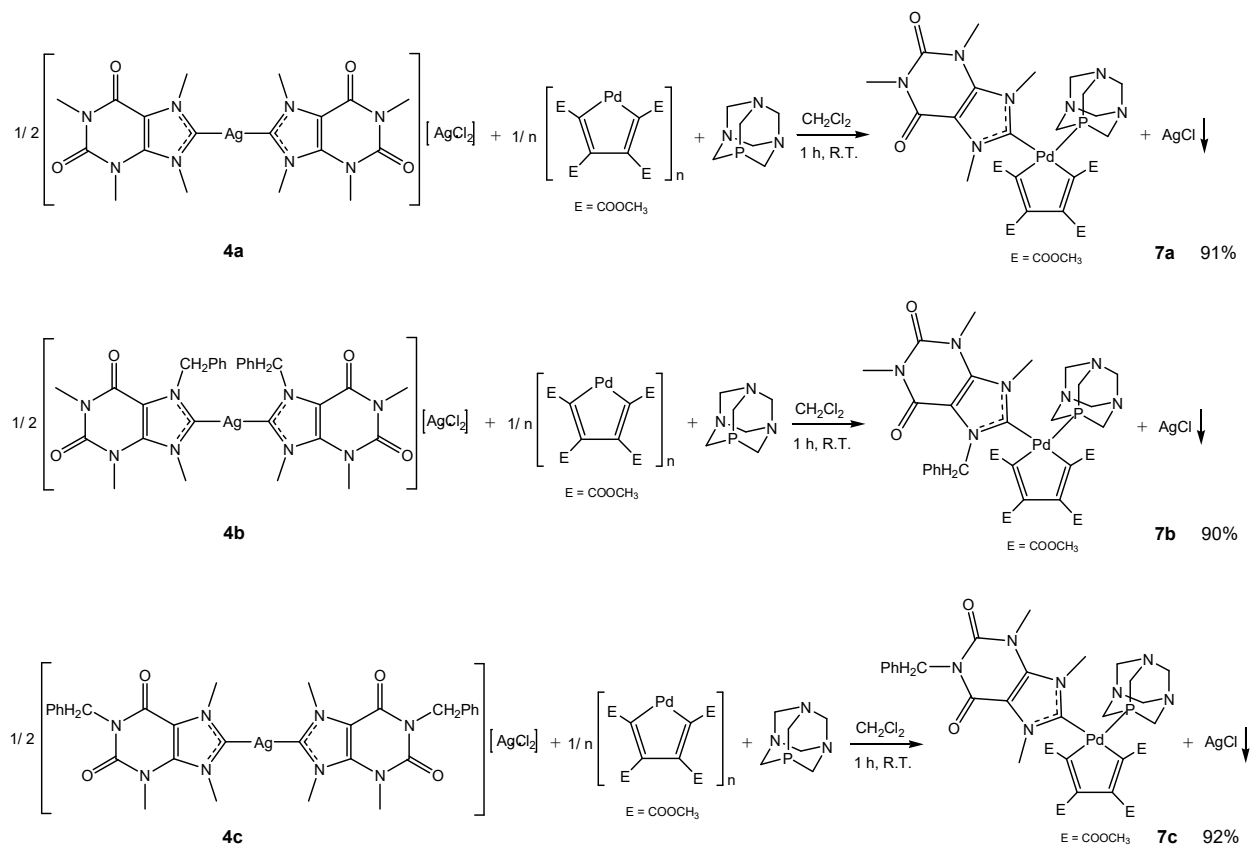


Fig. 72 Struttura del complesso **6b** ottenuta per diffrazione ai raggi X

3.1.4.3. COMPLESSI MISTI NHC / PTA

La sintesi dei complessi palladaciclopentadienilici misti NHC / PTA è stata condotta in maniera del tutto analoga a quella dei composti contenenti la trifenilfosfina, in accordo con lo schema di seguito proposto (*Schema 20*).



Schema 20 Reazioni di sintesi dei complessi misti NHC / PTA **7a-c** a partire dai complessi biscarbenici di Ag(I) **4a-c**

L'ottenimento esclusivo dei derivati misti è inequivocabilmente confermato dagli spettri ¹H-NMR (*Figs. 73 e 74*), nei quali si rinvencono i segnali relativi ai gruppi NCH₃ (singoletti) e NCH₂ (solo per i composti **7b** e **7c** in forma di sistemi AB tra 5 e 6.5 ppm) del legante carbenico, i 4 diversi gruppi esterei del ciclometallato e i protoni metilenici del PTA coordinato (NCH₂N come sistema AB, più o meno risolto, a 4.3-4.5 ppm e i protoni NCH₂P come doppietto con J_{HP} ≈ 2 Hz, tra 3.5 e 4 ppm).

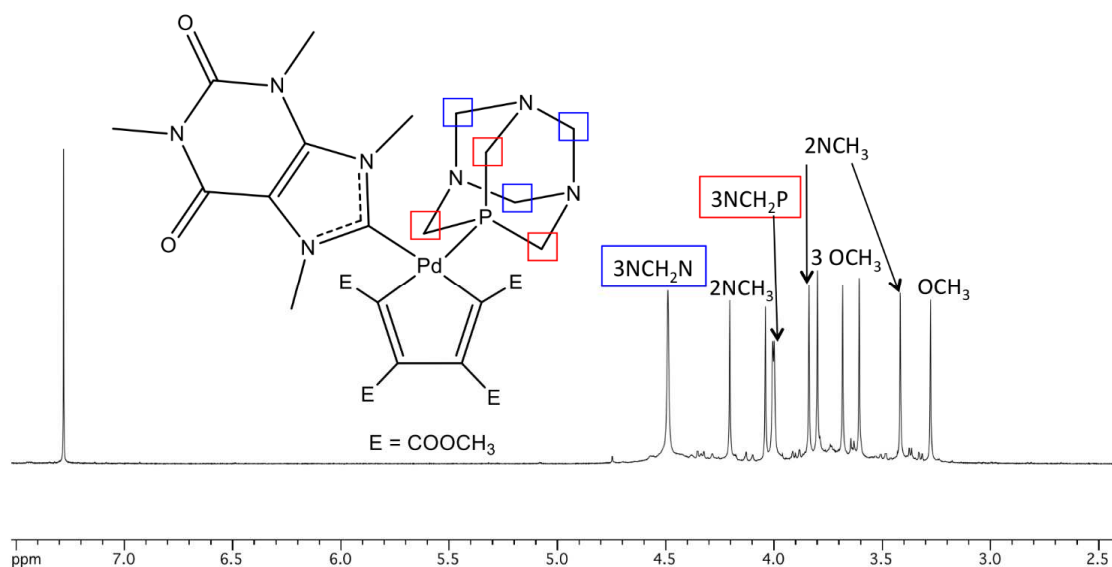


Fig. 73 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del composto **7a**

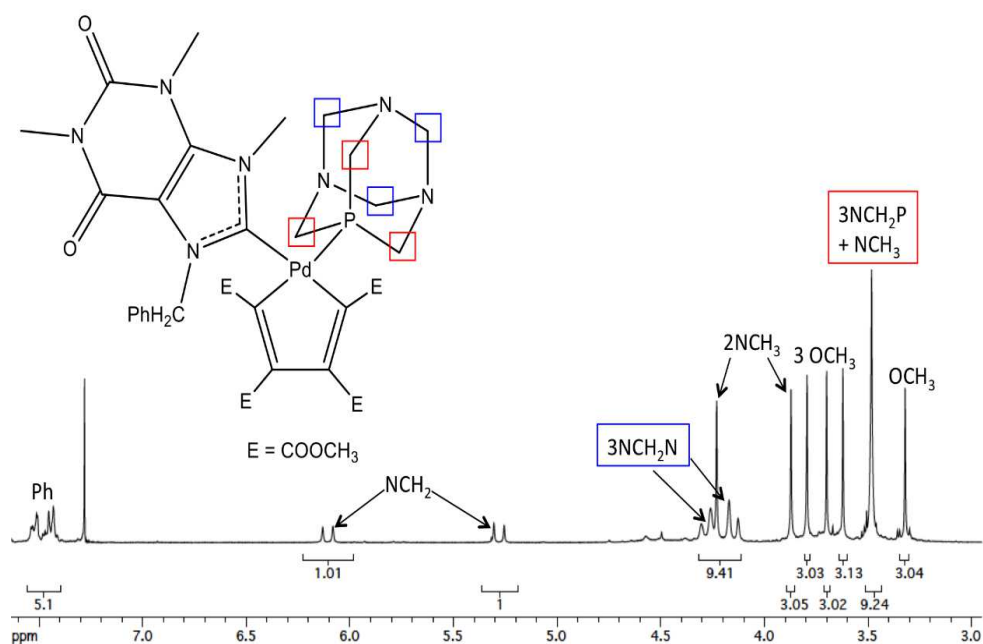


Fig. 74 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del composto **7b** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Coerentemente, negli spettri $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (Fig. 75) si può osservare a 180-190 ppm il segnale del carbonio carbenico che risuona come doppietto ($J_{\text{CP}} \approx 17\text{-}18\text{ Hz}$) per l'accoppiamento con il fosforo del PTA. Per quanto riguarda i segnali del PTA coordinato, vanno annoverati i picchi dei carboni metilenici NCH_2P e NCH_2N rispettivamente a circa 50 ppm (doppietto con $J_{\text{CP}} \approx 10\text{ Hz}$) e 73 ppm (doppietto con $J_{\text{CP}} \approx 6\text{ Hz}$). Questi segnali, insieme a tutti gli altri relativi ai leganti spettatori e al frammento ciclometalato, sono stati correttamente attribuiti grazie alla registrazione e all'interpretazione di spettri bidimensionali HSQC e HMBC (Figs. 76 e 77).

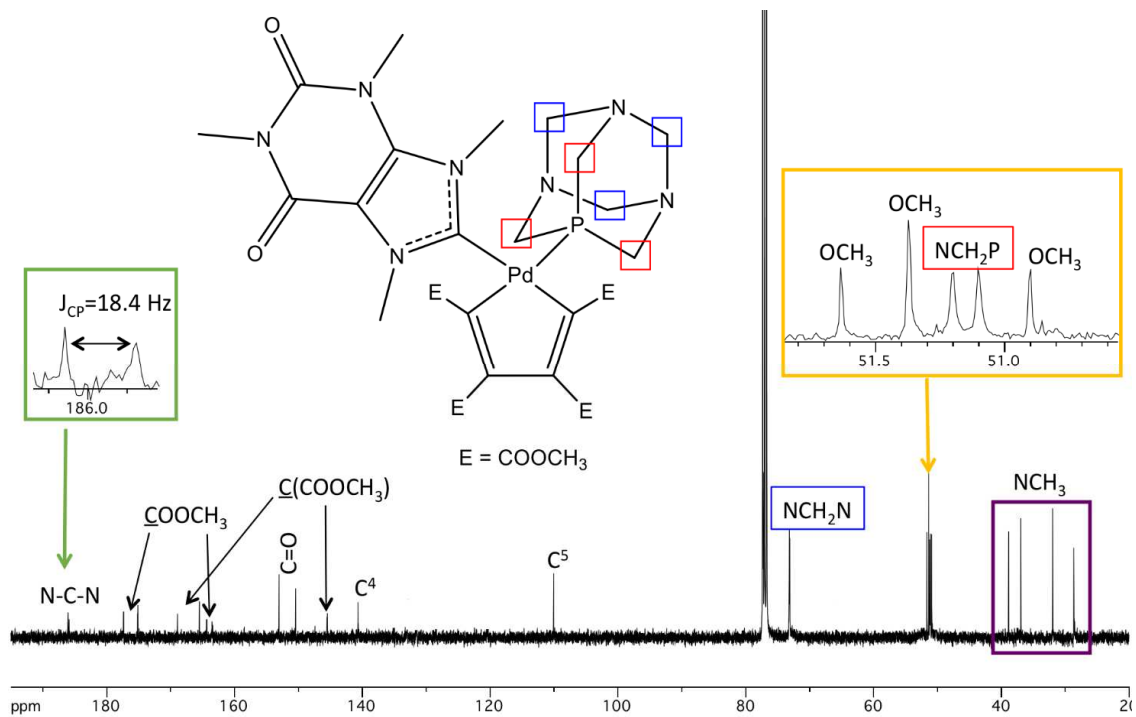


Fig. 75 Spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR del composto **7a** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

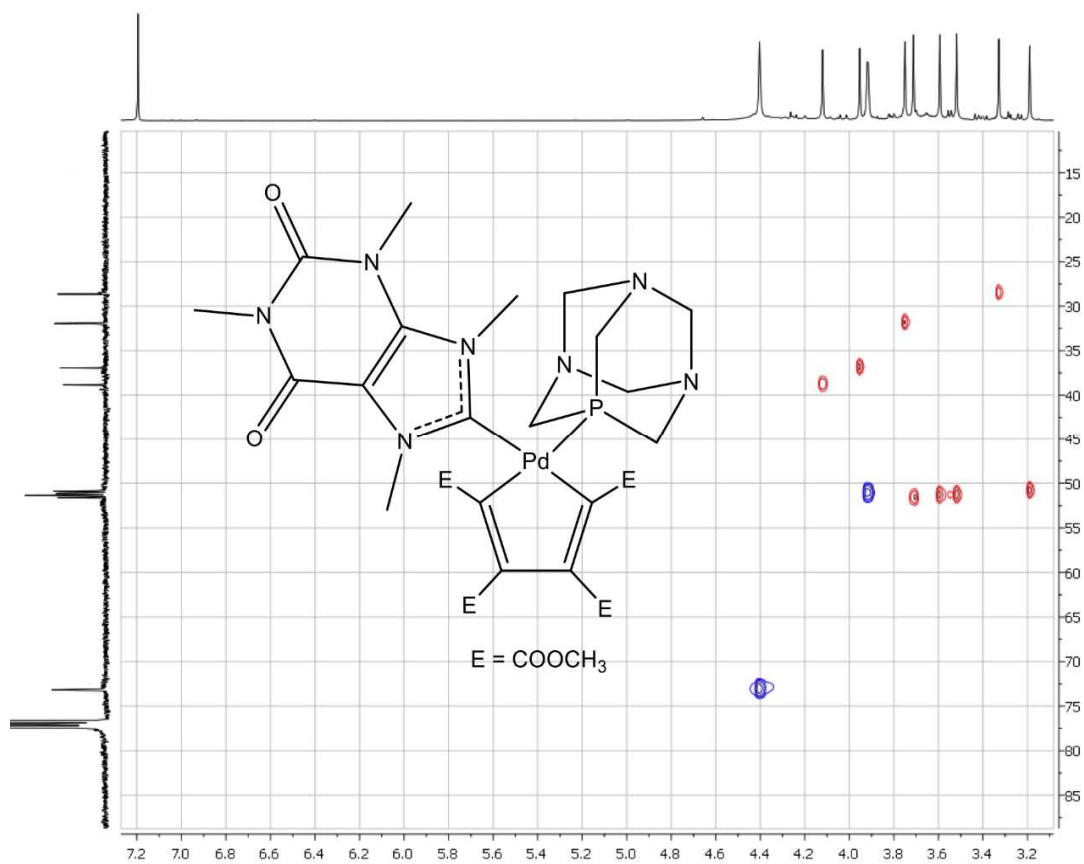


Fig. 76 Spettro HSQC del composto **7a** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

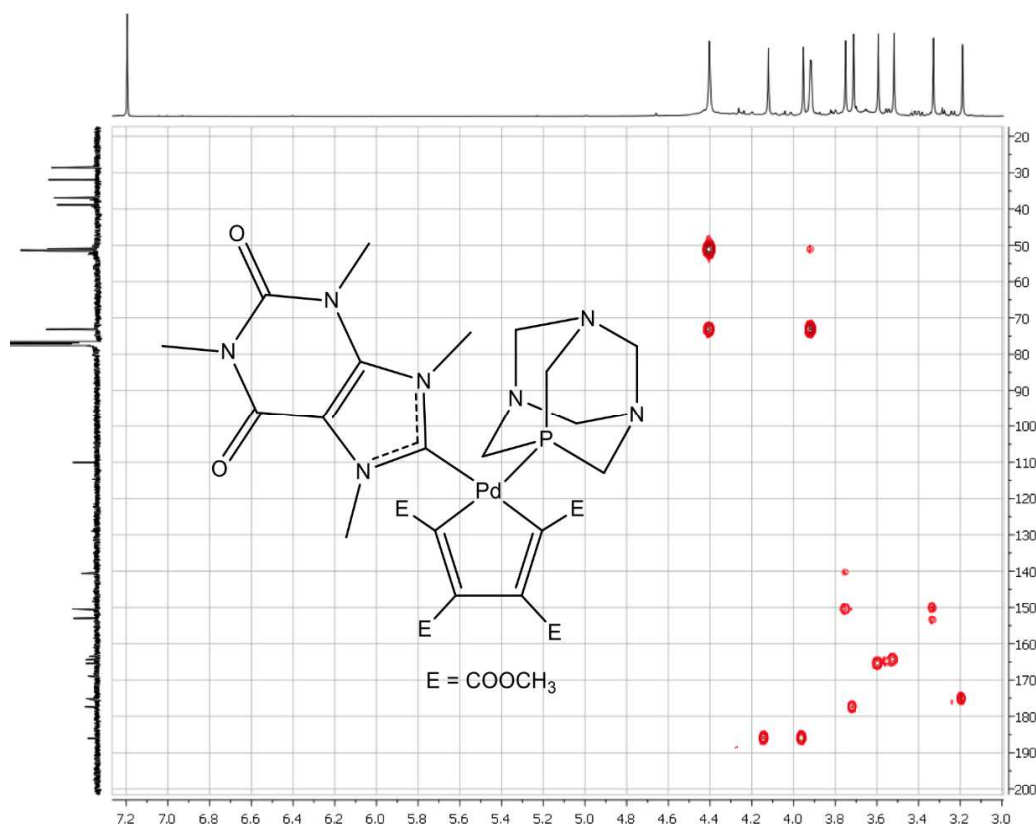


Fig. 77 Spettro HMBC del composto **7a** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Infine, gli spettri $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (Fig. 78) evidenziano la presenza di un solo picco ed il suo posizionamento a *chemical shift* in questo caso decisamente più alto rispetto a quello del legante libero ($\Delta\delta \approx 45$ ppm) conferma la coordinazione del PTA.

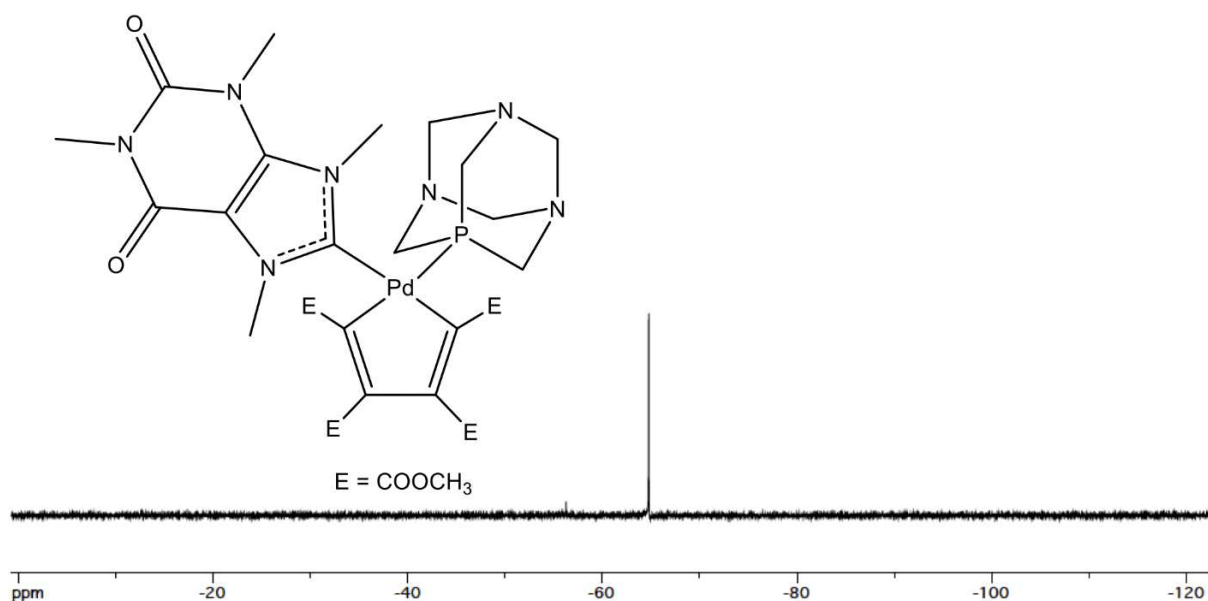


Fig. 78 Spettro $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR del composto **7a** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Lo spettro IR (*Fig. 79*) segnala infine la presenza dei gruppi carbonilici, appartenenti sia alla struttura purinica che al frammento palladaciclopentadienilico, con delle bande intense tra 1710 e 1670 cm^{-1} .

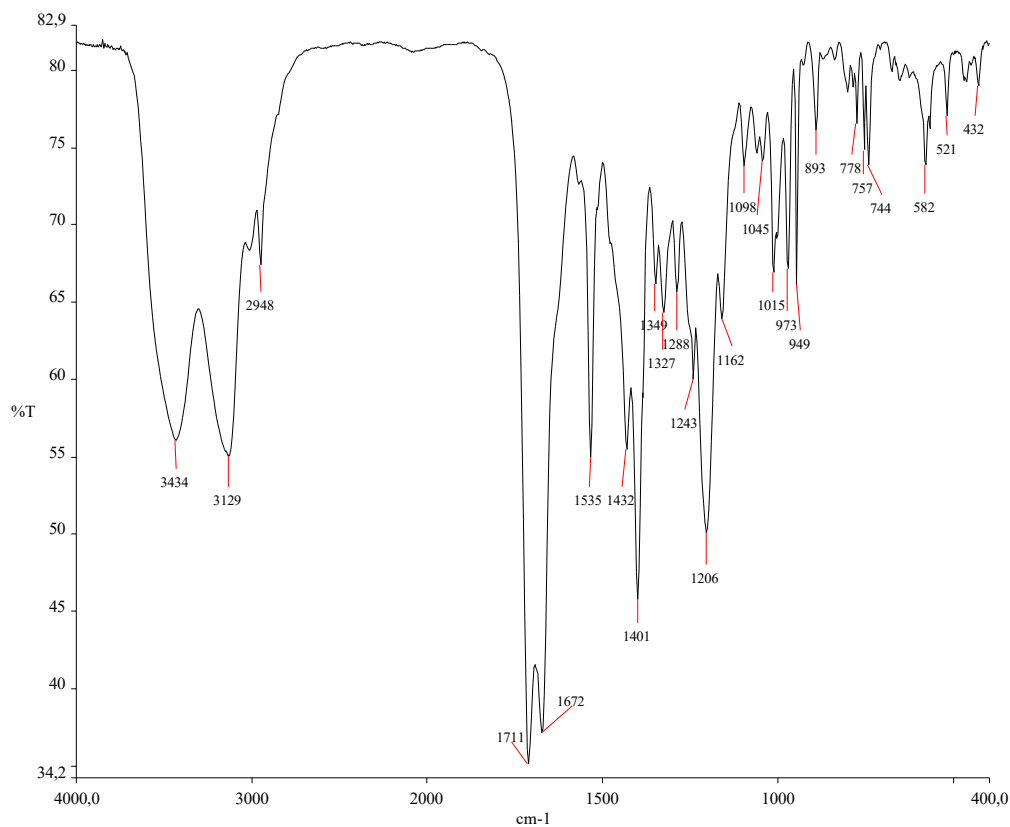


Fig. 79 Spettro IR in KBr del composto **7a**

3.1.4.4. COMPLESSI MISTI NHC / DIC

Il buon esito delle reazioni con il PTA e la trifenilfosfina ci ha spinto ad utilizzare lo stesso approccio sintetico per ottenere complessi ciclometallati con un legante carbenico a struttura purinica affiancato ad un legante isonitrilico scegliendo, in particolare, il 2,6-dimetilfenil isonitrile (DIC). La caratteristica interessante di questa classe di composti è la co-presenza di due leganti dalle caratteristiche elettroniche decisamente diverse. Rispetto ai leganti carbenici, che sono principalmente σ -donatori, gli isonitrili sono leganti significativamente π -accettori.

La reazione di formazione di questa classe di composti, come già verificato nel caso di carbeni *N*-eterociclici che non derivano da basi puriniche funzionalizzate, richiede tempi decisamente più lunghi rispetto al caso dei leganti fosfinici.

Dopo qualche minuto dall'aggiunta del DIC e del complesso carbenico di argento alla soluzione del precursore ciclopalladato, si ottiene, infatti, una miscela contenente il prodotto misto e i due composti "omoleptici". Lasciando la miscela a temperatura ambiente è possibile osservare la progressiva trasformazione dei due "omoleptici" nel derivato misto, processo che si completa nell'arco di circa 48 ore. Di seguito vengono riportati gli spettri con cui è stata monitorata la reazione descritta in un lavoro precedente del gruppo di ricerca (Fig. 80) [63e].

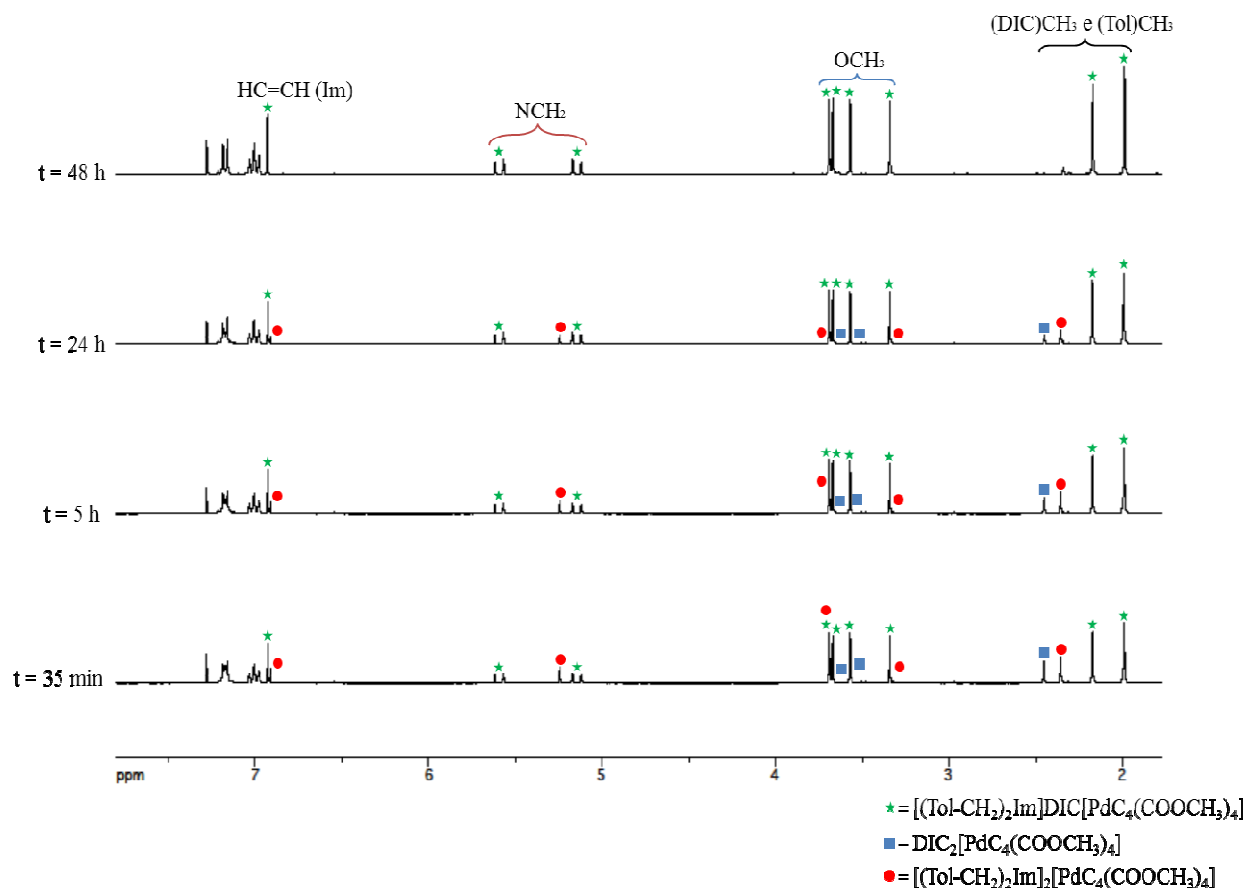
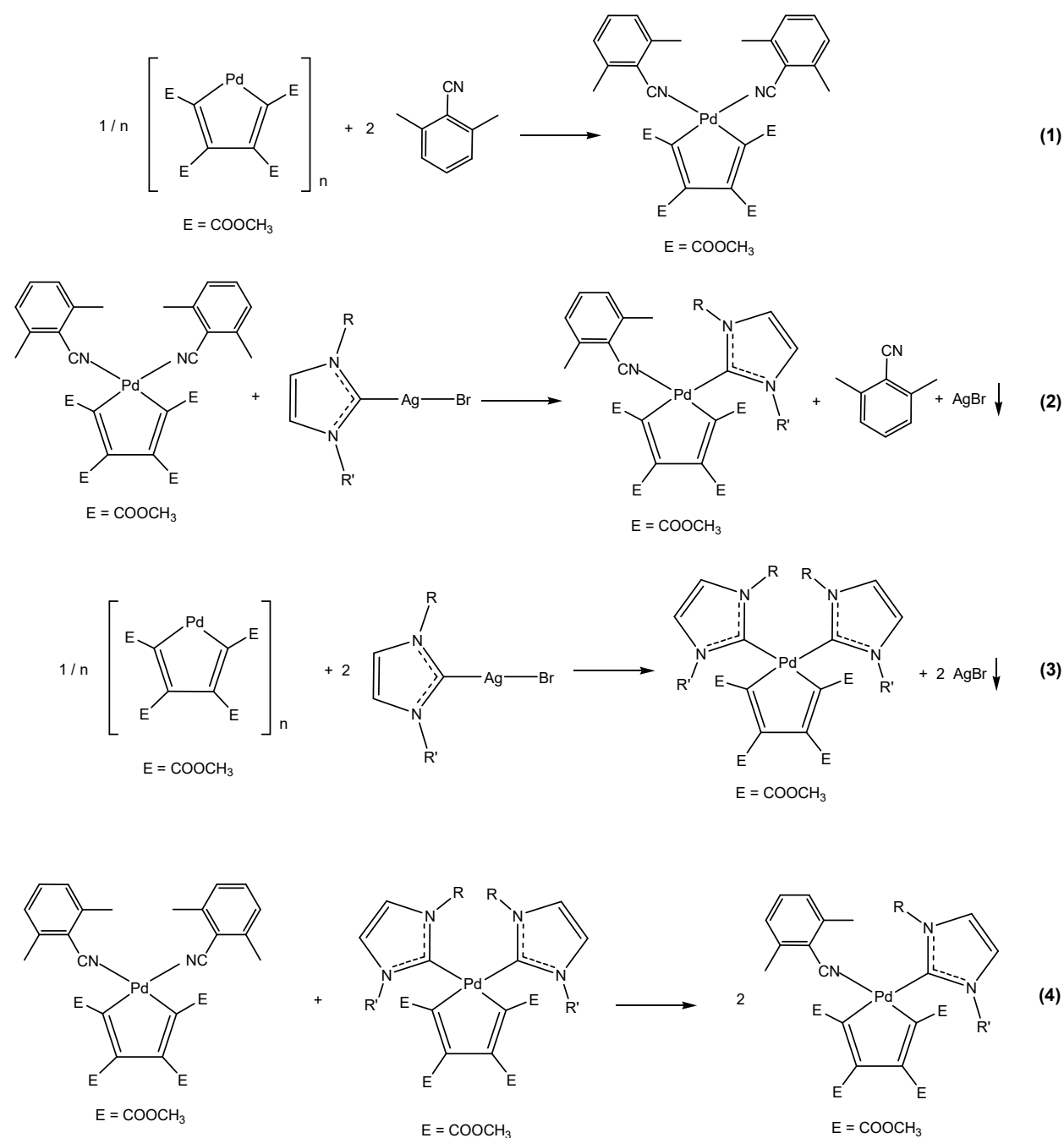


