

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA



DIPARTIMENTO DI CHIMICA
CHIM/03-Chimica Generale ed Inorganica

Tesi di Dottorato di Ricerca in ICM
“Inorganic Chemistry Methods”
XIV Ciclo

Sintesi e caratterizzazione di complessi di Zn(II):
un nuovo approccio per ottenere biomateriali

Supervisore
Prof. Daniela Pucci

Candidato
Sante Pirillo

Coordinatore
Ch.mo Prof. Nino Russo

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

SOMMARIO	1
CAPITOLO I	14
I.1“Drug discovery” e design di complessi metallici antitumorali	14
I.2 Metallo-intercalazione del DNA	17
I.3 Lo zinco come metallo innovativo	25
I.4 Complessi di zinco biologicamente attivi	31
I.5 G-quadruplex	46
CAPITOLO II	58
II.1 Curcumina-storia e tradizione	59
II.2 Curcumina-chimica	62
II.3 Curcumina-farmacologia	67
II.3.1 Attività antinfiammatoria	68
II.3.2Attività antiossidante	69
II.3.3 Attivita antiaggregante	72
II.3.4Attività ipoglicemizzante	73
II.3.5 Attività antitumorale	74
II.3.6 Curcumina-effetti indesiderati tossicità	81
II.4 Le formulazioni della curcumina	82
II.5 Complessi metallici di cucumioidi	89
II.5.1 Complessi metallici omolettici della curcumina	90
II.5.2. Compessi metallici eterolettici della curcumina	96

CAPITOLO III	102
III.1 Sintesi e caratterizzazione di complessi di Zn (II) della curcumina con derivanti 1,10 fenantrolinici	103
III.1.1 Sintesi e caratterizzazione dei complessi precursori	
$[(L^n)ZnCl_2]$, 1-3	105
III.1.1.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 1	106
III.1.1.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 2	108
III.1.1.3 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 3	111
III.1.2 Sintesi e caratterizzazione dei complessi curcuminici	
$[(L^n)Zn(curc)(Cl)]$, 4-6	113
III.1.1.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso 4	114
III.1.1.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso 5	120
III.1.1.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso 6	123
III.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso di Zn(II) della curcumina con un derivato 2,2' bichinolinico	127
III.2.1 Sintesi e caratterizzazione del legante bichinolinico L⁴	130
III.2.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 7	133
III.2.3 Sintesi e caratterizzazione del complesso 8	134
III.3 Sintesi e caratterizzazione di complessi di Zn(II) della curcumina con derivati 2,2' bipyridinici	140
III.3.1. Sintesi e caratterizzazione dei leganti 2,2' bipyridinici	142
III.3.1.1 Sintesi e caratterizzazione del legante bipyridinico L⁶	143
III.3.1.2 Sintesi e caratterizzazione del legante bipyridinico L⁷	146
III.3.1.3 Sintesi e caratterizzazione del legante bipyridinico L⁸	148
III.3.2 Sintesi e caratterizzazione dei complessi precursori	
$[(L^n)ZnCl_2]$, 9-12	149
III.3.2.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 9	150

III.3.2.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 10	152
III.3.2.3 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 11	154
III.3.2.4 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore 12	156
III.3.3 Sintesi e caratterizzazione dei complessi curcuminici [(L ⁿ)Zn(curc)(Cl)], 13-16	158
III.3.3.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso 13	159
III.3.3.1.1 Caratterizzazione biologica del complesso 13	169
III.3.3.1.2 Caratterizzazione spettroscopica dell'interazione del complesso 13 con l'HSA	171
III.3.3.1.3 Studio di incapsulazione nei nanotubi di carbonio del complesso 13	174
III.3.3.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso 14	178
III.3.3.2.1 Caratterizzazione biologica del complesso 14	182
III.3.3.3 Studio di interazione dei complessi 13 e 14 con oligomeri di DNA tramite fluorescenza a microscopia polarizzata	184
III.3.3.4 Sintesi e caratterizzazione del complesso 15	186
III.3.3.5 Sintesi e caratterizzazione del complesso 16	190
III.4 Sintesi e caratterizzazione di complessi omolettici di Zn(II) con derivati 2,2' bipyridinici	195
III.4.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso 17	195
III.4.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso 18	200
III.4.3 Caratterizzazione fotofisica dei complessi 17 e 18	202

CAPITOLO IV	205
IV.1 Materiali e metodi	205
IV.1.1 Informazioni generali	205
IV.1.2 Fotofisica	205
IV.1.3 Cristallografia a raggi X	206
IV.1.4 Microscopia a forza atomica “AFM”	207
IV.1.5 Microscopia a fluorescenza polarizzata	208
IV.1.6 Citotossicità e inibizione della crescita cellulare	210
IV.1.7 Nanotubi di carbonio “CNTs”	212
IV.2 Sintesi di complessi curcuminici di Zn(II)	214
IV.2.1 Sintesi di $[(L^1)ZnCl_2]$, 1	214
IV.2.2 Sintesi di $[(L^2)ZnCl_2]$, 2	215
IV.2.3 Sintesi di $[(L^3)ZnCl_2]$, 3	217
IV.2.4 Sintesi di $[(L^1)Zn(curc)(Cl)]$, 4	218
IV.2.5 Sintesi di $[(L^2)Zn(curc)(Cl)]$, 5	220
IV.2.6 Sintesi di $[(L^3)Zn(curc)(Cl)]$, 6	221
IV.2.7 Sintesi del legante L⁴	223
IV.2.8 Sintesi di $[(L^4)ZnCl_2]$, 7	225
IV.2.9 Sintesi di $[(L^4)Zn(curc)(Cl)]$, 8	227
IV.2.10 Sintesi del legante L⁶	228
IV.2.11 Sintesi del legante L⁷	232
IV.2.12 Sintesi del legante L⁸	233
IV.2.13 Sintesi di $[(L^5)ZnCl_2]$, 9	234
IV.2.14 Sintesi di $[(L^6)ZnCl_2]$, 10	235

IV.2.15 Sintesi di $[(L^7)ZnCl_2]$, 11	236
IV.2.16 Sintesi di $[(L^8)ZnCl_2]$, 12	237
IV.2.17 Sintesi di $[(L^5)Zn(curc)(Cl)]$, 13	238
IV.2.18 Sintesi di $[(L^6)Zn(curc)(Cl)] \cdot (Acetone)$, 14	240
IV.2.19 Sintesi di $[(L^7)Zn(curc)(Cl)]$, 15	242
IV.2.20 $[(L^8)Zn(curc)(Cl)]$, 16	243
IV.3. Sintesi di complessi omolettici di Zn(II)	245
IV.3.1 Sintesi di $\{[Zn(L^6)_3](PF_6)_2\}_2 \cdot L^6 \cdot 4H_2O$, 17	245
IV.3.2 Sintesi di $[Zn(L^8)_3](PF_6)_2$, 18	246

SOMMARIO

La chemioterapia è una delle principali modalità di trattamento dei tumori, nonostante i noti effetti collaterali e l'instaurarsi di resistenza farmacologica dopo la prima esposizione all' agente chemioterapico. Pertanto sarebbe auspicabile lo sviluppo di nuovi composti con minor tossicità ma maggiore efficacia. L'applicazione della chimica inorganica alla medicina è un campo di ricerca in grande crescita; in particolare, molti sforzi sono rivolti a sviluppare nuovi farmaci antitumorali basati sulla chimica dei metalli di transizione. I complessi di coordinazione, infatti, offrono nuovi meccanismi di azione rispetto ai composti organici, poiché la natura dello ione metallico, il suo stato di ossidazione ed il tipo e numero di leganti coordinati possono tutti esercitare una influenza decisiva sull'attività biologica del complesso metallico. Il *cis*-platino (*cis*-DDP) è entrato nell'uso clinico del trattamento del cancro da più di 30 anni ma esso presenta alcuni problemi, come l'elevata tossicità, lo sviluppo di resistenza al trattamento farmacologico e la ridotta efficacia nei confronti di alcuni tipi di cancro. Negli ultimi anni, quindi, la ricerca si è spostata verso lo sviluppo di una nuova generazione di complessi metallici che si discostano dalle classiche regole struttura-attività, ed un'ottima alternativa al Pt(II) sembra essere lo Zn(II). Lo Zn(II) è uno dei metalli biologicamente più importanti ed apparentemente indispensabile a tutte le forme di vita: è considerato un microelemento ma con un grande ruolo. E' un metallo a basso costo, con vasta chimica di coordinazione e con interessanti proprietà fotofisiche, grande protagonista nella chimica bioinorganica ma ancora poco esplorato per le sue potenzialità antitumorali.

Sono stati, infatti, recentemente sintetizzati alcuni complessi di Zn(II) basati su leganti O,O chelanti, appartenenti alla famiglia dei troponoidi e

degli acilpirazoloni, e leganti N,N chelanti biperidinici, di cui sono state studiate le proprietà antitumorali *in vitro* su linee cellulari prostatiche. I risultati sono stati promettenti, ma i limiti di solubilità nei solventi biologicamente compatibili e la loro scarsa affinità strutturale per un meccanismo di intercalazione hanno spinto verso la ricerca di complessi simili ma più adatti agli scopi prefissati.

Un'ulteriore tendenza nella ricerca dei farmaci anticancro, è quella di individuare tratti particolari e caratteristiche uniche delle cellule cancerose. Fino ad oggi, i maggiori sforzi sono stati ampiamente indirizzati alla progettazione di molecole che interagiscono con la doppia elica del DNA o DNA duplex. I moltissimi studi sulla trasformazione delle cellule umane normali in cellule tumorali hanno consentito di caratterizzare meglio le differenze tra i due tipi di cellule e di individuare target esclusivi delle cellule tumorali: tra questi ha avuto ampio risalto l'intimo legame tra l'immortalità del tumore e l'attività dell'enzima telomerasi, una nucleoproteina che ha il compito di conservare la lunghezza dei cromosomi. Le quadruple eliche, o G-quadruplex, sono strutture secondarie del DNA caratteristiche di oligonucleotidi con sequenze ricche di guanine, le quali hanno una naturale tendenza ad associarsi in quartetti complanari di basi, tenute insieme da legami idrogeno di tipo Hoogsteen. L'interesse scientifico verso strutture del DNA a quadrupla elica è giustificato dalla presenza di sequenze ricche di guanine, potenzialmente in grado di strutturarsi in quadruplex, in regioni importanti del genoma umano quali telomeri eucarioti. La mancata azione della telomerasi è alla base del meccanismo dell'apoptosi. Al contrario, un'intensa attività telomerasica, tipica di diverse forme tumorali, causa il fallimento dell'apoptosi. Pertanto, la telomerasi è considerata un target molecolare promettente in varie terapie anticancro, proprio perché

espressa nell'80-90% delle cellule tumorali ed assente nella maggior parte dei tessuti somatici. La strutturazione dei telomeri in forme a quadrupla elica non consente il riconoscimento da parte della telomerasi e, pertanto, blocca l'allungamento del telomero. Un approccio farmacologico estremamente promettente è basato, quindi, sulla possibilità di inibire l'attività della telomerasi in cellule tumorali e promuoverne, conseguentemente, l'apoptosi mediante somministrazione di sostanze in grado di indurre e/o stabilizzare strutture quadruplex nei telomeri. Fino ad ora pochi sono gli esempi di complessi metallici in grado di stabilizzare strutture quadruplex telomeriche, ma grazie alla versatilità della chimica di coordinazione dei metalli di transizione, i complessi metallici si configurano come ottimi potenziali leganti G-quadruplex.

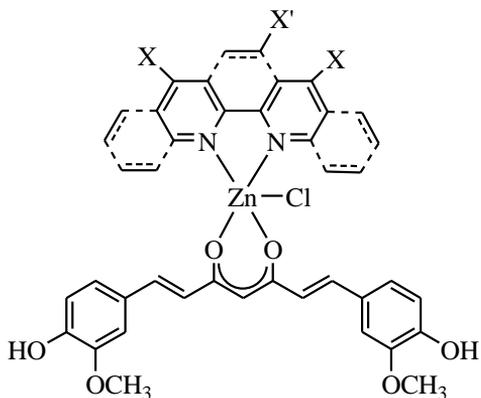
In questo lavoro di ricerca sono state progettate due famiglie di complessi di Zn(II), in modo che la struttura e le proprietà abbiano i requisiti per soddisfare le attività biologiche precedentemente menzionate.

Complessi eterolettici

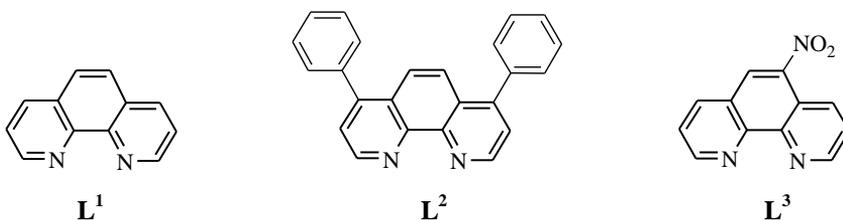
E' stata messa a punto di sintesi per la realizzazione di nuovi complessi metallici eterolettici multifunzionali, capaci cioè di raggruppare in una singola molecola diverse proprietà: esibire effetti antitumorali attraverso meccanismi addizionali o alternativi rispetto a quelli covalenti classici, come l'intercalazione, ed essere nello stesso tempo dotati di una fluorescenza intrinseca, per seguirne per via spettroscopica sia la localizzazione che il meccanismo stesso di citotossicità.

Per ottenere tale scopo è stato utilizzato lo ione Zn(II) come metallo centrale ed a lui sono state coordinate due diverse tipologie di leganti, uno N,N ed uno O,O chelante, entrambi potenzialmente intercalanti. A completare la sfera di coordinazione dello Zn(II) è stato utilizzato un

legante monodentato labile per dare origine a complessi pentacoordinati con una geometria piramidale quadrata, quindi molto innovativi rispetto ai classici metallointercalatori a geometria quadrato-planare o ottaedrica presenti in letteratura. La struttura generale di tali complessi è la seguente:

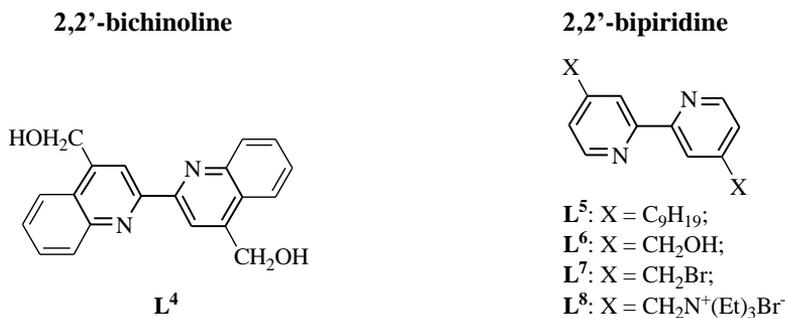


Come leganti N,N chelanti sono stati utilizzati 1,10-fenantroline, 2,2'-bichinoline e 2,2'-bipiridine, leganti che presentano elevata capacità di coordinazione. In particolare sono stati usati la 1,10-fenantrolina (L^1), la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (L^2), e la 5-nitro-1,10-fenantrolina (L^3), in modo da sondare se la presenza di sostituenti più o meno ingombranti potesse modificare le proprietà e la reattività dei complessi finali.

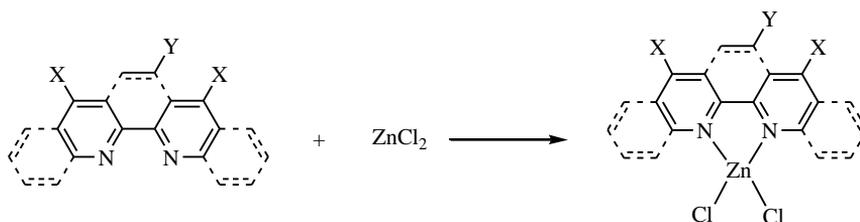


A differenza dei leganti fenantrolinici che sono commerciali, è stato necessario mettere a punto una strategia sintetica opportuna che prevede numerosi step, il legante 2,2' bichinolinico e quelli 2,2' bipiridinici

funzionalizzati opportunamente in posizione para rispetto agli atomi di azoto, in modo da studiarne e migliorarne il ruolo dei vari gruppi sulle proprietà di solubilità nonché sulla citotossicità.