Fig. 80 Evoluzione temporale dei complessi omoleptici in favore della completa formazione del derivato misto

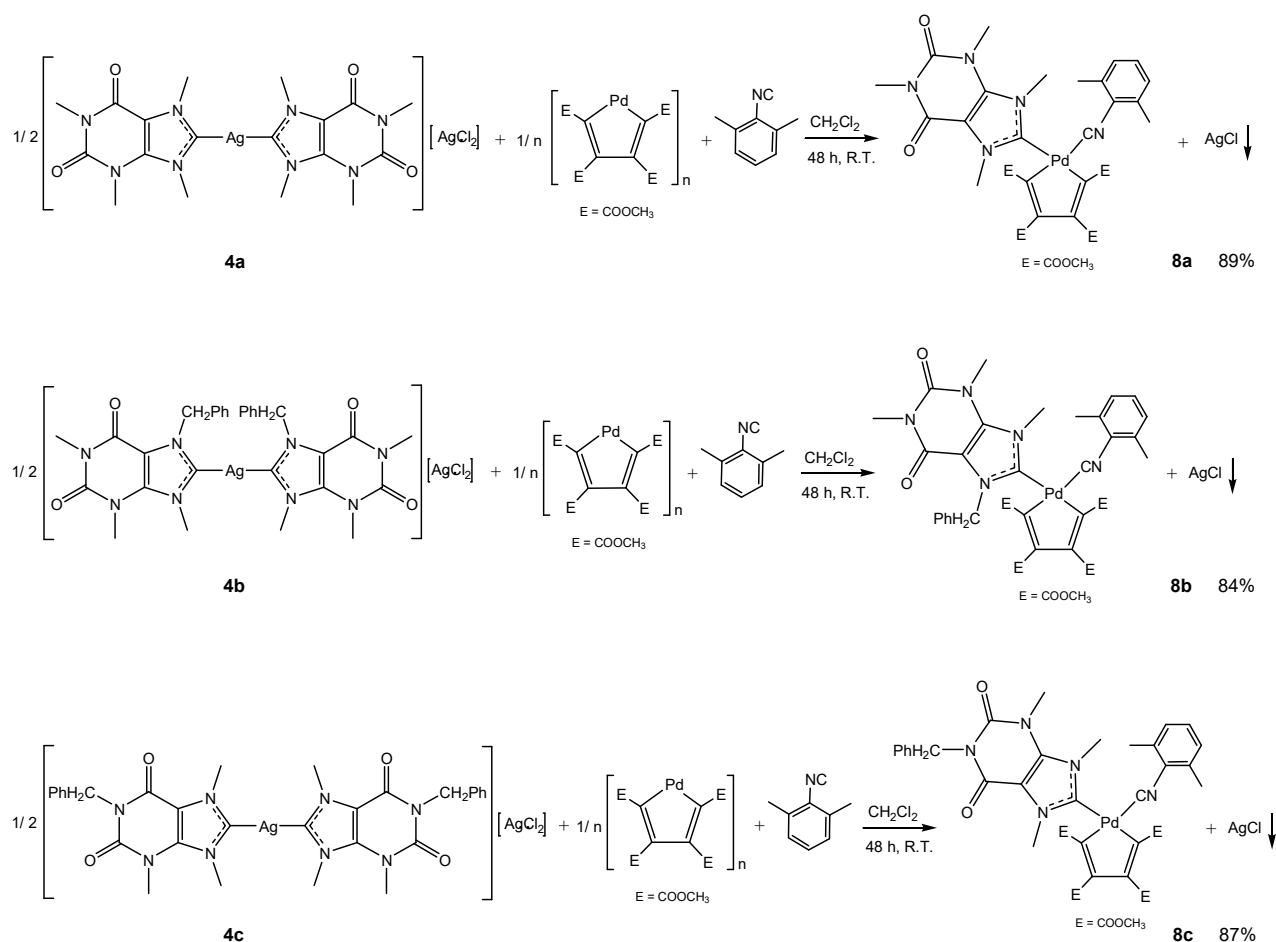
Da uno schema di reazione analogo a quello utilizzato per descrivere la reazione con la trifenilfosfina (*Schema 21*), risulta chiaro che, in questo caso, le velocità dei processi (3) e (2) devono essere confrontabili, mentre il processo (4) deve rimanere in ogni caso significativamente più lento dei primi tre.

Questa affermazione spiega l'iniziale presenza in soluzione di tutte e tre le possibili specie palladacicliche e la successiva e lenta trasformazione dei due "omoleptici" nel prodotto misto desiderato.



Schema 21 Possibili processi competitivi coinvolgenti il precursore polimerico, il legante isonitrilico e quello carbenico presenti nell'ambiente di reazione

Sulla base di questa conoscenza pregressa e di prove preliminari che sono state comunque condotte anche sui complessi di nostro interesse è stato possibile sintetizzare con buone rese i composti **8a-c**, facendo reagire il DIC e l'opportuno carbene d'argento a struttura purinica con il precursore ciclometallato e mantenendo la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per 48 ore (*Schema 22*).



Schema 22 Reazioni di sintesi dei complessi misti NHC / DIC **8a-c** a partire dai complessi biscarbenici di Ag(I) **4a-c**

I complessi sono stati caratterizzati mediante spettroscopie NMR e IR.

Negli spettri $^1\text{H-NMR}$ (*Fig. 81*) si possono facilmente individuare i segnali dei due diversi leganti spettatori (isonitrile e carbene). Per quanto riguarda il frammento carbenico sono presenti i segnali dei gruppi NCH_3 e, limitatamente ai composti **8b** e **8c**, il sistema AB relativo al gruppo NCH_2 .

La presenza del gruppo funzionale palladaciclico è testimoniata dai quattro differenti picchi assegnabili ai gruppi OCH_3 . Il singoletto rinvenibile invece tra 2 e 2.5 ppm è attribuibile ai due gruppi metilici dell'isonitrile coordinato. Tali valori sono diversi dal corrispondente *chemical shift* dell'isonitrile libero, come differenti sono anche le frequenze di risonanza dei protoni aromatici presenti tra 7 e 8 ppm.

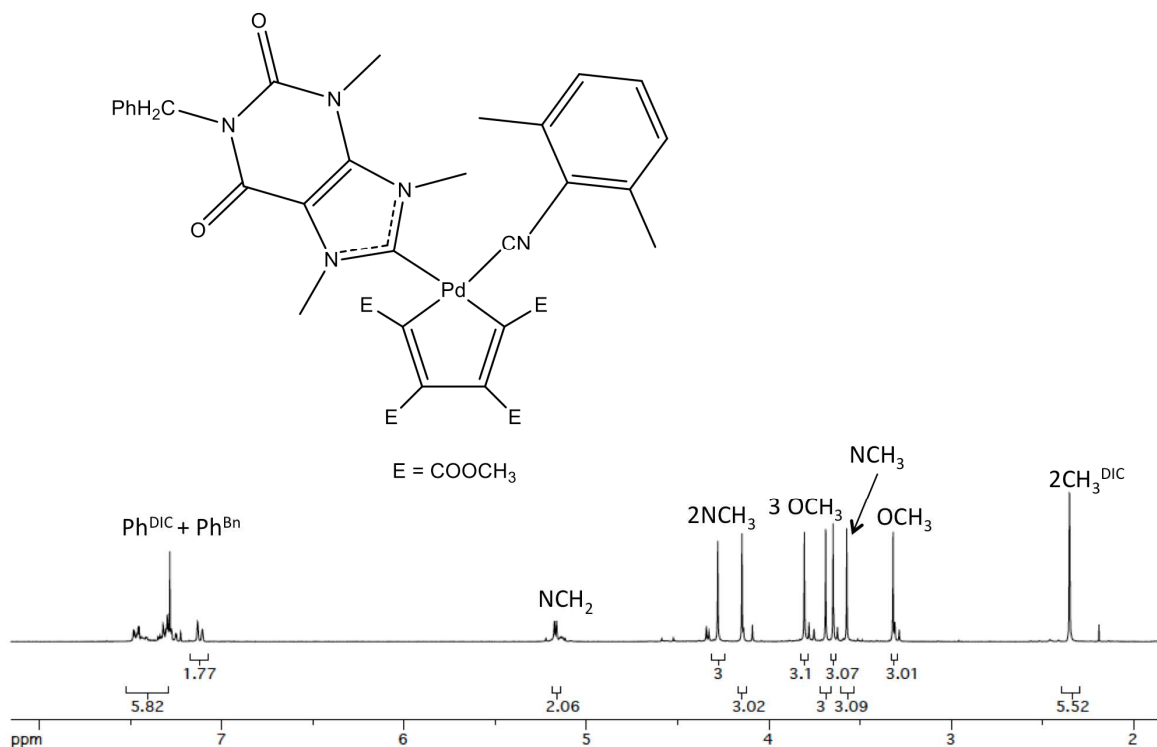


Fig. 81 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del composto **8c** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Degni di menzione sono, negli spettri $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (Fig. 82), i deboli segnali riconducibili al carbonio del gruppo isonitrilico (a circa 149 ppm) e quello carbenico (a circa 180-190 ppm) legati al centro metallico.

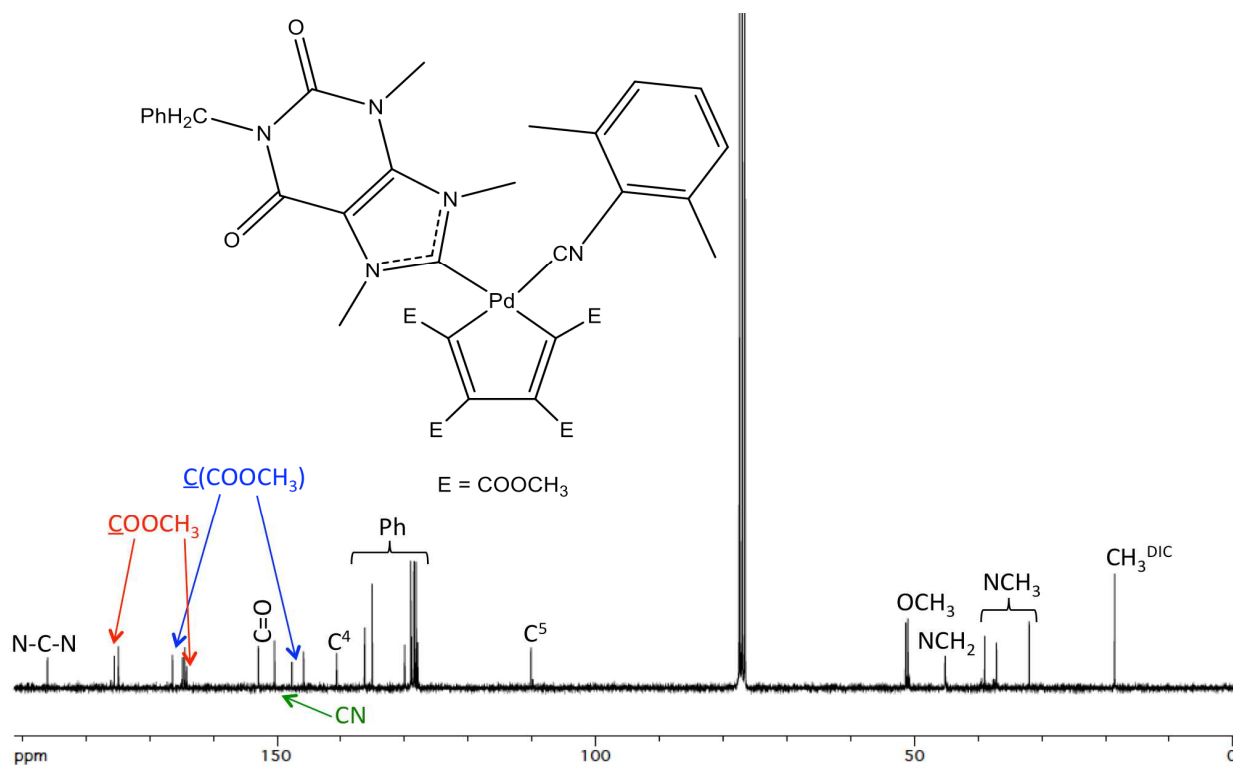


Fig. 82 Spettro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR del composto **8c** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Per l'attribuzione dei segnali metilici della base purinica e dell'isonitrile, dei carboni aromatici e degli altri carboni sono risultati di fondamentale importanza gli spettri bidimensionali HSQC e HMBC (Figs. 83 e 84).

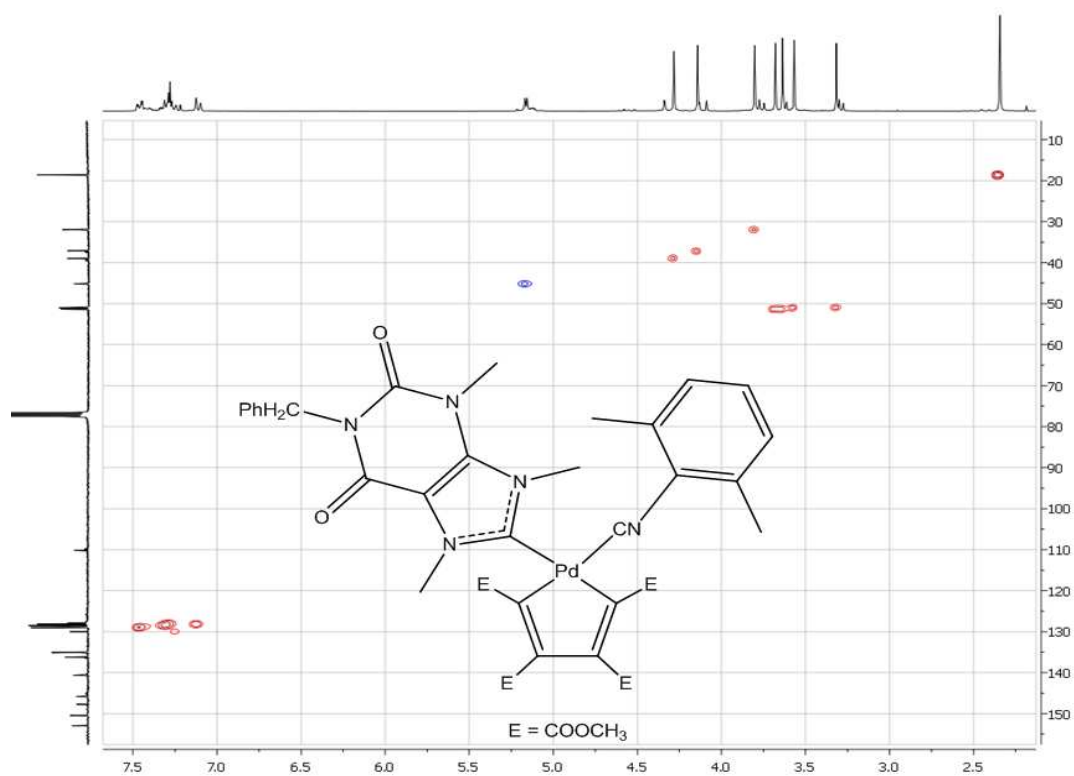


Fig. 83 Spettro HSQC del composto **8c** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

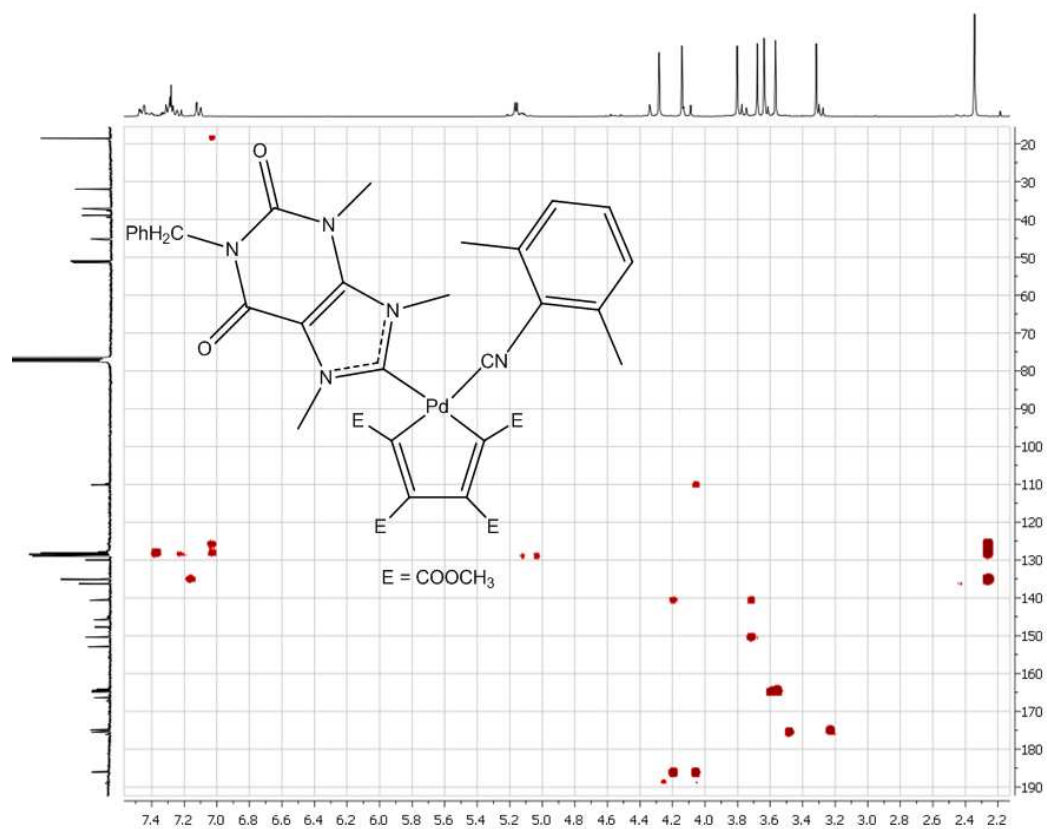


Fig. 84 Spettro HMBC del composto **8c** ($T = 298\text{K}$, CDCl_3)

Infine, nello spettro IR (Fig. 85) vanno segnalate una banda di media intensità a 2175-2180 cm^{-1} , attribuibile allo *stretching* del gruppo CN dell'isonitrile coordinato, e delle bande più intense tra 1710 e 1670 cm^{-1} , riconducibili ai gruppi carbonilici sia della struttura purinica che del frammento ciclopalladato.

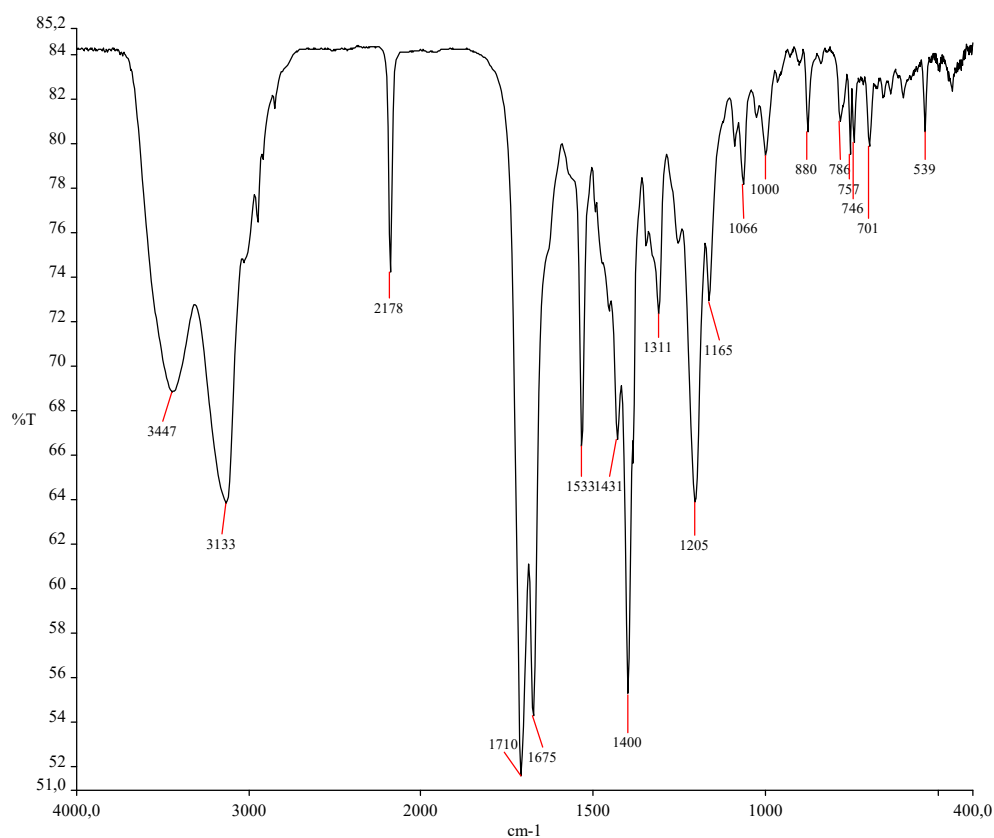


Fig. 85 Spettro IR in KBr del composto 8c

3.2 PARTE BIOLOGICA: ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

3.2.1. ATTIVITÀ CITOTOSSICA DEI COMPLESSI CICLOPALLADATI

I 12 complessi palladaciclopentadienilici contenenti carbeni a struttura purinica sintetizzati ed il precursore polimerico $[\text{PdC}_4(\text{COOCH}_3)_4]_n$ sono stati testati durante la seconda parte dell'attività di tirocinio, presso i laboratori di biologia molecolare dell'Università di Ferrara, sotto la supervisione della Prof.ssa Ilaria Lampronti (gruppo di ricerca del Prof. Roberto Gambari).

In modo particolare, è stata inizialmente investigata l'attività antiproliferativa esercitata dai nostri composti nei confronti delle linee tumorali di carcinoma ovarico denominate A2780 (*cisplatino* sensibili) e A2780*cis* (*cisplatino* resistenti).

Le prime operazioni eseguite sono state il ripristino delle linee cellulari, conservate in azoto liquido, e la predisposizione del terreno di coltura adatto a tali linee, attività effettuate secondo i protocolli standard.

Le cellule sono state costantemente monitorate al microscopio per valutarne lo stato di salute e, per quelle *cisplatino* resistenti, tale caratteristica è stata mantenuta aggiungendo periodicamente il *cis*[$\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$] nel terreno di coltura.

Per ciascun complesso sintetizzato è stata preparata una soluzione madre 50 mM in DMSO e da questa, sulla base di prove preliminari di solubilità, per diluizioni successive con etanolo, sono state ottenute le soluzioni 5 mM, 500 μM e 50 μM .

A questo punto si è proceduto depositando le cellule in piastre dove potessero crescere in adesione, secondo il protocollo detto di semina o piastramento, già messo a punto e utilizzato nel laboratorio presso il quale è stata svolta l'attività.

Nella fase successiva, ovvero durante il trattamento, dopo 24 ore dalla semina, le soluzioni dei composti sono state inserite all'interno dei differenti pozzetti delle piastre contenenti le cellule tumorali, le quali sono state poi poste nuovamente in incubatore per 72 ore, in condizioni ambientali regolate ($T = 37\text{ }^\circ\text{C}$ e 5% di CO_2).

In particolare, nelle prove preliminari, sono stati aggiunti nei singoli pozzetti i composti impiegando ampie scalari di concentrazione: 0.1, 1, 10, 100 e 500 μM . Il *cisplatino*, utilizzato come controllo positivo, è stato addizionato a concentrazioni che vanno da 0.1 a 20 μM .

Al termine del periodo indicato è stata effettuata la conta delle cellule rimaste in ogni singolo pozzetto mediante lo strumento Beckman Coulter Z2, al fine di determinare un primo valore indicativo di IC_{50} (concentrazione alla quale il 50% delle cellule va incontro a morte).

Una volta ottenuto il responso strumentale di conta è stato possibile esprimere la quantità di cellule rimaste nei singoli pozzetti trattati sotto forma di percentuale rispetto alla quantità di cellule presenti nei pozzetti di controllo negativo (cellule non trattate).

Riportando in grafico queste percentuali in funzione della concentrazione di composto utilizzato sono state ottenute delle curve di inibizione della crescita cellulare nelle quali è possibile osservare l'azione citotossica di ogni famiglia di composti (*Figs. 86 - 93*).

Ai fini di una maggiore chiarezza grafica, nella costruzione di tali curve non è stato riportato l'intero *range* di concentrazione utilizzato (0.1-500 μM), ma sono stati inseriti intervalli di concentrazione ridotti (intorno all' IC_{50}) usati nel corso di vari esperimenti successivamente ripetuti.

Come si può notare, l'effetto citotossico dei complessi misti NHC / PTA e NHC / DIC risulta evidente già nell'intervallo di concentrazione 0.1-1 μM in cui, nella maggior parte dei casi e per entrambe le linee tumorali, si ritrova un drastico calo della popolazione cellulare: in tale intervallo effettivamente è stato poi ritrovato e calcolato il valore finale di IC_{50} .

Per quanto concerne invece i complessi misti NHC / PPh_3 e i biscarbeni (NHC / NHC), le curve ottenute mostrano che l'azione citotossica è stata esplicitata in misura inferiore e conseguentemente il valore di IC_{50} è stato rinvenuto prevalentemente tra 1 e 10 μM , ad eccezione dei composti **5c** e **6c**, per i quali l' IC_{50} rientra nell'intervallo 10-100 μM .

Nell'ultima curva riportata (*Fig. 94*) si può infine notare la diversa azione del *cisplatin* nei confronti delle due differenti linee cellulari: nella linea tumorale A2780 (*cisplatin* sensibile) il *cisplatin* determina un valore di IC_{50} tra 0.1 e 1 μM , mentre nella linea tumorale A2780*cis* (*cisplatin* resistente), il costante mantenimento della resistenza acquisita ha reso il farmaco efficace solo se utilizzato in un intervallo di concentrazione di un ordine di grandezza superiore, pari a 1-10 μM .

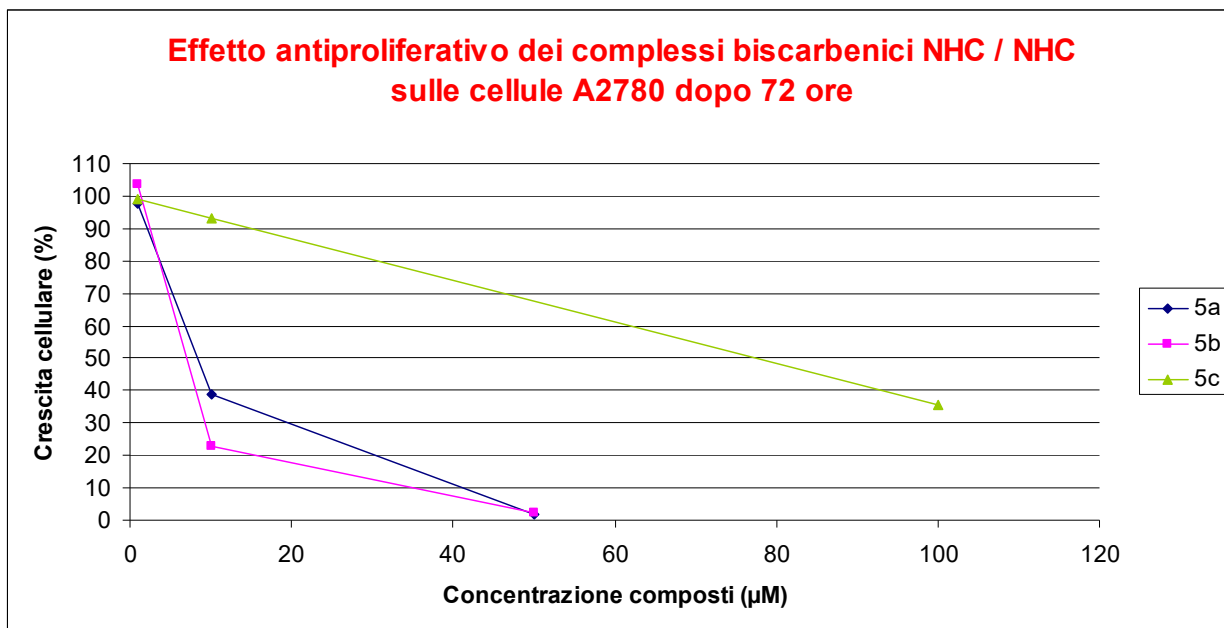


Fig. 86 Effetto antiproliferativo dei complessi biscarbenici sulla linea tumorale A2780 in un esperimento rappresentativo

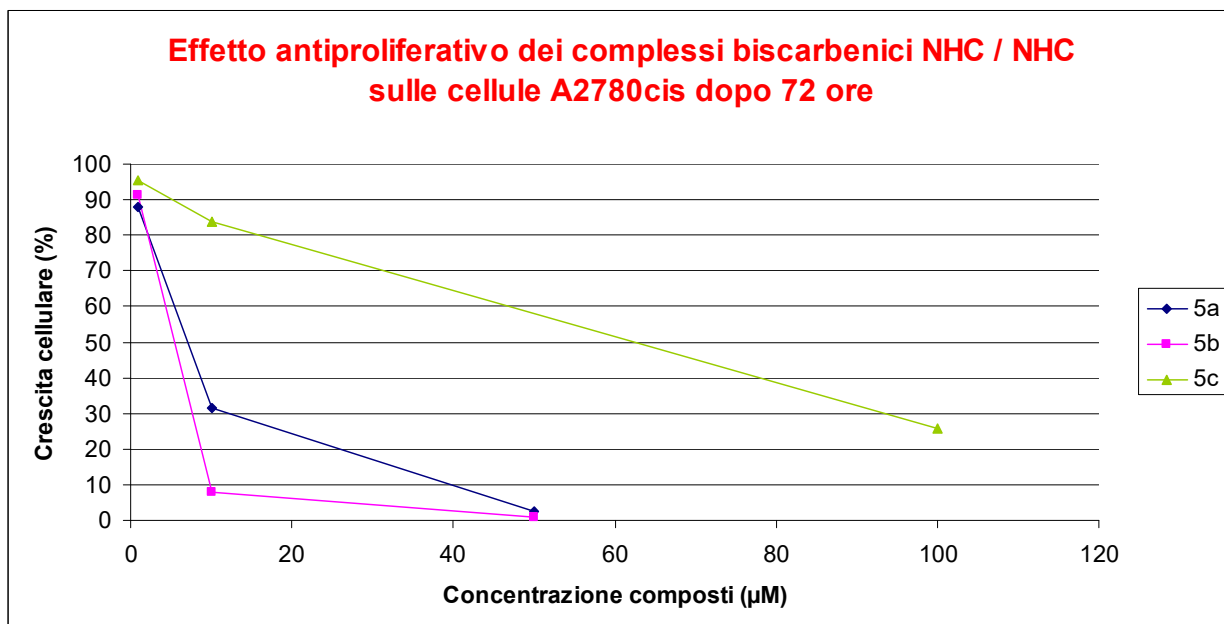


Fig. 87 Effetto antiproliferativo dei complessi biscarbenici sulla linea tumorale A2780cis in un esperimento rappresentativo

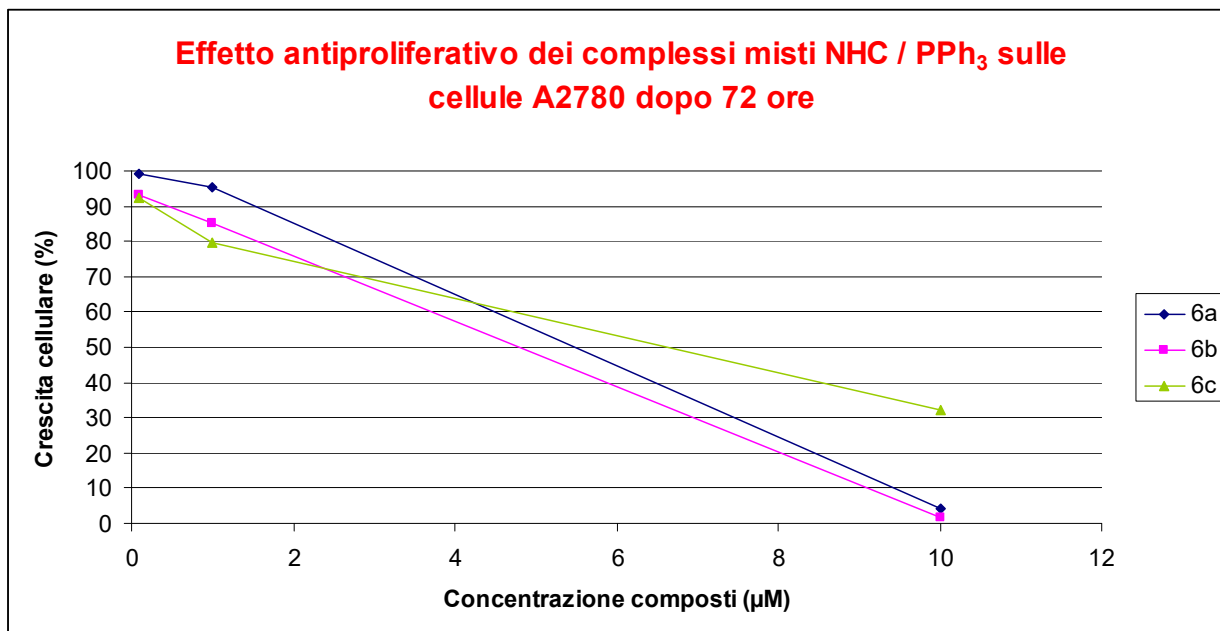


Fig. 88 Effetto antiproliferativo dei complessi misti NHC / PPh₃ sulla linea tumorale A2780 in un esperimento rappresentativo

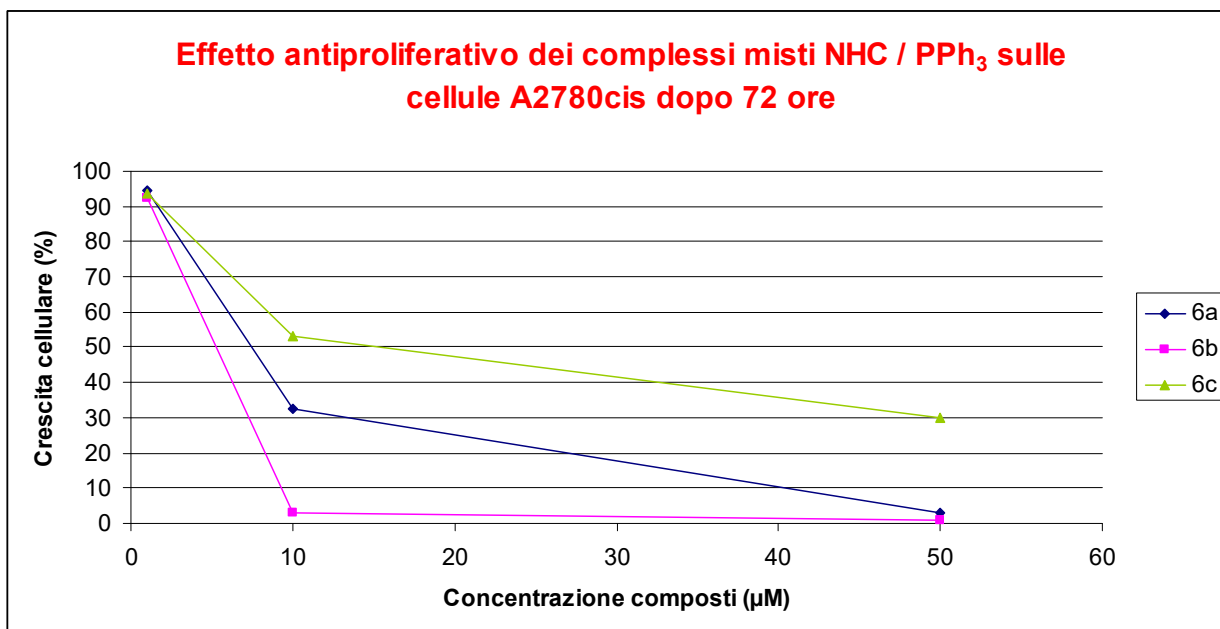


Fig. 89 Effetto antiproliferativo dei complessi misti NHC / PPh₃ sulla linea tumorale A2780cis in un esperimento rappresentativo

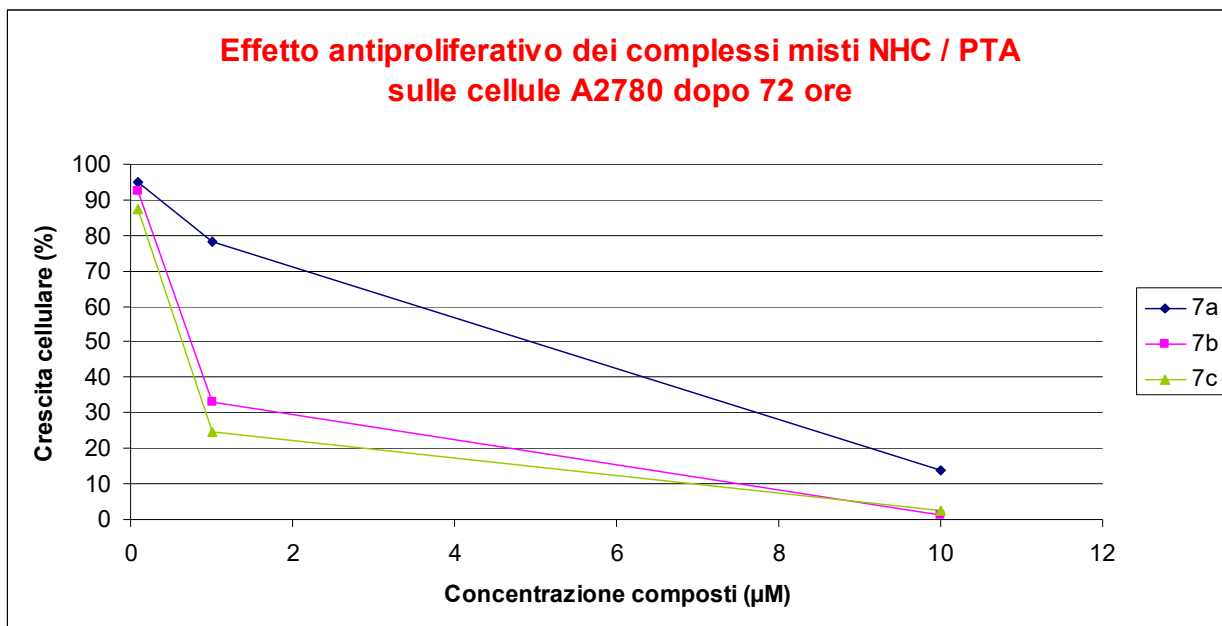


Fig. 90 Effetto antiproliferativo dei complessi misti NHC / PTA sulla linea tumorale A2780 in un esperimento rappresentativo

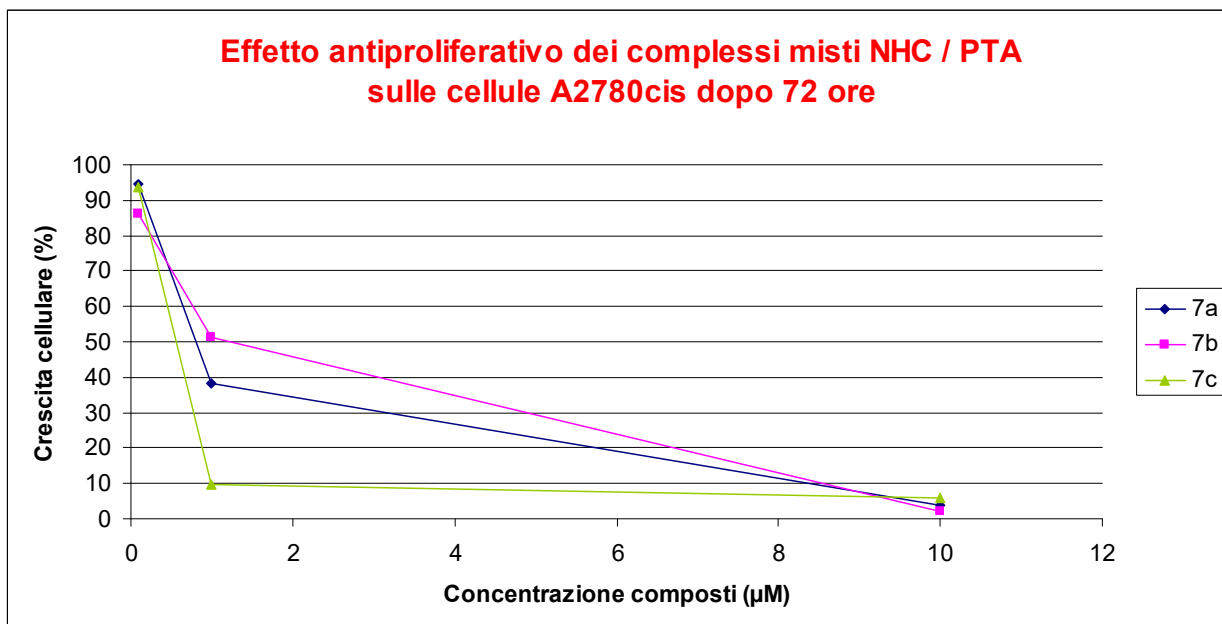


Fig. 91 Effetto antiproliferativo dei complessi misti NHC / PTA sulla linea tumorale A2780cis in un esperimento rappresentativo

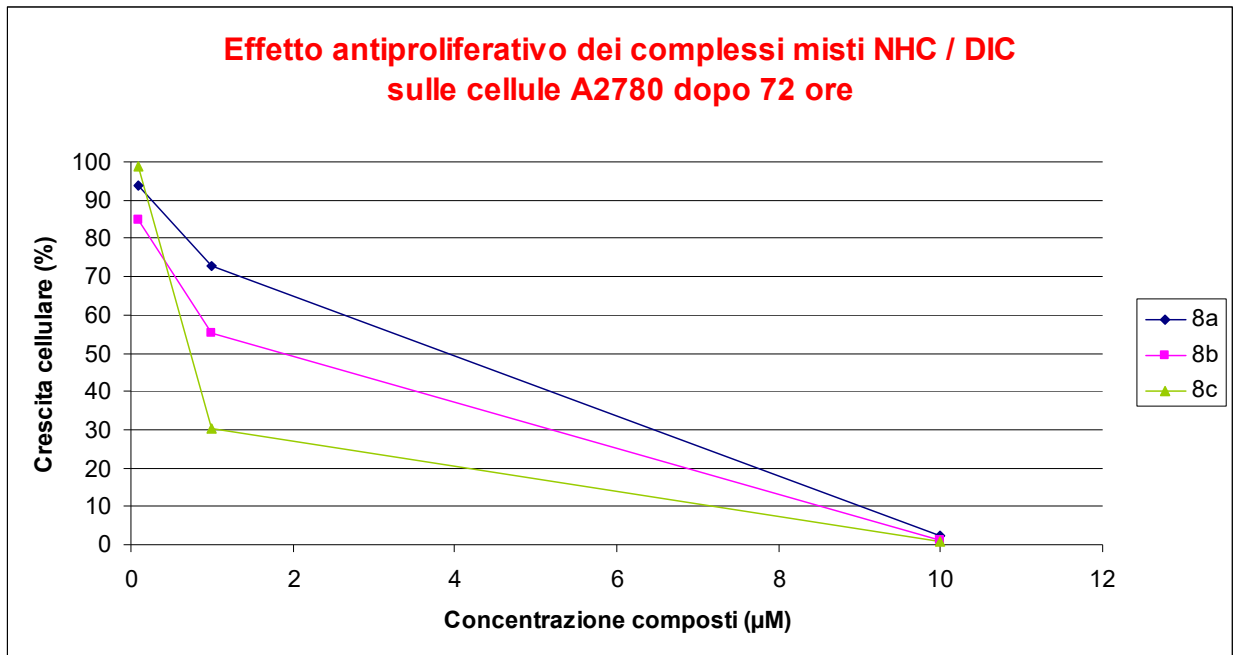


Fig. 92 Effetto antiproliferativo dei complessi misti NHC / DIC sulla linea tumorale A2780 in un esperimento rappresentativo

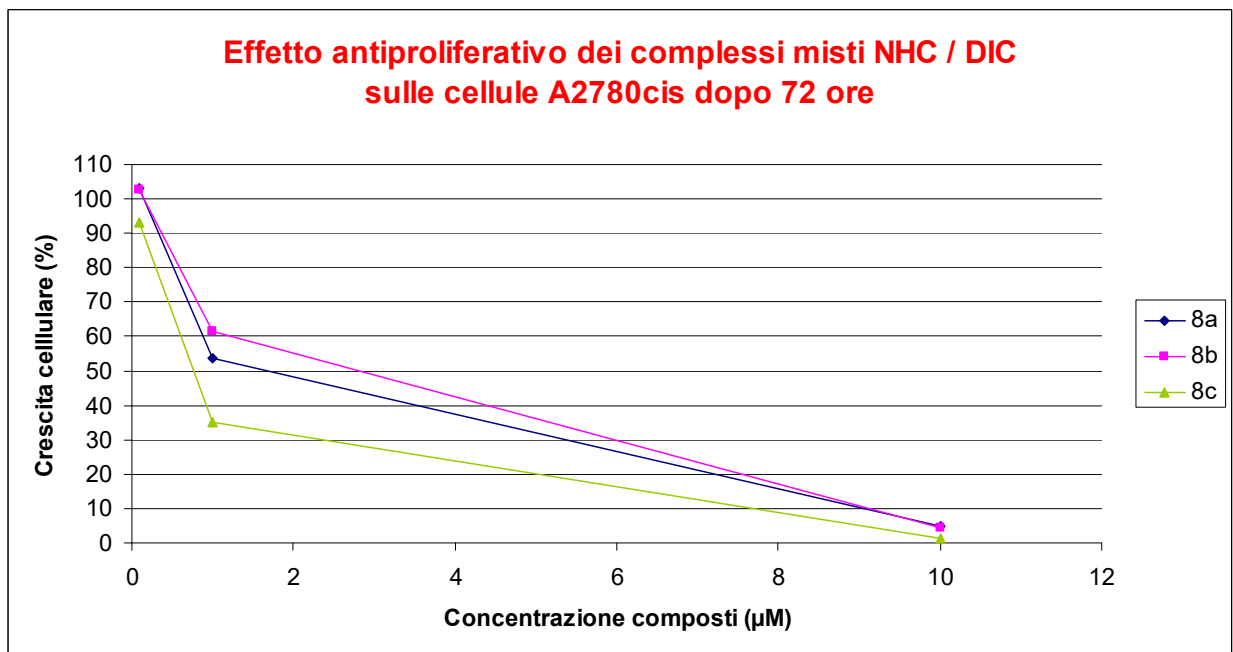


Fig. 93 Effetto antiproliferativo dei complessi misti NHC / DIC sulla linea tumorale A2780cis in un esperimento rappresentativo

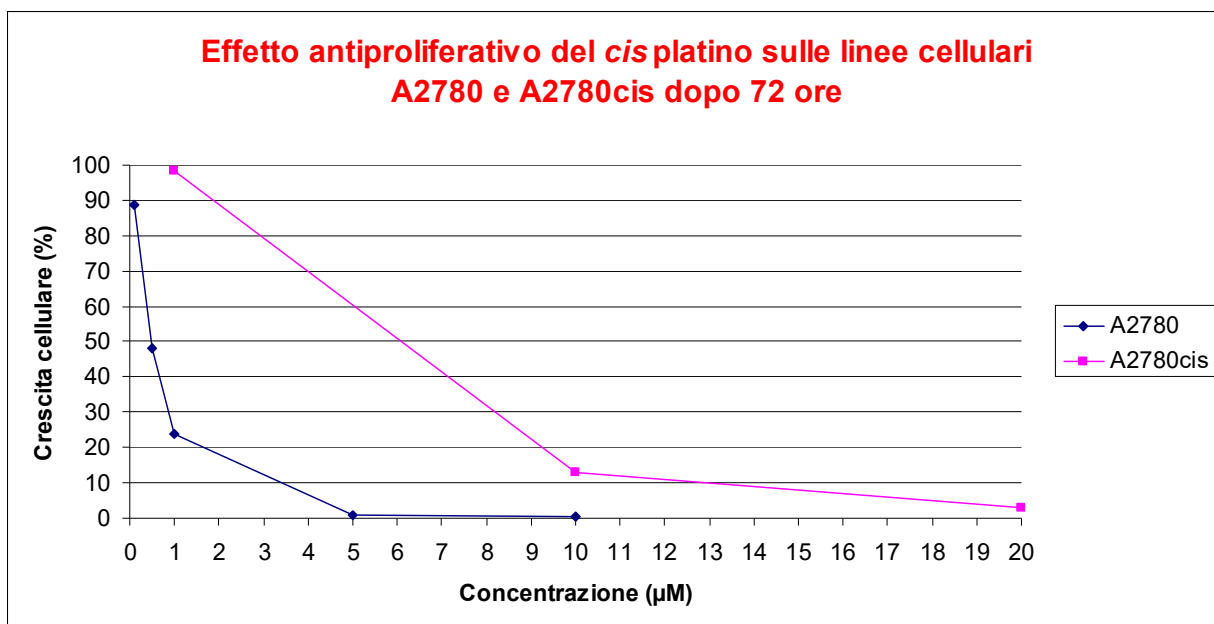


Fig. 94 Effetto antiproliferativo del cisplatino sulle linee tumorali A2780 e A2780cis in un esperimento rappresentativo

Sulla base degli esiti di queste prove preliminari, restringendo il *range* di concentrazione attorno al valore ottenuto, gli esperimenti di attività antiproliferativa sono stati ripetuti almeno tre volte al fine di determinare il valore effettivo di IC₅₀ con la relativa deviazione standard.

I risultati ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle ed istogrammi (*Tabelle 1 e 2*) (*Figs. 95 e 98*).

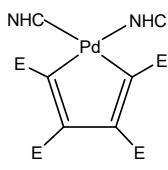
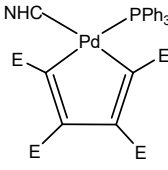
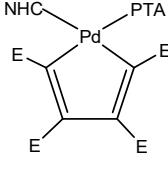
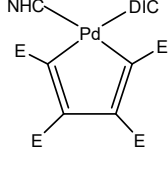
	IC₅₀ (μM) su cellule A2780 dopo 72 ore	
Cisplatino	0.6 ± 0.1	
[PdC₄(COOCH₃)₄]_n	> 100	
Biscarbeni	5a	9.0 ± 0.7
	5b	6.5 ± 0.5
	5c	81 ± 4
	6a	5.3 ± 0.7
NHC / PPh₃	6b	5.0 ± 0.2
	6c	6.66 ± 0.03
	7a	4.3 ± 0.7
NHC / PTA	7b	0.9 ± 0.1
	7c	0.56 ± 0.08
	8a	3.3 ± 0.6
NHC / DIC	8b	1.6 ± 0.3
	8c	0.70 ± 0.05

Tabella 1 Valori di IC₅₀ ottenuti per la linea cellulare A2780 dopo 72 ore dal trattamento (dove E = COOCH₃)

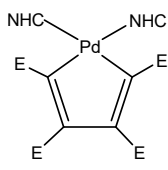
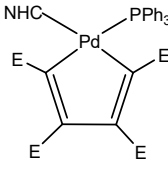
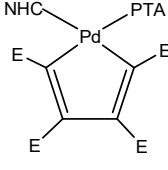
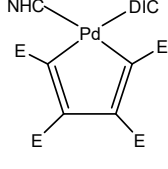
	IC ₅₀ (μM) su cellule A2780cis dopo 72 ore	
Cisplatino	6 ± 1	
[PdC₄(COOCH₃)₄]_n	> 100	
Biscarbeni 	5a	7.03 ± 0.01
	5b	5.53 ± 0.06
	5c	60 ± 3
NHC / PPh₃ 	6a	6.7 ± 0.8
	6b	5.25 ± 0.05
	6c	16 ± 1
NHC / PTA 	7a	0.6 ± 0.2
	7b	1.0 ± 0.3
	7c	0.64 ± 0.07
NHC / DIC 	8a	2.1 ± 0.4
	8b	1.8 ± 0.9
	8c	0.87 ± 0.09

Tabella 2 Valori di IC₅₀ ottenuti per la linea cellulare A2780cis dopo 72 ore dal trattamento (dove E = COOCH₃)

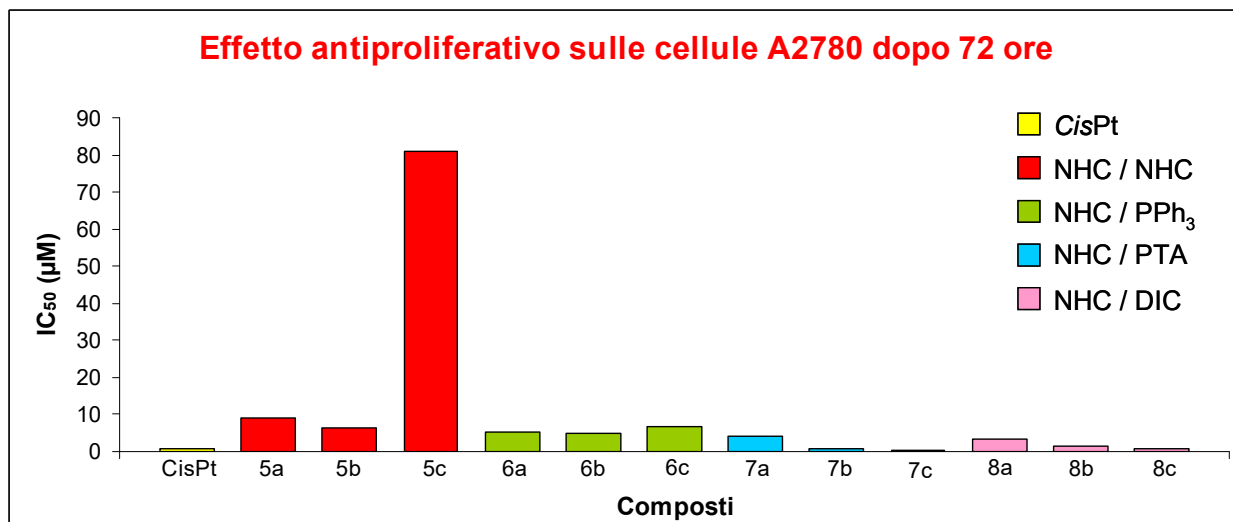


Fig. 95 Istogramma recante i valori di IC₅₀ ottenuti sulle cellule A2780, raggruppati in base alla classe di composto

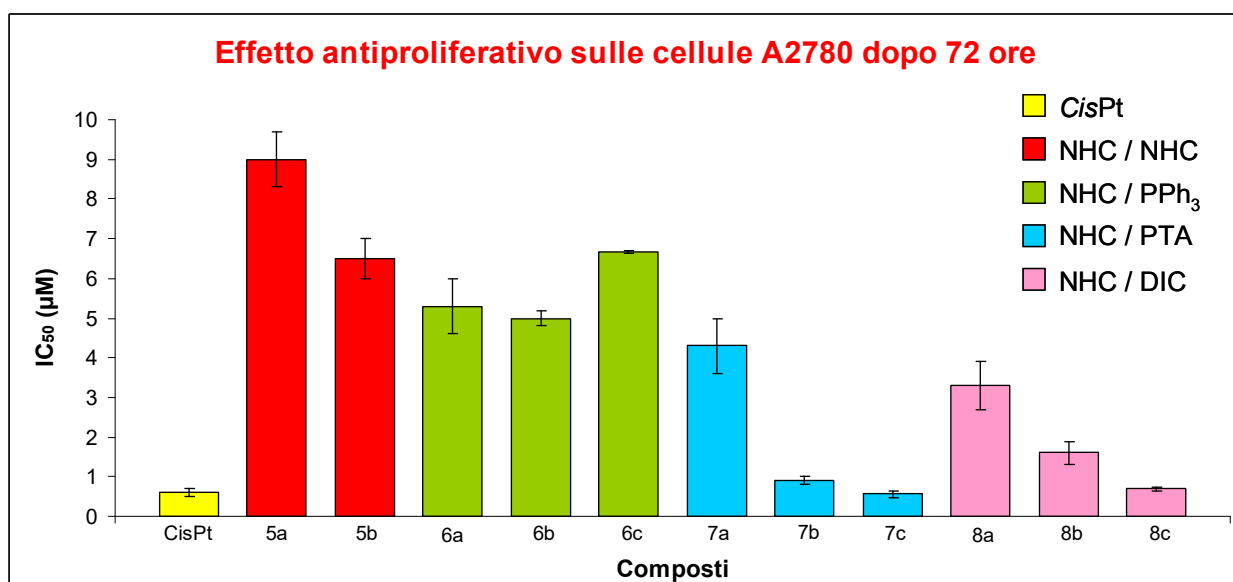


Fig. 96 Istogramma recante i valori di IC₅₀ correlati di deviazione standard, ottenuti sulle cellule A2780, raggruppati in base alla classe di composto (il composto 5c è omesso per chiarezza grafica)

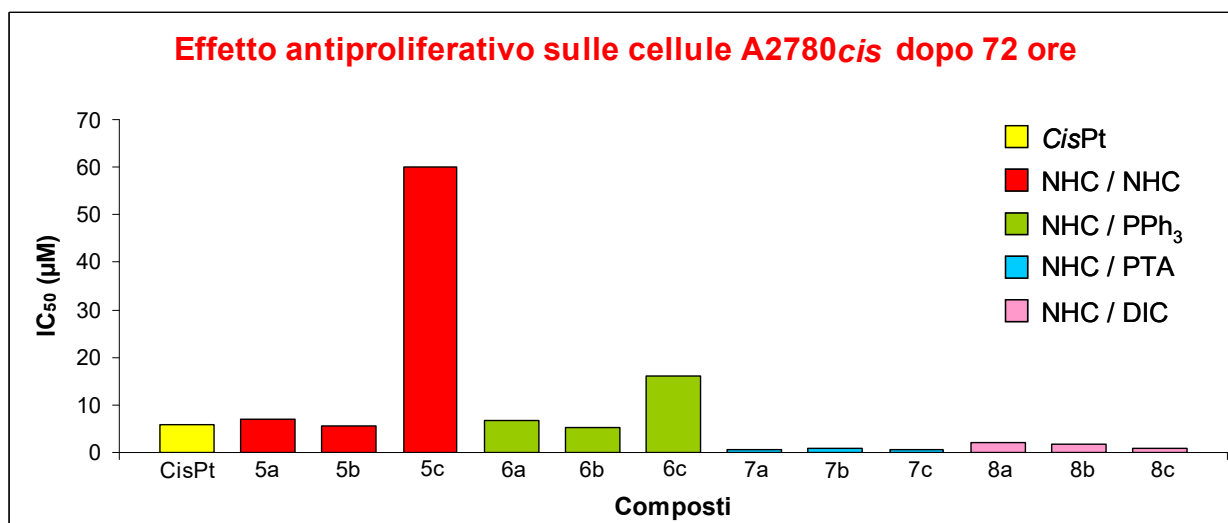


Fig. 97 Istogramma recante i valori di IC₅₀ ottenuti sulle cellule A2780cis, raggruppati in base alla classe di composto

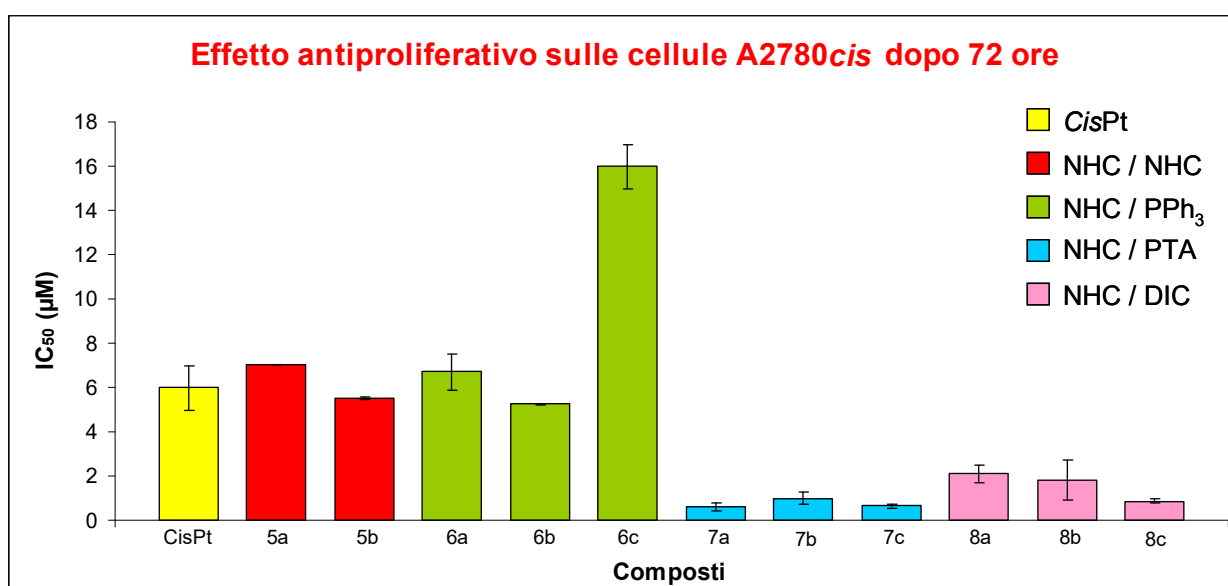


Fig. 98 Istogramma recante i valori di IC₅₀ correlati di deviazione standard, ottenuti sulle cellule A2780cis, raggruppati in base alla classe di composto (il composto 5c è omesso per chiarezza grafica)

Dai dati ottenuti si possono fare le seguenti considerazioni:

1. il precursore polimerico utilizzato, a differenza dei complessi finali, sembra non possedere attività citotossica alle concentrazioni utilizzate in entrambe le linee cellulari ($IC_{50} > 100 \mu M$ per le A2780 e per le A2780*cis*)
2. a parità di legante carbenico, i composti più performanti sembrano essere quelli contenenti DIC e PTA. Per questi ultimi complessi sono state effettuate delle prove di diluizione in acqua (al posto dell'etanolo) e i dati preliminari ottenuti, entro il limite dell'errore sperimentale, sono in linea con i precedenti (Tabella 3).