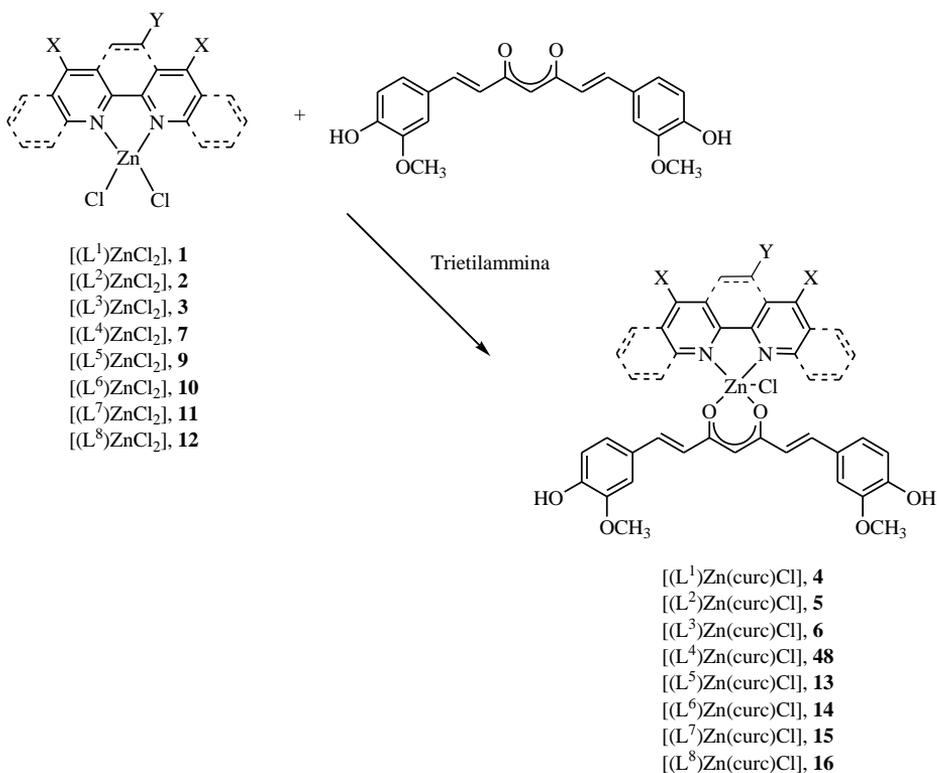


Tali leganti N,N chelanti sono stati coordinati allo ione Zn(II) dando luogo alla formazione di complessi di Zn(II) tetracoordinati [(Lⁿ)ZnCl₂].



I complessi [(Lⁿ)ZnCl₂] rappresentano i precursori dei complessi eterolettici finali [(Lⁿ)Zn(curc)Cl] in cui è stata utilizzata, come legante O,O, la curcumina (curc).

La curcumina, infatti, come legante libero presenta una buona attività in diversi campi della medicina essendo un potente antiossidante con numerose proprietà biologiche, recentemente noto anche per la sua efficacia terapeutica nei confronti di varie forme tumorali. Sfortunatamente però la curcumina soffre dello svantaggio di essere relativamente poco biodisponibile, facilmente ossidabile e fotodegradabile, tutti fenomeni alla base dell'uso limitato che di questa specie organica si può fare in campo farmaceutico. La coordinazione di tale legante ad uno ione metallico però induce delle variazioni strutturali consistenti che possono stabilizzare il farmaco, impedendone la degradazione e migliorandone le proprietà farmacologiche.



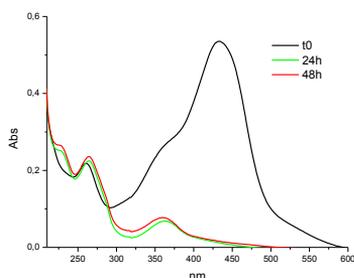
La presenza contemporanea del frammento curcuminoide e dello ione Zn(II), permette di combinare in una singola molecola le proprietà antitumorali con una intrinseca fluorescenza, ottimo strumento per poter seguire il percorso farmacocinetico ed i target specifici in modo da esaminare il meccanismo d'azione del farmaco senza bisogno di ulteriori agenti esterni.

Tutti i complessi sintetizzati sono stati ottenuti con buone rese e sono stati caratterizzati mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare e, laddove possibile, mediante analisi diffrattometrica a raggi X e microscopia AFM in modo da studiarne la morfologia in nanoscala e testare l'effetto di differenti substrati e solventi sulla forma ed aggregazione delle molecole stesse.

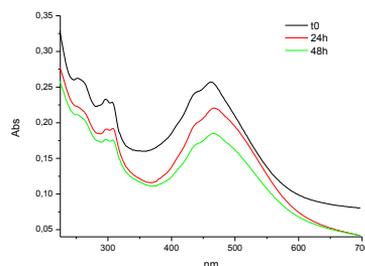
Tutti i leganti ed i complessi sono stati caratterizzati anche da un punto di vista fotofisico per verificare il loro possibile carattere emissivo e la loro stabilità in soluzione. La curcumina assorbe nel blu-violetto ed emette nella regione giallo-verde con una resa quantica del 5%. I leganti fenantrolinici, bipyridinici e bichinolinici assorbono nell'UV e risultano essere privi di proprietà emissive, eccezion fatta per i leganti \mathbf{L}^1 , \mathbf{L}^2 e \mathbf{L}^8 che presentano proprietà emissive nella regione UV, ma con basse rese quantiche di emissione. Anche i complessi precursori $[\text{L}^n\text{ZnCl}_2]$ assorbono nella regione UV dello spettro elettromagnetico ed emettono nella regione UV con basse rese quantiche di emissioni, eccezion fatta per i complessi precursori bipyridinici **9** e **10**, che mostrano elevate rese quantiche di emissione, rispettivamente pari al 6% ed al 43%. Un comportamento completamente diverso, rispetto ai leganti N,N chelanti ed ai loro precursori dicloro, mostrano i complessi curcuminici $[(\text{L}^n)\text{Zn}(\text{curc})\text{Cl}]$, che assorbono nel blu-violetto ed emettono conseguentemente nella regione giallo-verde, in un range che va da 531 a

545 nm, con buone rese quantiche di emissione (dal 2% al 20.4%). Questo comportamento si origina dalla presenza del legante curcumina nei complessi sintetizzati.

Sulla maggior parte dei complessi sono stati effettuati studi biologici, ma prima di fare i test biologici sono state eseguite le misure di spettroscopia UV-vis dei complessi, dopo 24 e 48h, in soluzione acquosa tamponata con tampone fosfato a pH fisiologico (pH=7.4). Tali misure hanno confermato la stabilità nel tempo dei complessi rispetto alla curcumina libera che, invece va incontro, già dopo 24 ore, a fotodegradazione.



Curcumina



Complexo 13

Quindi, i complessi sono stati testati *in vitro* su linee cellulari tumorali prostatiche umane (DU145, LnCaP e PC-3) e su linee cellulari di neuroblastomi umani (LAN-5 e SHSY-5Y). I complessi testati, a differenza dei leganti liberi e dei complessi precursori dicloro, mostrano un'ottima attività antitumorale dell'ordine micromolare. Si può affermare che questa coordinazione non solo stabilizza la curcumina, ma ne modifica anche l'attività biologica.

In modo particolare il complesso biperidinico **13** $[(L^5)Zn(curc)Cl]$ è quello che presenta la migliore solubilità in vari solventi (clorurati, alcoli,

DMSO e parzialmente acqua), quindi è stato scelto per effettuare studi più approfonditi.

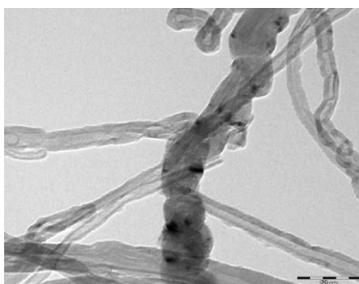
E' stata studiata l' attività antiproliferativa *in vitro*, nei confronti di linee cellulari tumorali prostatiche umane (DU145, LNCaP e PC-3) e di neuroblastomi (SHSY-5Y e LAN-5). In particolare, nella seguente tabella sono riportati i suoi valori di IC₅₀ (concentrazione di farmaco necessaria per inibire il 50% della proliferazione cellulare). Si può notare che, a differenza del legante bipyridinico **L⁵** e del complesso precursore **9** che non mostrano una particolare attività antiproliferativa, il complesso **13** ha un' ottima attività citotossica dell' ordine micro molare, in particolare sulla linea cellulare prostatica DU145 (12,5 µM) con un' attività nettamente superiore allo stesso *cis*-platino (33µM).

	DU145	Pc-3	LNCaP	SH5Y-SY	LAN-5
Curcumina	2.3±0.7	2.0±2.2	7.8±1.5	13.6±5.6	24±2.2
(bipy-9), L⁵	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
[(L⁵)ZnCl₂], 9	32.3±2.5	28.3±2.2	45.3±2.1	19.1±3	36±2.2
[(L⁵)Zn(curc)Cl],13	12.5±2.6	21.5±8	34±1.3	16±8.1	13.2±9

Validata l'attività citotossica del complesso **13** nei confronti di cellule neoplastiche e dunque, una sua potenziale applicazione come farmaco antitumorale, è stato effettuato lo studio dell'interazione dello stesso complesso con l'HSA (human serum albumin), mediante tecniche spettroscopiche di fluorescenza UV/VIS, con l'obiettivo di giungere ad una comprensione del meccanismo di binding complesso-proteina. E' stato deciso di condurre questo studio in quanto la farmacocinetica e la farmacodinamica di molti farmaci dipendono, ampiamente, dall'interazione che gli stessi hanno con l'albumina sierica umana, che è la più abbondante proteina presente a livello del plasma sanguigno. Lo

studio è stato realizzato monitorando il cambiamento delle proprietà fotofisiche del complesso **13** e dell'albumina, in seguito alla loro interazione. I risultati ottenuti convergono alla conclusione che il sito di legame del complesso all'albumina è localizzato in una tasca idrofobica del subdominio IIA della stessa.

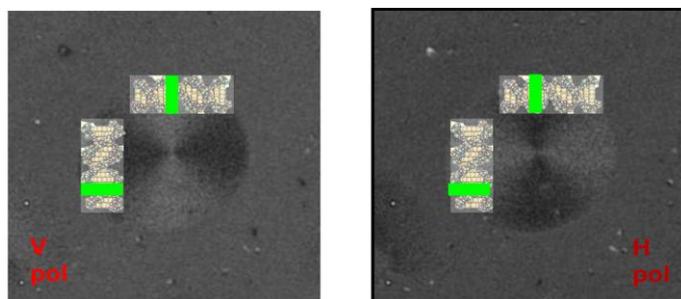
E' stata studiata, inoltre, la possibile incapsulazione del complesso **13** nei nanotubi di carbonio (CNTs). I nanotubi di carbonio sono materiali innovativi che presentano svariati campi di applicazione, tra cui quello biomedicale e farmaceutico è senz'altro quello in più rapida espansione. Questo complesso è stato incapsulato all'interno dei CNTs e la sua effettiva incapsulazione all'interno dei CNTs è stata confermata mediante microscopia TEM come si può osservare dalla seguente immagine



Inoltre, è stata determinata l'efficienza di caricamento del farmaco che è risultata essere del 29 ± 2 %. Questo risulta essere un buon dato che darà la possibilità di passare allo step successivo, che sarà quello di valutare i profili di rilascio del potenziale farmaco prima *in vitro* al fine di valutare le cinetiche di rilascio, e successivamente in coltura cellulare per valutare l'efficacia del sistema di rilascio proposto.

Infine, è stata studiata la potenziale capacità intercalante a livello del DNA. Questo è stato studiato utilizzando tecniche ottiche come la microscopia a trasmissione polarizzata e la microscopia a fluorescenza

polarizzata, così da caratterizzare ulteriormente il complesso **13** in presenza di oligomeri di DNA a doppio filamento grazie alla fluorescenza che presentano nel range del visibile. In particolare, è stato mescolato con gli oligomeri di DNA liquido-cristallini che provvedono anche a rendere l'ambiente più idrofobico, quindi molto più adatto per molecole che presentano una bassa solubilità in acqua. L'emissione della miscela è stata fotografata in varie direzioni della polarizzazione incidente (orizzontale e verticale) ed è stata osservata nel dominio liquido-cristallino, come mostrato nella seguenti immagini



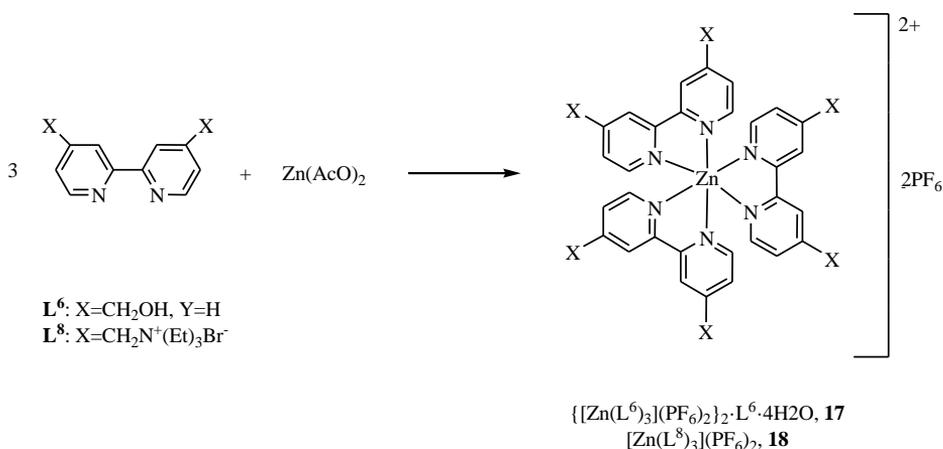
Tutto ciò sta ad indicare la presenza di interazioni tra le doppie eliche di DNA e le molecole ospiti. Inoltre per i complessi **13** il pattern di fluorescenza, lungo i domini liquido-cristallini, è simile a quello del bromuro di etidinio (paradigma di molecola intercalante), infatti la loro intensità di fluorescenza indica, che le molecole sono perpendicolari all'asse del DNA, parallele alle basi e quindi intercalate.

Complessi omolettici

E' stata messa a punto anche la sintesi di complessi tris omolettici di Zn(II), in cui sono stati utilizzati come leganti esclusivamente le 2,2' bipyridine, in modo da avere una estesa superficie aromatica e quindi

svolgere sia una potenziale attività intercalante che una potenziale stabilizzazione delle strutture G-quadruplex. Sono state utilizzate 2,2'-bipiridine che presentano differenti sostituenti in posizione para rispetto agli atomi di azoto, in modo da poter verificare gli effetti dei gruppi terminali sulla solubilità dei complessi e nello stesso tempo in modo che la solubilità in mezzi polari venga in questo modo favorita da interazioni elettrostatiche.

In particolare, sono stati utilizzati i leganti **L⁶** ed **L⁸**, in quanto presentano come sostituenti in posizione para rispetto agli atomi di azoto, rispettivamente un gruppo idrossilico ed un gruppo ionico. Sono stati scelti con la possibilità che la solubilità nei mezzi polari venga favorita da possibili interazioni elettrostatiche.



I complessi sintetizzati sono stati ottenuti con buone rese e sono stati caratterizzati mediante spettroscopie IR, ¹H-NMR, UV-vis, analisi elementare e mediante analisi diffrattometrica a raggi X.

In generale l'obiettivo che ci si era proposti, cioè di mettere a punto una strategia sintetica per ottenere da un lato, nuovi complessi di Zn(II)

eterolettici e dall' altro, nuovi complessi tris omolettici sempre di Zn(II), è stato raggiunto.

I complessi di Zn(II) con la curcumina mostrano una buona stabilità in soluzione ha permesso di superare svantaggi come poca biodisponibilità e fotodegradazione che limitano l'efficacia del legante curcumina da solo. La struttura molecolare complessiva e la presenza dei leganti aromatici planari coordinati allo Zn(II) ha suggerito che tali complessi possano agire come metallointercalanti. Inoltre la presenza contemporanea del frammento curcuminoide e dello ione Zn(II), ha permesso di combinare in una singola molecola le proprietà antitumorali con una intrinseca fluorescenza, ottimo strumento per poter seguire il percorso farmacocinetico ed i target specifici in modo da esaminare il meccanismo d'azione del farmaco senza bisogno di ulteriori agenti esterni.

Inoltre, tutti i complessi tris biperidinici di Zn(II), vista la loro stabilità nel tempo in soluzione acquosa tamponata a pH 7.4, saranno testati per studiare se sono anch' essi citotossici e nello stesso tempo, vista la loro solubilità in acqua e l' estesa superficie aromatica, se sono capaci di stabilizzare le strutture G-quadruplex.

Capitolo I

I.1 “Drug discovery” e design di complessi metallici antitumorali

Il cancro rappresenta una tra le maggiori cause di morte per l'uomo. La principale strategia di trattamento antitumorale è la chemioterapia, nonostante i ben noti effetti collaterali.¹ A livello clinico, molti tumori rispondono in modo soddisfacente al primo trattamento con chemioterapici, sebbene la maggior parte di essi sviluppi una farmaco resistenza secondaria che determina un progressivo peggioramento clinico del paziente. E' stato ampiamente dimostrato che il fenotipo “multi drug resistant” espresso dalle cellule tumorali sia la maggior causa di insuccesso della chemioterapia antitumorale.² Pertanto è necessario ricercare e sviluppare nuovi composti in grado di ridurre la sopravvivenza delle cellule tumorali al trattamento.

Negli ultimi decenni la chimica inorganica si è occupata, con sempre maggiore interesse, della sintesi di complessi metallici che possano risultare utili in campo biologico, lavoro che risulta essere molto stimolante e proficuo come testimoniano i numerosi nuovi complessi sintetizzati che sono entrati a far parte dell'uso medico come innovativi agenti terapeutici.^{3,4,5,6} I complessi di coordinazione, infatti, offrono nuovi meccanismi di azione rispetto ai composti organici, poiché la natura dello ione metallico, il suo stato di ossidazione ed il tipo e numero di leganti coordinati possono tutti esercitare una influenza decisiva

¹ V. T. Devita, E. Chu, *Cancer Res.* **2008**, 68, 8643.

² M. D. Hall, M. D. Handley, M.M. Jottesman, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2009**, 30, 546.

³ C. X. Zhang, S. J. Lippard, *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 481.

⁴ G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 3.

⁵ Z. Guo, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1512.

⁶ I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2007**, 340, 117.

sull' attività biologica del complesso metallico.^{7,8,9} L'uso di complessi inorganici in medicina non è una novità: per migliaia di anni i complessi di rame sono stati utilizzati per le loro proprietà antisettiche mentre i complessi di oro hanno trovato largo impiego nella medicina araba e cinese. L'applicazione sicuramente più nota nella medicina moderna riguarda l'uso del *cis*-platino (*cis*-DDP) come agente antitumorale. Il *cis*-platino è entrato nell'uso clinico del trattamento del cancro da più di 30 anni ma esso presenta alcuni problemi, come l'elevata tossicità, lo sviluppo di resistenza al trattamento farmacologico¹⁰ e la ridotta efficacia nei confronti di alcuni tipi di cancro.¹¹ Recentemente quindi la ricerca si è spostata verso la sintesi di nuovi complessi a base di Pt(II), che esplicano la loro azione citotossica formando sempre addotti covalenti con le molecole responsabili della trasmissione dei caratteri ereditari; ma tuttavia presentano un grosso limite, che deriva dall'elevata tossicità dovuta alla scarsa selettività d'azione, in quanto agiscono nella larga matrice organica dei sistemi biologici.^{7,12,13,14} Di recente, comunque, la ricerca si è spostata verso la sintesi di nuovi complessi metallici la cui attività antiproliferativa sia legata a nuovi modi di interazione con il DNA.^{8,11,15,16,17} Infatti, dalla scoperta del *cis*-DDP ad oggi, molti progressi sono stati fatti per quanto riguarda lo studio delle interazioni tra biomolecole e complessi metallici a potenziale attività farmacologica e

⁷ P. CA Bruijninx, P. J. Sadler, *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2008**, 12, 197.

⁸ G. Sava, A. Bergamo, P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 9069.

⁹ T. W. Hambley, *Dalton Trans.*, **2007**, 4929.

¹⁰ M. Galanski, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 2075.

¹¹ J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 1303.

¹² Y.-P. Ho, S. C. F. Au-Yeung, K. K. W. To, *Med. Res. Rev.*, **2003**, 5, 633.

¹³ R. Bakhtiar, E.-I. Ochiai, *General Pharmacol.*, **1999**, 32, 525.

¹⁴ L. M. Pasetto, M. R. D' Andrea, A. A. Brandes, E. Rossi, S. Monfardini, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2006**, 60, 59.

¹⁵ T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 534.

¹⁶ S. P. Fricker, *Dalton Trans.*, **2007**, 4903.

¹⁷ S. H. van Rijt, P. J. Sadler, *Drug Discovery Today*, **2009**, 14, 1089.

molte tecniche provenienti dalla biologia molecolare sono in grado di studiare questi aspetti. Oggi possiamo affermare che i complessi metallici possono legarsi al DNA reversibilmente o irreversibilmente. Sono legami irreversibili il legame covalente, che può essere bifunzionale (*intrastrand* o *interstrand*) o monofunzionale. Tra gli agenti più noti che legano il DNA in modo covalente possiamo ricordare potenti cancerogeni come il benzo[α]pirene e lo stesso *cis*-platino. Mentre legami reversibili sono il legame al solco minore, l'intercalazione e l'inserzione (Figura I.1 e I.2). Questi ultimi implicano interazioni elettrostatiche e/o legame a idrogeno.¹⁸

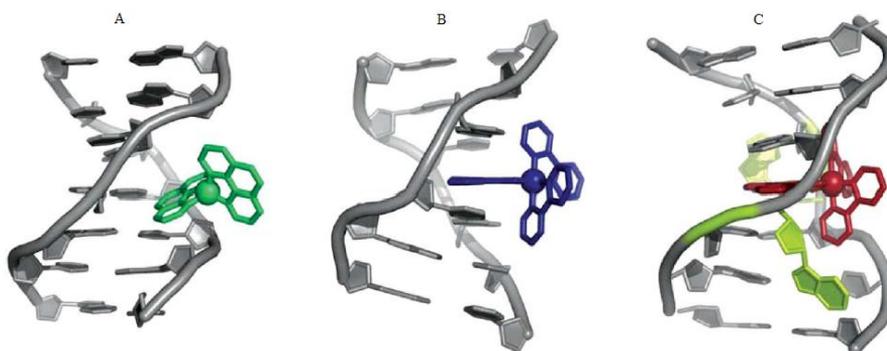


Fig. I.1. Legame al solco (A), metallointercalazione (B) e metalloinserzione (C)

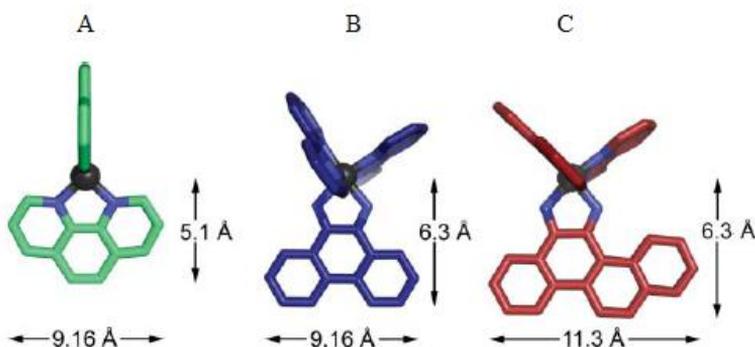


Fig. I.2. Legante al solco (A), metallointercalatore (B) e metalloinsertore (C)

¹⁸ B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. K. Barton, *Chem. Commun.*, **2007**, 4565.

I.2 Metallo-intercalazione del DNA

La novità nella ricerca di specie antitumorali è rappresentata dall'interazione con il DNA mediante intercalazione che è una delle modalità più studiate perché produce alta affinità di legame e selettività specifica nei confronti del target.¹⁸

Il concetto d'intercalazione fu proposto per primo da Lerman nel 1961 per spiegare il reversibile e non covalente legame delle acridine al DNA.¹⁹

Queste, come altre strutture aromatiche o eteroaromatiche planari, sono in grado di inserirsi all'interno dello spazio esistente tra due coppie di basi consecutive del DNA, provocando un gran numero di effetti biologici. Da qui il crescente interesse verso lo studio dei processi d'intercalazione, come si vede dal continuo aumento delle pubblicazioni scientifiche relative a questo argomento.

Ma per capire come avviene l'interazione tra il DNA e gli agenti intercalanti bisogna conoscere la complessità chimica della macromolecola responsabile della trasmissione dei caratteri ereditari. Il modello di Watson e Crick del DNA propone una struttura costituita da due catene polinucleotidiche avvolte a spirale a formare una doppia elica destrorsa. Lungo le due catene o filamenti antiparalleli, si alternano una molecola di acido fosforico e una di pentosio a cui sono legate lateralmente le basi puriniche e pirimidiniche. Nel DNA gli accoppiamenti dell'adenina con la timina, AT e della guanina con la citosina, GC (Figura I.3) rendono massima la stabilizzazione della doppia elica attraverso legami a idrogeno.²⁰

¹⁹ L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 18.

²⁰ I. Haq, J. Ladbury, *J. Mol. Recognit.*, **2000**, 13, 188.

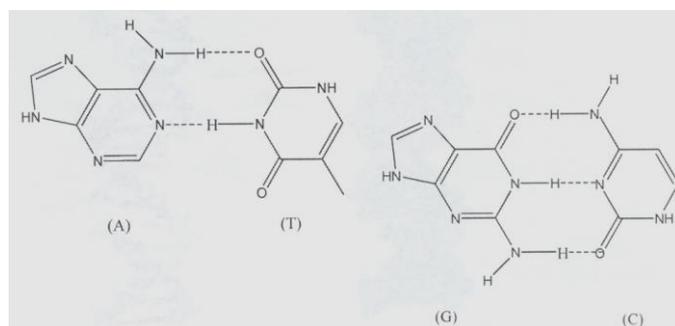


Fig. I.3. Coppie di legame AT e GC

Con tali interazioni ogni coppia di basi forma un piano che dista 3.4 Å uno dall'altro, e questi piani si sovrappongono parzialmente con interazioni di tipo idrofobico che vengono chiamate interazioni di stacking.

Alcuni studi dimostrano che gli agenti intercalanti tendono ad aggregarsi tra di loro in soluzione acquosa, come dimeri o polimeri, e queste strutture sono dovute ad interazioni idrofobiche o forze di Van der Waals, le stesse responsabili dello stacking degli acidi nucleici. Ne deriva che le stesse interazioni di stacking tra le molecole intercalate e i nucleotidi, non solo non disturbano i pattern di stacking del DNA ma l'intercalato risultante ne risulta stabilizzato. L'interazione dell'intercalante poi, determina cambiamenti di parametri strutturali, quali il grado di rotazione con le successive coppie di basi (angolo di twist), distorsione del legame zucchero-fosfato e una separazione tra i piani formati dalle coppie di basi. L'allungamento risultante della doppia elica, conseguente all'intercalazione (Figura I.4), si traduce a sua volta in una serie di cambiamenti di proprietà fisiche, quali aumento dell'intrinseca viscosità ed un irrigidimento totale che determina una diminuzione del coefficiente di sedimentazione.²¹

²¹ W. I. Sundquist, S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, 100, 293.

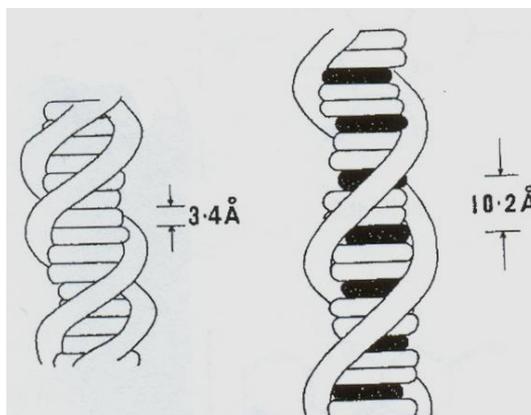


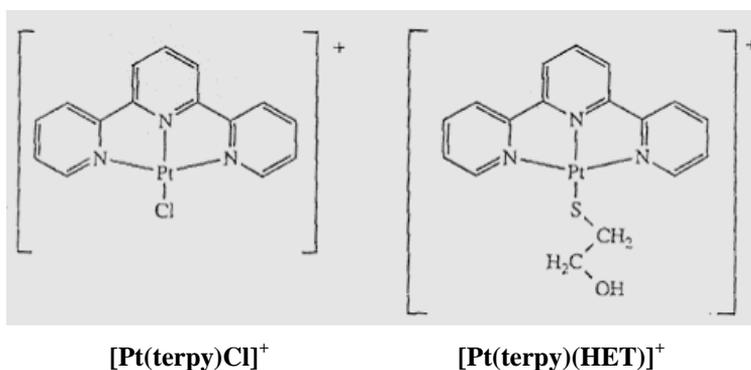
Fig. I.4. Modello semplificato di un tratto del DNA prima e dopo intercalazione

Secondo questo modello semplificato del DNA e del corrispondente complesso intercalato, proposto da Lerman, si esclude la possibilità d'inserzione di una seconda molecola d'intercalante nei siti immediatamente vicini, per cui quando il polinucleotide è saturato, si ottiene un'alternanza di siti vuoti ed occupati. A livello più macroscopico possiamo dire che l'intercalazione è un'interazione di tipo host-guest, cioè le sequenze del polinucleotide a cui si legano gli intercalatori vengono viste come siti accettori piuttosto che come dei veri recettori, dato che i loro effetti biologici sono esercitati solo attraverso l'interferenza con il riconoscimento e quindi con la funzione di proteine che legano il DNA (es. polimerasi, topoisomerasi). Così molecole in grado di inibire la sintesi degli acidi nucleici *in vivo* sono mutageni, antibiotici, antibatterici, antiparassitari e agenti antitumorali.

I complessi metallici, ovvero complessi formati da ioni metallici di transizione legati a strutture contenenti un'estesa parte aromatica, vengono detti metallointercalatori in quanto producono una forte interazione al DNA mediante intercalazione. La planarità di questi leganti

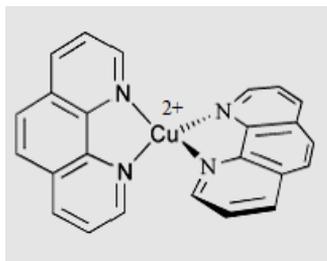
infatti, promuove il processo d'intercalazione, ovvero grazie alla capacità che ha il residuo aromatico planare di inserirsi all'interno dello spazio esistente tra due coppie di basi consecutive, il metallo viene avvicinato alle basi azotate dell'acido nucleico, facilitandone l'attacco ai siti selezionati.

Un complesso progenitore che si lega in modo non covalente al DNA fu sintetizzato e studiato da Lippard e suoi collaboratori nel 1970, un complesso monocationico del Pt(II), planare-quadrato, il $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ che viene attratto, grazie alla carica positiva, dallo scheletro esterno dei fosfati del DNA e si intercala con una costante di legame di 10^5 M^{-1} .²¹



Analogamente, con una costante di associazione dell'ordine 10^5 - 10^6 M^{-1} il complesso $[\text{Pt}(\text{terpy})(\text{HET})]^+$, lega in modo molto forte, ma del tutto reversibile il DNA. Questo complesso dimerizza sia in soluzione ($K_{\text{dimer}} = 7(5) \times 10^3$) che allo stato solido. L'inserzione di questo cromoforo planare al sito adiacente ad una coppia di guanina-citosina determina un aumento della temperatura di fusione e della viscosità specifica del DNA. Questi complessi vengono definiti progenitori, in quanto contengono un sito di legame al metallo labile, a differenza di un complesso di Cu(II)

sintetizzato poco più tardi nel laboratorio di D. S. Sigman, il complesso $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$.²²



$[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$

Questo complesso, che segna l'introduzione della fenantrolina in complessi che legano il DNA reversibilmente, ha infatti la proprietà di funzionare come una nucleasi sintetica del DNA, ovvero legandosi al solco minore è in grado di degradare non solo la doppia elica della forma B-DNA ma anche della forma A del DNA e del RNA.

Sulla base degli studi d'interazione con il DNA dei primi complessi sintetizzati si può affermare che i complessi che legano il DNA non-covalentemente sono complessi cineticamente inerti, principalmente complessi ottaedrici d^6 o complessi quadrato-planari d^8 , in generale complessi con una struttura tridimensionale rigida o quasi del tutto rigida e in cui la stereochimica è importante per la specificità di legame.

Alla stereochimica si aggiunge il fatto che il tipo di legame è influenzato anche dal grado di saturazione del DNA con il complesso metallico, come avviene nel caso di un complesso ionico del rutenio(II), $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, complesso ottaedrico della fenantrolina che interagisce con il DNA attraverso tre tipi di legame non-covalente: elettrostaticamente, legame

²² C. Metcalfe, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, 32, 215.

idrofobico al solco minore e parziale intercalazione di una fenantrolina (Figura I.5).²²

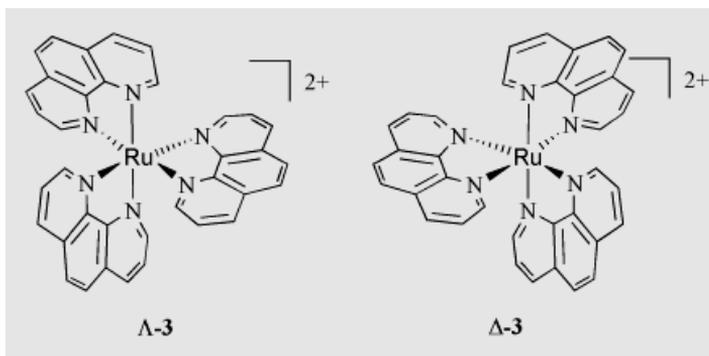
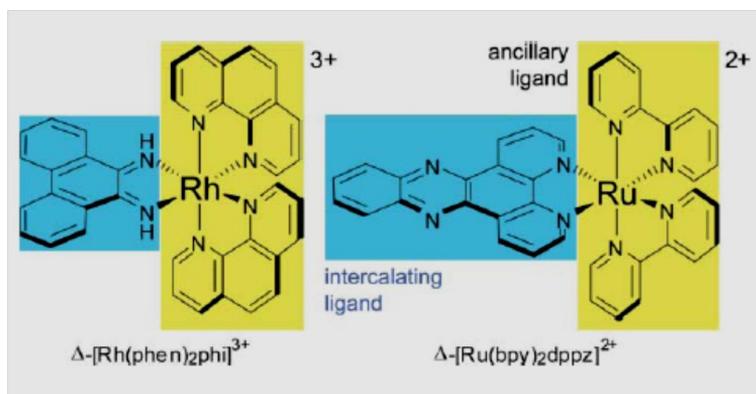


Fig. I.5. Isomeri di $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$

Infatti, a tutte le concentrazioni l'isomero Λ -3 si lega nel solco maggiore con una sola fenantrolina, in modo approssimativamente parallelo al piano delle basi, mentre il legame dell' isomero Δ -3 è più complesso. Quest'ultimo, infatti, a basse concentrazioni si inserisce con due unità fenantroliniche nel solco minore, mentre ad alte concentrazioni l' inserzione di una singola fenantrolina sia nel solco minore che in quello maggiore risulta essere più favorito.