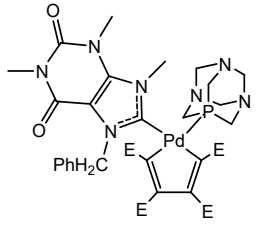
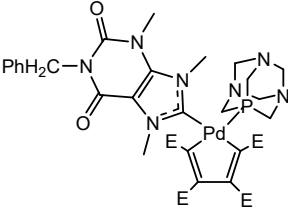
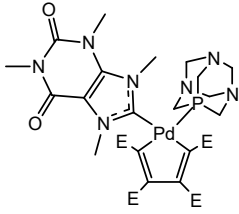
	IC ₅₀ (μM) su cellule A2780 dopo 72 ore	
	H ₂ O	Etanolo
7b 	0.69	0.9 ± 0.1
7c 	1.21	0.56 ± 0.08
7a 	2.95	4.3 ± 0.7

Tabella 3 Valori di IC_{50} ottenuti per la linea cellulare A2780 dopo 72 ore dal trattamento: confronto sul solvente (dove $E = COOCH_3$)

Tale classe di composti risulta quindi particolarmente interessante in quanto i complessi si dimostrano attivi e contestualmente sono anche gli unici idrosolubili tra quelli sintetizzati.

Tra i complessi delle altre categorie, i meno performanti risultano quelli biscarbenici. Nel dettaglio, è stato possibile osservare mediamente il seguente *trend* di attività:



3. a parità di legante spettatore (PPh₃, DIC e PTA) non esiste un *trend* generale che correli l'attività antiproliferativa con la tipologia di sostituenti presenti nel frammento carbenico
4. i valori di IC₅₀, a parità di composto, sono in molti casi confrontabili tra le due linee cellulari esaminate. Questo sembra indicare che il meccanismo d'azione dei complessi palladaciclopentadienilici sia ragionevolmente diverso da quello proposto per il *cisplatino* [13, 19]. Nel caso del *cisplatino* si registra, infatti, un'attività circa 10 volte maggiore nelle linee sensibili rispetto a quelle resistenti
5. per quanto riguarda la linea A2780, *cisplatino* sensibile, i composti **7b** e **7c** (NHC / PTA) e **8c** (NHC / DIC) presentano valori paragonabili al *cisplatino*
6. per l'omologa linea A2780*cis* vi sono due composti (**6a** e **6b**) che presentano attività paragonabile al *cisplatino* e ben sei composti (**7a-c** e **8a-c**) che sono più attivi, fino ad un ordine di grandezza, rispetto al *cisplatino* stesso.
Questi valori sono molto interessanti se confrontati con i complessi di Pd più attivi riportati in letteratura [40].

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi si possono riassumere come segue:

- Sono stati sintetizzati e caratterizzati tre nuovi sali d'imidazolio **3a-c** recanti come controione l'anione cloruro e contenenti uno scheletro purinico riconducibile a caffeina, teofillina e teobromina mediante reazione di scambio con AsPh_4Cl
- Sono stati sintetizzati e caratterizzati i relativi tre complessi biscarbenici di Ag(I) a struttura purinica **4a-c**
- Sono stati sintetizzati e caratterizzati dodici nuovi complessi ciclometallati di Pd(II) **5a-8c** mediante reazione di transmetallazione
- È stata determinata l'attività citotossica esercitata da tutti i complessi ciclopalladati nei confronti delle linee cellulari di cancro ovarico A2780 (*cisplatino* sensibile) e A2780*cis* (*cisplatino* resistente)
- Sulla base dei simili valori di IC_{50} ottenuti nei confronti delle due diverse linee tumorali è stato possibile concludere che verosimilmente il meccanismo d'azione dei nuovi complessi palladaciclopentadienilici sia diverso da quello del *cisplatino*
- È stata evidenziata una correlazione tra l'attività citotossica dei complessi ciclopalladati ed una loro caratteristica strutturale; sembra, infatti, che i complessi meno ingombrati, vale a dire i misti contenenti NHC / PTA e NHC / DIC, siano più efficienti rispetto a quelli stericamente più congestionati come i misti con NHC / PPh_3 e i complessi biscarbenici, prescindendo invece dalle loro caratteristiche elettroniche. Questo fatto potrebbe indurre a pensare che i complessi palladaciclopentadienilici utilizzati in questo lavoro agiscano da composti strutturali [18].

In prospettiva, al fine di ottenere una maggiore comprensione sull'attività di questi complessi ciclometallati di Pd(II), andrà avviata, nei casi più promettenti, una serie di analisi che permettano di individuare il *target* su cui essi esplicano la loro funzione ed il corrispondente meccanismo d'azione.

CAPITOLO 5

PARTE SPERIMENTALE

5.1 PARTE CHIMICA

5.1.1 SOLVENTI E REAGENTI

I solventi impiegati nelle sintesi dei complessi e dei precursori, ad eccezione del metanolo, sono stati preventivamente ed accuratamente anidrificati.

In particolare, sia il diclorometano che l'acetonitrile sono stati distillati su calcio idruro, mentre l'acetone è stato ottenuto in forma anidra per trattamento a refluxo su setacci molecolari 4A.

Le basi naturali di partenza caffeina, teobromina e teofillina, i leganti utilizzati nella sintesi dei complessi, i reagenti usati nella sintesi dei precursori e i solventi deuterati indispensabili per le caratterizzazioni NMR sono prodotti disponibili commercialmente o già presenti nel laboratorio presso il quale ho svolto il periodo di tirocinio.

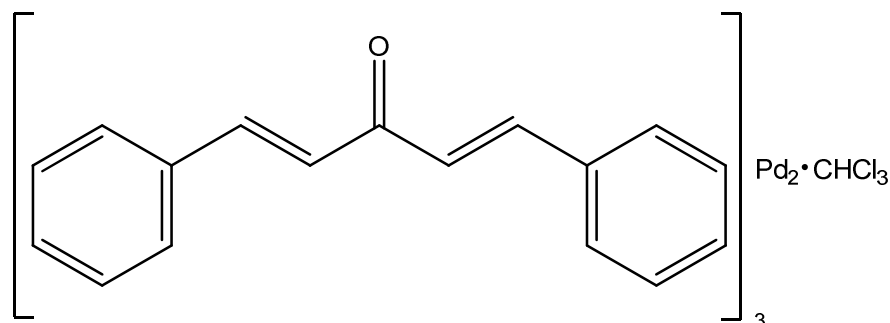
Tali composti sono stati impiegati come tali, senza ulteriori purificazioni.

5.1.2. STRUMENTAZIONE

- Gli spettri ^1H , ^{13}C , ^{31}P -NMR e gli spettri bidimensionali sono stati ottenuti con spettrometri NMR Bruker® Advance 400 e NMR Bruker® Advance 300
- Gli spettri IR sono stati acquisiti mediante spettrofotometro FT-IR Perkin Elmer Spectrum One, impiegando campioni dispersi in pastiglie di KBr
- Le strutture ai raggi X sono state risolte dal Dr. Nicola Demitri presso il Sincrotrone di Trieste
- Le analisi ESI-MS sono state effettuate dal gruppo del Prof. Paolo Sgarbossa (Università degli studi di Padova).

5.1.3. SINTESI DEI PRECURSORI DI PALLADIO

Sintesi del composto $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3 \cdot \text{CHCl}_3$



In un pallone da 500 mL sono stati introdotti 4.610 g (19.68 mmol) di dibenzilidenacetone (DBA), 3.960 g (48.28 mmol) di acetato di sodio e 150 mL di metanolo.

La miscela così preparata è stata scaldata alla temperatura di 50 °C fino a completa dissoluzione dei reagenti, ottenendo in questo modo una soluzione limpida di colore giallo.

Sono stati quindi aggiunti 1.090 g (6.147 mmol) di PdCl_2 ed il sistema è stato lasciato in agitazione, sempre a 50 °C, per circa quattro ore, osservando la progressiva dissoluzione del cloruro di palladio (solido marrone) e la formazione di un precipitato di colore viola costituito da $\text{Pd}(\text{DBA})_2$.

Dopo aver lasciato raffreddare il pallone ed averlo tenuto in frigorifero per una notte, il prodotto ottenuto è stato separato per filtrazione su gooch, lavato con più aliquote di acqua (per eliminare tracce di acetato di sodio residuo) e, velocemente, con acetone freddo (per purificarlo da eventuali tracce di DBA).

Il solido è stato quindi asciugato sotto vuoto a temperatura ambiente.

Sono stati ottenuti 3.450 g di $\text{Pd}(\text{DBA})_2$ corrispondenti ad una resa del 98%.

Il prodotto solido è stato ridissolto a caldo in cloroformio all'interno del gooch, ottenendo una soluzione viola che è stata raccolta in un pallone da 1000 mL precedentemente scaldato.

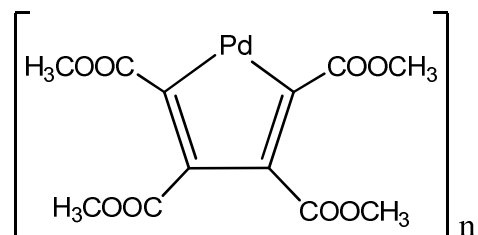
La precipitazione controllata del complesso finale $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ è stata indotta per lenta diffusione di circa 300 mL di dietilere e raffreddamento in frigorifero per 24 ore.

Il prodotto è stato separato per filtrazione, lavato ripetutamente con dietilere ed infine asciugato in essiccatore.

Sono stati sintetizzati 2.552 g di $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3 \cdot \text{CHCl}_3$, pari ad una resa dell'80%.

IR (KBr): $\nu_{\text{CO}} = 1614 \text{ cm}^{-1}$

Sintesi del precursore polimerico $[\text{PdC}_4(\text{COOCH}_3)_4]_n$



All'interno di un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera inerte di argon, sono stati posti 399.0 mg di $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (0.3855 mmol) in 30 mL di acetone anidro.

Sono stati quindi aggiunti 300 μL di dimetilacetilendicarbossilato (2.44 mmol) e la miscela così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per un'ora, fino ad ottenere una soluzione gialla.

Eventuali residui solidi di palladio metallico, unitamente alla piccola quantità di carbone attivo aggiunta alla miscela di reazione, sono stati rimossi mediante filtrazione su celite.

A questo punto la miscela di reazione è stata ridotta a piccolo volume al rotavapor e, dopo aggiunta di dietilere, si è osservata la precipitazione del prodotto polimerico di color arancione.

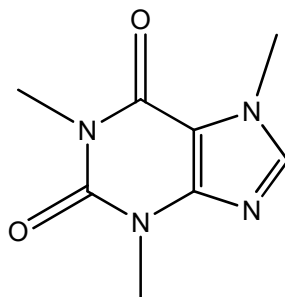
Il solido è stato filtrato su gooch, lavato ripetutamente con dietilere ed asciugato a temperatura ambiente sottovuoto.

Sono stati ottenuti 292.5 mg di ciclopalladato, corrispondenti ad una resa del 97%.

IR (KBr): $\nu_{\text{C=O}} = 1695 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C-O}} = 1228 \text{ cm}^{-1}$

5.1.4. BASI NATURALI XANTINICHE COMMERCIALI DI PARTENZA

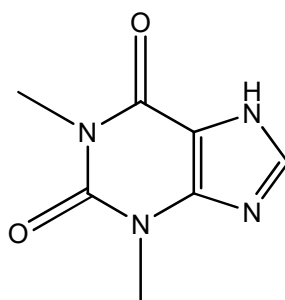
Caffeina o 1,3,7-trimetilxantina



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 3.32 (s, 3H, NCH_3), 3.50 (s, 3H, NCH_3), 3.94 (s, 3H, NCH_3), 7.48 (s, 1H, NCHN).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 27.8 (CH_3 , NCH_3), 29.7 (CH_3 , NCH_3), 33.5 (CH_3 , NCH_3), 107.5 (C, C^5), 141.4 (CH, N-CH-N), 148.6 (C, C^4), 151.6 (C, $\text{C}=\text{O}$), 155.3 (C, $\text{C}=\text{O}$).

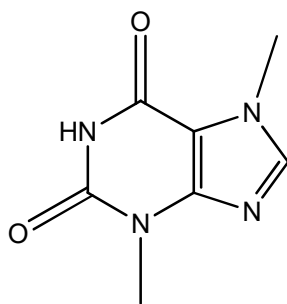
Teofillina o 1,3-dimetilxantina



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 3.52 (s, 3H, NCH_3), 3.69 (s, 3H, NCH_3), 7.87 (s, 1H, NCHN), 12.68 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 28.5 (CH_3 , NCH_3), 30.3 (CH_3 , NCH_3), 106.9 (C, C^5), 140.2 (CH, N-CH-N), 149.0 (C, C^4), 151.5 (C, $\text{C}=\text{O}$), 156.2 (C, $\text{C}=\text{O}$).

Teobromina o 3,7-dimetilxantina

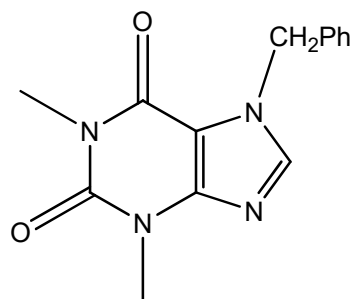


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , T = 298K, ppm) δ : 3.34 (s, 3H, NCH_3), 3.85 (s, 3H, NCH_3), 7.98 (s, 1H, NCHN), 11.09 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- d_6 , T = 298K, ppm) δ : 28.9 (CH_3 , NCH_3), 33.5 (CH_3 , NCH_3), 107.6 (C, C^5), 143.2 (CH, N-CH-N), 150.3 (C, C^4), 151.5 (C, C=O), 155.4 (C, C=O).

5.1.5. FUNZIONALIZZAZIONE DELLE BASI XANTINICHE

Sintesi della 7-benzil-1,3-dimetilxantina (**1b**)



In un pallone da 250 mL sono stati inseriti 1.18 g di teofillina (6.55 mmol) e 1.38 g di K_2CO_3 (9.93 mmol) in 20 mL di DMF.

Sono stati aggiunti 2.26 g di benzilbromuro (1.6 mL, 13.1 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione per una notte.

Successivamente sono stati aggiunti circa 100 mL di acqua distillata ottenendo la precipitazione del prodotto finale che è stato filtrato su gooch ed asciugato a temperatura ambiente sottovuoto.

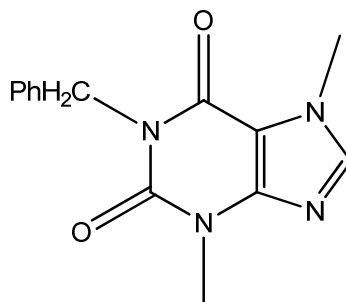
Sono stati ottenuti 1.64 g del composto **1b** corrispondenti ad una resa del 93%.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, T = 298K, ppm) δ : 3.43 (s, 3H, NCH_3), 3.60 (s, 3H, NCH_3), 5.52 (s, 2H, NCH_2), 7.30-7.40 (m, 5H, Ph), 7.58 (s, 1H, $NCHN$).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR ($CDCl_3$, T = 298K, ppm) δ : 28.0 (CH_3 , NCH_3), 29.8 (CH_3 , NCH_3), 50.3 (CH_2 , NCH_2), 107.0 (C, C^5), 128.0-135.4 (Ph), 140.9 (CH, N-CH-N), 148.9 (C, C^4), 151.7 (C, C=O), 155.3 (C, C=O).

ESI-MS (CH_3CN): m/z 271.06 $[M-H]^+$.

Sintesi dell'1-benzil-3,7-dimetilxantina (1c)



In un pallone da 250 mL sono stati inseriti 1.35 g di teobromina (7.47 mmol) e 1.58 g di K_2CO_3 (11.5 mmol) in 20 mL di DMF.

Sono stati aggiunti 2.58 g di benzilbromuro (1.8 mL, 14.9 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione per una notte.

Con un work-up analogo a quello descritto nella sintesi precedente, sono stati ottenuti 1.92 g del composto **1c** corrispondenti ad una resa del 95%.

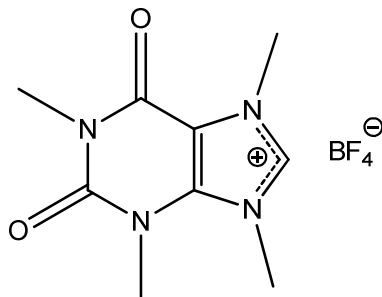
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, T = 298K, ppm) δ : 3.59 (s, 3H, NCH_3), 4.00 (s, 3H, NCH_3), 5.22 (s, 2H, NCH_2), 7.25-7.55 (m, 5H, Ph), 7.51 (s, 1H, $NCHN$).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR ($CDCl_3$, T = 298K, ppm) δ : 29.8 (CH_3 , NCH_3), 33.6 (CH_3 , NCH_3), 44.5 (CH_2 , NCH_2), 107.7 (C, C^5), 127.5-137.3 (Ph), 141.5 (CH, N-CH-N), 148.9 (C, C^4), 151.6 (C, C=O), 155.3 (C, C=O).

ESI-MS (CH_3CN): m/z 271.14 $[M-H]^+$.

5.1.6. SINTESI DEI SALI D'IMIDAZOLIO A STRUTTURA PURINICA

Sintesi del sale d'imidazolio 2a



In un pallone da 100 mL sono stati disciolti 1.12 g di caffeina (5.77 mmol) in circa 40 mL di acetonitrile anidro. A tale soluzione sono stati addizionati 1.02 g (6.92 mmol) di Me_3OBF_4 . Dopo aver mantenuto in costante agitazione la soluzione per circa 30 minuti sono stati aggiunti circa 800 μL di trietilammina (5.75 mmol).

Il prodotto grezzo è ottenuto per rimozione completa del solvente al rotavapor e trasferimento su gooch. Il composto finale viene purificato lavandolo con 3-4 aliquote di diclorometano.

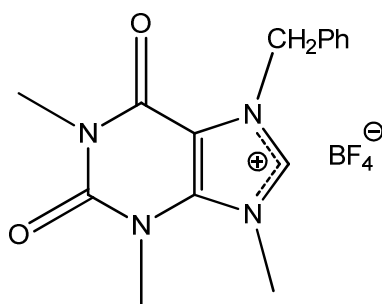
Sono stati ottenuti 1.25 g del composto **2a** pari ad una resa del 73%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN , T = 298K, ppm) δ : 3.35 (s, 3H, NCH_3), 3.74 (s, 3H, NCH_3), 4.08 (s, 6H, 2NCH_3), 8.47 (s, 1H, NCHN).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CD_3CN , T=298K, ppm) δ : 28.7 (CH_3 , NCH_3), 31.8 (CH_3 , NCH_3), 36.3 (CH_3 , NCH_3), 37.6 (CH_3 , NCH_3), 109.1 (C, C^5), 139.3 (CH, N-CH-N), 140.2 (C, C^4), 151.1 (C, C=O), 154.2 (C, C=O).

ESI-MS (CH_3CN): m/z 209.07 $[\text{M}]^+$.

Sintesi del sale d'imidazolio 2b



In un pallone da 100 mL sono stati disciolti 1.60 g del composto **1b** (5.92 mmol) in circa 40 mL di acetonitrile anidro. A tale soluzione sono stati addizionati 1.04 g (7.03 mmol) di Me₃OBF₄. Dopo aver mantenuto sotto agitazione la soluzione per circa 30 minuti sono stati aggiunti circa 800 µL di trietilammina (5.75 mmol).

Il prodotto grezzo è ottenuto per rimozione completa del solvente al rotavapor e trasferimento su gooch. Il composto finale viene purificato lavandolo con 3-4 aliquote di una miscela etere dietilico/diclorometano (1:1).

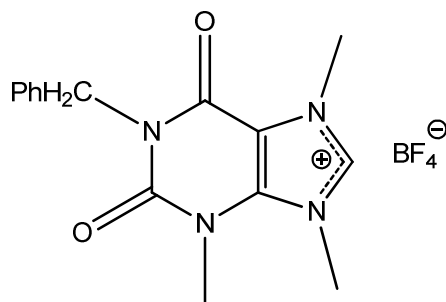
Sono stati ottenuti 1.70 g del composto **2b** pari ad una resa del 77%.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN, T = 298K, ppm) δ: 3.33 (s, 3H, NCH₃), 3.73 (s, 3H, NCH₃), 4.06 (s, 3H, NCH₃), 5.70 (s, 2H, NCH₂), 7.45-7.48 (m, 5H, Ph), 8.56 (s, 1H, NCHN).

¹³C{¹H}-NMR (CD₃CN, T = 298K, ppm) δ: 28.8 (CH₃, NCH₃), 31.8 (CH₃, NCH₃), 37.9 (CH₃, NCH₃), 52.7 (CH₂, NCH₂), 108.4 (C, C⁵), 129.2-133.9 (Ph), 138.9 (CH, N-CH-N), 140.6 (C, C⁴), 151.0 (C, C=O), 154.0 (C, C=O).

ESI-MS (CH₃CN): m/z 285.04 [M]⁺.

Sintesi del sale d'imidazolio 2c



In un pallone da 100 mL sono stati disciolti 1.21 g del composto **1c** (4.48 mmol) in circa 40 mL di acetonitrile anidro. A tale soluzione sono stati addizionati 787 mg (5.32 mmol) di Me_3OBF_4 . Dopo aver mantenuto sotto agitazione la soluzione per circa 30 minuti sono stati aggiunti circa 800 μL di trietilammina (5.75 mmol).

Il prodotto grezzo è ottenuto per rimozione completa del solvente al rotavapor e trasferimento su gooch. Il composto finale viene purificato lavandolo con 3-4 aliquote di una miscela etere dietilico/diclorometano (1:1).

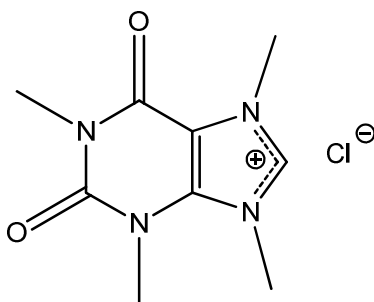
Sono stati ottenuti 1.27 g del composto **2c** pari ad una resa del 76%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 3.74 (s, 3H, NCH_3), 4.08 (s, 3H, NCH_3), 4.09 (s, 3H, NCH_3), 5.17 (s, 2H, NCH_2), 7.28-7.42 (m, 5H, Ph), 8.48 (s, 1H, NCHN).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (CD_3CN , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 31.9 (CH_3 , NCH_3), 36.4 (CH_3 , NCH_3), 37.6 (CH_3 , NCH_3), 45.6 (CH_2 , NCH_2), 109.2 (C, C^5), 128.3-137.1 (Ph), 139.4 (CH, N-CH-N), 140.5 (C, C^4), 151.0 (C, C=O), 154.1 (C, C=O).

ESI-MS (CH_3CN): m/z 285.11 $[\text{M}]^+$

Sintesi del sale d'imidazolio **3a**



In un pallone da 250 mL dotato di ancoretta magnetica, sono stati sciolti 356.2 mg (1.203 mmol) del composto **2a** in 100 mL di acqua distillata.

A questa soluzione sono stati aggiunti 503.9 mg (1.203 mmol) di AsPh_4Cl , osservando istantaneamente la formazione di un precipitato bianco flocculento costituito da AsPh_4BF_4 , conseguenza dell'avvenuta reazione di scambio dell'anione a temperatura ambiente. Dopo aver comunque lasciato la miscela di reazione sotto vigorosa agitazione per circa 30 minuti, il precipitato è stato rimosso mediante filtrazione su millipore ottenendo una soluzione limpida contenente il prodotto desiderato.

Dopo aver tirato a secco con evaporatore rotante (mantenendo la temperatura del bagno non oltre i 50 °C) il residuo è stato ripreso con 20 mL di diclorometano e successivamente filtrato su gooch.

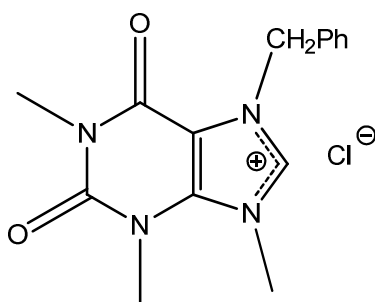
Il prodotto, ottenuto come solido bianco, è stato asciugato a temperatura ambiente in essiccatore. Sono stati ottenuti 293.3 mg del composto **3a**, corrispondenti ad una resa del 99%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN , T = 298K, ppm) δ : 3.34 (s, 3H, NCH_3), 3.75 (s, 3H, NCH_3), 4.13 (s, 3H, NCH_3), 4.21 (s, 3H, NCH_3), 10.03 (s, 1H, NCHN).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (CD_3CN , T = 298K, ppm) δ : 28.6 (CH_3 , NCH_3), 31.8 (CH_3 , NCH_3), 36.2 (CH_3 , NCH_3), 37.5 (CH_3 , NCH_3), 108.8 (C, C^5), 140.1 (C, C^4), 140.4 (CH, N-CH-N), 151.1 (C, $\text{C}=\text{O}$), 154.2 (C, $\text{C}=\text{O}$).

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1719 \text{ cm}^{-1}$, 1675 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}-\text{O}} = 1304 \text{ cm}^{-1}$, 1264 cm^{-1}

Sintesi del sale d'imidazolio **3b**



In un pallone da 250 mL dotato di ancorotta magnetica, sono stati sciolti 400.4 mg (1.076 mmol) del composto **2b** in 200 mL di acqua distillata.

A questa soluzione sono stati aggiunti 450.6 mg (1.076 mmol) di AsPh₄Cl, osservando istantaneamente la precipitazione di un solido bianco flocculento costituito da AsPh₄BF₄, a testimonianza dell'avvenuta reazione di scambio dell'anione a temperatura ambiente.

Dopo aver comunque lasciato la miscela di reazione sotto vigorosa agitazione per circa 30 minuti, il precipitato è stato rimosso mediante filtrazione su millipore ottenendo una soluzione limpida contenente il prodotto desiderato.

Dopo aver tirato a secco con evaporatore rotante (mantenendo la temperatura del bagno non oltre i 50 °C) il residuo è stato ripreso con 20 mL di diclorometano e successivamente filtrato su gooch.

Dopo aver effettuato una serie di lavaggi con dietilere, il prodotto, ottenuto sotto forma di solido bianco, è stato asciugato a temperatura ambiente in essiccatore.

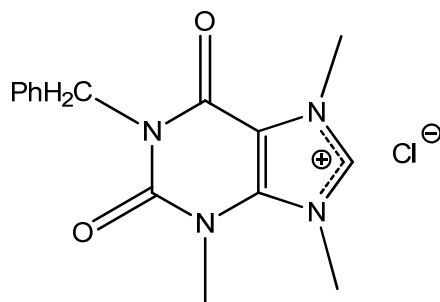
Sono stati ottenuti 343.4 mg del composto **3b**, corrispondenti ad una resa del 98%.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN, T = 298K, ppm) δ: 3.33 (s, 3H, NCH₃), 3.73 (s, 3H, NCH₃), 4.10 (s, 3H, NCH₃), 5.72 (s, 2H, NCH₂), 7.44-7.50 (m, 5H, Ph), 8.92 (s, 1H, NCHN).

¹³C {¹H}-NMR (CD₃CN, T = 298K, ppm) δ: 28.2 (CH₃, NCH₃), 31.2 (CH₃, NCH₃), 37.3 (CH₃, NCH₃), 52.0 (CH₂, NCH₂), 107.8 (C, C⁵), 128.6-133.4 (Ph), 138.6 (CH, NCHN), 140.0 (C, C⁴), 150.4 (C, C=O), 153.4 (C, C=O).

IR (KBr): ν_{C=O} = 1717 cm⁻¹, 1671 cm⁻¹, ν_{C-O} = 1267 cm⁻¹

Sintesi del sale d'imidazolio 3c



In un pallone da 250 mL dotato di ancoretta magnetica, sono stati sciolti 351.2 mg (0.9438 mmol) del composto **2c** in 200 mL di acqua distillata.

A questa soluzione sono stati aggiunti 395.2 mg (0.9438 mmol) di AsPh_4Cl , osservando istantaneamente la precipitazione di un solido bianco flocculento costituito da AsPh_4BF_4 , a conferma dell'avvenuta reazione di scambio dell'anione a temperatura ambiente.

Dopo aver comunque lasciato la miscela di reazione sotto vigorosa agitazione per circa 30 minuti, il precipitato è stato rimosso mediante filtrazione su millipore ottenendo una soluzione limpida contenente il prodotto desiderato.

Dopo aver tirato a secco con evaporatore rotante (mantenendo la temperatura del bagno non oltre i 50 °C) il residuo è stato ripreso con 20 mL di diclorometano e successivamente filtrato su gooch.

Dopo aver effettuato una serie di lavaggi con dietiletere, il prodotto, ottenuto sotto forma di solido bianco, è stato asciugato a temperatura ambiente in essiccatore.

Sono stati ottenuti 302.1 mg del composto **3c**, corrispondenti ad una resa del 99%.

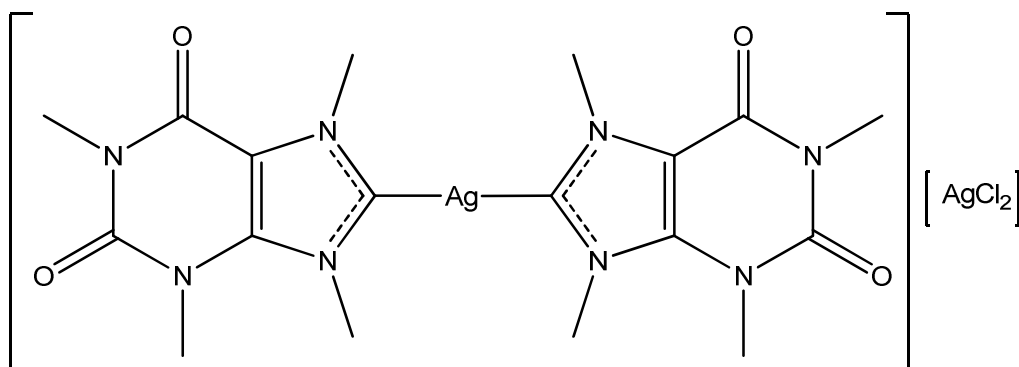
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN , T = 298K, ppm) δ : 3.73 (s, 3H, NCH_3), 4.09 (s, 3H, NCH_3), 4.10 (s, 3H, NCH_3), 5.16 (s, 2H, NCH_2), 7.33-7.39 (m, 5H, Ph), 8.82 (s, 1H, NCHN).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (CD_3CN , T = 298K, ppm) δ : 31.3 (CH_3 , NCH_3), 35.8 (CH_3 , NCH_3), 37.0 (CH_3 , NCH_3), 45.0 (CH_2 , NCH_2), 108.6 (C, C^5), 127.7-136.5 (Ph), 139.0 (CH, NCHN), 139.8 (C, C^4), 150.4 (C, $\text{C}=\text{O}$), 153.5 (C, $\text{C}=\text{O}$).

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1722 \text{ cm}^{-1}$, 1674 cm^{-1}

5.1.7. SINTESI DEI COMPLESSI D'ARGENTO (I) A STRUTTURA PURINICA

Sintesi del complesso 4a



In un pallone codato da 100 mL, sotto atmosfera inerte di argon, 142.5 mg (0.5824 mmol) del sale d'imidazolio **3a** sono stati sciolti in 35 mL di acetonitrile anidro

Alla soluzione sono stati aggiunti 74.23 mg (0.3203 mmol) di Ag_2O e la miscela di reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione al buio per circa 4 ore, durante le quali si è potuta osservare la progressiva formazione di un precipitato bianco flocculento.

Trascorso questo periodo di tempo il solido è stato filtrato su gooch, trasferito in un pallone da 250 mL e ripreso con 200 mL di diclorometano, facilitandone la solubilizzazione mediante bagno ad ultrasuoni.

Tale miscela è stata filtrata su millipore per eliminare l'eccesso di Ag_2O e ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante.

La precipitazione del prodotto finale è ottenuta per aggiunta di dietilere e dopo filtrazione su gooch il solido bianco è asciugato a temperatura ambiente sottovuoto.

Sono stati ottenuti 121.4 mg del composto **4a**, pari ad una resa del 60%.

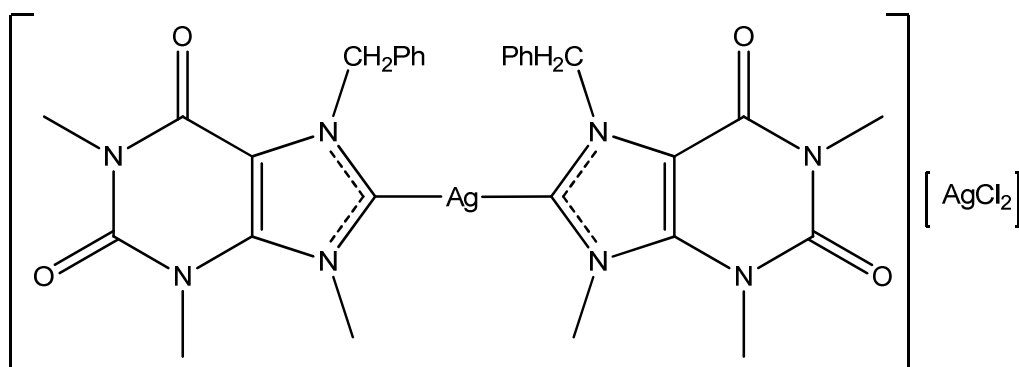
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2 , T = 298K, ppm) δ : 3.41 (s, 6H, 2NCH₃), 3.84 (s, 6H, 2NCH₃), 4.17 (s, 6H, 2NCH₃), 4.24 (s, 6H, 2NCH₃).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (d^6 -DMSO, T = 298K, ppm) δ : 28.7 (CH₃, NCH₃), 31.2 (CH₃, NCH₃), 32.0 (CH₃, NCH₃), 38.3 (CH₃, NCH₃), 109.3 (C, C⁵), 140.9 (C, C⁴), 151.0 (C, C=O), 153.7 (C, C=O), 207.0 (C, carbene).

ESI-MS (CH_3CN): m/z 525.04 [$\text{Ag}(\text{NHC})_2$]⁺.

IR (KBr): $\nu_{\text{C=O}}$ = 1709 cm^{-1} , 1669 cm^{-1}

Sintesi del complesso **4b**



In un pallone codato da 100 mL, sotto atmosfera inerte di argon, sono stati sciolti 343.4 mg (1.071 mmol) del sale d'imidazolio **3b** in 40 mL di acetonitrile anidro.

Alla soluzione sono stati aggiunti 130.3 mg (0.5620 mmol) di Ag_2O e la miscela di reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione al buio per circa 4 ore, durante le quali si è potuta osservare la progressiva formazione di un precipitato bianco flocculento.

Trascorso questo periodo di tempo il solido è stato filtrato su gooch, trasferito in un pallone da 250 mL e ripreso con 200 mL di diclorometano, facilitandone la solubilizzazione mediante bagno ad ultrasuoni.

Tale miscela è stata filtrata su millipore per eliminare l'eccesso di Ag_2O e ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante.

La precipitazione del prodotto finale è ottenuta per aggiunta di dietilere e dopo filtrazione su gooch il solido bianco è asciugato a temperatura ambiente sottovuoto.

Sono stati ottenuti 306.9 mg di **4b**, pari ad una resa del 67%.

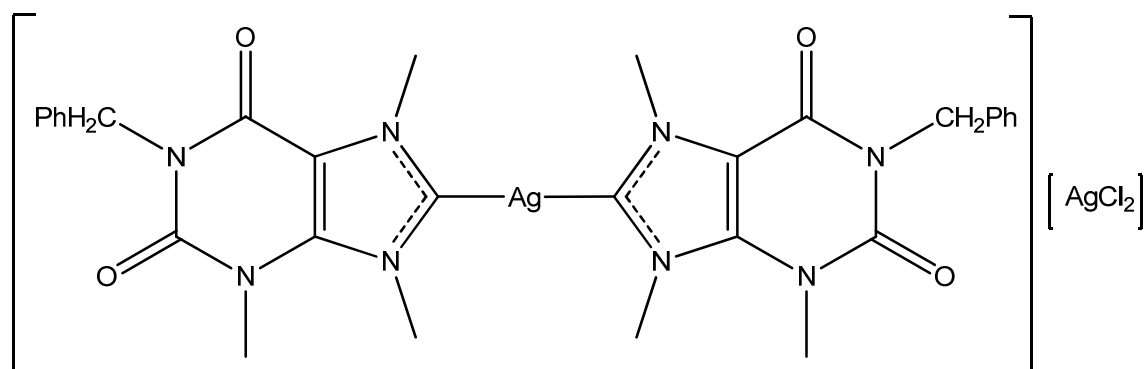
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 3.31 (s, 6H, 2NCH₃), 3.73 (s, 6H, 2NCH₃), 4.16 (s, 6H, 2NCH₃), 5.62 (s, 4H, 2NCH₂), 7.20-7.41 (m, 10H, 2Ph).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 28.8 (CH₃, NCH₃), 32.0 (CH₃, NCH₃), 40.1 (CH₃, NCH₃), 54.1 (CH₂, NCH₂), 109.1 (C, C⁵), 128.3-135.5 (Ph), 140.3 (C, C⁴), 150.6 (C, C=O), 153.1 (C, C=O), 188.1 (C, carbene).

ESI-MS (CH_3CN): m/z 677.11 [$\text{Ag}(\text{NHC})_2$]⁺.

IR (KBr): $\nu_{\text{C=O}}$ = 1713 cm^{-1} , 1673 cm^{-1}

Sintesi del complesso 4c



In un pallone codato da 100 mL, sotto atmosfera inerte di argon, sono stati sciolti 134.1 mg (0.4181 mmol) del sale d'imidazolio **3c** in 35 mL di acetonitrile anidro.

Alla soluzione sono stati aggiunti 50.86 mg (0.2195 mmol) di Ag₂O e la miscela di reazione è stata lasciata sotto vigorosa agitazione al buio per circa 4 ore, durante le quali si è potuta osservare la progressiva formazione di un precipitato bianco flocculento.

Trascorso questo periodo di tempo il solido è stato filtrato su gooch, trasferito in un pallone da 250 mL e ripreso con 200 mL di diclorometano, facilitandone la solubilizzazione mediante bagno ad ultrasuoni.

Tale miscela è stata filtrata su millipore per eliminare l'eccesso di Ag₂O e ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante.

La precipitazione del prodotto finale è ottenuta per aggiunta di dietilere; dopo filtrazione su gooch il solido bianco è asciugato a temperatura ambiente sottovuoto.

Sono stati ottenuti 124.9 mg di **4c**, pari ad una resa del 70%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 3.83 (s, 6H, 2NCH₃), 4.15 (s, 6H, 2NCH₃), 4.19 (s, 6H, 2NCH₃), 5.19 (s, 4H, 2NCH₂), 7.29-7.50 (m, 10H, 2Ph).

¹³C {¹H}-NMR (d⁶-DMSO, T = 298K, ppm) δ: 31.2 (CH₃, NCH₃), 32.1 (CH₃, NCH₃), 38.3 (CH₂, NCH₂), 109.3 (C, C⁵), 127.7-137.3 (Ph), 141.3 (C, C⁴), 150.9 (C, C=O), 153.5 (C, C=O), 206.9 (C, carbene).

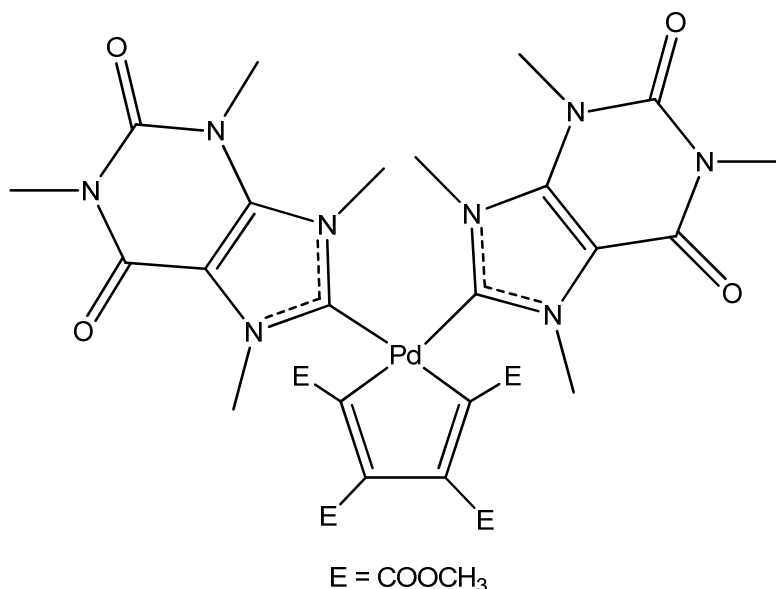
ESI-MS (CH₃CN): m/z 677.08 [Ag(NHC)₂]⁺.

IR (KBr): ν_{C=O} = 1711 cm⁻¹, 1674 cm⁻¹

5.1.8. SINTESI DEI COMPLESSI PALLADACICLOPENTADIENILICI A STRUTTURA PURINICA

5.1.8.1. SINTESI DEI COMPLESSI BISCARBENICI

Sintesi del complesso 5a



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 18.2 mg (0.0466 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 27.3 mg del complesso **4a** (0.0388 mmol) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitarne il processo di solubilizzazione.

La sospensione ottenuta è stata trasferita mediante pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla precipitazione di argento cloruro.

Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione limpida di colore giallo è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il prodotto, dopo essere stato filtrato su gooch, lavato con dietilere e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

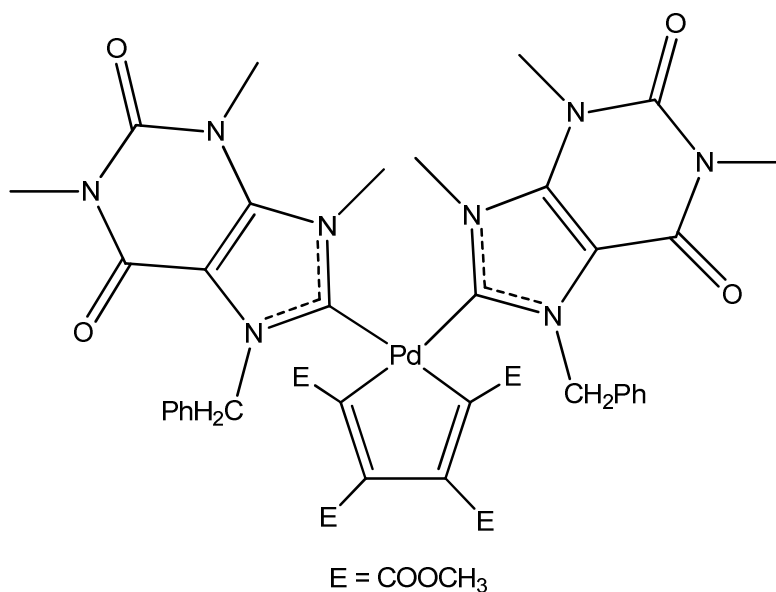
Sono stati ottenuti 21.3 mg del complesso **5a** corrispondenti ad una resa del 70%.

^1H -NMR (400 MHz, CD_2Cl_2 , T = 298K, ppm) δ : 3.30 (s, 12H, 4 OCH₃), 3.36 (s, 12H, 4NCH₃), 3.61 (s, 12H, 4 OCH₃), 3.78 (s, 6H, 2NCH₃), 3.79 (s, 6H, 2NCH₃), 4.11 (s, 6H, 2NCH₃), 4.15 (s, 6H, 2NCH₃), 4.32 (s, 6H, 2NCH₃), 4.34 (s, 6H, 2NCH₃).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CD_2Cl_2 , T = 298K, ppm) δ : 28.3 (CH₃, NCH₃), 31.8 (CH₃, NCH₃), 37.2 (CH₃, NCH₃), 37.4 (CH₃, NCH₃), 39.2 (CH₃, NCH₃), 39.3 (CH₃, NCH₃), 50.6 (CH₃, OCH₃), 51.0 (CH₃, OCH₃), 109.8 (C, C⁵), 140.5 (C, C⁴), 144.6 (C, C-COOCH₃), 150.6 (C, C=O), 153.0 (C, C=O), 164.8 (C, COOCH₃), 164.9 (C, COOCH₃), 167.1 (C, C-COOCH₃), 167.2 (C, C-COOCH₃), 175.7 (C, COOCH₃), 175.9 (C, COOCH₃), 188.1 (C, carbene), 188.4 (C, carbene).

IR (KBr): $\nu_{\text{C=O}}$ = 1710 cm^{-1} , 1672 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-O}}$ = 1209 cm^{-1}

Sintesi del complesso 5b



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 19.4 mg (0.0497 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 35.4 mg del complesso **4b** (0.0414 mmol) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitarne la solubilizzazione. La sospensione ottenuta è stata trasferita mediante pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla precipitazione di argento cloruro.

Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione limpida di colore giallo è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il prodotto, dopo essere stato filtrato su gooch, lavato con dietilere e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

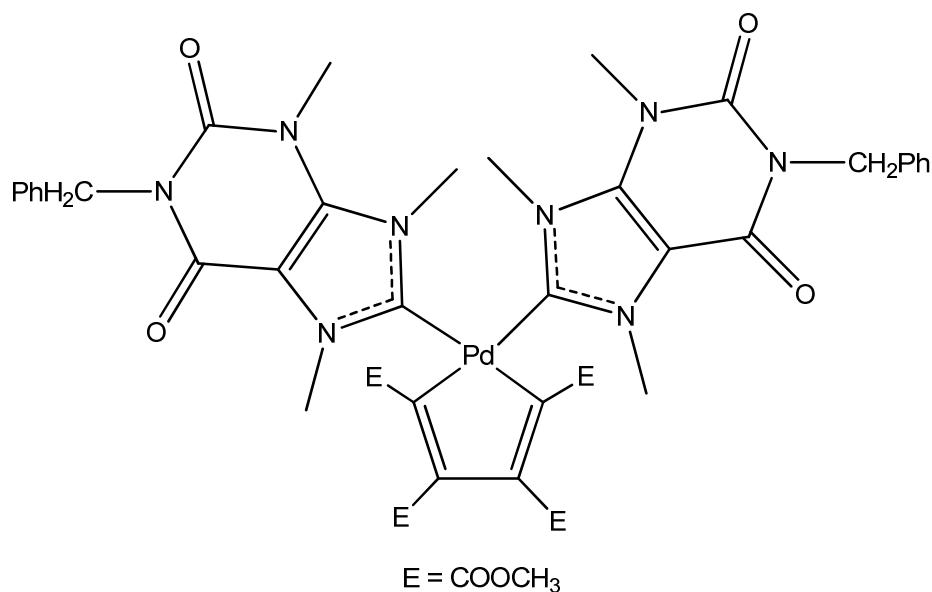
Sono stati ottenuti 36.3 mg del complesso **5b** corrispondenti ad una resa del 91%.

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂, T = 298K, ppm) δ: 3.27 (s, 12H, 4 OCH₃), 3.29 (s, 12H, 4NCH₃), 3.43 (s, 6H, 2NCH₃), 3.61 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.63 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.75 (s, 6H, 2NCH₃), 3.79 (s, 6H, 2NCH₃), 4.32 (s, 6H, 2NCH₃), 4.98 and 5.40 (AB system, 4H, J = 15.5 Hz, 2NCH₂), 5.77 and 5.85 (AB system, 4H, J = 16.3 Hz, 2NCH₂), 6.90-7.33 (m, 20H, 4Ph).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CD_2Cl_2 , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 28.3 (CH_3 , NCH_3), 31.5 (CH_3 , NCH_3), 31.9 (CH_3 , NCH_3), 38.4 (CH_3 , NCH_3), 39.4 (CH_3 , NCH_3), 50.6 (CH_3 , OCH_3), 51.0 (CH_3 , OCH_3), 52.7 (CH_2 , NCH_2), 109.0 (C, C^5), 109.5 (C, C^5), 125.1-136.7 (Ph), 140.7 (C, C^4), 140.8 (C, C^4), 145.1 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 145.2 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 150.4 (C, $\text{C}=\text{O}$), 150.5 (C, $\text{C}=\text{O}$), 152.3 (C, $\text{C}=\text{O}$), 164.8 (C, $\underline{\text{C}}$ $\underline{\text{O}}$ OCH_3), 165.1 (C, $\underline{\text{C}}$ $\underline{\text{O}}$ OCH_3), 166.7 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 167.1 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 175.4 (C, $\underline{\text{C}}$ $\underline{\text{O}}$ OCH_3), 188.6 (C, carbene), 189.1 (C, carbene).

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1710\text{ cm}^{-1}$, 1668 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}-\text{O}} = 1206\text{ cm}^{-1}$

Sintesi del complesso 5c



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 28.3 mg (0.0724 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 51.6 mg del complesso **4c** (0.0603 mmol) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitarne la solubilizzazione. La sospensione ottenuta è stata trasferita mediante pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla precipitazione di argento cloruro.

Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione limpida di colore giallo è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il prodotto, dopo essere stato filtrato su gooch, lavato con dietilere e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

Sono stati ottenuti 55.1 mg del complesso **5c** corrispondenti ad una resa dell'80%.

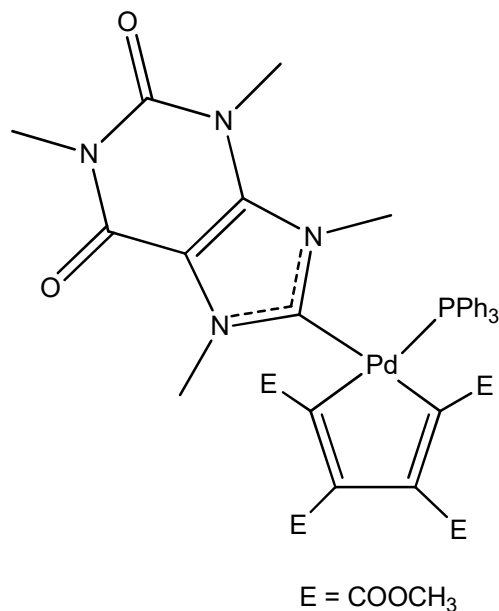
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 3.28 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.31 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.62 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.64 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.74 (s, 6H, 2NCH₃), 3.78 (s, 6H, 2NCH₃), 4.09 (s, 6H, 2NCH₃), 4.13 (s, 6H, 2NCH₃), 4.35 (s, 6H, 2NCH₃), 4.36 (s, 6H, 2NCH₃), 5.14 (m, 8H, 4NCH₂), 7.27-7.40 (m, 20H, 4Ph).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 31.9 (CH_3 , NCH_3), 32.0 (CH_3 , NCH_3), 37.4 (CH_3 , NCH_3), 37.6 (CH_3 , NCH_3), 39.4 (CH_3 , NCH_3), 39.6 (CH_3 , NCH_3), 45.1 (CH_2 , NCH_2), 50.8 (CH_3 , OCH_3), 51.3 (CH_3 , OCH_3), 109.9 (C, C^5), 127.9-136.3 (Ph), 140.7 (C, C^4), 140.8 (C, C^4), 145.0 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 145.3 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 150.4 (C, $\text{C}=\text{O}$), 152.9 (C, $\text{C}=\text{O}$), 165.0 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 165.2 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 166.6 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 166.9 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 176.1 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 176.2 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 188.3 (C, carbene), 189.1 (C, carbene).

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1709\text{ cm}^{-1}$, 1671 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}-\text{O}} = 1208\text{ cm}^{-1}$

5.1.8.2. SINTESI DEI COMPLESSI MISTI NHC / PPh₃

Sintesi del complesso 6a



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 27.9 mg (0.0713 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 21.8 mg (0.0310 mmol) del complesso **4a** e 17.1 mg (0.0651 mmol) di trifenilfosfina in 30 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per favorirne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita utilizzando una pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro. Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore in un pallone da 100 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

Sono stati ottenuti 50.9 mg del complesso **6a** pari ad una resa dell'83%.

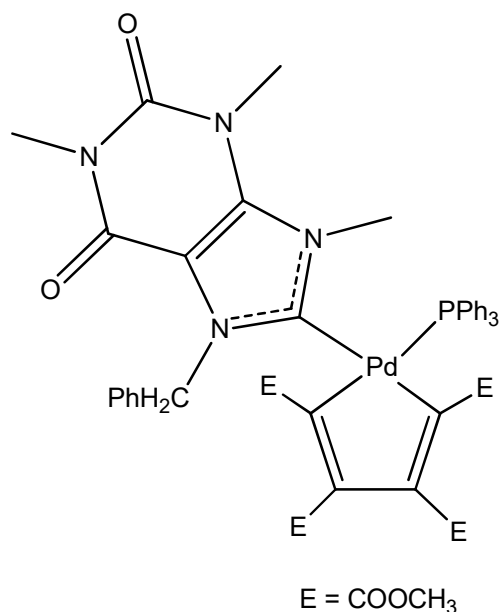
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T=298K, ppm) δ: 2.53 (s, 3H, OCH₃), 3.25 (s, 3H, OCH₃), 3.36 (s, 3H, NCH₃), 3.48 (s, 3H, NCH₃), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, NCH₃), 3.82 (s, 3H, NCH₃), 7.32-7.51 (m, 15H, 3Ph).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 28.6 (CH_3 , NCH_3), 31.5 (CH_3 , NCH_3), 36.6 (CH_3 , NCH_3), 38.2 (CH_3 , NCH_3), 50.0 (CH_3 , OCH_3), 50.8 (CH_3 , OCH_3), 51.2 (CH_3 , OCH_3), 51.3 (CH_3 , OCH_3), 109.7 (C, C^5), 128.3-134.1 (Ph), 140.2 (C, C^4), 145.9 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 5.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 148.8 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 7.0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 150.2 (C, $\text{C}=\text{O}$), 152.7 (C, $\text{C}=\text{O}$), 164.0-166.4 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 168.1 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 169.6 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 174.9 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 4.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 175.6 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 5.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 189.1 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 15.8$ Hz, carbene).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 26.1

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1730\text{ cm}^{-1} - 1692\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C-O}} = 1212\text{ cm}^{-1}$

Sintesi del complesso **6b**



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 26.7 mg (0.0689 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 26.5 mg (0.0310 mmol) del complesso **4b** e 16.3 mg (0.0622 mmol) di trifenilfosfina in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per favorirne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita utilizzando una pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro. Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore all'interno di un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

Sono stati ottenuti 55.2 mg del complesso **6b** pari ad una resa dell'86%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 2.56 (s, 3H, OCH₃), 3.04 (s, 3H, OCH₃), 3.38 (s, 3H, NCH₃), 3.46 (s, 3H, NCH₃), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, NCH₃), 5.40 and 5.50 (AB system, 2H, J = 14.2 Hz, NCH₂), 7.12-7.52 (m, 20H, 4Ph).

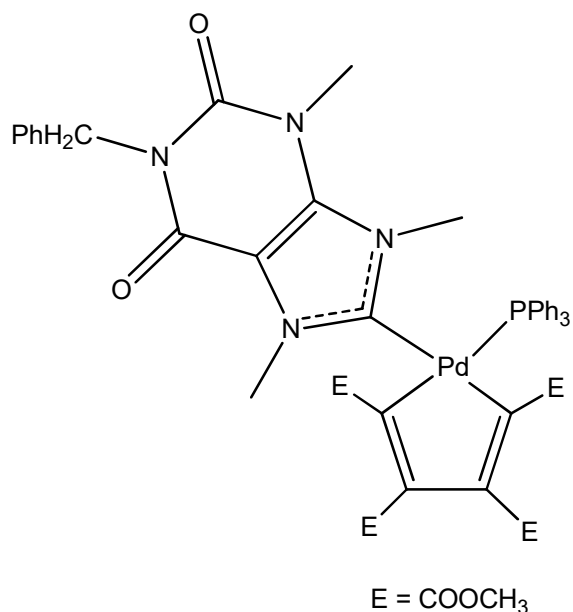
¹³C {¹H}-NMR (CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 28.7 (CH₃, NCH₃), 31.8 (CH₃, NCH₃), 39.0 (CH₃, NCH₃), 50.0 (CH₃, OCH₃), 50.9 (CH₃, OCH₃), 51.2 (CH₃, OCH₃), 51.3 (CH₃, OCH₃), 53.6 (CH₂,

NCH₂), 109.5 (C, C⁵), 128.2-134.7 (Ph), 140.9 (C, C⁴), 148.8 (d, C, J_{C-P}= 5.6 Hz, C-COOCH₃), 149.0 (d, C, J_{C-P}= 7.3 Hz, C-COOCH₃), 150.3 (C, C=O), 152.7 (C, C=O), 164.9-165.1 (C, COOCH₃), 166.0 (C, C-COOCH₃), 166.4 (C, C-COOCH₃), 174.5 (d, C, J_{C-P}= 5.2 Hz, COOCH₃), 174.9 (d, C, J_{C-P}= 6.4 Hz, COOCH₃), 189.4 (d, C, J_{C-P}= 15.5 Hz, carbene).