Affinchè un intercalante possa trovare posto tra due basi del DNA è necessario che la doppia elica perda la sua conformazione standard. I metallo-intercalanti sono complessi metallici con al massimo un legante che funge da intercalante. Questi leganti, detti ancillari, sono orientati parallelamente rispetto alle coppie di basi, sporgono al di fuori del centro metallico e possono prontamente impilarsi nell'area π del DNA-duplex. Due noti esempi di leganti intercalanti sono phi (9,10-fenantrenechinone diimmina) e dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina).²³

²³ K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2777.

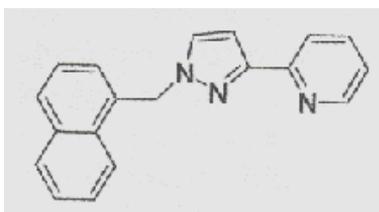


I metallo-intercalanti entrano dunque nella doppia elica attraverso il major groove. Con l'intercalazione, in effetti, il legante agisce come una nuova coppia di basi. Nessuna base è però espulsa dal DNA-duplex. I metallo-intercalanti sono stati studiati in modo da essere saturi da un punto di vista della coordinazione e inerti alla sostituzione così che non ci sia coordinazione diretta con le basi del DNA. Le caratteristiche fotochimiche e fotofisiche che spesso mostrano sono vantaggiosamente esplorate sia per investigare la loro intercalazione che per capire ulteriori vari aspetti della chimica degli acidi nucleici.

Da quanto emerso finora, l'intercalazione rappresenta uno dei modi di legame al DNA più importante attraverso cui complessi metallici, che assomigliano strutturalmente poco al cis-DDP, esercitano la loro attività antiproliferativa, ed è assodato che l'abilità intercalante aumenta all'aumentare della planarità dei leganti. Tuttavia, la geometria di coordinazione gioca un ruolo essenziale nel tipo e forza di legame al DNA e dipende, oltre che dalla struttura dei leganti, dal tipo di ione metallico. Esso infatti, sfruttando differenti numeri di coordinazione può dare luogo a differenti geometrie che possono influenzare il tipo di legame al DNA.

Un'esaustiva letteratura su metallointercalatori di Ru(II) e Rh(III) descrive l'interazione di questi complessi con il DNA, i quali, anche se hanno una geometria differente dalla classica quadrato-planare, sono complessi relativamente semplici.^{24,25} Quello che invece sorprende è che metalli “nuovi” nell'ambito della ricerca sul farmaco antitumorale, manifestino attività antiproliferativa che è dovuta oltre che alla planarità del sistema, alla particolare geometria dei loro complessi.

Un esempio di questi nuovi complessi metallici è rappresentato da due complessi di Cu(II) e Zn(II), $[\text{Cu}(\text{L})_3](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Zn}(\text{L})_3](\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2$, dove L è l'1-[3-(2-piridil)pirazol-1-metil]naftalene.²⁶



1-[3-(2-piridil)pirazol-1-metil]naftalene

Questi due complessi sono stati testati contro tre linee cellulari tumorali e la riscontrata attività è dovuta all'interazione con il DNA attraverso intercalazione grazie alla planarità del sistema metallo-legante. Inoltre, la maggiore attività del Cu(II) è dovuta alla geometria distorta del complesso (Figura I.6) derivante dalle proprietà elettroniche del sistema.

²⁴ J. D. Higgins III, L. Neely, S. Fricker, *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, 49, 149.

²⁵ A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.*, **2007**, 1267.

²⁶ H. Zhang, C.-S. Liu, X.-H. Bu, M. Yang, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99, 1119.

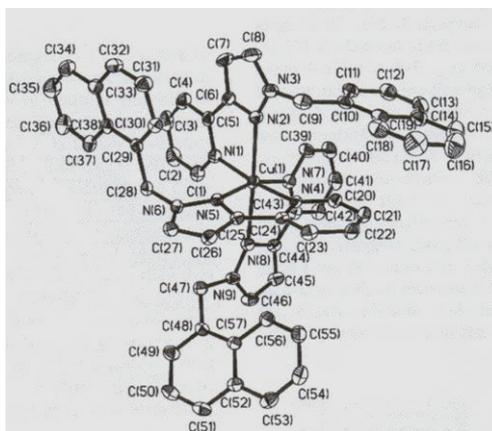


Fig. I.6. Struttura del complesso di Cu(II) contenente il legante 1-[3-(2-piridil)pirazol-1-metil]naftalene

Una descrizione delle relazioni struttura-attività di alcuni dei più significativi contributi provenienti dalla chimica di coordinazione, allo scopo di migliorare l'attività antitumorale dei complessi metallici, vuole essere non una mera digressione sullo stato dell'arte di nuovi sistemi con un potenziale valore terapeutico, ma piuttosto si vuole mettere in risalto l'importanza del drug design in questo settore della ricerca. In effetti si vuole evidenziare il fatto che, alterando la natura del metallo e i leganti cineticamente inerti (L), o cineticamente labili (X), la cinetica, la proprietà strutturali ed elettroniche della molecola possono massimizzare o minimizzare l'attività biologica. In molti casi anche la semplice sostituzione di differenti gruppi funzionali sui leganti può ribaltare l'attività dell'intero complesso metallico.

I.3. Lo zinco come metallo innovativo

Un metallo alternativo al Pt(II) ma poco utilizzato per la sintesi di complessi potenzialmente citotossici e nello stesso tempo intercalanti potrebbe essere lo Zn(II). Lo zinco è un metallo bivalente che, data la sua

posizione nella tavola periodica, presenta poche delle proprietà caratteristiche dei metalli di transizione. È considerato un metallo molto versatile grazie alla sua elevata capacità di coordinazione nei confronti di leganti N₂-donatori e N,O-donatori formando complessi con interessanti proprietà. Lo zinco è uno dei metalli biologicamente più importanti ed apparentemente indispensabile a tutte le forme di vita: è considerato un microelemento ma con un grande ruolo. È il secondo metallo di transizione, dopo il ferro, più abbondante nel corpo umano, in più è un elemento essenziale per la vita degli organismi in quanto è coinvolto in diversi processi biologici.^{27,28} A differenza di altri metalli, l'accumulo dello ione Zn(II) non comporta effetti tossici, mentre una carenza potrebbe comportare gravi effetti sul sistema immunitario e soprattutto problemi di tipo metabolico.²⁹

Lo zinco ha importanti ruoli strutturali in quanto è coinvolto nel mantenimento dell'integrità delle membrane biologiche. Fa parte di moltissimi sistemi enzimatici, è catalizzatore di 300 enzimi diversi coinvolti nel metabolismo proteico, nella produzione di energia, nella divisione cellulare e nella sintesi di acidi nucleici. Le sue funzioni catalitiche derivano dalle sue proprietà di acido di Lewis. E' nota da tempo l'esistenza di zinco proteine che riconoscono sequenze specifiche di basi del DNA e partecipano a processi di regolazione e trascrizione. Sono dette anche fattori di trascrizione e alcune di esse contengono motivi strutturali chiamati zinco "finger" (dita contenenti zinco) per il fatto che possono inserirsi nel solco della doppia elica del DNA e ripiegarsi come fossero delle dita. Ciò è dovuto alla possibilità che hanno gli ioni metallici di formare legami trasversali all'interno di una stessa proteina. Molti sono

²⁷ N. P. Farrell, *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, **1999**.

²⁸ S. Aoki, E. Kimura, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 769.

²⁹ M. Stefanidou, C. Maravelias, A. Dona, C. Spiliopoulou, *Arch. Toxicol.*, **2006**, 80,1.

i fattori di trascrizione che contengono zinco, il più importante è l' RNA. L'esistenza dei domini zinco "finger" fu proposta in base alle ricerche del fattore di trascrizione III A.³⁰ La caratteristica fondamentale delle proteine zinco "finger" è che esse contengono unità adiacenti (finger) costituite da un atomo di zinco centrale coordinato a due cisteine e a due istidine (Figura I.7).

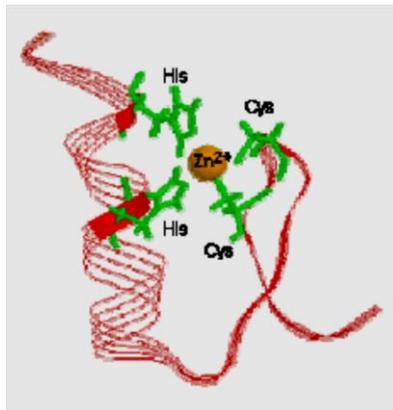


Fig. I.7. Struttura del dominio di zinco "finger"

Gli zinco "finger" interagendo con il DNA formano un'elica destrorsa avvolgendo esternamente la doppia elica (Figura I.8).

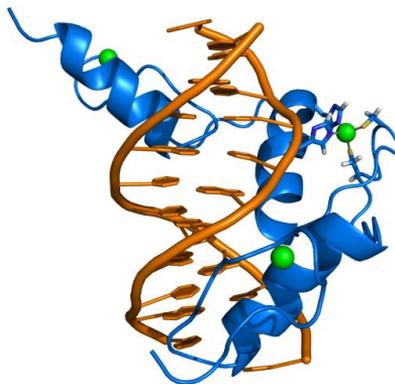


Fig. I.8. Interazioni di una proteina "zinc finger" con frammenti di DNA

³⁰ N. D. Clarke, J. M. Berg, *Science*, **1998**, 283, 2018.

Lo zinco “finger” che riconosce particolari siti del DNA ha numerose potenziali applicazioni in medicina, prima tra tutte la generazione di fattori di trascrizione biomimetici per controllare l’espressione del DNA e per inibire alcuni geni specifici.²⁸

Inoltre, l’interesse per lo Zn(II) e gli studi *in vitro* ed *in vivo* hanno permesso di capire un altro particolare aspetto di questo metallo. Infatti, recentemente è emerso che lo Zn(II) ha un ruolo fondamentale nei processi di cancerogenesi ed in particolare è un importante regolatore dell’apoptosi cellulare.³¹ Per capire il ruolo dello zinco nello sviluppo e progressione del cancro dobbiamo soffermare la nostra attenzione sul processo che caratterizza la trasformazione di una normale cellula in una cellula tumorale (Figura I.9).

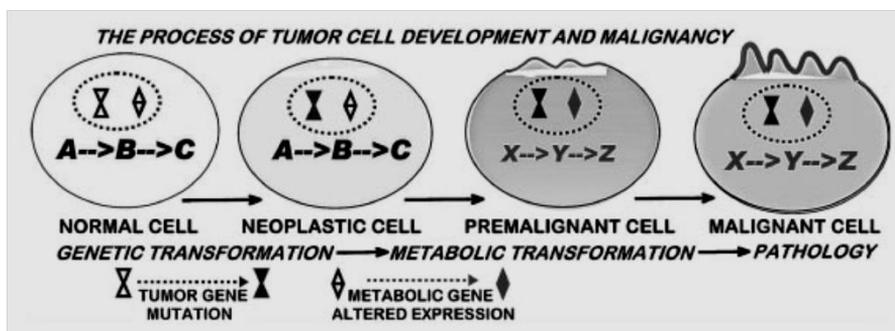


Fig. I.9. Trasformazione genetica/metabolica di cellule tumorali

Infatti, da come possiamo vedere in figura I.9, in assenza di una trasformazione metabolica, la cellula neoplastica potrebbe rimanere in una condizione di stabilità oppure potrebbe essere eliminata; se invece, la trasformazione metabolica si verifica, la cellula va incontro alla manifestazione tumorale. Questo importante processo di trasformazione patologica, da studi effettuati recentemente, interessa anche lo zinco ed in

³¹ R. B. Franklin, L. C. Costello, *J. Cell. Biochem.*, **2009**, 106, 750.

particolare è la variazione di concentrazione di quest' ultimo a livello cellulare che assume una certa importanza in tale processo. L' accumulo di zinco nelle cellule dipende dai trasportatori dello zinco: ³² gli "Zip-transporter", che sono presenti sulle membrane plasmatiche e trasportano lo zinco dall' ambiente extracellulare a quello intracellulare e gli "ZnT-transporter", che sequestrano lo zinco dagli organelli citoplasmatici. Quindi, l'espressione e la disponibilità degli zinco trasportatori ed in particolare degli "Zip-transporter" costituisce un fattore critico della trasformazione genetica e metabolica che è essenziale per il processo tumorale nella maggior parte, se non in tutti, i tumori come mostrato in figura I.10 per le cellule prostatiche.

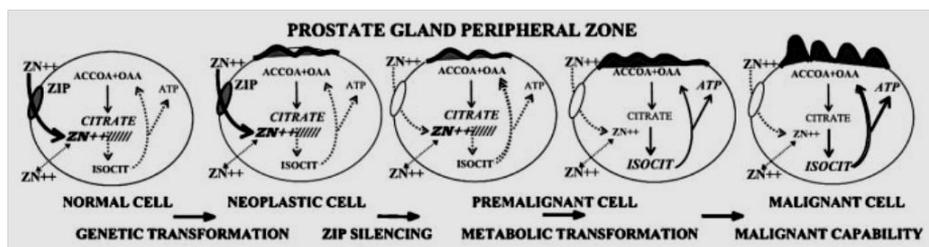


Fig. I.10. Il ruolo di Zip-1 e dello zinco nella trasformazione genetica/metabolica delle normali cellule prostatiche a cellule tumorali

Infatti, le normali cellule epiteliali secretorie sono cellule altamente specializzate che sintetizzano, accumulano e secerono alti livelli di citrato nel fluido prostatico e ciò avviene grazie alla capacità che queste cellule hanno di accumulare alti livelli di Zn(II) cellulare e mitocondriale. Nei mitocondri lo Zn(II) inibisce l'attività enzimatica dell'm-aconitasi prevenendo così l'ossidazione del citrato attraverso il ciclo di Krebs. Di conseguenza il ciclo di Krebs si arresta al primo ossidativo ed il citrato risulta essere un prodotto finale del metabolismo intermedio nelle

³² D. J. Heide, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1763, 711.

cellule prostatiche. La produzione del citrato come prodotto finale ha delle implicazioni bioenergetiche: l'ossidazione del glucosio, fermata al citrato, porta alla formazione di 14 molecole di ATP mentre dalla sua completa ossidazione se ne ottengono 38 per ogni molecola di glucosio. Nelle cellule tumorali prostatiche viene a mancare la capacità di accumulare Zn(II) che quindi non esplica la funzione inibitoria rispetto all'attività dell'm-aconitasi: il citrato è dunque completamente ossidato attraverso il ciclo di Krebs. Il meccanismo responsabile della capacità di accumulare Zn(II) è la down-regulation di Zip-1, che è il maggiore trasportatore responsabile dell' uptake dello zinco.³³ In questo modo, le cellule tumorali della prostata evitano gli effetti soppressori dello zinco, compreso l'effetto apoptogenico ed è per questa ragione che si può definire lo Zip-1 e quindi lo zinco un agente soppressore nel cancro alla prostata.

Ulteriori studi hanno rivelato effetti diretti dello zinco sul meccanismo apoptogenico come mostrato in figura I.11:

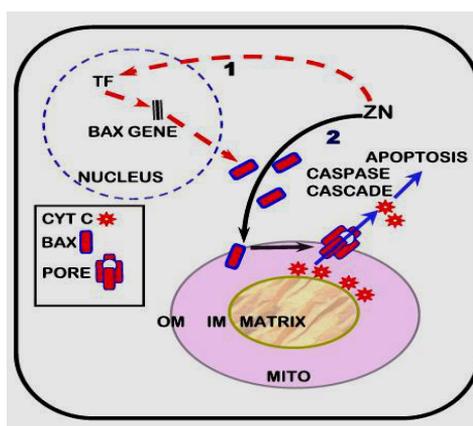


Fig. I.11. Induzione del processo apoptotico nelle cellule prostatiche da parte dello zinco

³³ R. B. Franklin, L. C. Costello, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2007**, 463, 211.

Infatti, si è avuta conferma che l'effetto apoptotico nelle cellule della prostata è dovuto all'apoptogenesi mitocondriale indotta dallo zinco. Più significativamente, questa azione è dovuta all'effetto dello zinco citoplasmatico sui mitocondri, in particolare quest'ultimo ha la capacità di aumentare l'inserzione di Bax (proteina pro-apoptotica) citosolico a livello della membrana mitocondriale, facilitare la formazione del poro a livello del mitocondrio, con successiva attivazione della caspasi-3 che da luogo alla cascata apoptotica.^{34,35} Conseguentemente, l'induzione dell'apoptosi, da parte dello zinco, è soppressa nelle normali cellule *in situ* grazie alla presenza di attività antiapoptotiche. Le normali cellule epiteliali prostatiche, infatti, presentano una up-regulation della proteina antiapoptotica Bcl-2 che ha il ruolo di prevenire gli effetti apoptogeni dello zinco. L'effetto apoptotico individuato nelle cellule prostatiche è un importante risultato che bisogna approfondire e studiare maggiormente per cercare di capire meglio il ruolo ed i meccanismi che lo zinco esplica anche in altre forme tumorali. Nello stesso tempo, si può affermare che la presenza dello zinco in queste cellule ha una notevole importanza dandoci la possibilità di poter individuare nuovi approcci per il trattamento e la possibile prevenzione del cancro alla prostata.