³¹P{¹H}-NMR (CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 25.1

IR (KBr): ν_{C=O} = 1710 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹, ν_{C-O} = 1208 cm⁻¹

Sintesi del complesso 6c



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 35.5 mg (0.0908 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 35.3 mg (0.0413 mmol) del complesso **4c** e 21.7 mg (0.0826 mmol) di trifenilfosfina in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitarne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita utilizzando una pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro. Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore all'interno di un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

Sono stati ottenuti 72.9 mg del complesso **6c** pari ad una resa dell'85%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 2.53 (s, 3H, OCH₃), 3.24 (s, 3H, OCH₃), 3.48 (s, 3H, NCH₃), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 6H, 2NCH₃), 5.08 and 5.13 (AB system, 2H, J = 14.5 Hz, NCH₂), 7.24-7.50 (m, 20H, 4Ph).

¹³C {¹H}-NMR (CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 31.6 (CH₃, NCH₃), 36.6 (CH₃, NCH₃), 38.3 (CH₃, NCH₃), 45.0 (CH₂, NCH₂), 49.9 (CH₃, OCH₃), 50.8 (CH₃, OCH₃), 51.2 (CH₃, OCH₃), 51.3 (CH₃,

OCH₃), 109.9 (C, C⁵), 128.0-136.5 (Ph), 140.1 (C, C⁴), 145.9 (d, C, J_{C-P} = 5.5 Hz, C-COOCH₃), 148.8 (d, C, J_{C-P} = 7.1 Hz, C-COOCH₃), 150.1 (C, C=O), 152.5 (C, C=O), 164.1-166.3 (C, COOCH₃), 168.1 (C, C-COOCH₃), 169.2 (C, C-COOCH₃), 174.3 (d, C, J_{C-P} = 5.5 Hz, COOCH₃), 175.6 (d, C, J_{C-P} = 5.5 Hz, COOCH₃), 189.4 (d, C, J_{C-P} = 16.0 Hz, carbene).

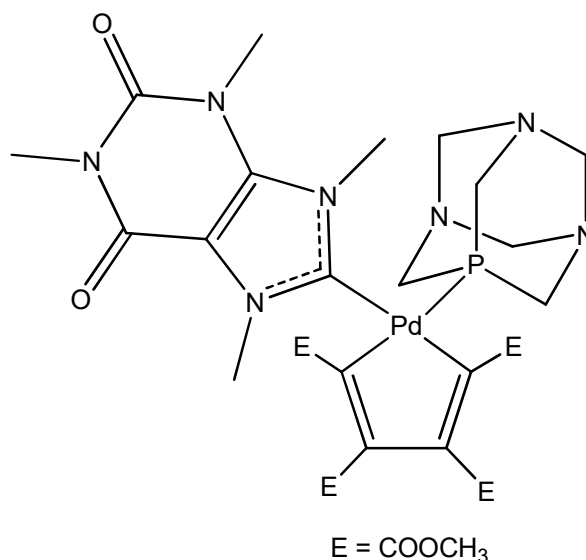
³¹P{¹H}-NMR (CDCl₃, T=298K, ppm) δ: 26.2

IR (KBr): ν_{C=O} = 1699 cm⁻¹, 1674 cm⁻¹, ν_{C-O} = 1205 cm⁻¹

5.1.8.3. SINTESI DEI COMPLESSI MISTI NHC / PTA

(PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano)

Sintesi del complesso 7a



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 57.8 mg (0.148 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro.

All'interno di una provetta sono stati posti 45.2 mg (0.0643 mmol) del complesso **4a** e 21.2 mg (0.135 mmol) di 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano (PTA) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per favorirne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita utilizzando una pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro. Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore marrone.

Sono stati ottenuti 101.9 mg del complesso **7a** pari ad una resa del 91%.

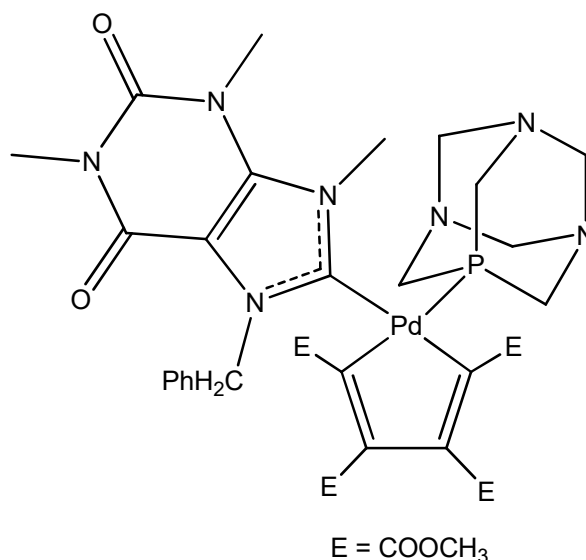
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 3.28 (s, 3H, OCH_3), 3.42 (s, 3H, NCH_3), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (s, 3H, NCH_3), 4.00 (d, 6H, J = 2.1 Hz, $3\text{NCH}_2\text{P}$), 4.04 (s, 3H, NCH_3), 4.20 (s, 3H, NCH_3), 4.49 (s, 6H, $3\text{NCH}_2\text{N}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 28.7 (CH_3 , NCH_3), 32.0 (CH_3 , NCH_3), 37.0 (CH_3 , NCH_3), 38.9 (CH_3 , NCH_3), 50.9 (CH_3 , OCH_3), 51.1 (d, CH_2 , $J_{\text{C-P}} = 10.2$ Hz, NCH_2P), 51.2 (CH_3 , OCH_3), 51.4 (CH_3 , OCH_3), 51.6 (CH_3 , OCH_3), 73.1 (d, CH_2 , $J_{\text{C-P}} = 6.4$ Hz, NCH_2N), 110.1 (C, C^5), 140.6 (C, C^4), 164.3-165.0 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 165.4 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 168.7 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 175.1 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 5.7$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 177.3 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 5.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 186.9 (d, C, $J_{\text{C-P}} = 18.4$ Hz, carbene).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : -64.8

IR (KBr): $\nu_{\text{C=O}} = 1711\text{ cm}^{-1}$, 1672 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-O}} = 1206\text{ cm}^{-1}$

Sintesi del complesso 7b



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 29.0 mg (0.074 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro.

All'interno di una provetta sono stati posti 27.6 mg (0.0323 mmol) del complesso **4b** e 11.2 mg (0.0710 mmol) di 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano (PTA) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitarne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita utilizzando una pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro. Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per aggiunta di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore marrone.

Sono stati ottenuti 55.6 mg del complesso **7b** pari ad una resa del 90%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 3.23 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (s, 9H, 3NCH₂P+NCH₃), 3.53 (s, 3H, OCH₃), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, NCH₃), 4.14 (s, 3H, NCH₃), 4.06 and 4.20 (AB system, 6H, J = 14.8 Hz, 3NCH₂N), 5.19 and 6.02 (AB system, 2H, J = 13.4 Hz, NCH₂), 7.34-7.44 (m, 5H, Ph).

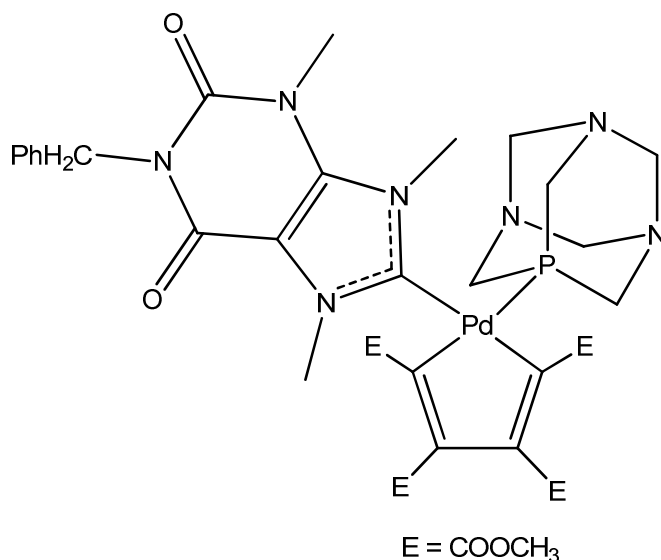
¹³C {¹H}-NMR (CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 28.8 (CH₃, NCH₃), 32.2 (CH₃, NCH₃), 39.3 (CH₃, NCH₃), 50.1 (d, CH₂, J_{C-P} = 10.0 Hz, NCH₂P), 51.0 (CH₃, OCH₃), 51.3 (CH₃, OCH₃), 51.4 (CH₃,

OCH₃), 51.6 (CH₃, OCH₃), 52.8 (CH₂, NCH₂), 72.7 (d, CH₂, J_{C-P} = 6.5 Hz, NCH₂N), 110.1 (C, C⁵), 128.6-136.5 (Ph), 140.6 (C, C⁴), 164.7-165.2 (C, COOCH₃), 166.6 (C, C-COOCH₃), 167.7 (C, C-COOCH₃), 175.1 (d, C, J_{C-P} = 5.5 Hz, COOCH₃), 177.3 (d, C, J_{C-P} = 5.9 Hz, COOCH₃), 188.0 (d, C, J_{C-P} = 17.5 Hz, carbene).

³¹P{¹H}-NMR (CDCl₃, T=298K, ppm) δ: -66.7

IR (KBr): ν_{C=O} = 1709 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹, ν_{C-O} = 1242 cm⁻¹, 1207cm⁻¹

Sintesi del complesso 7c



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 28.7 mg (0.074 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro.

All'interno di una provetta sono stati posti 28.6 mg (0.0334 mmol) del complesso **4c** e 10.5 mg (0.0669 mmol) di 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano (PTA) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitarne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita utilizzando una pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro. Dopo un'ora di reazione a temperatura ambiente, la miscela è stata filtrata su millipore all'interno di un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per addizione di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore marrone.

Sono stati ottenuti 56.4 mg del complesso **7c** pari ad una resa del 92%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ : 3.24 (s, 3H, OCH₃), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, NCH₃), 4.00 (d, 6H, J = 2.0 Hz, 3NCH₂P), 4.04 (s, 3H, NCH₃), 4.20 (s, 3H, NCH₃), 4.48 (s, 6H, 3NCH₂N), 5.18 (s, 2H, NCH₂), 7.32-7.50 (m, 5H, Ph).

¹³C {¹H}-NMR (CDCl₃, T = 298K, ppm) δ : 32.0 (CH₃, NCH₃), 37.0 (CH₃, NCH₃), 39.0 (CH₃, NCH₃), 45.3 (CH₂, NCH₂), 50.9 (CH₃, OCH₃), 51.1 (d, CH₂, J_{C-P} = 10.3 Hz, NCH₂P), 51.3 (CH₃,

OCH₃), 51.4 (CH₃, OCH₃), 51.6 (CH₃, OCH₃), 73.1 (d, CH₂, J_{C-P} = 6.4 Hz, NCH₂N), 110.1 (C, C⁵), 128.0-136.2 (Ph), 140.8 (C, C⁴), 163.6-164.3 (C, COOCH₃), 165.4 (C, C-COOCH₃), 168.9 (C, C-COOCH₃), 175.1 (d, C, J_{C-P} = 5.5 Hz, COOCH₃), 177.3 (d, C, J_{C-P} = 5.7 Hz, COOCH₃), 186.0 (d, C, J_{C-P} = 18.7 Hz, carbene).

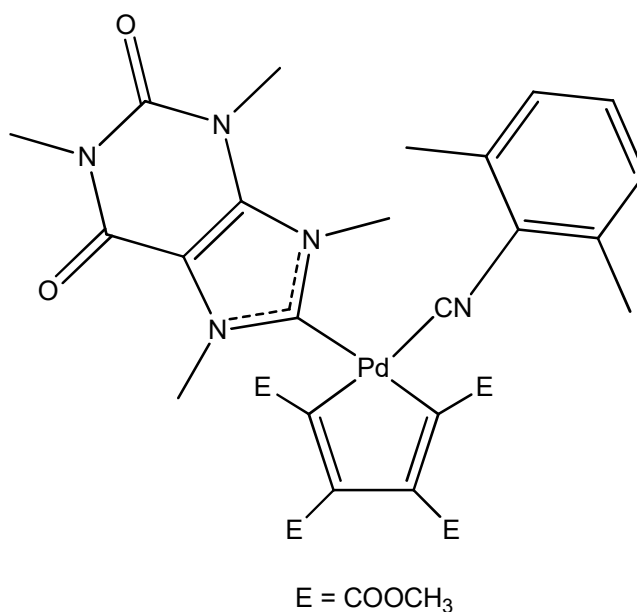
³¹P{¹H}-NMR (CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: -64.8

IR (KBr): ν_{C=O} = 1710 cm⁻¹, 1672 cm⁻¹, ν_{C-O} = 1243 cm⁻¹, 1207 cm⁻¹

5.1.8.4. SINTESI DEI COMPLESSI MISTI NHC / DIC

(DIC = 2-isonitril-1,3-dimetilbenzene)

Sintesi del complesso 8a



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 43.8 mg (0.112 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro.

All'interno di una provetta sono stati posti 39.4 mg (0.0560 mmol) del complesso **4a** e 14.7 mg (0.112 mmol) di 2-isonitril-1,3-dimetilbenzene (DIC) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitare il processo di solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita utilizzando una pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro.

Dopo 48 ore di reazione a temperatura ambiente, la miscela di colore rosso scuro è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per addizione di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

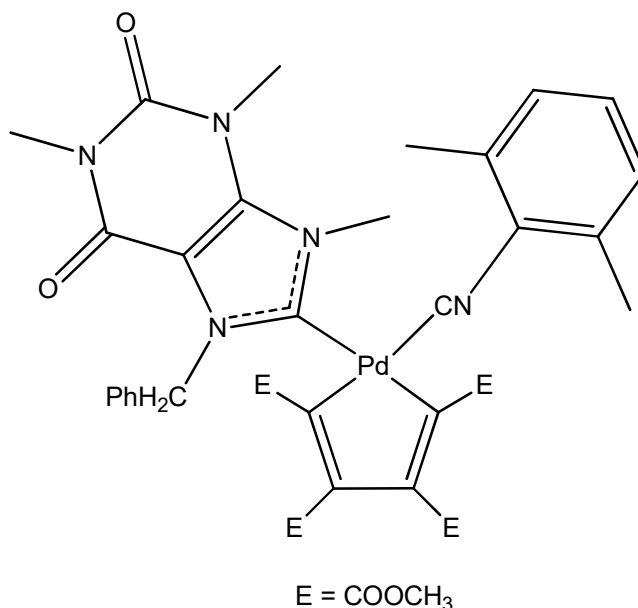
Sono stati ottenuti 73.1 mg del complesso **8a** pari ad una resa dell'89%.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 2.35 (s, 6H, $2\text{CH}_3^{\text{DIC}}$), 3.34 (s, 3H, OCH_3), 3.41 (s, 3H, NCH_3), 3.58 (s, 3H, OCH_3), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.83 (s, 3H, NCH_3), 4.14 (s, 3H, NCH_3), 4.30 (s, 3H, NCH_3), 7.12 (d, 2H, J = 8.1 Hz, 2H^{meta}), 7.23 (t, 1H, J = 8.1 Hz, H^{para}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , T = 298K, ppm) δ : 18.5 (CH_3 , CH_3^{DIC}), 28.6 (CH_3 , NCH_3), 32.0 (CH_3 , NCH_3), 37.1 (CH_3 , NCH_3), 39.0 (CH_3 , NCH_3), 51.0 (CH_3 , OCH_3), 51.3 (CH_3 , OCH_3), 110.1 (C, C^5), 128.2-135.1 (Ph^{DIC}), 140.6 (C, C^4), 145.9 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 147.7 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 149.0 (C, CN), 150.5 (C, $\text{C}=\text{O}$), 153.1 (C, $\text{C}=\text{O}$), 164.3 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 164.5 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 164.8 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 166.5 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 174.9 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 175.6 (C, $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 185.8 (C, carbene).

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{N}} = 2176 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1710 \text{ cm}^{-1}$, 1670 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}-\text{O}} = 1207 \text{ cm}^{-1}$

Sintesi del complesso **8b**



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 34.8 mg (0.0891 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 38.1 mg (0.0446 mmol) del complesso **4b** e 11.7 mg (0.0891 mmol) di 2-isonitril-1,3-dimetilbenzene (DIC) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per favorirne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita mediante pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro.

Dopo 48 ore di reazione a temperatura ambiente, la miscela di colore rosso scuro è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore rotante e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per addizione di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

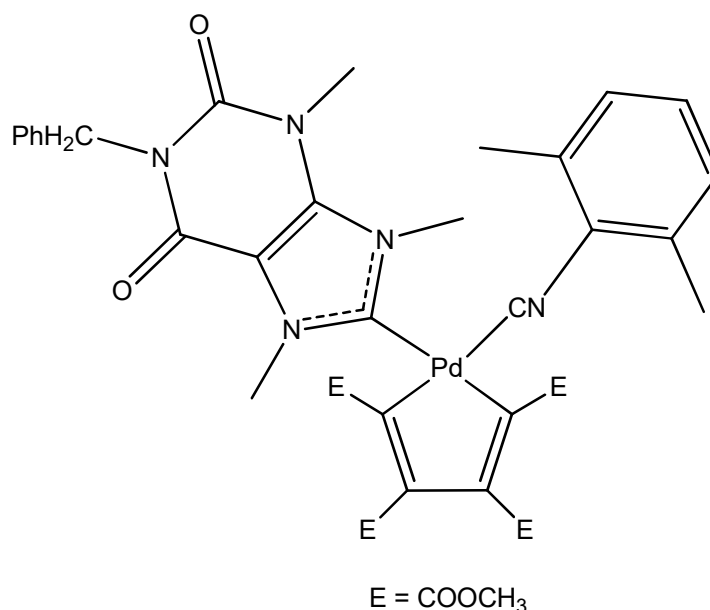
Sono stati ottenuti 60.2 mg del complesso **8b** pari ad una resa dell'84%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 2.11 (s, 6H, 2CH₃^{DIC}), 3.29 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (s, 3H, NCH₃), 3.56 (s, 3H, OCH₃), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, NCH₃), 4.33 (s, 3H, NCH₃), 5.60 and 5.94 (AB system, 2H, J = 14.7 Hz, NCH₂), 7.04-7.44 (m, 8H, Ph^{DIC}+Ph^{Bn}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 18.4 (CH_3 , CH_3^{DIC}), 28.7 (CH_3 , NCH_3), 32.0 (CH_3 , NCH_3), 39.3 (CH_3 , NCH_3), 51.0 (CH_3 , OCH_3), 51.1 (CH_3 , OCH_3), 51.3 (CH_3 , OCH_3), 51.4 (CH_3 , OCH_3), 53.1 (CH_2 , NCH_2), 109.7 (C, C^5), 128.0-135.9 (Ph), 140.7 (C, C^4), 145.7 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 148.2 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 149.1 (C, CN), 150.5 (C, $\text{C}=\text{O}$), 152.8 (C, $\text{C}=\text{O}$), 163.7 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 164.6 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 164.8 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 166.9 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 174.9 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 175.5 (C, $\underline{\text{C}}$ - COOCH_3), 187.4 (C, carbene).

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{N}} = 2177\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1710\text{ cm}^{-1}$, 1670 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}-\text{O}} = 1208\text{ cm}^{-1}$

Sintesi del complesso 8c



In un pallone codato da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e sotto atmosfera di argon, sono stati sciolti 31.3 mg (0.0802 mmol) del polimero ciclopalladato in 5 mL di diclorometano anidro. All'interno di una provetta sono stati posti 34.3 mg (0.0401 mmol) del complesso **4c** e 10.5 mg (0.0802 mmol) di 2-isonitril-1,3-dimetilbenzene (DIC) in 25 mL di diclorometano anidro, impiegando un bagno ad ultrasuoni per facilitarne la solubilizzazione.

Tale miscela è stata trasferita mediante pipetta Pasteur nel pallone contenente il precursore di palladio, osservando un progressivo intorbidamento dovuto alla formazione di argento cloruro.

Dopo 48 ore di reazione a temperatura ambiente, la miscela di colore rosso scuro è stata filtrata su millipore in un pallone da 50 mL.

La soluzione è stata quindi ridotta a piccolo volume all'evaporatore e la precipitazione del complesso finale è stata ottenuta per addizione di etere dietilico sotto vigorosa agitazione.

Il complesso, dopo essere stato filtrato su gooch e asciugato in essiccatore, si presenta come un solido di colore giallo.

Sono stati ottenuti 56.4 mg del complesso **8c** pari ad una resa dell'87%.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, T = 298K, ppm) δ: 2.35 (s, 6H, 2CH₃^{DIC}), 3.32 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (s, 3H, NCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.15 (s, 3H, NCH₃), 4.28 (s, 3H, NCH₃), 5.14 and 5.20 (AB system, 2H, J = 13.8 Hz, NCH₂), 7.10-7.48 (m, 8H, Ph^{DIC}+Ph^{Bn}).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , $T = 298\text{K}$, ppm) δ : 18.6 (CH_3 , CH_3^{DIC}), 32.0 (CH_3 , NCH_3), 37.1 (CH_3 , NCH_3), 39.0 (CH_3 , NCH_3), 45.2 (CH_2 , NCH_2), 51.0 (CH_3 , OCH_3), 51.3 (CH_3 , OCH_3), 51.4 (CH_3 , OCH_3), 110.2 (C, C^5), 128.0-136.3 (Ph), 140.7 (C, C^4), 145.8 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 147.7 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 149.0 (C, CN), 150.4 (C, $\text{C}=\text{O}$), 153.0 (C, $\text{C}=\text{O}$), 164.2 (C, $\underline{\underline{\text{C}}}\text{OOCH}_3$), 164.5 (C, $\underline{\underline{\text{C}}}\text{OOCH}_3$), 164.8 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 166.4 (C, $\underline{\text{C}}\text{-COOCH}_3$), 174.9 (C, $\underline{\underline{\text{C}}}\text{OOCH}_3$), 175.6 (C, $\underline{\underline{\text{C}}}\text{OOCH}_3$), 186.0 (C, carbene).

IR (KBr): $\nu_{\text{C}=\text{N}} = 2178\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C}=\text{O}} = 1710\text{ cm}^{-1}$, 1675 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}-\text{O}} = 1205\text{ cm}^{-1}$

5.2.PARTE BIOLOGICA

5.2.1. SOLVENTI E ADDITIVI BIOLOGICI

Per la solubilizzazione dei composti di Pd(II) (soluzioni madri) e per l'ottenimento delle soluzioni diluite sono stati impiegati DMSO, etanolo ed acqua distillata; tutti i solventi sono stati conservati in condizioni di sterilità. Le soluzioni sono state quindi mantenute in congelatore (-20 °C) e prelevate al momento dell'utilizzo.

Per il mantenimento delle colture cellulari sono stati utilizzati:

- Terreno di coltura RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) disciolto in soluzione acquosa secondo il protocollo standard a partire dal prodotto in polvere disponibile commercialmente. Esso contiene amminoacidi, vitamine, sali e componenti vari necessari alla vita delle cellule
- DPBS 1X (soluzione di Dulbecco: tampone salino costituito da una miscela di fosfati e cloruri di sodio e potassio) impiegato nel lavaggio delle cellule
- FBS (siero fetale bovino) necessario a fornire fattori di crescita e adesione, ormoni, trasportatori ed elementi minerali
- Tripsina-EDTA 0.05%: un enzima proteolitico additivato di un agente chelante che consente di staccare le cellule adese dal contenitore in cui si trovano.

Questi additivi e soluzioni biologici sono stati conservati, nella forma commercialmente disponibile, in congelatore (-20 °C) o in frigorifero (4 °C), a seconda delle esigenze specifiche.

Al momento dell'utilizzo sono stati portati a temperatura ambiente e, nel caso particolare dell'FBS, si è proceduto anche a micro-filtrazione; successivamente sono stati mantenuti sterili.

Per effettuare la conta cellulare è stato impiegato l'apposito diluente (soluzione fisiologica) per contaglobuli.

5.2.2. STRUMENTAZIONE

- Nelle fasi di scongelamento/congelamento delle cellule è stata utilizzata centrifuga Beckman Coulter Allegra™ X-12R
- Tutte le operazioni routinarie di manipolazione delle linee cellulari sono state svolte in condizioni di sterilità sotto flusso laminare all'interno di cappa FASTER BH-EN 2006
- Il monitoraggio dello stato di salute delle cellule è stato effettuato mediante loro osservazione al microscopio inverso Nikon Eclipse TS100
- La proliferazione delle cellule è stata favorita all'interno di incubatore RSBiotech Galaxy R (condizioni operative: T = 37 °C e livello di CO₂ pari al 5%)
- I valori di conta cellulare per la determinazione dell'IC₅₀ sono stati ottenuti tramite contaglobuli Beckman Coulter Z2, impostando il range di dimensioni delle particelle contate tra 8 e 20 µm.

5.2.3. SCONGELAMENTO / CONGELAMENTO LINEE CELLULARI

Prima di tutto la *cryovial* contenente le cellule è stata estratta dal cestello in azoto liquido in cui era conservata, quindi è stata mantenuta a temperatura ambiente e successivamente si è proceduto al completo scongelamento in incubatore (T = 37 °C) (Fig. 99).



Fig. 99 Cryovials contenenti le cellule congelate

Contemporaneamente è stata riscaldata in incubatore anche una provetta (*falcon*) contenente 10 mL di terreno di coltura.

La soluzione di siero (col 10% di DMSO) contenente le cellule è stata quindi prelevata dalla *cryovial*, inserita nella provetta predisposta con l'aliquota di terreno e miscelata, quindi tale contenitore è stato posto in centrifuga (5 minuti - 800 rpm).

Terminato il periodo di tempo impostato, il *pellet* di cellule è stato estratto dalla centrifuga e, previa separazione dal surnatante, risospeso all'interno di un'apposita fiasca (*flask*) predisposta precedentemente col nuovo terreno di coltura contenente il 10% di FBS.

Tale fiasca è stata quindi adagiata all'interno dell'incubatore, al fine di permettere alle cellule di crescere e moltiplicarsi.

Terminata l'attività di tirocinio, si è proceduto con la metodica di congelamento della linea cellulare.

Sostanzialmente, le cellule in questione sono state staccate con tripsina dalla fiasca in cui si trovavano adese e sono state risospese in un volume pari a 10 mL di terreno di coltura e siero freschi.

Il tutto è stato trasferito in una provetta e centrifugato (10 minuti - 1200 rpm).

Una volta eliminato il surnatante, il *pellet* di cellule è stato risospeso in una miscela di siero contenente il 10% di DMSO.

La miscela di cellule così costituita è stata aliquotata all'interno di *cryovials*, inserendo 1 mL di sospensione all'interno di ogni contenitore.

Le *cryovials* sono state mantenute per una notte alla temperatura di -80 °C e successivamente sono state conservate nell'apposito cestello in azoto liquido.

5.2.4. PASSAGGI CELLULARI

Le cellule delle linee tumorali A2780 e A2780*cis* crescono in adesione, ovvero necessitano della presenza di una superficie sulla quale poter aderire e svilupparsi, fino a costituire un monostrato.

Una volta occupata tutta la superficie disponibile della fiasca, esse si presentano come un tappeto omogeneo di cellule e risentono del contatto le une con le altre: questo potrebbe inibirne lo sviluppo ottimale e portare alla loro morte.

Pertanto, al fine della loro sopravvivenza, risulta necessario effettuare il cosiddetto “passaggio cellulare” o “subcoltura” che consiste in una diluizione delle cellule stesse all'interno di una nuova fiasca, dove vengono posti anche del terreno di coltura e del siero freschi. Questa operazione è stata svolta in modo routinario durante il periodo di tirocinio, al fine di disporre costantemente di cellule vitali da impiegare nelle analisi.

Prima di tutto la fiasca originale contenente le cellule adese è stata estratta dall'incubatore ed osservata al microscopio, per valutare lo stato di salute delle cellule stesse (*Fig. 100*).



Fig. 100 Cellule delle linee tumorali A2780 (a sinistra) e A2780cis (a destra) osservate al microscopio durante il tirocinio

Laddove è stata osservata l'avvenuta formazione del suddetto monostrato (definito *plateau* o confluenza) o quasi, si è proceduto alla rimozione del vecchio terreno di coltura e al lavaggio delle cellule con 5 mL di DPBS.

A questo punto è stato addizionato 1 mL di tripsina e la fiasca è stata posta in incubatore per circa 3 minuti. Trascorso questo tempo, ci si è assicurati che le cellule fossero completamente staccate, osservandole al microscopio, quindi sono stati aggiunti 1 mL di FBS e 8 mL di RPMI.

La sospensione di cellule è stata mescolata e disgregata e se n'è prelevata un'opportuna aliquota (variabile a seconda del tipo di diluizione che si è ritenuta necessaria: nello specifico sono stati effettuati prelievi di 1 o 2 mL a seconda che il passaggio desiderato fosse 1:10 o 1:5) che è stata inserita all'interno di una nuova fiasca sterile predisposta in precedenza. A questo punto è stato aggiunto 1 mL di FBS ed è stato ripristinato il volume finale di 10 mL mediante aggiunta di RPMI (Fig. 101).



Fig. 101 Fiasche usate per il mantenimento delle linee cellulari

Nel caso in cui le cellule non avessero raggiunto il *plateau*, al posto del passaggio è stato eseguito solamente un cambio di terreno, procedendo alla rimozione del precedente mezzo di coltura, al lavaggio delle cellule e infine all'inserimento, nella stessa fiasca iniziale, di mezzo di coltura fresco.

Al fine del mantenimento della resistenza, nel caso delle cellule A2780cis, una volta ogni 3 passaggi è stata aggiunta, all'interno della fiasca, una quantità di soluzione acquosa di cisplatino tale da raggiungere la concentrazione di 1 μ M (protocollo standard).

5.2.5. ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

Prima di tutto i composti sintetizzati sono stati solubilizzati all'interno di microprovette sterili in DMSO, ottenendo delle soluzioni 50 mM. Sulla base di prove preliminari di solubilità, da queste soluzioni madri, per diluizioni successive in etanolo, sono state ottenute delle soluzioni 5 mM, 500 μ M e 50 μ M. Solo per i complessi **7a-c** è stato possibile effettuare un'ulteriore analoga serie di diluizioni in acqua.