I.4 Complessi di zinco biologicamente attivi

La fondamentale importanza dello Zn(II) nel corpo umano ha fatto sì che nascesse e si espandesse la sintesi di nuovi complessi basati su tale centro metallico così da ottenere nuovi composti con migliori proprietà

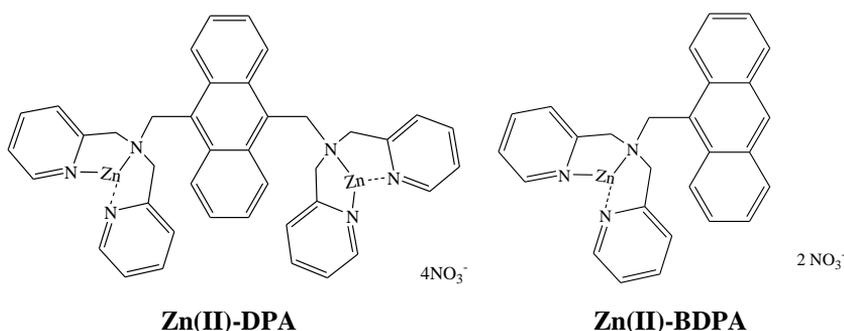
³⁴ P. Feng, T.-L. Li, Z.-X. Guan, R. B. Franklin, L. C. Costello, *Prostate*, **2002**, 52, 311.

³⁵ P. Feng, T. Li, Z. Guan, R. B. Franklin, L.C. Costello, *Mol. Cancer*, **2008**, 7, 1.

biologiche e nello stesso tempo minore tossicità rispetto a complessi di metalli differenti.³⁶

Possiamo constatare come, nella passata decade, ci sia stato un maggiore interesse nell'applicazione di complessi di Zn(II) nell'ambito della chimica biologica, specificatamente come potenti biosensori e nello stesso tempo come potenziali ed emergenti farmaci per il diabete mellito, i tumori e l' HIV.

Un campo notevolmente in crescita è lo sviluppo di biosensori: i complessi di Zn(II) hanno ottime caratteristiche da questo punto di vista, sono in grado di indagare selettivamente macromolecole biologiche e fornire informazioni su parametri quali la concentrazione o la conformazione del target. Un esempio è rappresentato dai complessi fluorescenti di Zn(II), come Zn(II)-dipicolilammideantracene (DPA) e Zn(II)₂-bisdipicolilammideantracene (BDPA), che sono capaci di legare selettivamente, in condizioni fisiologiche, fosfopeptidi polianionici rispetto a peptidi non fosforilati.³⁷



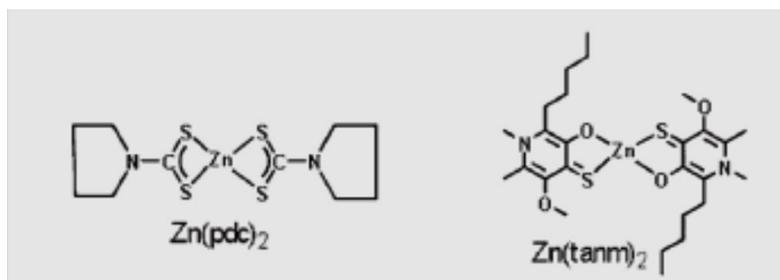
Altri studi hanno dimostrato che i complessi di Zn(II) possono essere usati per inibire targets biologici in una serie di meccanismi non classici:

³⁶J. A. Drewry, P. T. Gunning, *Coord. Chem. Rev.*, **2011**, 255, 459.

³⁷A. Ojida, I. Mito-oka, M.-A. Inoue, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6256.

sono infatti in grado di denaturare la struttura proteica stabilizzando un ripiegamento non-funzionale. Lo Zn(II)-cyclen ad esempio agisce sulla proteina RAS, una proteina oncogenica attiva nel 30% di tutti i tumori umani. La proteina RAS legata ad una guanosina trifosfato esiste in due conformazioni: una delle conformazioni lega proteine e svolge il suo ruolo nello sviluppo della malattia (stato on), mentre l'altra conformazione non lega le proteine e quindi non dà origine alla patologia (stato off), quindi lo Zn(II)-cyclen è in grado di stabilizzare la forma off.³⁸

Lo zinco, tra le sue notevoli proprietà biologiche, ha mostrato di esibire attività insulinomimetica e quindi avere effetto antidiabetico, infatti è stata largamente studiata la correlazione tra la deficienza di Zn(II) e il diabete mellito. Tali studi hanno dimostrato che lo zinco esplica un ruolo importante nel diabete mellito e quindi la ricerca si è spinta verso la sintesi di complessi metallici basati sullo ione Zn(II) con promettenti proprietà antidiabetiche. Sono stati sintetizzati due complessi omolettici di zinco contenenti due leganti: la N-metil-tioallixina nello $[Zn(tanm)_2]$, o N-ditiocarbammato-pirrolidina nel $[Zn(pdc)_2]$.³⁹

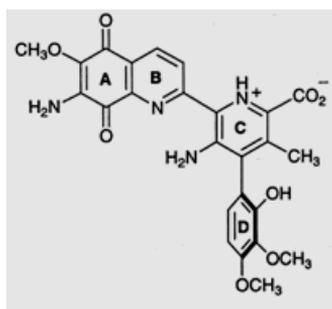


³⁸ M. Spoerner, T. Graf, B. Koning, H. R. Kalbitzer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 334, 709.

³⁹ H. Sakurai, Y. Yoshikawa, H. Yasui, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 2383.

Tali complessi sono stati testati *in vivo* su topi ammalati di diabete mellito ed hanno dimostrato, dopo somministrazione orale, un'alta attività ipoglicemica che sembra essere dovuta alla loro capacità di bloccare l'attivazione del fattore trascrizionale NF-kB nel pancreas.

Molto interesse ha destato, come detto in precedenza, la sintesi di complessi con attività antitumorale. E' stata presa in considerazione la streptonigrina, antibiotico con struttura aminochinolinica, che presenta importanti effetti su diversi tipi di tumore umano.

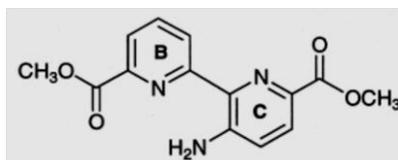


Alcuni metalli di transizione, tra cui lo ione zinco, sono stati coordinati alla streptonigrina, e sembrano essere coinvolti nella frammentazione del DNA attraverso o complessazione diretta con il farmaco o formazione di radicali ossidrilici vicino al DNA, anche se, il ruolo esatto del metallo, nel meccanismo d'azione, non è del tutto chiaro.⁴⁰ Diversi studi su complessi modello, che hanno in comune con la streptonigrina alcuni siti di coordinazione, hanno messo in evidenza che la struttura e la stabilità sono solvente-dipendenti.⁴¹

E' stato, inoltre, utilizzato un legante analogo alla streptonigrina,

⁴⁰ X. Wei, L.-J. Ming, *Dalton Trans.*, **1998**, 2793.

⁴¹ G. V. Long, M. M. Harding, M. C. L. Xie, I. E. Buys, T. W. Hambley, *Dalton Trans.*, **1995**, 951.



Analogo della Streptonigrina

il quale è stato complessato con lo zinco. E' stata ottenuta la struttura allo stato solido (Figura I.12) che fornisce utili informazioni sul sito di legame del metallo e che può essere usata come base per studiare complessi metallici della streptonigrina.

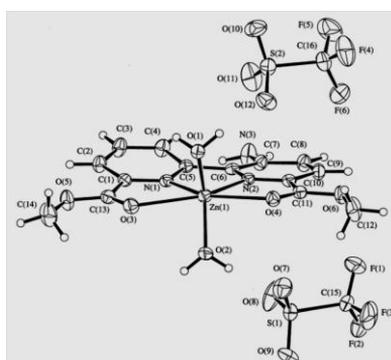
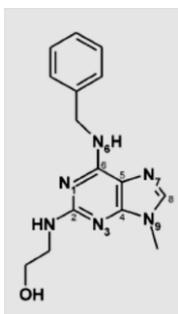
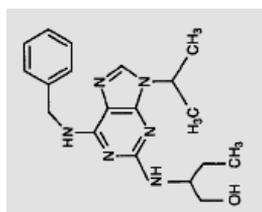


Fig. I.12. Struttura del complesso di Zn(II) contenente l' analogo della streptonigrina

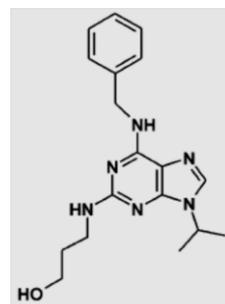
Possiamo, anche, affermare che una delle caratteristiche principali delle cellule cancerogene è l'anormale divisione cellulare dovuta ad una iperattivazione del CDKs o per via di mutazioni e delezioni degli inibitori naturali CDK. Per questo motivo, parecchi inibitori farmacologici di CDKs sono stati sviluppati e valutati come nuova generazione di chemioterapici antitumorali, incluse le 2,6,9-purine trisostituite (che hanno come nucleo base l'adenina), quali l'olomucina, la bohemina ed la R-roscovitina, quest' ultima è stata approvata come farmaco antitumorale nella fase II dei trials clinici.



Olomocina

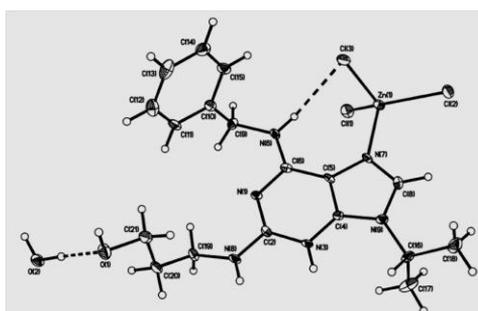


R-Roscovitina



Bohemina

Sono stati effettuati diversi studi che riportano l'interazione tra la base purinica adenina e lo ione Zn(II) ed a partire da ciò che sono stati sintetizzati i primi complessi di zinco con bohemina ed olomocina.



[Zn(BohH⁺)Cl₃] H₂O

Questi complessi mostrano attività citotossica, sulle linee cellulari tumorali quali G-361, HOS, K-562e MCF7, addirittura maggiore rispetto a quella dei rispettivi leganti.⁴²

Comunque, pochi sono gli esempi di complessi di Zn(II) con attività antitumorale ed, oltre a quelli già menzionati, possiamo prenderne in considerazione pochi altri, che sono, per la maggior parte, rappresentati da derivati omolettici di formula generale [Zn(L₂)] in cui al metallo si trovano coordinati due unità dello stesso legante, L, che è costituito da

⁴² Z. Travinicek, V. Krystof, M. Sipl, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 214.

tiosemicarbazoni,⁴³ quercitina,⁴⁴ acilpirazoloni,⁴⁵ benzimidazoli,⁴⁶ e terpiridine⁴⁷.

- I tiosemicarbazoni (TSC) sono molecole versatili non solo per le loro ben note attività farmacologiche (attività antibatterica, antivirale e antitumorale), ma anche perché possono agire come leganti con differenti modi di coordinazione. I TSC hanno mostrato di legare una grande varietà di composti mostrando differenti attività.⁴⁸ Il meccanismo d'azione dei TSC è dovuto alla loro abilità di inibire la biosintesi del DNA, di legarsi agli atomi di azoto delle basi del DNA e del RNA e di creare delle lesioni a livello dei filamenti del DNA grazie a rotture ossidative.⁴⁹ Inoltre, la loro attività antitumorale è esaltata dalla coordinazione con metalli di transizione ed in particolar modo con lo zinco. Sono stati, recentemente, sintetizzati due nuovi complessi di Zn(II) con 2-acetilpiridinaN(4)-(4-fluorofenile)-piperazina tiosemicarbazone (HAcPipPhF), che presentano una configurazione ottaedrica distorta [Zn(HAcPipPhF)₂] (A) ed una configurazione piramidale quadrata distorta [Zn(OAc)(HAcPipPheF)]₂ (B), come si può vedere in figura I.13.

⁴³ T. P. Stanojkovic, D. Kovala-Demertzi, A. Primikyri, I. Garca-Santos, A. Castineiras, Z. Juranic, M. A. Demertzis, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 467.

⁴⁴ J. Tan, B. Wang, L. Zhu, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 614.

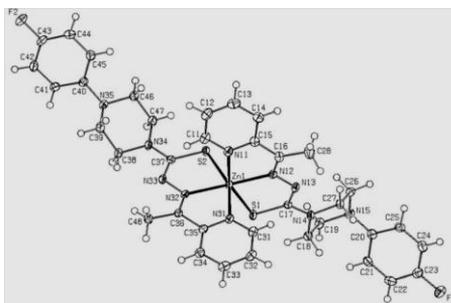
⁴⁵ F. Caruso, C. Pettinari, F. Marchetti, M. Rossi, C. Opazo, S. Kumar, S. Balwani, B. Ghosh, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 6166.

⁴⁶ O. Sanchez-Guadarrama, H. Lopez-Sandoval, F. Sanchez-Bartez, I. Gracia-Mora, H. Hopfl, N. Barba-Behrens, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, 103, 1204.

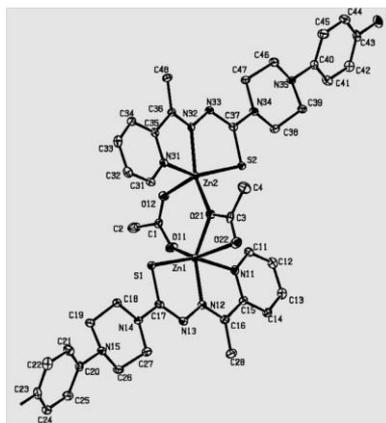
⁴⁷ O. Jiang, J. Zhu, Y. Zhang, N. Xiao, Z. Guo, *Biometals*, **2009**, 22, 297.

⁴⁸ J. S. Casas, M. S. Garcia-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 209, 197.

⁴⁹ R. A. Finch, M.-C. Liu, S. P. Grill, W. C. Rose, R. Loomis, K. M. Vasquez, Y.-C. Cheng, A. C. Sartorelli, *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, 59, 983.



a

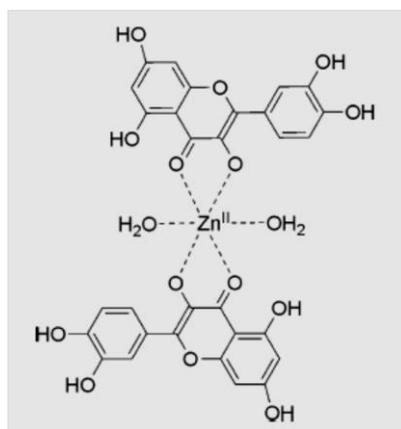


b

Fig. I.13. Strutture dei complessi $[Zn(HAcPipPheF)_2]$ (a) e $[Zn(OAc)_2(HAcPipPheF)_2]$ (b)

Studi biomedici rivelano che, sia il legante che i complessi ottenuti, mostrano una potente attività antitumorale. Infatti l'attività antiproliferativa è stata trovata essere considerevolmente migliore rispetto al *cis*-Pt: il valore di IC_{50} per i complessi va da 26 a 90 nM nei confronti delle linee cellulari testate (HeLa, K562, MDA-MB-361 e MDA-MB-453), mentre abbiamo un valore di IC_{50} per il *cis*-Pt che va da 2 a 17 μ M. Il complesso B mostra la più alta attività nei confronti di tutte le linee cellulari testate ed inoltre, entrambe i complessi, inibiscono la proliferazione per arresto del ciclo cellulare nella fase S.⁴⁴

- La quercitina (3,5,7,3',4'-pentaidrossiflavone), è un bioflavonoide distribuito in frutta e vegetali, che presenta vari effetti biologici e mostra principalmente attività antitumorale ed antiossidante.⁵⁰ La quercitina è in grado di chelare ioni metallici e quindi formare complessi che hanno un'attività antitumorale ed antiossidante migliore rispetto alla quercitina stessa.⁵¹ E' stato sintetizzato il seguente complesso di Zn(II) della quercitina [Zn(Que)₂(H₂O)₂], che presenta significativa attività citotossica nei confronti delle tre linee cellulari (HepG2, SMMC7721 e A549) testate *in vitro*.



[Zn(Que)₂(H₂O)₂]

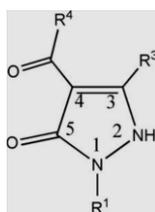
Inoltre ha la capacità di legare il DNA, intercalandosi tra le basi dello stesso e competendo con il forte intercalatore etidinio bromuro. Infatti ha un valore di K_{sq} (costante di quenching di Stern-Volmer) pari a 1.24, valore che suggerisce un'interazione forte del complesso con il DNA; in aggiunta a ciò, studi di “molecular modeling” hanno permesso di constatare che il complesso potrebbe essere legato al DNA specificatamente nella

⁵⁰ H.-B. Shao, L.-Y. Chu, Z.-H. Lu, C.-M. Kang, *Int. J. Biol. Sci.*, **2008**, 4, 8.

⁵¹ J. Zhou, L. Wang, J. Wang, N. Tang, *Trans. Met. Chem.*, **2001**, 26, 57.

regione GC. Questi risultati ottenuti, infatti, confermano che l'attività del complesso di Zn(II) della quercitina potrebbe essere correlata alla sua intercalazione a livello del DNA.⁴⁵

- Recenti lavori hanno mostrato che il β -dichetone naturale curcumina, gioca un ruolo molto importante nell'inibire ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare 1), che ha un ruolo fondamentale nei processi infiammatori.⁵² Questa attività della curcumina ha destato l'attenzione di ricercatori che hanno studiato l'attività inibitoria nei confronti di ICAM-1 di altri composti β -dichetonici, per esempio i 4-acil-5-pirazoloni.



4-acil-5-pirazoloni

I 4-acil-5-pirazoloni sono adatti per vari cationi metallici ed alcuni studi hanno permesso di affermare che i loro complessi mostrano una marcata attività citotossica.⁵³

I 4-acil-5-pirazoloni sono una classe di asimmetrici β -dichetoni che differiscono dalla curcumina per la mancanza di sostituenti idrossi e metossi aromatici, infatti, la loro attività biologica sembrerebbe essere dovuta solo al gruppo dichetonico e ciò ci permette di avere informazioni indirette sul meccanismo d'azione della curcumina.

⁵² Y. S. Kim, Y. Ahn, M. H. Hong, S. Y. Joo, K. H. Kim, H. W. Park, Y. J. Hong, J. H. Kim, W. Kim, M. H. Jeong, J. G. Cho, J. C. Park, J. C. Kang, *Cardiovasc Pharmacol.*, **2007**, 50, 41.

⁵³ C. Pettinari, F. Caruso, N. Zaffaroni, R. Villa, F. Marchetti, R. Pettinari, C. Phillips, J. Tanski, M. Rossi, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 58.

In questo lavoro, si è investigata l'inibizione di ICAM-1 da parte dei β -dichetoni e dei relativi complessi di sodio e dei complessi omolettici di zinco e calcio e si è potuto constatare che i β -dichetoni sono sistematicamente più attivi dei complessi metallici e la migliore inibizione ottenuta è pari al 75%. I migliori inibitori sono il 4-benzoil-3-metil-1-fenil-pirazolo-5-one (HQ^{Ph}) per i leganti ed il sodio benzoilacetato per i derivati metallici, risultati in linea con le riportate attività antitumorali delle relative specie. Dato che i 4-acil-5-pirazoloni possiedono quattro forme tautomeriche (Figura I.14), le rispettive forme tautomeriche di HQ^{Ph} sono state studiate usando la teoria del funzionale della densità.

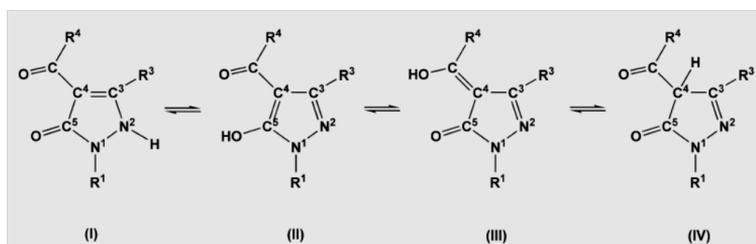


Fig. I.14. Forme tautomeriche dei 4-acil-5-pirazoloni. I) N-H dicheto; 2) Cheto-enolica (pirazolone); 3) Cheto-enolica (acil); 4) C-H dicheto

In aggiunta, sono stati effettuati studi di docking per tutti i tautomeri del legante HQ^{Ph} sulla proteina ICAM-1 suggerendo che la forma cheto-enolica (II) è quella più favorita di agire in ambiente biologico.⁴⁶

- I benzimidazoli sono stati usati come agenti antivirali ed antitumorali^{54,55} ed i loro composti di metalli di transizione

⁵⁴ J. R. Hwu, R. Singha, S. C. Hong, Y. H. Cang, A. R. Das, I. Vliegen, E. De Clercq, J. Neyts, *Antiviral Res.*, **2008**, 77, 157.

mostrano potenziale attività terapeutica e presentano attività citotossica.⁵⁶ In virtù di queste attività è stata recentemente presentata la sintesi, la caratterizzazione strutturale e l'attività citotossica di complessi di Co(II), Cu(II) e Zn(II) con benzimidazoli variamente sostituiti in posizione 2 (Figura I.15).

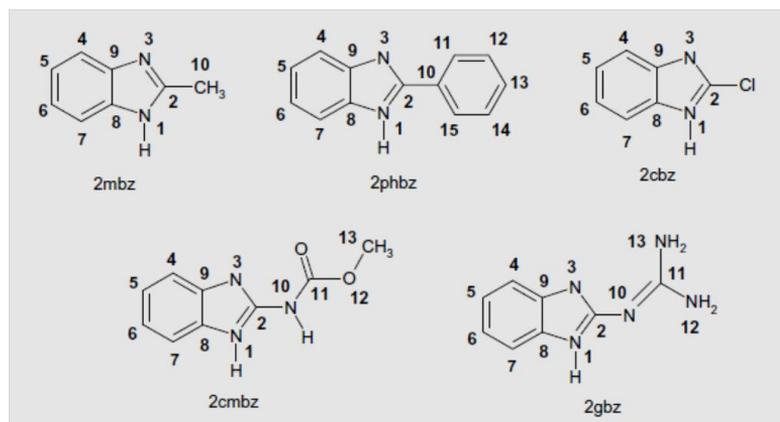


Fig. I.15. Strutture di 2-metilbenzimidazolo (2mbz), 2phenilbenzimidazolo (2phbz), 2-chlorobenzimidazolo (2cbz), metil 2-benzimidazolocarbamato (2cmbz) e 2guanidinobenzimidazolo (2gbz)

La loro attività citotossica è stata valutata su varie linee cellulari cancerose umane come PC-3 della prostata, MCF-7 del seno, HCT-15 del colon, HeLa della cervice uterina e SKLU dell'intestino ed hanno mostrato significativa attività, in particolare i complessi di Zn(II) e di Cu(II) $[Zn(2mbz)_2Cl_2] \cdot 0.5H_2O$, $[Zn(2cmbz)_2Cl_2] \cdot EtOH$, $[Cu(2cmbz)-Br_2] \cdot 0.7H_2O$ e $[Cu(2gbz)Br_2]$, al contrario di quelli isostrutturali di Co(II) che non presentano significativa attività citotossica. La loro

⁵⁵ M. M. Ramla, M. A. Omar, H. Tokuda, H. I. El-Diwani, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 6489.

⁵⁶ F. Saczewski, E. Dziemidowicz-Borys, P. J. Bednarski, R. Grunert, M. Gdaniec, P. Tabin, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 1389.

attività citotossica è relativa alla presenza di alogenuri nella sfera di coordinazione dello ione metallico.⁴⁷

- La chimica di coordinazione delle terpiridine sta attraendo l'attenzione di molti ricercatori per la capacità di quest'ultime di coordinarsi a differenti ioni metallici.^{57,58,59} I complessi sintetizzati presentano proprietà luminescenti, in particolare quelli di platino e palladio,^{60,61} argento e cadmio;⁶² inoltre, è ben noto che i complessi delle terpiridine con vari metalli mostrano attività antitumorale, antimicrobica ed anti-HIV.^{63,64,65} Di recente, sono state studiate l'interazione con il DNA e le relative proprietà citotossiche di complessi ionici omolettici con una terpiridina sostituita con adenina (atpy) e una terpiridina senza sostituenti (tppy): $[\text{Zn}(\text{atpy})_2](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Zn}(\text{tppy})_2](\text{PF}_6)_2$. E' stata, anche, effettuata un'analisi strutturale che ha confermato la struttura proposta per i complessi sintetizzati come mostrato in figura I.16.

⁵⁷ R. Trokowski, S. Akine, T. Nabeshima, *Chem. Commun.*, **2008**, 889.

⁵⁸ C. Di Nicola, Effendy, F. Marchetti, C. Pettinari, B. W. Skelton, A. H. White, *Inorg. Chim. Acta*, **2007**, 360, 1433.

⁵⁹ J. Muller, E. Freisinger, P. Lax, D. A. Megger, F.-A. Polonius, *Inorg. Chim. Acta*, **2007**, 360, 255.

⁶⁰ P. Du, J. Schneider, W. W. Brennessel, R. Eisenberg, *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 69.

⁶¹ C. Hamann, J.-M. Kern, J.-P. Sauvage, *Dalton Trans.*, **2003**, 3770.

⁶² Z. Ma, Y. Xing, M. Yang, M. Hu, B. Liu, M. F. C. Guades da Silva, A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta*, **2009**, 362, 2921.

⁶³ Z. Ma, Y. Cao, Q. Li, M. F. C. Guades da Silva, J. J. R. Fausto da Silva, A. J. L. Pombeiro, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 704.

⁶⁴ E. R. T. Tekink, *InflammoPharmacol.*, **2008**, 16, 138.

⁶⁵ I. Eryazici, C. N. Moorefield, G. R. Newkome, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 1834.

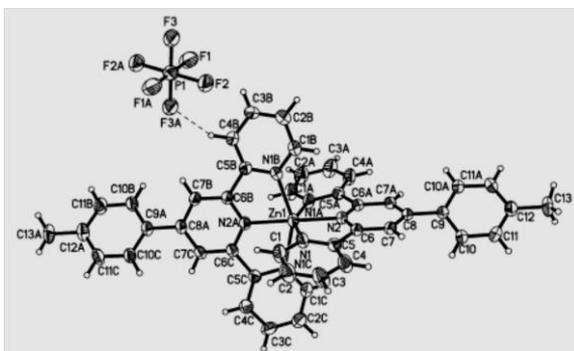


Fig. I.16. Struttura di $[Zn(tpy)_2][PF_6]_2$

Inoltre, gli studi di interazione con il DNA, mediante dicroismo circolare, hanno confermato che i complessi interagiscono con il DNA ed in particolare è il complesso con la terpiridina $[Zn(tpy)_2](PF_6)_2$ sostituita con l'adenina ($[Zn(atpy)_2](PF_6)_2$) che induce un cambiamento più significativo nella struttura del DNA; anche se, gli studi di citotossicità, nei confronti di diverse linee cellulari (HeLa, HepG2, MCF-7 e PC-3), hanno confermato che, il complesso più attivo, è quello del legante terpiridinico non sostituito ($IC_{50} \cong 0.43-1.81 \mu M$), che presenta un'attività 10 volte superiore a quello dello stesso *cis*-Pt.⁴⁸

Il ruolo dello Zn(II) nella crescita cellulare e la sua versatile geometria di coordinazione hanno permesso di progettare e sintetizzare anche l'unico esempio di complessi eterolettici di Zn(II), sia pentacoordinati che esacoordinati, di formula generale $[(L_1)Zn(L_2)(X)]$ o $[(L_1)Zn(L_2)_2]$ in cui al metallo centrale si trovano coordinate due diverse tipologie di leganti: una o due unità di leganti O,O chelanti biologicamente attivi, L_2 , (troponoidi e acilpirazoloni) ed una di legante bipyridinico (L_1) diversamente sostituito in posizione para rispetto agli azoti chelanti.⁶⁶

⁶⁶ P. F. Liguori, A. Valentini, M. Palma, A. Bellusci, S. Bernardini, M. Ghedini, M. L. Panno, C. Pettinari, F. Marchetti, A. Crispini, D. Pucci, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 4205.

Sono stati studiati da un punto di vista cristallografico e si è ottenuta la struttura molecolare con analisi a raggi X a cristallo singolo, che ha confermato la struttura proposta per il complesso [(bpy-9)Zn(Trop)₂] (Figura I.17). Il complesso ha una geometria ottaedrica distorta e lo ione centrale metallico è esacoordinato, essendo coordinato a quattro atomi di ossigeno dei due leganti tropolonici ed a due atomi di azoto del legante bipyridinico.

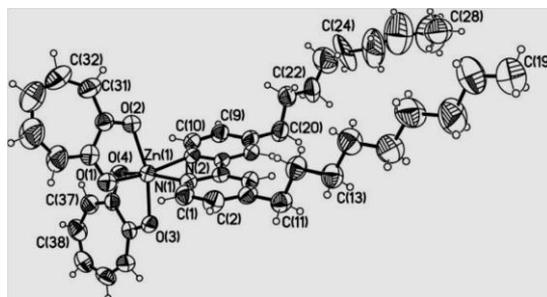


Fig. I.17. Struttura di [(bpy-9)Zn(Trop)₂]

Di tali complessi sono state studiate le proprietà antitumorali *in vitro* su linee cellulari prostatiche e sono risultati citotossici, presentando bassi valori di IC₅₀ dell'ordine di $\cong 15 \mu\text{M}$, addirittura migliori rispetto al farmaco di riferimento *cis*-platino (IC₅₀ $\cong 33 \mu\text{M}$). Inoltre, alcuni di questi complessi, oltre a presentare proprietà biologiche, presentano anche proprietà di luminescenza e tale proprietà consente di combinare in una singola molecola, le proprietà antitumorali con la fluorescenza intrinseca utile per indagare sul meccanismo di citotossicità. Una delle caratteristiche molto importanti di tali complessi è quella di presentare dei leganti (L₁ ed L₂) aromatici planari, grazie ai quali possiamo considerare questi complessi come potenzialmente intercalanti.⁶⁷

Fino ad oggi, i maggiori sforzi sono stati ampiamente indirizzati alla progettazione di molecole che interagiscono con la doppia elica del DNA

o DNA duplex. I moltissimi studi sulla trasformazione delle cellule umane normali in cellule tumorali hanno consentito di caratterizzare meglio le differenze tra i due tipi di cellule e di individuare nuovi ed esclusivi target delle cellule tumorali: ⁸ tra questi ha avuto ampio risalto l'intimo legame tra l'immortalità del tumore e l'attività dell'enzima telomerasi, una nucleoproteina che ha il compito di conservare la lunghezza dei cromosomi. ⁶⁷ Uno dei meccanismi di maggiore interesse e studio necessario per bloccare l'attività di questo enzima, è rappresentato dallo stabilizzare i G-Quadruplex.

I.5 G-quadruplex

Gli acidi nucleici possono adottare diverse strutture in relazione ai legami a idrogeno che si possono formare tra i vari nucleotidi. La struttura del DNA più diffusa è quella in cui due catene elicoidali avvolte intorno ad uno stesso asse formano una doppia elica destrorsa (DNA-duplex): tra le coppie di basi GC e AT si formano rispettivamente tre e due legami a idrogeno (Figura I.18).

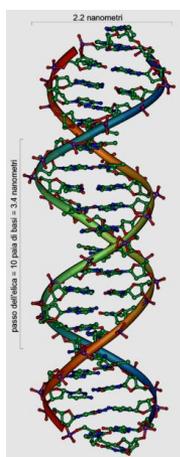


Fig. I.18. Struttura DNA-duplex

⁶⁷ C. W. Greider, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 7422.

Nella struttura del DNA esistono sequenze ricche di guanina suscettibili alla formazione di strutture non duplex, come conseguenza della propensione delle guanine ad associarsi con le altre in un riarrangiamento denominato G-tetrate, in una struttura nota come G-quadruplex (Figura I.19). Le tetradi sono strutture planari derivanti dall'associazione di quattro guanine tenute insieme da legami a idrogeno e stabilizzate da interazioni elettrostatiche tra gli atomi di ossigeno carbonilici elettronegativi delle basi guaniniche ed i cationi di metalli alcalini che occupano il centro delle tetradi (in genere Na^+ e K^+). La catena o le catene che costituiscono la struttura G-quadruplex, sia che derivino dalla stessa molecola che da molecole distinte, possono essere parallele o antiparallele.⁶⁸

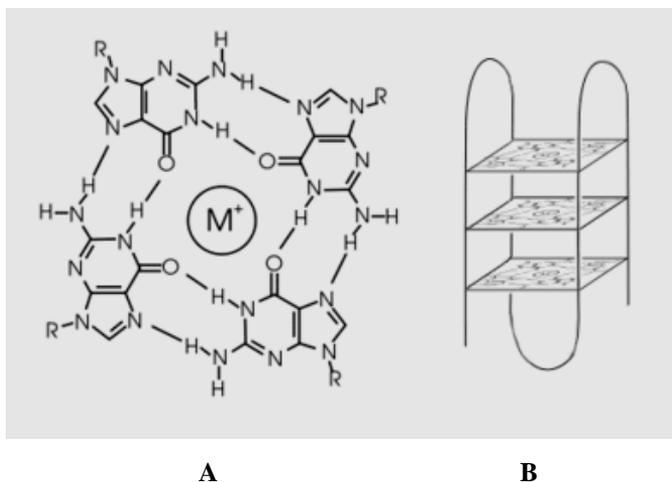


Fig. I.19. Struttura di un quartetto di guanine (A), struttura di un G-quadruplex (B)

Fu nel 1962 che, per la prima volta, venne descritto un intreccio di quattro acidi nucleici e la loro struttura molecolare fu successivamente determinata tramite cristallografia a raggi X su fibre di polinucleotidi.

⁶⁸ J. L. Huppert, *Biochimie*, **2008**, 90, 1140.

Queste strutture spesso risultano stabili termicamente, infatti alcune sequenze rimangono piegate, in condizioni fisiologiche, anche a temperature superiori di 90 °C rispetto alla norma. Sebbene questa stabilità rende molto probabile la formazione di tali strutture, è necessario che siano ulteriormente stabilizzate per spostare la curva di denaturazione verso temperature maggiori e permettere di raggiungere gli scopi biologici per cui sono indagate. Le sequenze ricche di guanina che possono formare strutture G-quadruplex sono distribuite in tutto il genoma umano, probabilmente sono più di 370000 sequenze, in particolare sono maggiormente presenti nel DNA telomerico. I telomeri sono una struttura specializzata di DNA a singolo filamento associato a proteine, situati all'estremità di ciascun cromosoma. Una delle caratteristiche prominenti del DNA telomerico è di essere costituito da brevi sequenze ricche in guanina, in particolare, nell'uomo, si trova ripetuto l'esanucleotide TTAGGG, in grado quindi di organizzarsi nella struttura G-quadruplex (Figura I.20).⁶⁹

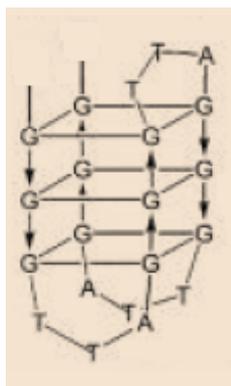


Fig. I.20. G-Quadruplex del DNA telomerico umano

⁶⁹ G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle, *Nature*, **2002**, 417, 876.