L'analisi che consente di determinare la capacità di inibizione della crescita cellulare esercitata da ogni composto sintetizzato è stata eseguita nel corso di una settimana e ha previsto l'esecuzione in sequenza di tre fasi:

1. Piastramento o semina delle cellule nei pozzetti dell'apposita piastra a 24 pozzetti
2. Trattamento delle cellule con i complessi sintetizzati e col *cisplatin* (controllo positivo)
3. Conta cellulare e determinazione del valore di IC₅₀ dei composti

Per la procedura di semina le cellule sono state inizialmente staccate dalla fiasca in cui si trovavano, ripetendo sostanzialmente la stessa sequenza iniziale di operazioni descritta per il passaggio.

Giunti al punto in cui si dispone di un volume pari a 10 mL di cellule staccate e risospese nel nuovo mezzo di coltura, si è proceduto ad una conta del numero di cellule presenti prelevando 50 μ L di sospensione e trasferendoli in un apposito contenitore da conta (bicchierino), aggiungendo anche 10 mL di soluzione fisiologica.

Sulla base del responso numerico fornito dal contacellule, si è proceduto al calcolo delle quantità di sospensione cellulare, FBS e RPMI necessari a costituire la cosiddetta sospensione "mix" adeguata alla semina, in ogni singolo pozzetto della piastra d'analisi, di 25.000 cellule (protocollo standard della linea cellulare).

Costituita questa nuova miscela cellulare, ne è stato inserito 1 mL all'interno di ogni singolo pozzetto della piastra (*Fig. 102*).

Terminata questa fase la piastra è stata adagiata in incubatore per 24 ore.

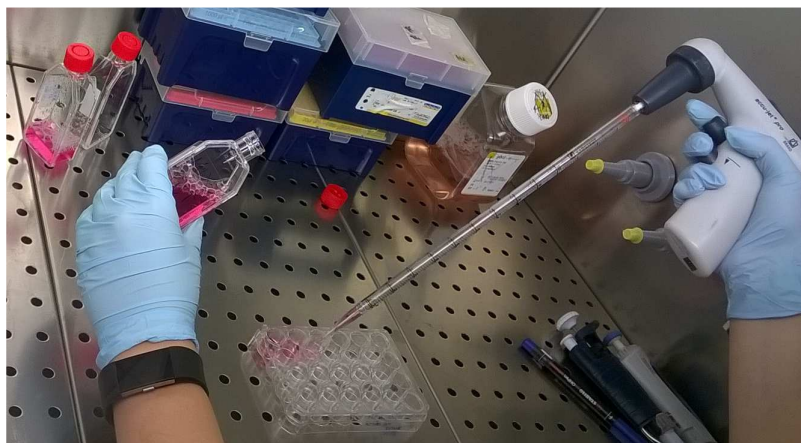


Fig. 102 Fase di semina delle cellule all'interno dei pozzetti della piastra

Il giorno dopo si è proceduto con la fase successiva del processo d'analisi, ovvero il trattamento. Nello specifico, all'interno di ogni singolo pozzetto della piastra seminata è stato inserito, mediante micropipette, un ben determinato volume di soluzione di complesso (corrispondente alla specifica concentrazione desiderata all'interno del pozzetto), avendo cura di tenere due pozzetti non trattati, definiti "controlli negativi". Questo accorgimento consente di monitorare la normale crescita cellulare e assicura un parametro di riferimento nel momento del calcolo dell' IC_{50} (Fig. 103).

Al termine di questa operazione, la piastra è stata nuovamente depositata all'interno dell'incubatore, dove è rimasta per 72 ore.

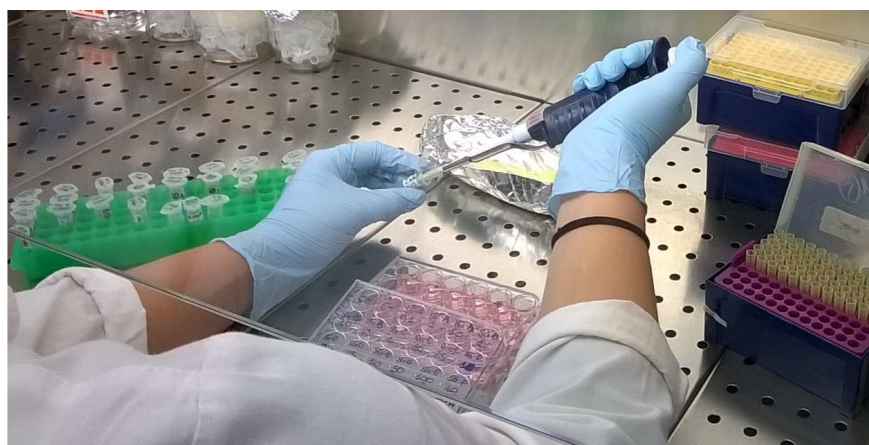


Fig. 103 Fase di trattamento delle cellule contenute nei pozzetti della piastra

Trascorso questo periodo di tempo è stata eseguita l'ultima tappa dell'analisi antiproliferativa, ovvero la conta cellulare. In particolare, sono state staccate, raccolte e risospese (in 100 μ L di tripsina + 400 μ L di terreno completo) le cellule contenute in ogni singolo pozzetto; a questo punto sono stati prelevati 50 μ L di sospensione da ogni pozzetto e sono stati sottoposti alla conta cellulare, previo inserimento negli appositi bicchierini contenenti anche il diluente (Fig. 104).

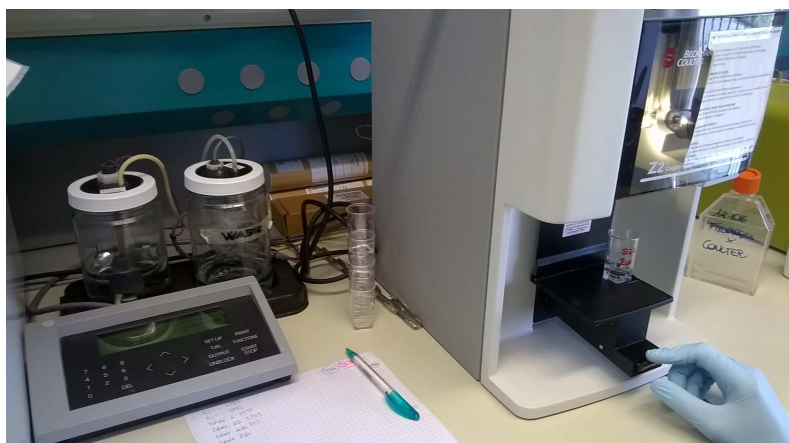


Fig. 104 Fase di conta cellulare mediante apposito strumento contattelle

A partire dai valori di conta cellulare forniti dallo strumento è stato calcolato il valore di IC_{50} .

Sulla base di questo primo esperimento indipendente, effettuato per ogni composto con la scala di concentrazione 0.1, 1, 10, 100 e 500 μM , ne sono stati effettuati almeno altri due (per i composti più performanti) utilizzando un opportuno *range* di concentrazione ridotto e centrato sul valore preliminare di IC_{50} individuato.

Al termine di queste ripetizioni è stato quindi ottenuto il valore medio di IC_{50} di ogni singolo complesso accompagnato dalla relativa deviazione standard.

La stessa procedura è stata effettuata su entrambe le linee cellulari saggiando anche l'azione del *cisplatino*, al fine di disporre del valore di IC_{50} del farmaco di riferimento.

5.2.6. EFFETTO CITOTOSSICO DEL SOLVENTE

L'effetto citotossico esercitato dai solventi utilizzati per la solubilizzazione dei complessi è stato valutato, in un singolo esperimento effettuato sulla linea cellulare A2780, inserendo tali sostanze all'interno dei pozzetti contenenti le cellule seminate.

In particolare, l'aggiunta di 2 μL di una soluzione di EtOH col 10% di DMSO, corrispondente al massimo volume usato della soluzione di solubilizzazione più concentrata EtOH/DMSO (per ottenere all'interno del pozzetto una concentrazione di composto pari a 10 μM) ha portato al 98% di crescita cellulare.

CAPITOLO 6

APPENDICE

6.1. INCIDENZA, MORTALITÀ E FATTORI DI RISCHIO DELLA MALATTIA

Il monitoraggio a lungo termine dell'insorgenza del cancro e della mortalità in differenti popolazioni è importante al fine di investigare l'eziologia della malattia.

Dato il lungo periodo che spesso intercorre tra l'esposizione ad un agente cancerogeno e la diagnosi di un neoplasma clinicamente rivelabile (fino a 20-30 anni), gli attuali dati di incidenza riflettono condizioni ambientali, occupazionali, abitudini e stili di vita di qualche decade fa [68].

L'*American Cancer Society* ha stimato che nel 2015 siano stati diagnosticati negli USA 1.658.370 nuovi casi di tumori invasivi, di cui il 51% a pazienti uomini (848.200) e il 49% (810.170) a donne.

La stima dell'incidenza specifica dei tumori, classificati in base alla zona del corpo in cui si originano, è mostrata in *figura 105*, da cui si evince come i tumori all'apparato riproduttivo costituiscano la maggior parte dei casi diagnosticati, indipendentemente dal sesso dell'individuo, quantificati in 329.330 nuovi casi.

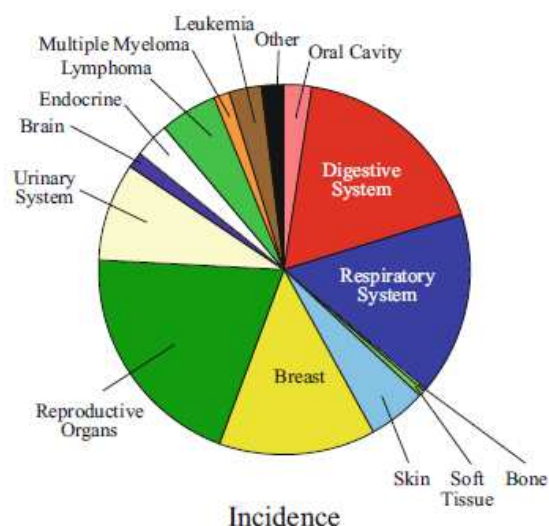


Fig. 105 Incidenza delle principali tipologie di tumore in USA nel 2015 [68]

(Dove il cancro degli organi riproduttivi comprende il cancro alla prostata, al corpo uterino, alla cervice uterina, alla vulva, alla vagina, ai testicoli, al pene e ad altri organi dell'apparato riproduttivo femminile e maschile; il cancro del sistema digestivo comprende il cancro all'esofago, allo stomaco, all'intestino, al colon-retto, al fegato, alla cistifellea, al pancreas e ad altri organi digestivi; il cancro del sistema respiratorio comprende il cancro ai polmoni, ai bronchi, alla laringe e ad altri organi respiratori)

In particolare, è possibile notare come la malattia abbia afflitto principalmente la prostata nell'uomo (26%) e il seno nella donna (29%) (*Fig. 106*), seguiti in entrambi i casi da patologie

all'apparato respiratorio (principalmente polmoni e bronchi) e digestivo (colon e retto in prevalenza) [69a].

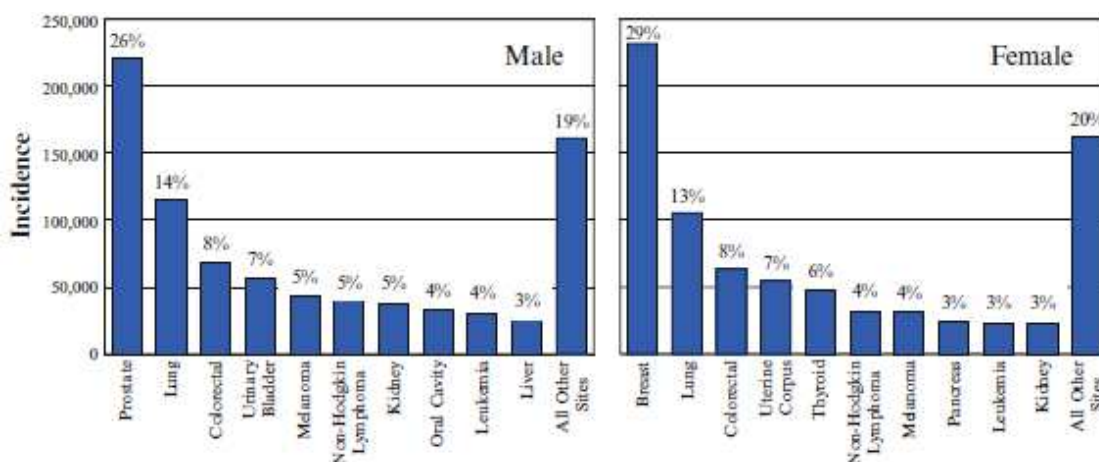


Fig. 106 Istogramma recante l'incidenza delle principali tipologie di tumore in USA nel 2015 [68]

(Dove il cancro ai polmoni comprende il cancro ai polmoni e ai bronchi, mentre il tumore al colon-retto comprende i tumori al colon e quelli al retto)

Dallo stesso studio epidemiologico è emerso che il numero totale di decessi imputabili al cancro è stato pari a 589.430, ripartiti per il 53% tra gli uomini (312.150) e per il 47% tra le donne (277.280).

Nella totalità della popolazione americana la mortalità è stata imputabile prevalentemente (53% del totale) a tumori che hanno leso il sistema digestivo (149.300) e quello respiratorio (162.460) (Fig. 107), affliggendo in particolar modo i polmoni nel 28% degli uomini e nel 26% delle donne (Fig. 108).

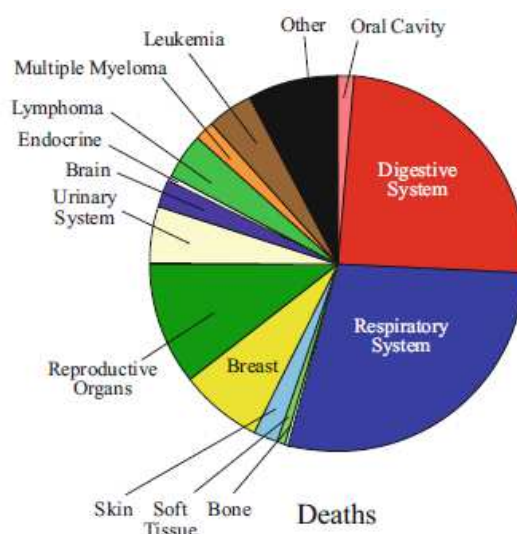


Fig. 107 Mortalità causata dalle principali tipologie di tumore in USA nel 2015 [68]

(Dove il cancro degli organi riproduttivi comprende il cancro alla prostata, al corpo uterino, alla cervice uterina, alla vulva, alla vagina, ai testicoli, al pene e ad altri organi dell'apparato riproduttivo femminile e maschile; il cancro del sistema digestivo comprende il cancro all'esofago, allo stomaco, all'intestino, al fegato, alla cistifellea, al pancreas e ad altri organi digestivi; il cancro del sistema respiratorio comprende il cancro ai polmoni, ai bronchi, alla laringe e ad altri organi respiratori)

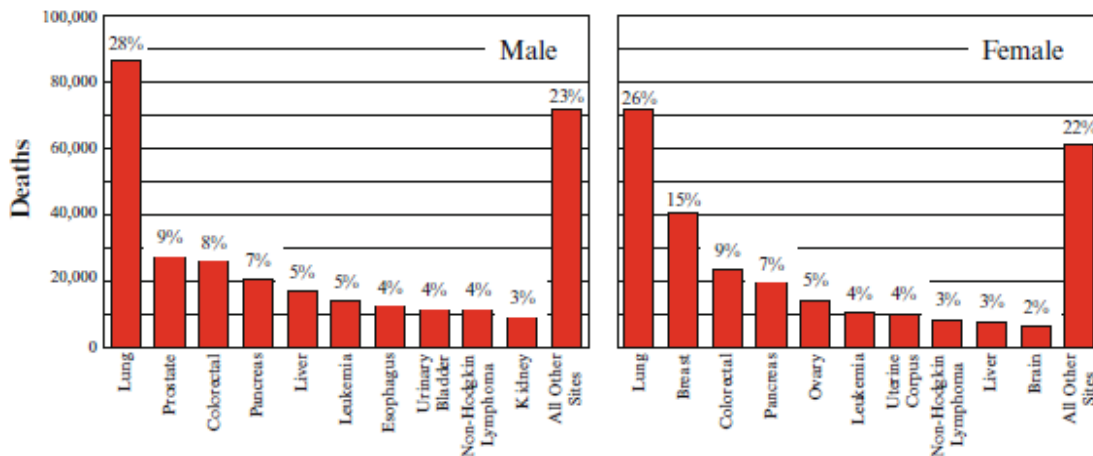


Fig. 108 Istogramma recante la mortalità provocata dalle principali tipologie di tumore in USA nel 2015 [68]

(Dove il cancro ai polmoni comprende il cancro ai polmoni e ai bronchi, mentre il tumore al colon-retto comprende i tumori al colon e quelli al retto)

La IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha stimato che nel 2008 sono stati diagnosticati nel mondo 12.667.500 nuovi casi di tumori, di cui il 52% a pazienti uomini (6.629.100) e il 48% (6.038.400) a donne.

Le principali tipologie di neoplasia riscontrate sono riportate in *fig. 109*.

Nello stesso anno sono stati registrati 7.571.500 decessi imputabili a questa malattia, di cui il 56% (4.225.700) maschi e il 44% femmine (3.345.800) per lo più dovuti a tumori di polmoni, stomaco, fegato, colon e retto e seno (*Fig. 13*).

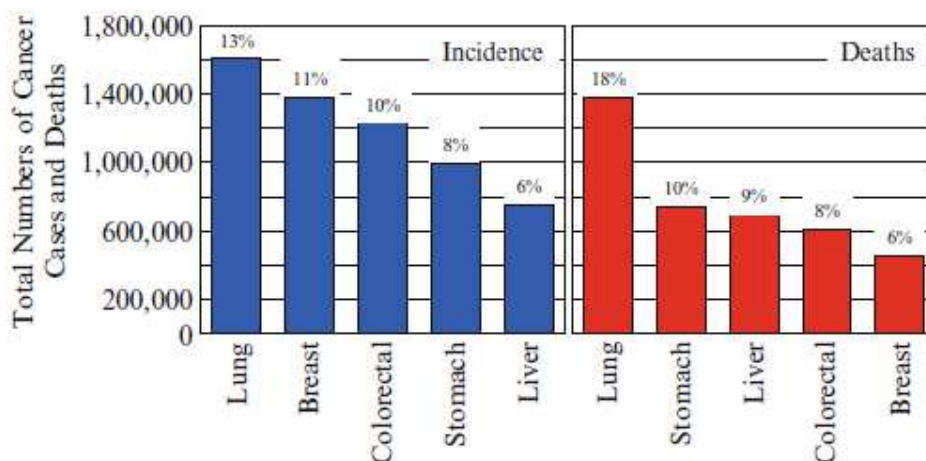


Fig. 109 Istogramma recante i valori percentuali di incidenza e mortalità mondiali legate alle principali tipologie di tumore [68]

(Dove il cancro ai polmoni comprende il cancro ai polmoni e ai bronchi, mentre il tumore al colon-retto comprende i tumori al colon e quelli al retto)

La maggior parte dei decessi maschili (59% del totale) sono provocati, in ordine di importanza, da patologie associate a polmoni, fegato, stomaco, colon e retto ed esofago, mentre per le donne gli organi più colpiti dalla malattia sono stati rispettivamente seno, polmoni, colon e retto, cervice uterina e stomaco (51% dei decessi) [69b].

Generalmente, con l'avanzamento dell'età si osserva un aumento della probabilità di insorgenza di malattie imputabile alla diminuzione della capacità di difesa del corpo umano e, in particolare, la maggior parte delle diagnosi di tumori maligni riguarda pazienti di età superiore ai 65 anni [69c-d].

Tra le eccezioni si annoverano il cancro al seno, che colpisce prevalentemente donne più giovani e specifiche tipologie di leucemia, nonché i tumori infantili.

Nella fase che precede la divisione cellulare, l'intero genoma (tutti i 46 cromosomi) viene replicato in modo tale che ogni "cellula figlia" mantenga la stessa informazione genetica.

Il processo di sintesi del DNA non è perfetto e si possono verificare degli errori che vengono incorporati nei cromosomi. Le alterazioni possono avere effetti negativi sui geni che promuovono o inibiscono la capacità della cellula di dividersi e questo può portare alla sua crescita incontrollata. Dal momento che tali modifiche si accumulano nel corso del tempo, più lunga è la vita di un individuo, maggiore è la sua probabilità di presentare mutazioni.

Proprio per questo motivo, nonostante vi siano evidenze di tumori ossei nei resti di mummie egizie e peruviane risalenti a circa 5000 anni fa, in tempi remoti, quando la durata media della vita era più corta a causa di patologie infettive fatali, questa malattia non era molto comune ed il suo studio accurato non era possibile; pertanto le prime pubblicazioni relative a studi anatomici *postmortem* risalgono alla seconda metà del settecento.

Nel tardo diciannovesimo secolo, con lo sviluppo del microscopio, è stato possibile esaminare l'aspetto delle cellule e valutarne l'attività, riuscendo in tale modo a discriminare le cellule sane da quelle affette da tumore. Nel ventesimo secolo si collocano invece gli albori degli studi *in vitro* tramite colture cellulari, delle tecniche diagnostiche, delle cure grazie alla radio- e chemioterapia e la scoperta di proprietà cancerogene di sostanze anche di largo impiego.

Dal 1900 ai giorni nostri vi è stato un radicale miglioramento nella prevenzione e nella cura delle malattie infettive grazie anche all'evoluzione delle tecniche di smaltimento e riciclo dei rifiuti e agli aumentati standard di qualità e controlli cui è sottoposta l'acqua potabile.

In accordo con i dati resi disponibili dal *Center for Disease Control and Prevention*, ad oggi, il tumore è la seconda causa di morte nella popolazione americana dopo le patologie cardiovascolari con rispettivamente circa 560.000 e più di 630.000 vittime nel 2006, complessivamente pari al 60% dei decessi [1].

Come ribadito in precedenza, tra i fattori di rischio rientrano l'etnia (*Fig. 110*) e vi sono poi ostacoli culturali, riscontrabili soprattutto da parte delle minoranze, come gli stereotipi, le difficoltà di comunicazione dovute alle diverse lingue parlate, la sfiducia nel sistema sanitario o la mancanza dell'assicurazione sanitaria; fattori che nel complesso contribuiscono ad ostacolare la prevenzione, la diagnosi precoce ed il successo nella cura.

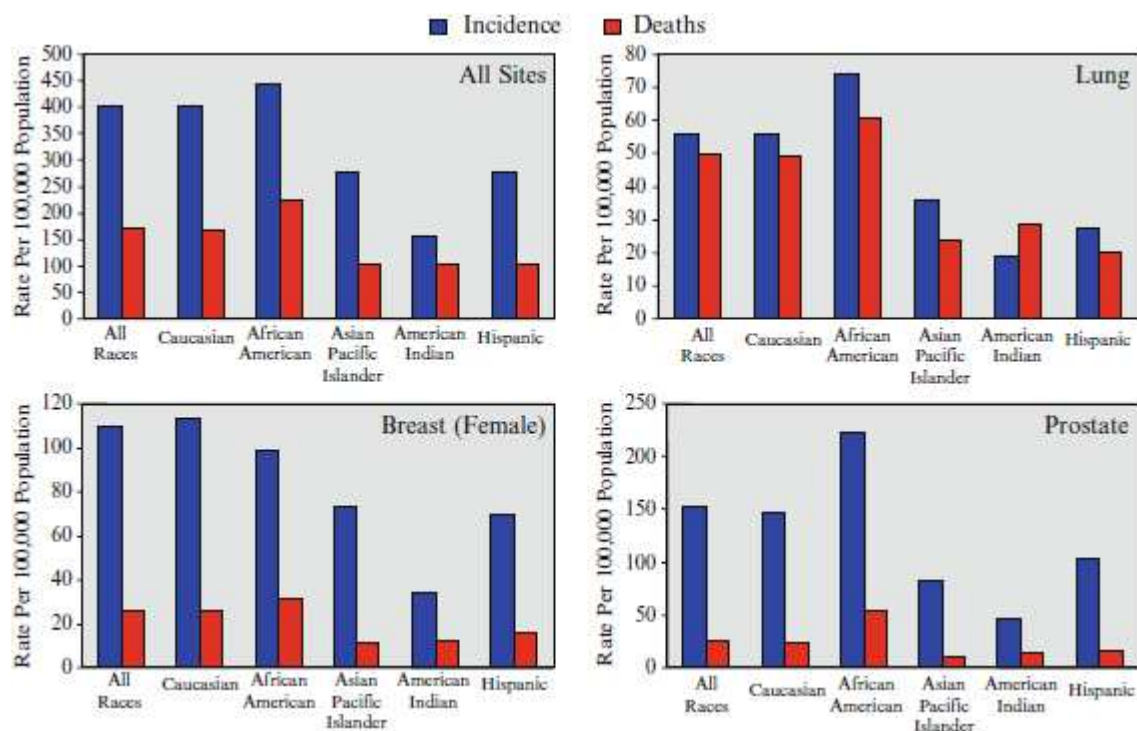


Fig. 110 Incidenza e mortalità del cancro legate all'etnia (Usa 1990-1996) [68]

Di grande impatto sono i fattori di rischio ambientali legati all'esposizione ad agenti cancerogeni ed imputabili sia ad arbitrarie abitudini nello stile di vita che a particolari categorie di occupazione.

Ad esempio, tra le migliaia di sostanze che si originano dalla combustione delle sigarette, sono presenti noti composti chimici cancerogeni e mutageni tra cui benzo[α]pirene, dibenzo[α]antracene, nickel, cadmio, uretano, formaldeide, ossidi nitrosi e nitrosodietilammina [69f], che incrementano la probabilità di contrarre il cancro ai polmoni.

Studi epidemiologici hanno evidenziato come individui che seguono una dieta composta in prevalenza da carne rossa e grassi di origine animale [69g-h] o povera di fibre [69i-j] mostrino una maggiore probabilità di insorgenza di tumore al colon e al retto. L'esposizione al sole (in particolare alle radiazioni UV) è invece una delle principali cause all'origine dei tumori della pelle.

La correlazione esistente tra l'esposizione a fattori cancerogeni e l'insorgere della malattia evidenzia il fatto che molte tipologie di tumore siano prevenibili e che ogni individuo possa tutelarsi semplicemente assumendo maggiore consapevolezza del rischio, prendendo delle opportune precauzioni e facendo scelte oculate riguardo al proprio stile di vita.

Da ultimo non si deve trascurare, tra le cause della malattia, l'esposizione a certi tipi di ormoni e il loro livello, ad esempio, sia maschi che femmine possono sviluppare il cancro al seno, ma ad un uomo cui viene diagnosticato questo tumore corrispondono più di cento donne con la stessa prognosi ed è stato appurato che questa discrepanza è imputabile alla quantità di estrogeni a cui una donna è esposta nel corso della vita.

Sempre nel 2006 l'*American Cancer Society* ha riportato che tra il 2002 e il 2003 il numero di morti riconducibili al cancro è diminuito per la prima volta dal 1930, nonostante il concomitante aumento demografico e della durata media della vita [1].

Questa inversione di tendenza è attribuibile ad una serie di fattori quali l'aumento della consapevolezza della popolazione, il cambiamento nelle abitudini riguardanti l'esercizio fisico e la dieta alimentare, il numero crescente di persone che si sottopone a *screening* e test diagnostici aventi sempre maggiore accuratezza nel rilevare l'insorgere della malattia in stadi precoci e quindi facilmente trattabili, nonché maggiormente disponibili su larga scala, ed infine lo sviluppo di terapie sempre più efficienti e tollerabili.

6.2. I NUMERI DEL CANCRO IN ITALIA

Si stima che in Italia, nel 2016, siano stati diagnosticati poco più di 365.000 nuovi casi di tumore maligno di cui circa 190.000 (54%) negli uomini e 175.000 (46%) nelle donne [4].

Entro i confini nazionali, ogni giorno, circa 1.000 persone ricevono una nuova diagnosi di tumore maligno.

La tabella sottostante (*Tabella 4*) riporta i primi 5 tumori diagnosticati con maggiore frequenza, rispettivamente suddivisi in base al sesso e relativi alla proporzione sul totale della popolazione (sono esclusi i tumori della cute).

Le stime nazionali sono prodotte partendo dai dati osservati nei Registri Tumori Italiani, sulla base dei livelli di incidenza regionali e dei *trend* area geografica specifici.

Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Prostata (19%)	Mammella (30%)	Mammella (14%)
2°	Polmone (15%)	Colon-retto (13%)	Colon retto (13%)
3°	Colon-retto (13%)	Polmone (6%)	Polmone (11%)
4°	Vescica* (11%)	Tiroide (5%)	Prostata (10%)
5°	Stomaco (4%)	Utero corpo (5%)	Vescica (7%)

Tabella 4 Tumori più frequentemente diagnosticati e proporzione sul totale dei tumori (esclusi i carcinomi della cute) per sesso [4]

La tabella 5 mostra, in ordine di importanza, le 5 più frequenti cause di decesso oncologico rispettivamente negli uomini, nelle donne e nella totalità della popolazione.

Le percentuali riportate si basano sui dati riguardanti le aree coperte dai Registri Tumori Italiani.

Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Polmone (26%)	Mammella (17%)	Polmone (19%)
2°	Colon-retto (10%)	Colon-retto (12%)	Colon-retto (11%)
3°	Prostata (8%)	Polmone (11%)	Mammella (7%)
4°	Fegato (7%)	Pancreas (7%)	Stomaco (6%)
5°	Stomaco (6%)	Stomaco (6%)	Pancreas (6%)

Tabella 5 Prime cinque cause di morte tumorali più frequenti e proporzione sul totale dei decessi oncologici per sesso [4]

Oltre all'influenza del sesso dell'individuo, le tabelle sottostanti (Tabelle 6 e 7) evidenziano rispettivamente la variabilità nel numero di diagnosi e di decessi in base alla fascia d'età investigata.

Rango	Maschi			Femmine		
	Età			Età		
	0-49	50-69	70+	0-49	50-69	70+
1°	Testicolo (12%)	Prostata (22%)	Prostata (20%)	Mammella (41%)	Mammella (35%)	Mammella (21%)
2°	Cute (melanomi) (9%)	Polmone (15%)	Polmone (17%)	Tiroide (15%)	Colon-retto (12%)	Colon-retto (17%)
3°	Linfoma non-Hodgkin (8%)	Colon-retto (13%)	Colon-retto (14%)	Cute (melanomi) (7%)	Utero corpo (7%)	Polmone (7%)
4°	Colon-retto (8%)	Vescica* (10%)	Vescica* (12%)	Colon-retto (4%)	Polmone (7%)	Stomaco (5%)
5°	Tiroide (8%)	Vie aero-digestive superiori** (5%)	Stomaco (5%)	Utero cervice (4%)	Tiroide (5%)	Pancreas (5%)

Tabella 6 Tumori più frequentemente diagnosticati e proporzione sul totale dei tumori (esclusi i carcinomi della cute) per sesso ed età [4]

Rango	Maschi			Femmine		
	Età			Età		
	0-49	50-69	70+	0-49	50-69	70+
1°	Polmone (14%)	Polmone (30%)	Polmone (26%)	Mammella (29%)	Mammella (21%)	Mammella (16%)
2°	Sistema nervoso centrale (10%)	Colon-retto (10%)	Colon-retto (10%)	Polmone (9%)	Polmone (14%)	Colon-retto (12%)
3°	Colon-retto (8%)	Fegato (8%)	Prostata (8%)	Colon-retto (7%)	Colon-retto (10%)	Polmone (11%)
4°	Leucemie (7%)	Pancreas (6%)	Fegato (7%)	Ovaio (6%)	Pancreas (7%)	Pancreas (7%)
5°	Fegato (7%)	Stomaco (6%)	Stomaco (6%)	Sistema nervoso centrale (6%)	Ovaio (7%)	Stomaco (6%)

Tabella 7 Prime cinque cause di morte tumorali più frequenti e proporzione sul totale dei decessi oncologici per sesso ed età [4]

I dati dell'Associazione Italiana dei Registri Tumori indicano un costante aumento del numero di italiani che vivono dopo una diagnosi di tumore. Il numero di prevalenti, pari a 2 milioni e 244 mila nel 2006, è aumentato sino a oltre 3 milioni nel 2016 ed uno su quattro può considerarsi guarito, in quanto è tornato ad avere la stessa aspettativa di vita della popolazione generale.

6.3. LA PREVENZIONE TRAMITE SEMPLICI TEST DI *SCREENING*

Sulla base di quanto illustrato finora è evidente come la possibilità di contrarre il cancro esista e sia concreta per ogni individuo, pertanto è importante disporre di un vasto *range* di test di *screening* che permettano di individuare la presenza di sospette crescite anomale e di successivi esami mirati a determinare se si tratti di tumori di tipo benigno o maligno.

Nella lotta contro questa patologia, la tempistica riveste una primaria importanza in quanto, se la diagnosi viene effettuata nel momento in cui il cancro è in uno stadio iniziale, vi sono maggiori *chance* di curarlo o di mantenerlo sotto controllo, evitando la formazione di metastasi.

Il singolo individuo può controllare regolarmente specifiche aree del corpo, mentre *checkup* di *routine* più approfonditi possono essere condotti da personale specializzato, includendo l'utilizzo di strumentazioni in grado di monitorare gli organi interni e test di laboratorio per esaminare campioni di materiale biologico.

Nella maggior parte dei casi le persone sottoposte ai controlli sono asintomatiche, ma com'è stato ampiamente illustrato nel paragrafo precedente, presentano un elevato rischio di sviluppo di una o più forme di neoplasia a causa di molteplici fattori.

Alcuni test invece sono usati per confermare una diagnosi elaborata sulla base di specifiche avvisaglie riscontrate dal paziente o per monitorare lo stadio della malattia e l'efficacia delle cure.

La qualità e l'affidabilità di tali test sono valutate in base a sensibilità, specificità e ricorrenza di esiti falsi positivi e negativi, caratteristiche sulle quali incidono il tempo intercorso tra la raccolta dei campioni e la loro analisi, la temperatura alla quale gli stessi vengono conservati, la qualità dei kit d'analisi impiegati e l'esperienza del personale che effettua le procedure ed interpreta i risultati.

Nella maggior parte dei casi, per ottenere una conferma definitiva della presenza di neoplasia viene effettuata una biopsia ovvero si procede alla rimozione di un campione di tessuto che viene posto in un contenitore e spedito al laboratorio patologico per essere sottoposto ad ulteriori accertamenti specifici.

Ad esempio, data l'alta frequenza di tumore alla mammella, a partire dal ventesimo anno d'età, è auspicabile che le donne inizino a prendere familiarità col monitoraggio del seno, mettendo abitualmente in pratica semplici tecniche di automanipolazione e sottoponendosi regolarmente ad esami clinici [1].

In Italia, lo *screening* per la diagnosi precoce del tumore mammario si rivolge alle donne di età compresa tra i 50 e i 69 anni e si esegue con una mammografia ogni 2 anni.

In caso di sospetto, al primo esame seguono ulteriori accertamenti diagnostici che, all'interno dei programmi organizzati di *screening*, consistono in una seconda mammografia, in un'ecografia e in una visita clinica. A questi esami può far seguito una biopsia per valutare le caratteristiche delle eventuali cellule tumorali. Soltanto al completamento di questo percorso si ottiene la conferma della diagnosi e, se necessario, si avvia un preciso *iter* terapeutico [70].

Sempre in un'ottica di grande attenzione alla prevenzione, secondo le linee guida nazionali, tutte le donne tra i 25 e i 64 anni devono effettuare un pap-test ogni 3 anni.

L'esame consiste in un prelievo di una piccola quantità di cellule dal collo dell'utero che vengono analizzate al microscopio e, in caso di anomalie, la donna viene convocata direttamente dal centro di riferimento per eseguire una colposcopia di approfondimento ed anche una biopsia per confermare definitivamente le caratteristiche esatte della sospetta lesione [70].

Lo *screening* per la diagnosi precoce del cancro al colon-retto comprende invece il test del sangue occulto nelle feci, effettuato in persone tra i 50 ed i 69 anni. Tale procedura consiste nella semplice raccolta, da parte del singolo individuo, di un campione all'interno del quale vengono poi ricercate tracce di sangue non visibili ad occhio nudo, la cui presenza è indice di forme tumorali o di polipi, i quali possono in futuro degenerare.

In caso di esito positivo, il protocollo standard prevede di procedere con una colonscopia (esame diagnostico di approfondimento dell'intero tratto del colon-retto) che, oltre a confermare l'eventuale presenza di polipi, ne consente l'asportazione all'interno della stessa seduta. Gli

stessi vengono successivamente analizzati e, in base al loro numero, alle loro dimensioni e alle caratteristiche delle loro cellule, vengono avviati percorsi terapeutici e di controllo *ad hoc* [70]. Similmente alle donne, dopo la pubertà, anche agli uomini viene consigliato di prendere confidenza col monitoraggio del proprio corpo al fine di individuare precocemente eventuali caratteristiche anomale. In particolare, le linee guida suggeriscono di effettuare in modo regolare un'autoesaminazione dei testicoli alla ricerca di bozzoli e noduli o di evidenti cambiamenti in dimensioni, forma e consistenza.

Le analisi del sangue e delle urine sono esami non invasivi che costituiscono un importante strumento diagnostico in quanto sono in grado di fornire informazioni sulle modalità con cui il cancro o i trattamenti terapeutici affliggono il resto del corpo.

In particolare, la conta totale del sangue consente di determinare il numero di globuli rossi (eritrociti), globuli bianchi (leucociti) e piastrine (trombociti) in esso contenuti e valori anomali di questi parametri, se confrontati con quelli di una persona sana, possono rivelare la presenza di patologie tra cui rispettivamente anemia, infezioni in corso o sanguinamento anormale.

Dall'analisi delle urine si possono ottenere informazioni sullo stato di salute di reni, vescica, vie urinarie e di altre parti del corpo in grado di produrre molecole che poi vengono espulse proprio attraverso l'apparato urinario [1].

6.4. L'EVOLUZIONE DELLA DIAGNOSI PRECOCE MEDIANTE TECNICHE DI IMAGING

La vera rivoluzione nel campo della diagnosi precoce, della caratterizzazione e del monitoraggio in tempo reale di una patologia, nonché della valutazione dell'efficacia di una terapia, si è ottenuta con l'introduzione del *molecular imaging* che consente di visualizzare, caratterizzare e misurare processi biologici a livello molecolare o cellulare nell'uomo o in altri organismi viventi.

Le tecniche di *imaging*, il cui impiego varia principalmente a seconda del tipo di problema da investigare, comprendono quelle basate su radionuclidi (medicina nucleare), la risonanza magnetica (MRI), le tecniche ottiche, l'ecografia e la tomografia assiale computerizzata (TAC).

Nello specifico, quest'ultima procedura (adatta al monitoraggio di tessuti densi come le ossa) rappresenta una delle innovazioni più importanti ottenute nel campo della radiologia negli ultimi due decenni in quanto consente il riconoscimento di lesioni prima difficilmente individuabili, sfruttando immagini di sezioni assiali del corpo umano ottenute grazie ad una valutazione statistico-matematica (computerizzata) dell'assorbimento dei raggi X da parte delle strutture corporee esaminate.

Allo stato attuale, le tecniche diagnostiche di *radio-imaging* (dette anche di *nuclear-imaging*) che hanno assunto notevole importanza nella pratica clinica sono la radio-scintigrafia o SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) e la tomografia di emissione di positroni o PET (*Positron Emission Tomography*).

Sia nella SPECT che nella PET i raggi γ emessi dal nuclide (somministrato per via endovenosa sotto forma di radio-farmaco) sono registrati dai detector di una γ -camera esterna ed il segnale viene poi processato e convertito in un'immagine che identifica la localizzazione del tracciante radioattivo.

In particolare, queste due metodologie diagnostiche hanno la sensibilità necessaria per individuare lesioni di dimensioni comprese tra alcuni centimetri e millimetri, a concentrazioni da micro- a nano-molari del tracciante radioattivo.

Dal punto di vista del *design*, i radio-farmaci per la diagnostica ad immagini sono in maggioranza costituiti da radio-nuclidi metallici che non sono mai somministrati come tali, ma vengono coordinati a dei leganti. A seconda della formulazione e del meccanismo di bio-distribuzione si individuano quindi due categorie:

- Piccoli complessi (o agenti di perfusione) in cui è importante mantenere inalterate le caratteristiche chimico-fisiche del composto assicurandone stabilità termodinamica e cinetica per preservarne l'attività, per evitare radio-tossicità e per mantenere alto il livello di selettività
- Coniugati, formati a loro volta dal radio-metallo chelato ad un *linker* che ne consenta il legame con una biomolecola (*targeting molecule*), la quale deve avere dei recettori specifici sovra-espressi nel tessuto di interesse. Ad esempio, il recettore del folato, una proteina di membrana sulla superficie cellulare, è sovra-espresso in molti tumori umani e pertanto l'acido folico costituisce potenzialmente un ideale *targeting vector* per il trasporto selettivo di agenti diagnostici (e terapeutici)

In particolare, la SPECT sfrutta nuclidi che emettono possibilmente solo radiazioni γ di energia compresa tra 100 e 250keV e l'80% dei radio-diagnostici utilizzati sono a base di tecnezio, ma vengono impiegati anche ^{67}Ga e ^{131}I .

La PET invece sfrutta radionuclidi che decadono con emissione di positroni, cioè di particelle β^+ , le quali riescono a percorrere una distanza dal nucleo emittente molto breve (da 0.5 a 2 cm a seconda della loro energia) prima di collidere con un elettrone nel tessuto circostante. Da questo fenomeno di annichilamento si generano due raggi γ che viaggiano in direzioni opposte e che possono essere misurati con precisione da un sistema di *detector* esterni. Dall'acquisizione di un

gran numero di questi eventi è possibile ricostruire un'immagine con informazioni sulla distribuzione spaziale della radioattività in funzione del tempo.

Laddove tecniche come MRI ed ultrasuoni forniscono essenzialmente mappe anatomiche molto dettagliate (*imaging* strutturale), PET e SPECT sono in grado di misurare alterazioni chimiche in corso ancor prima che la malattia si manifesti tramite segni anatomici macroscopici consentendo una diagnosi super-precoce. Infatti, tali esperimenti forniscono informazioni su processi metabolici, interazioni enzima/recettore e su meccanismi biochimici nei tessuti viventi fornendo così l'*imaging* molecolare o funzionale.

La PET sfrutta per lo più composti contenenti ^{64}Cu , ^{68}Ga e ^{86}Y e, in generale, è preferibile che il radionuclide non dia origine ad altri decadimenti oltre all'emissione di positroni, in modo da ottimizzare la risoluzione e limitare al contempo la quantità di radiazioni subita dal paziente.

In aggiunta a quanto detto finora, l'*imaging* molecolare di tessuti *ex vivo* (dopo biopsia) e lo *screening in vitro* possono essere ottenuti tramite tecniche ottiche che impiegano fluorofori. Tra questi, solo due specie hanno ricevuto l'approvazione da parte dell'ente governativo statunitense FDA (*Food and Drug Administration*) per l'uso in campo medico: si tratta della fluoresceina e dell'indocianina.

Uno dei vantaggi caratteristici dei sensori ottici è la loro capacità di essere attivati per stimolazione in un determinato ambiente e sotto condizioni specifiche; diversamente essi rimangono "invisibili", comportando quindi un trascurabile rumore di fondo e dimostrando elevata sensibilità.

Nel corso degli ultimi trent'anni ha assunto una sempre maggiore importanza la risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI), la quale permette di ottenere informazioni più dettagliate dei tessuti molli. Durante questo esame il paziente viene fatto stendere su un lettino che viene poi fatto scorrere all'interno di un magnete; dall'interazione tra le onde radio e il nucleo di ben determinati atomi presenti nel corpo, previa elaborazione al computer, si ottengono immagini di muscoli, tendini, cervello, colonna vertebrale, torace, addome, bacino, utero, ovaie, prostata, vasi sanguigni e ossa.

Il principale vantaggio dell'MRI rispetto agli altri metodi radio-diagnostici descritti è l'assenza di dannose radiazioni ad elevata energia, d'altra parte il suo maggior limite è la bassa sensibilità. Questa tecnica si basa sul monitoraggio della distribuzione e delle differenti proprietà delle molecole d'acqua nei tessuti tramite la misura della variazione nello spazio del tempo di rilassamento longitudinale e/o di quello trasversale degli spin nucleari dei protoni dell'acqua.

È stato dimostrato, infatti, che queste due grandezze risentono delle condizioni biochimiche del tessuto in esame e di conseguenza uno scanner MRI, mediante confronto di questi parametri

nelle parti sane ed in quelle che hanno subito delle variazioni patologiche, è in grado di fornire un ottimo contrasto.

Oltre che per stabilire variazioni di tipo anatomico, l'MRI può essere impiegata per monitorare la funzionalità degli organi se accoppiata ad un opportuno agente di contrasto (complessi di Fe(II), Mn(II) e Gd(III)).

L'interazione energia-materia è anche alla base dell'ecografia, tecnica spesso impiegata per determinare la natura di masse sospette, data la sua efficacia nel discriminare sacche di fluidi (cisti) da accumuli di cellule, e che si basa sulla registrazione della riflessione di ultrasuoni inviati da una sonda sull'organo d'interesse [13].

CAPITOLO 7

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- [1] C.A. Almeida, S.A. Barry, *Cancer: Basic Science and Clinical Aspects*, Wiley-Blackwell, 2010.
- [2] <http://drjockers.com/the-difference-between-normal-and-cancer-cells/#lightbox/1>
- [3] <http://cisncancer.org>
- [4] AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica), *I numeri del cancro in Italia*, 2016.
- [5] M. Stefani, N. Taddei, *Percorsi di Biochimica*, Zanichelli, 2011.
- [6] <http://malignant-melanoma.purzuit.com>
- [7] ESMO (European Society for Medical Oncology), *Cancro dell'ovaio: una guida per il paziente*, 2014.
- [8] <http://ovarian.org/about-ovarian-cancer/what-is-ovarian-cancer/types-a-stages>
- [9] L. Hunakova, P. Gronesova, E. Horvathova, I. Chalupa, D. Cholujovala, J. Duraj, J. Sedlak, *Toxicol. Lett.*, 2014, **230**, 479–486.
- [10] J.G. Lombardino, J.A. Lowe III, *Nature reviews. Drug discovery*, 2004, **3**, 853-862
- [11] AIFA (<http://www.agenziafarmaco.gov.it/content/come-nasce-un-farmaco>).
- [12] (a) ECACC (European Collection of authenticated cell cultures - http://www.phc-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112519&collection=ecacc_gc); (b) COLT Cancer database (http://dpsc.cabr.utoronto.ca/cancer/get_cellline.pl?cellline=OVCA5).
- [13] (a) E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, 2011; (b) E. Alessio, Dispense corso *Metals in Medicine* per il dottorato in Chimica interateneo Venezia-Trieste, 2016.
- [14] <https://drbentownsend.wordpress.com/2012/02/29/first-chemo-cycle-learning-process/>
- [15] <https://stemcellthailand.org/apoptosis-programmed-cell-death-pcd/>
- [16] <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-death.html>
- [17] <http://www.therapies.com/chemotherapy-dangers.html>
- [18] T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2009, **37**, 7588-7598.
- [19] J.C. Dabrowiak, *Metals in medicine*, John Wiley & Sons, 2009.
- [20] P. Ma, H. Xiao, C. Li, Y. Dai, Z. Cheng, Z. Hou, J. Lin, *Elsevier*, 2015, **18**, 554-564.

- [21] H.J. Repich, V.V. Orysyk, L.G. Palchykovska, S.I. Orysyk, Y.L. Zborovskii, O.V. Vasylchenko, O.V. Storozhuck, A.A. Biluk, V.V. Nikulina, L.V. Garmanchuck, V.I. Pekhnyo, M.V. Vovk, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2017, **168**, 98–106.
- [22] K.R. Barnes, S.J. Lippard, *Metal Ions Biol. Syst.*, 2004, **42**, 143–177.
- [23] C.A. Rabik, M.E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.*, 2007, **33**, 9–23.
- [24] (a) S. Zalba, M.J. Garrido, *Expert. Opin. Drug Deliv.*, 2013, **10**, 829–844; (b) D. Liu, C. He, A.Z. Wang, W. Lin, *Int. J. Nanomedicine*, 2013, **8**, 3309–3319; (c) G.P. Stathopoulos, T. Boulikas, *J. Drug Deliv.*, 2012, **2012**, 581363.
- [25] N. Casagrande, M. Celegato, C. Borghese, M. Mongiat, A. Colombatti, D. Aldinucci, *Clin. Cancer Res.*, 2014, **20 (21)**, OF1-11.
- [26] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 8113–8127.
- [27] (a) A.R. Kapdi, I.J.S. Fairlamb, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4751–4777; (b) M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2008, 183; (c) C. Sanchez-Cano and M. J. Hannon, *Dalton Trans.*, 2009, 10702; (d) I. Ott, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1670; (e) C. Gabbiani, L. Messori, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2011, **11**, 929; (f) A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1692; (g) A. Casini, L. Messori, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, **11**, 2647.
- [28] J. Hartwig, *Organotransition Metal Chemistry: from Bonding to Catalysis*, University Science Books, 2010.
- [29] M.D. Coskun, F. Ari, A.Y. Oral, M. Sarimahmut, H.M. Kutlu, V.T. Yilmaz, E. Ulukaya, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 4698–4705.
- [30] (a) A.S. Abu-Surrah, H.H. Al-Sadoni and M.Y. Abdalla, *Cancer Ther.*, 2008, **6**, 1; (b) M. Navarro, N.P. Pena, I. Colmenares, T. Gonzalez, M. Arsenak, P. Taylor, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 152–157; (c) E. Budzisz, U. Krajewska, M. Rozalski, A. Szulawska, M. Czyz, B. Nawrot, *Eur J. Pharm.*, 2004, **502**, 59–65.
- [31] (a) R.S. Srivastava, F.R. Fronczek, R.S. Perkins, T. Fukuyama, W. Xu, *Int. J. Oncol.*, 2010, **36**, 1591; (b) T.S. Kamatchi, N. Chitrapriya, H. Lee, C.K. Fronczek, K. Natarajan, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 2066; (c) B.N. Chaudhari, P.S. Gide, R.S. Kankate, Z.J. Jain, R.D. Kakad, *Int. J. Pharm. Chem.*, 2012, **2**, 27; (d) L. Maiore, M.A. Cinellu, S. Nobili, I. Landini, E. Mini, C. Gabbiani, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **108**, 123; (e) M. Gras, B. Therrien, G. Suss-Fink, A. Casini, F. Edefe, P.J. Dyson, *J. Organomet. Chem.*, 2010, **695**, 1119; (f) F. Huq, H. Tayyem, P. Beale, J.Q. Yu, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 30.

- [32] M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, H. Ohi, K. Kawamoto, T. Shibahara, T. Mizoshita, Y. Mori, S. Tanida, T. Kamiya, T. Joh, *BMC Cancer*, 2013, **13**, 1-9.
- [33] (a) E. Guerrero, S. Miranda, S. Luttenberg, N. Frohlich, J.-M. Koenen, F. Mohr, E. Cerrada, M. Laguna, A. Mendia, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 6635; (b) M. Carreira, R. Calvo-Sanjuai'n, M. Sanau', I. Marzo, M. Contel, *Organometallics*, 2012, **31**, 5772.
- [34] M.M. Shoukry, A.A. Shoukry, M.N. Hafez, *J. Coord. Chem.*, 2010, **63**, 652-664.
- [35] A.S. Abu-Surrah, M. Kettunen, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13**, 1337-1357.
- [36] H. Nawaz, A. Waseem, Z. Rehman, M. Nafees, M. N. Arshad, U. Rashid, *Appl. Organomet. Chem.*, 2017.
- [37] (a) Z.D. Matovic, E. Mrkalic, G. Bogdanovic, V. Kojic, A. Meetsma, R. Jelic, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **121**, 134; (b) E.S. Koumoussi, M. Zampakou, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, C.M. Beavers, S.J. Teat, G. Psomas, T.C. Stamatatos, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 7699; (c) J. Albert, J. Granell, J.A. Durán, A. Lozano, A. Luque, A. Mate, J. Quirante, M.K. Khosa, C. Calvis, R. Messeguer, L. Baldomà, J. Badia, *J. Organomet. Chem.*, 2017, **839**, 116-125.
- [38] (a) W. Li, R. Gust, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 755; (b) I. Ott, *Medicinal Chemistry of Metal N-Heterocyclic Carbene Complexes* (book chapter of *Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells*), 2017, 147-179.
- [39] S. Ray, R. Mohan, J.K. Singh, M.K. Samantay, M.M. Shaikh, D. Panda, P. Gosh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 15042-15053.
- [40] T.T. Fong, C. Lock, C.Y. Chung, Y.E. Fung, P. Chow, P. Wan, C. Che, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 11935-11939.
- [41] (a) H. Rosemeyer, *Chemistry & Biodiversity*, 2004, **1**, 361-401; (b) S. Dinesh, G. Shikha, G. Bhavana, S. Nidhi, S. Dileep, *J. Pharm. and Scient. Innov.*, 2012, **1**, 29-36.
- [42] J.W. Daly, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, **64**, 2153-2169.
- [43] T.T. Hansel, R.C. Tennant, A.J. Tan, L.A. Higgins, H. Neighbour, E.M. Erin, P.J. Barnes, *Drugs Today*, 2004, **40**, 55-69.
- [44] (a) E.I. Ivanov, G.D. Kalayanov, I.M. Yaroshchenko, D.E. Stepanov, *Khim. Geterotsikl. Soedin*, 1989, **11**, 1570-1571; (b) J. Schutz, W.A. Herrmann, *J. Organomet. Chem.*, 2004, **689**, 2995-2999.
- [45] E. Mohammadi, B. Movassagh, *J. Mol. Cat. A*, 2016, **418**, 158-167.
- [46] V.R. Landaeta, R.E. Rodriguez-Lugo, E.N. Rodriguez-Arias, D.S. Coll-Gomez, T. Gonzalez, *Transition Met. Chem.*, 2010, **35**, 165-175.
- [47] A.J. Arduengo, R.L. Harlow, M. Kline, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 361-363.

- [48] I.J.B. Lin, C. S. Vasam, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 642-670.
- [49] (a) D.J. Nelson, S.P. Nolan, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6723-6753; (b) S.P. Nolan, *N-Heterocyclic Carbenes in Synthesis*, Wiley-VCH, 2006.
- [50] (a) M.Z. Ghdhayeb, R.A. Haque, S. Budagumpi, M.B.K. Ahamed, A.M.S.A. Majid, *Polyhedron*, 2017, **121**, 222–230; (b) M.Z. Ghdhayeb, R.A. Haque, S. Budagumpi, M.B.K. Ahamed, A.M.S.A. Majid, *Inorg. Chem. Commun.*, 2017, **75**, 41–45.
- [51] J.J. Zhang, J.K. Muenzner, M.A. Abu El Maaty, B. Karge, R. Schobert, S. Wolfl, I. Ott, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 13161-1368.
- [52] (a) K.M. Hindi, M.J. Panzner, C. A. Tessier, C.L. Cannon, W.J. Youngs, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 3859-3884; (b) A.K. Nebioglu, A. Melaiye, K.M Hindi, S. Durmus, M.J. Panzner, L.A. Hogue, R.J. Mallet, C.E. Hovis, M. Coughenour, S.D. Crosby, A. Milsted, D.L. Ely, C.A. Tessier, C.L. Cannon, W.J. Youngs, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 6811-6818; (c) H.A. Mohamed, B.R.M. Lake, T. Laing, R.M. Phillips, C.E. Willians, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 7563-7569.
- [53] A. Szadkowska, S. Staszko, E. Zaorska, R. Pawlowski, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 44248-44253.
- [54] (a) J.J. Zhang, C.M. Che, I. Ott, *J. Organomet. Chem.*, 2015, **782**, 37-41; (b) M. Skander, P. Retailleau, B. Bourriè, L. Schio, P. Mailliet, A. Marinetti, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 2146-2154.
- [55] B. Bertrand, L. Stefan, M. Pirrotta, D. Monchaud, E. Bodio, P. Richard, P.L. Gendre, E. Warmerdam, M.H. De Jager, G.M.M. Groothuis, M. Picquet, A. Casini, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 2296-2303.
- [56] E. Mohammadi, B. Movassagh, *J. Organomet. Chem.*, 2016, **822**, 62-66.
- [57] T. Scattolin, L. Canovese, F. Visentin, S. Paganelli, P. Canton, N. Demitri, *Appl. Organomet. Chem.*, 2017 (**article in press**).
- [58] T. Scattolin, F. Visentin, I. Lampronti, L. Canovese, R. Gambari, P. Bergamini, L. Marvelli, C. Santo, N. Demitri, (**manuscript in preparation**).
- [59] R.H. Crabtree, *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, Wiley-Interscience, 4th edn, 2005.
- [60] P.C.J. Kamer, P.W.N.M. Van Leeuwen, *Phosphorus(III) Ligands in Homogeneous Catalysis: Design and Synthesis*, Wiley-VCH, 2012.
- [61] K. Moseley, P.M. Maitlis, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1974, 169-175.
- [62] R. Van Belzen, C.J. Elsevier, A. Didieu, N. Veldman, A.L. Speck, *Organometallics*, 2003, **22**, 722-736.

- [63] L. Canovese, F. Visentin, T. Scattolin, C. Santo, V. Bertolasi, *J. Organomet. Chem.*, 2016, **808**, 48-56; (b) L. Canovese, F. Visentin, T. Scattolin, C. Santo, V. Bertolasi, *Polyhedron*, 2016, **113**, 25-34; (c) T. Scattolin, F. Visentin, C. Santo, V. Bertolasi, L. Canovese, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 11560-11567; (d) L. Canovese, F. Visentin, T. Scattolin, C. Santo, V. Bertolasi, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 15049-15058; (e) L. Canovese, C. Santo, T. Scattolin, F. Visentin, V. Bertolasi, *J. Organomet. Chem.*, 2015, **794**, 288-300; (f) F. Visentin, C. Santo, T. Scattolin, N. Demitri, L. Canovese, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 10399-10407.
- [64] D. Petch, R.J. Anderson, A. Cunningham, S.E. George, D.E. Hibbs, R. Liu, S.P. Mackay, A. Paul, D.A.P. Small, P.W. Groundwater, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 5901-5914.
- [65] T. Scattolin, F. Visentin, L. Canovese, C. Santo, *A simple and alternative way to the methylation of functionalized purine bases*, XXXVII Congresso Divisione Chimica Organica, SCI, Venice, 2016, p. 173.
- [66] H.E. Affsprung, V.S. Archer, *Anal. Chem.*, 1964, **36 (13)**, 2512-2513; (b) M.J. Smith, S.E. Manahan, *Anal. Chim. Acta*, **48**, 1969, 315-319.
- [67] P. de Fremont, N.M. Scott, E.D. Stevens, T. Ramnial, O.C. Lightbody, C.L.B. Macdonald, J.A.C. Clyburne, C.D. Abernethy, S.P. Nolan, *Organometallics*, 2005, **24**, 6301-6309.
- [68] W.B. Coleman, G.J. Tsongalis, *The Molecular Basis of Human Cancer*, Humana Press, 2017.
- [69] (a) R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer J. Clin.*, 2015, **65**, 5-29; (b) A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, *Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 69-90; (c) G.R. Newell, M.R. Spitz, J.G. Sider, *Semin. Oncol.*, 1989, **16**, 3-9; (d) R.A. Miller, *Cancer.*, 1991, **68**, 2496-501; (e) L.A.G. Reis, C.L. Kosary, B.F. Hankey, B.A. Miller, L. Clegg, B.K. Edwards, *SEER cancer statistics review, 1973-1996*, MD: National Cancer Institute; 1999; (f) U.S. Public Health Service, *The health consequences of smoking cancer: a report of the surgeon general*. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office on Smoking and Health; 1982; (g) B. Armstrong, R. Doll, *Int. J. Cancer*, 1975, **15**, 617-631; (h) W.C. Willett, M.J. Stampfer, G.A. Colditz, B.A. Rosner, F.E. Speizer, *N. Engl. J. Med.*, 1990, **323**, 1664-1672; (i) D.P. Burkitt, *Cancer.*, 1971, **28**, 3-13; (j) S. Bingham, D.R. Williams, T.J. Cole, W.P. James, *Br. J. Cancer*, 1979, **40**, 456-463.
- [70] Ministero della Salute (http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_4.jsp?lingua=italiano&area=Screening).