Nelle cellule la lunghezza dei telomeri viene progressivamente ridotta ad ogni divisione cellulare a causa del problema della duplicazione terminale, cioè all'incapacità del sistema replicativo di copiare le ultime basi del filamento durante la sintesi del DNA. Quando viene raggiunta la lunghezza telomerica minima critica, si attivano una serie di segnali cellulari che inducono le cellule ad entrare in senescenza replicativa, ovvero in fase di arresto permanente della crescita cellulare. L'accorciamento dei telomeri ad ogni divisione cellulare è una "misura molecolare" che limita il potenziale proliferativo della cellula. La telomerasi è l'enzima più importante coinvolto nel mantenimento della lunghezza dei telomeri, infatti ne previene l'accorciamento.⁷⁰ L'enzima telomerasi rappresenta un importante target selettivo, poiché risulta espresso in circa l'85% delle cellule tumorali rispetto alle normali cellule somatiche. L'inibizione di questo enzima è in grado di indurre la morte delle cellule tumorali, ma cosa più importante, non produce effetti tossici sulle cellule sane. La distinzione è dovuta dal fatto che le estremità cromosomiche delle cellule tumorali risultano diverse dal punto di vista morfologico rispetto a quelle presenti nelle cellule somatiche normali. I telomeri delle cellule normali sono, come già detto, soggetti ad un progressivo accorciamento. In netto contrasto, le cellule tumorali presentano telomeri generalmente più corti ma caratterizzati da una lunghezza costante. L'inibizione della telomerasi comporta un blocco del mantenimento della lunghezza dei telomeri; questi subiscono un progressivo accorciamento nei vari cicli cellulari fino a raggiungere la lunghezza critica con successivo arresto della proliferazione cellulare. Il DNA telomerico, organizzandosi in strutture quadruplex, inibisce l'attività della telomerasi. Quest'ultima, infatti, agisce solo sui singoli

⁷⁰ E. M. Rezler, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2003**, 43, 359.

filamenti di DNA, quindi stabilizzando i G-quadruplex la telomerasi non può più preservare la cellula dalla morte (Figura I.21).⁷¹

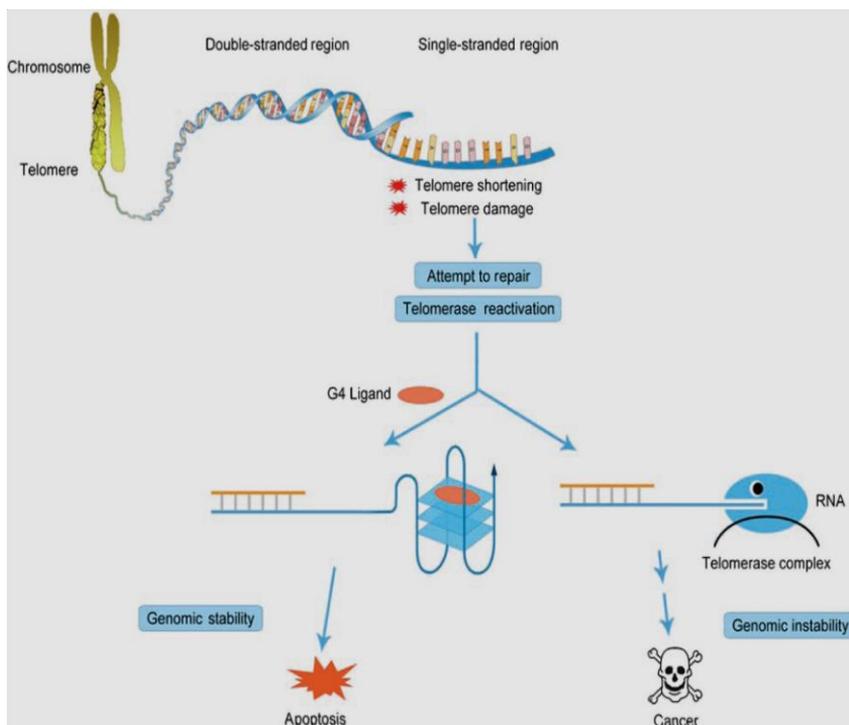


Fig. I.21. Stabilizzazione dei G-quadruplex e conseguente stabilità (apoptosi) o instabilità genomica (cancro)

Negli ultimi tempi l'attenzione si è concentrata sulla progettazione di molecole che interagiscono selettivamente ed efficientemente con questa particolare struttura del DNA, cioè i G-quadruplex.^{72,73,74} I leganti G-quadruplex sono progressivamente diventati il punto focale di nuovi esperimenti, infatti diversi studi hanno dimostrato che sono in grado di inibire selettivamente la crescita di cellule tumorali aprendo così

⁷¹ N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P.L.C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay, *Science*, **1994**, 266, 2011.

⁷² P. Murat, Y. Sing, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5293.

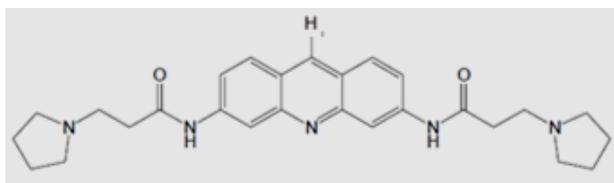
⁷³ T.-M. Ou, Y.-J. Lu, J.-H. Tan, Z.-S. Huang, K.-Y. Wong, L.-Q. Gu, *Chem. Med. Chem.*, **2008**, 3, 690.

⁷⁴ S. Balasubramanian, S. Neidle, *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2009**, 13, 345.

interessanti prospettive per lo sviluppo di nuovi farmaci. La stabilizzazione G-quadruplex avviene attraverso interazioni π - π e interazioni elettrostatiche date dalla parte aromatica della molecola con la struttura planare individuata dalle tetradi guaniniche. Data la vasta area delle tetradi, un efficiente legante G-quadruplex deve presentare una grande superficie aromatica, più grande rispetto ad un legante duplex, per aumentare la sovrapposizione aromatica-aromatica e aumentare la selettività. Alla stabilizzazione partecipa anche l'interazione elettrostatica con la carica positiva del legante. Affinché un composto risulti adatto ad interagire con la struttura G-quadruplex del DNA deve possedere sia caratteristiche idrofobiche che idrofiliche. Per ottenere ciò si introducono siti protonabili intorno alla struttura aromatica, generalmente gruppi amminici. In questo modo la molecola è solubile in acqua ma con la carica, o le cariche, lontane dal centro idrofobico.⁷⁵

Questa linea è stata seguita per oltre 10 anni con particolare attenzione verso la famiglia dei leganti bisammido-antrachinoni. Gli studi che seguirono misero però in evidenza che la selettività tra il DNA-quadruplex e il DNA-duplex non era molto alta per cui sono state esplorate diverse tipologie di leganti:

- Il legante BSU6039 (fa parte delle acridine 3,6-bisostituite)



BSU6039

⁷⁵ D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 627.

fu particolarmente utile per la sintesi di altri leganti G-quadruplex in quanto si ottenne la struttura cristallina del suo complesso con il G-quadruplex permettendo di capire le varie interazioni coinvolte nella sua formazione (Figura I.22).⁷⁶

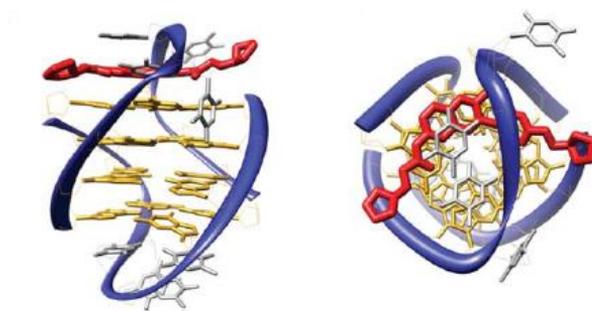
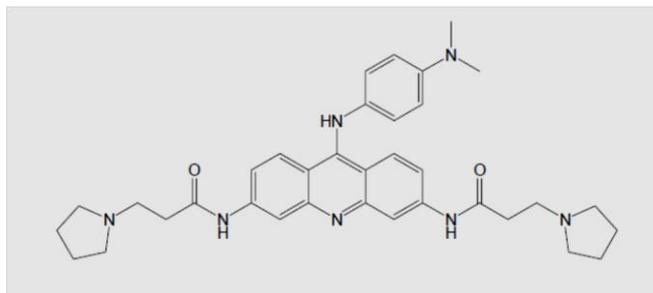


Fig. I.22. Struttura cristallina del complesso G-quadruplex

Partendo da questo composto se ne ottimizzò la struttura per avere una maggiore interazione e un buon traguardo si raggiunse con la sintesi dell'acridina BRACO-19 che mostrò una forte attività di inibizione dell'attività telomerica, IC_{50} -TRAP=115nM, (TRAP=telomeric repeat amplification protocol).⁷⁷

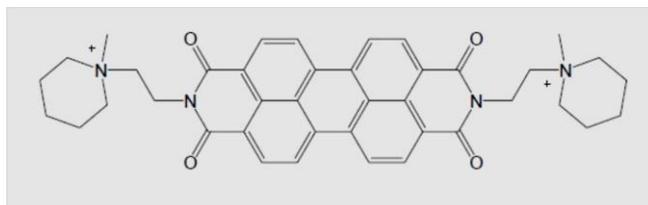


BRACO-19

⁷⁶ S. M. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, **2003**, 326, 117.

⁷⁷ C. M. Schultes, B. Guyen, J. Cuesta, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4347.

- Un'altra classe di composti analizzati fu quella dei perileni. Il diimide perilene PIPER è caratterizzato da un più ampio core idrofobico rispetto ai precedenti e presenta un'attività di inibizione della telomerasi modesta, $IC_{50}\text{-TRAP}=20\mu\text{M}$, ma è stato ampiamente studiato per la grande selettività tra la struttura G-quadruplex e quella DNA-duplex.⁷⁸

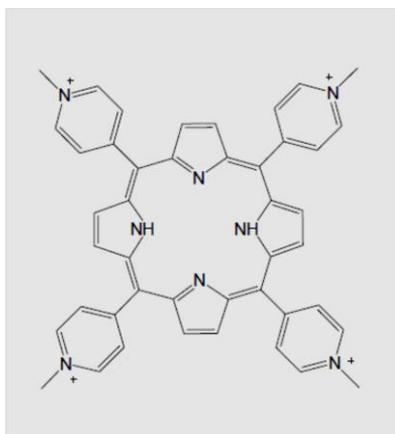


PIPER

- Sono stati studiati anche derivati della porfirina, il TMPyP4 è il principale rappresentante. Di questo legante è stato dimostrato che ha un'alta affinità riguardo ai G-quadruplex, infatti, inibisce in modo efficace la telomerasi, $IC_{50}\text{-TRAP}=6\mu\text{M}$, ma è anche in grado di agire nella down-regulation dell'espressione degli oncogeni quali *c-myc* o *k-ras*.⁷⁹

⁷⁸ O. Y. Federoff, M. Salazar, H. Han, V. V. Chemeris, S. M. Kerwin, L. H. Hurley, *Biochem.*, **1998**, 37, 12367.

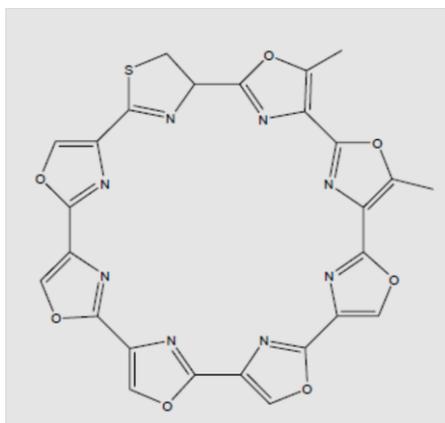
⁷⁹ D. Sun, K. Guo, J. J. Rusche, L. H. Hurley, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 6070.



TMPyP4

- La telomestatina, molecola naturale isolata nel 2001 da *Streptomyces annulatus*, è uno dei più interessanti leganti G-quadruplex con la più alta selettività rispetto a tutti gli altri: non è affine al DNA-duplex grazie al suo carattere neutro combinato con la forma ciclica. Questa molecola è molto promettente anche dal punto di vista dell'attività inibitoria telomerasica: IC_{50} -TRAP=5nM. È decisamente la forma macrociclica che si adatta perfettamente al probabile target, le tetradi, a rendere la telomestatina particolarmente efficace. Nonostante le indiscutibili qualità però non è molto utilizzata. La maggiore problematica connessa a questo legante è che è difficile da ottenere, la sua completa sintesi è stata riportata solo recentemente con un pathway molto complesso che è difficilmente compatibile con la preparazione su larga scala.⁸⁰

⁸⁰ T. Doi, M. Yoshida, K. Shin-Ya, T. Takahashi, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 4165.



Telomestatina

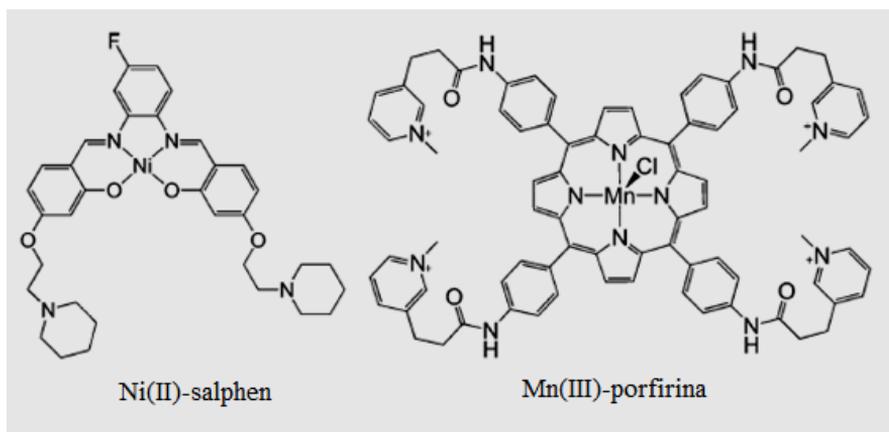
Sono state studiate le interazioni di diverse molecole con il DNA-quadruplex ma una valida alternativa all'uso di classiche molecole organiche può essere l'impiego di complessi metallici. Questa classe di composti è molto interessante grazie alla loro versatilità di sintesi e alle promettenti proprietà di legame ai G-quadruplex, stabilizzandone le strutture:

- Il metallo può occupare il centro delle tetradi di guanina favorendone la successiva stabilizzazione elettrostatica attraverso la sostituzione della carica cationica del K^+ o del Na^+ che normalmente occupano questo sito.
- Il legante, con una grande superficie aromatica, favorisce la sovrapposizione aromatica-aromatica con l'ampia area delle tetradi.

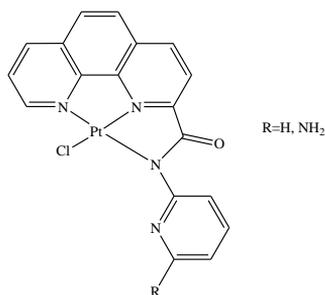
I primi esempi di complessi metallici studiati come stabilizzatori di strutture G-quadruplex sono complessi in cui la cavità centrale della porfirina TMPyP4 è occupato da ioni $Cu(II)$, $Ni(II)$, o $Mn(III)$. In particolare il complesso Mn -TMPyP4 ha una preferenza della struttura G-

quadruplex circa 10 volte superiore rispetto al DNA-duplex con una modesta attività di inibizione della telomerasi.⁸¹

Ni(II)-salphen⁸² e Mn(III)-porfirina⁸³ sono ottimi stabilizzanti con una buona selettività ed un buon livello di inibizione della telomerasi, IC₅₀-TRAP=120 e 580 nM per Ni(II) e Mn(III) rispettivamente.



Sono stati, inoltre, sintetizzati anche complessi piano-quadrati di Pt(II) e Pd(II) con leganti fenantrolinici di cui un esempio è:⁸⁴



[Pt(Phen-H)Cl]

questi composti hanno la geometria adatta per favorire le interazioni π - π con i quartetti di guanina.

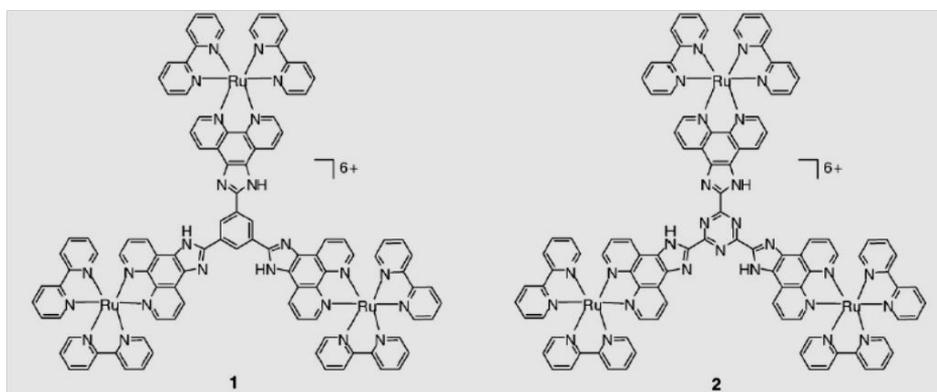
⁸¹ C. Vialas, G. Pratviel, B. Meunier, *Biochem.*, **2000**, 39, 9514.

⁸² J. E. Reed, A. A. Arnal, S. Neidle, R. Vilar, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5992.

⁸³ I. M. Dixon, F. Lopez, A. M. Tejera, J.-P. Esteve, M. A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1502.

⁸⁴ J. E. Reed, A. J. P. White, S. Neidle, R. Vilar, *Dalton Trans.*, **2009**, 2558.

Lo studio, tramite FRET (trasferimento di energia per risonanza), dalla possibile interazione dei leganti e dei complessi con il DNA (duplex e quadruplex) ha permesso di capire che quest' ultimi inducono un' alta stabilizzazione del DNA telomerico quadruplex, mentre hanno mostrato bassa interazione con il DNA-duplex. In aggiunta, è stato confermato l'importante ruolo svolto dal centro metallico, in quanto i complessi stabilizzano i quadruplex di DNA maggiormente rispetto ai leganti liberi. Infine, sono stati recentemente sintetizzati, due nuovi complessi trinucleari di rutenio $[(bipy)_6Ru_3(tpbip)]^{6+}$ (1) e $[(bipy)_6Ru_3(tptaip)]^{6+}$ (2) (bipy=2,2'-bipiridina, tpbip=1,3,5-tris(1,10-fenantrolina-[5,6-d]imidazol-2-il)-benzene, tptaip=2,4,6-tri(1,10-fenantrolina-[5,6-d]imidazol-2-il)-1,3,5-triazina),⁸⁵



$[(bipy)_6Ru_3(tpbip)]^{6+}$ (1) e $[(bipy)_6Ru_3(tptaip)]^{6+}$ (2)

che sono stati studiati attraverso spettroscopia CD (dicroismo circolare), ITC (calorimetria isoterma di titolazione) e FRET ed i risultati ottenuti hanno mostrato che i due complessi non solo inducono un cambio

⁸⁵ L. Xu, G.-L. Liao, X. Chen, C.-Y. Zhao, H. Chao, L.-N. Ji, *Inorg. Chem. Commun.*, **2010**, 13, 1050.

conformazionale del DNA telomerico umano, ma presentano anche la capacità di stabilizzare i G-Quadruplex.

La ricerca nel campo dei leganti G-quadruplex è in continua crescita e diventa sempre più interessante per lo sviluppo di nuovi farmaci che possano agire sul DNA di cellule tumorali con una ridotta tossicità.

Capitolo II

II.1 Curcumina - storia e tradizione

La curcumina o curcuma, noto rimedio naturale e diffusa spezia alimentare, è estratta dal rizoma della “*Curcuma Longa* Linn”, comunemente conosciuta come “turmeric”.⁸⁶ Quest’ ultima è una pianta erbacea perenne della famiglia delle Zingiberaceae (Figura II.1), la stessa del ginger. E’ originaria di Giava, ma trova il suo habitat naturale anche in India, nell’America centrale, nelle Antille e in Malaysia. Il primo produttore di curcumina a livello mondiale è l’India, seguita da Cina, Indonesia e Costa Rica.



Regno:	<i>Plantae</i> (Piante)
Sottoregno:	<i>Tracheobiota</i> (Piante vascolari)
Divisione:	<i>Spermatophyta</i> (Piante con semi)
Sottodivisione:	<i>Angiospermae</i> (Seme avvolto da frutto)
Classe:	<i>Liliopsida</i> (Monocotiledoni)
Sottoclasse:	<i>Zingiberidae</i>
Ordine:	<i>Zingiberales</i>
Famiglia:	<i>Zingiberaceae</i> (famiglia del Ginger)
Genere:	<i>Curcuma</i>
Specie:	<i>Curcuma longa</i> (Turmerico)

Fig. II.1. Classificazione botanica della “*Curcuma Longa*”

⁸⁶ F. E. Kohler, *Atlas zur Pharmacopea Germanica*, 1887.

Il suo nome deriva dal persiano-indiano Kour-Koum, che significa zafferano, e infatti, la curcumina è anche conosciuta col nome di "Zafferano delle Indie". Già nel 600 a.C. la curcuma fu menzionata in un trattato di Medicina assira, e nel primo secolo d.C. il medico Dioscòride la classificò fra le piante dotate di virtù terapeutiche.

I fiori, bianchi o color giallo vivace della curcuma, sono riuniti in una bella spiga fornita di brattee verdi o rosa intenso che li avvolgono, mentre le foglie, con nervature ben evidenti e un lungo picciolo, possono arrivare anche a un metro di lunghezza, e forse da questo deriva il nome di "*Curcuma Longa*". Viene raccolta annualmente e di essa si utilizza il rizoma (fusto sotterraneo allungato ed ingrossato, ricco di sostanze amidacee di riserva), di circa 10 cm di diametro che, in parte, viene ripiantato nell'anno successivo. Il rizoma, che rappresenta la parte officinale contenente i principi attivi, viene estirpato ed una volta ripulito, è fatto bollire e quindi essicato al sole e distillato per estrarne gli oli essenziali (Figura II.2).

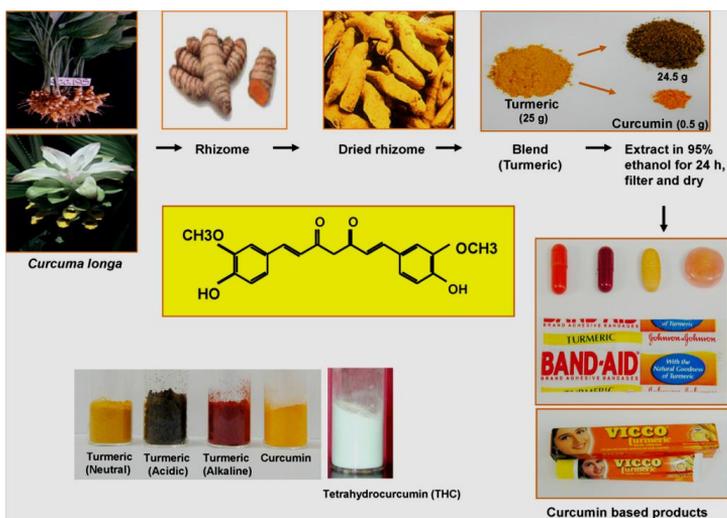


Fig. II.2. Isolamento, estrazione e struttura della curcumina. Capsule, pillole, crema e cerotti comunemente venduti.

Fra le numerose sostanze che la “*Curcuma Longa*” contiene le più importanti sono i curcuminoidi: il costituente più significativo, nonché principale principio attivo, è la curcumina, che dà la caratteristica colorazione gialla ai rizomi (Figura II.2). Viene ampiamente utilizzata nella medicina tradizionale indiana e cinese da oltre duemila anni.⁸⁷ Nel XV secolo la curcuma insieme ad altre spezie, grazie all’esplorazione nel subcontinente indiano del portoghese Vasco de Gama, venne introdotta nel mondo occidentale.⁸⁸ Fu solo durante il dominio inglese in India che la curcuma combinata con altre spezie venne ribattezzata “curry”, come viene chiamato ancora oggi in occidente; il suo uso aumentò notevolmente quando si individuò che, aggiunta a vari cibi, ne preservava la freschezza ed il valore nutritivo, migliorando l’appetibilità e la presentazione dello stesso. Il colore giallo brillante, che la contraddistingue, ha anche permesso di utilizzarla come agente colorante per cotone, seta e legno. Una pasta contenente questo principio attivo, ancora oggi, continua ad essere usata come rimedio popolare e nella medicina ayurvedica (ayurveda=scienza di lunga vita), per trattare le comuni infezioni dell’occhio, le ferite, le ustioni, l’acne e varie malattie della pelle. In India, la compagnia farmaceutica americana “Johnson and Johnson” produce cerotti a base di curcumina; la polvere della curcuma viene bevuta sciolta nel latte caldo per curare la tosse ed i disturbi respiratori correlati ed arrostita può essere usata come antidissenterico per bambini. Questo antico rimedio può essere usato, inoltre, per curare le malattie dentali, i disturbi digestivi come la dispepsia e l’acidità,

⁸⁷ H. P. T. Ammon, M. A. Wahl, *Planta Med.*, **1991**, 57, 1.

⁸⁸ B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, H. Ichikawa, *Adv Exp Med Biol.*, **2007**, 595, 1.

l' indigestione, la flatulenza, le ulcere ed anche per alleviare gli effetti allucinanti dell' hashish e di altre sostanze psicotrope.⁸⁹

Il recente interesse della medicina occidentale nei confronti di potenziali farmaci naturali ha attirato l' attenzione della comunità scientifica verso questo interessante principio attivo. La ricerca ha rivelato che la curcumina ha una sorprendente e vasta gamma di proprietà benefiche, tra cui possiamo menzionare l' attività antinfiammatoria, antiossidante, chemiopreventiva e chemioterapica;⁹⁰ queste attività sono state dimostrate sia *in vivo* che *in vitro* e ciò ha permesso di effettuare prove cliniche, sugli animali e sugli esseri umani, che hanno documentato le attività della curcumina, i suoi meccanismi d' azione e le sue caratteristiche chimico-cliniche.⁹¹

II. 2 Curcumina - chimica

La curcumina è un β -dichetone bis- α,β -insaturo, comunemente chiamato diferuloilmetano, ed avente la seguente formula bruta: $C_{21}H_{20}O_6$. E' un solido cristallino di colore giallo-arancio, viene usata come colorante alimentare e secondo la codifica dell'Unione Europea è identificata come E100.

La molecola della curcumina è stata isolata per la prima volta nel 1842 da Vogel e caratterizzata strutturalmente da Lampe e Milobedzka nel 1910⁹² ed è stata sintetizzata nel 1913.⁹³

⁸⁹ J. C. Tilak, M. Banerjee, H. Mohan, T. P. A. Devasagayam, *Phytother. Res.*, **2004**, 18, 798.

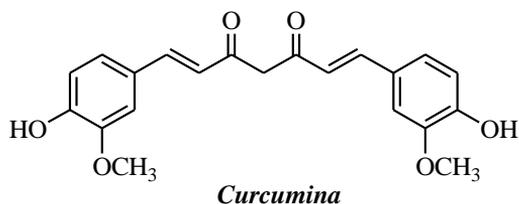
⁹⁰ B. B. Aggarwal, S. Shishodia, *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, 71, 1397.

⁹¹ H. Hatcher, R. Planalp, J. Cho, F. M. Torti, S. V. Torti, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, 65, 1631.

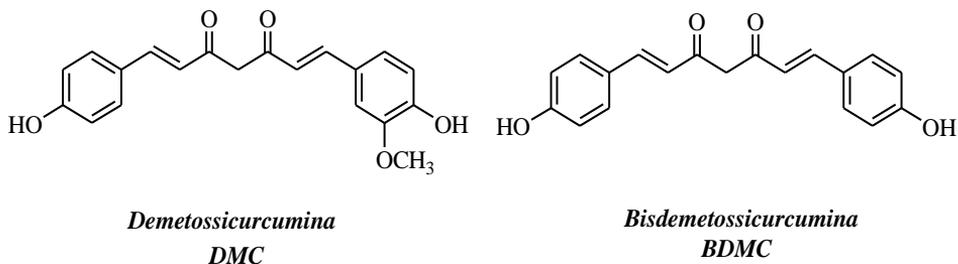
⁹² J. Milobedzka, Kostanecki, S. Lampe, V, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1910**, 43, 2163.

⁹³ V. Lampe, J. Milobedzka, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1913**, 46, 2235.

La curcumina commerciale (3-5% del turmeric), isolata dal rizoma della pianta, contiene approssimativamente: il 77% di curcumina che è il maggiore polifenolo, il 17% di demetossicurcumina (DMC) ed il 3% di bisdemetossicurcumina (BDMC).⁹⁴



(1E,6E)-1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-epta-1,6-dien-3,5-dione



La curcumina in soluzione presenta tautomerismo cheto-enolico (Figura II.3):

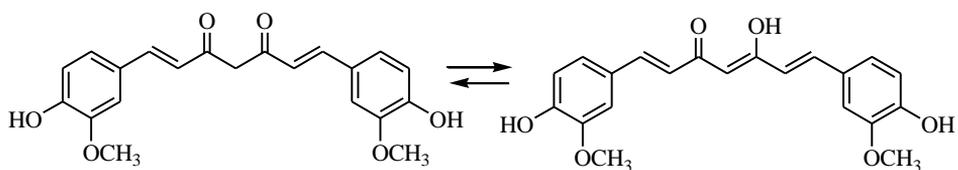


Fig. II.3

In analogia con simili dichetoni, anche per la curcumina, possono esistere in soluzione diverse forme enoliche e chetoniche con conformazioni *cis* o

⁹⁴ M.-T. Huang, H. L. Newmark, K. Frenkel, J. Cell. Biochem., 1997, 27, 26.

trans (Figura II.4), i cui contributi dipendono da diversi fattori come la temperatura, la polarità del solvente ed eventuali sostituenti presenti sull' anello aromatico.⁹⁵

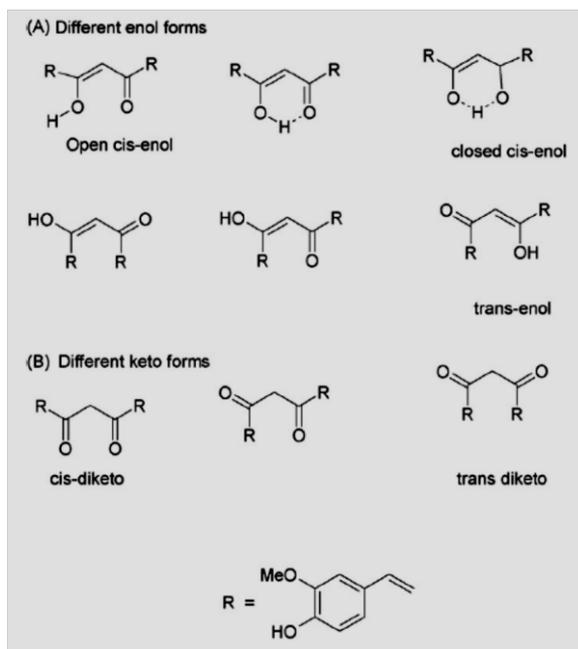


Fig. II.4. Possibili forme *cis-trans* e cheto-enoliche per la curcumina

Non è ben chiaro quale delle nove forme rappresenti lo stato predominante della curcumina in soluzione, comunque recenti studi di diffrazione a raggi X allo stato solido e studi NMR in soluzione indicano che la forma *cis*-enolica è quella che conferisce la maggiore stabilità alla molecola. Ulteriori studi hanno dimostrato che la molecola della curcumina è predominante nella forma cheto in soluzioni neutre o acide, e in quella enolica in ambiente alcalino.

La curcumina ha tre protoni ionizzabili: due protoni dei gruppi -OH fenolici ed un terzo rappresentato dal protone enolico. Sono state effettuati

⁹⁵ K. I. Priyadarsini, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **2009**, 10, 81.

vari studi sulla dissociazione di questi tre protoni così da calcolare e stimare le rispettive tre costanti di acidità (Figura II.5):^{96,97}

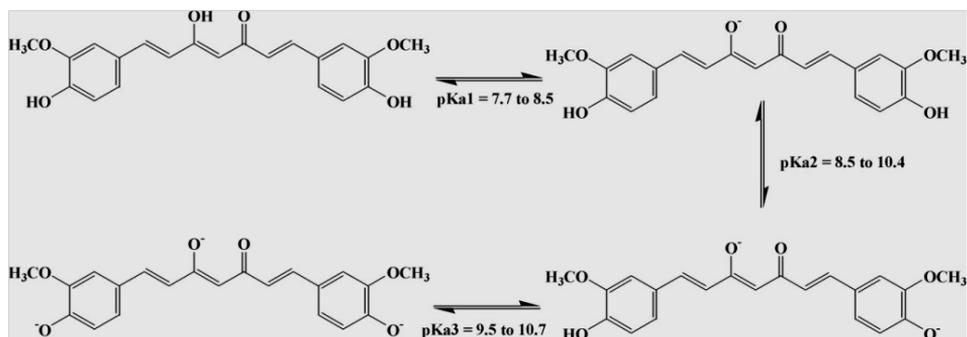


Fig. II.5. Dissociazione dei protoni della curcumina

I risultati ottenuti sono molto interessanti, non solo perché dimostrano che il protone enolico della curcumina è quello più facilmente dissociabile, ma anche perché in condizioni fisiologiche (pH 7.4) solo il 10-25% della curcumina è nella forma monoanionica, mentre la rimanente quantità è presente come specie neutra. La curcumina è praticamente insolubile in acqua a pH 7, mentre è parzialmente solubile in acqua alcalina; risulta essere solubile in numerosi solventi come metanolo, etanolo, DMSO, cloroformio, acetonitrile ed è moderatamente solubile in esano, cicloesano, tetraidrofurano e diossano.⁹⁵ Si presenta come solido dal colore giallo intenso ed in soluzione mostra un forte assorbimento nella regione UV-vis con un picco massimo di assorbimento compreso in un range che va da 408 nm a 434 nm. Nella maggior parte dei solventi polari l'assorbimento massimo è centrato a circa 420 nm, mentre in solventi donatori o accettori di legami ad idrogeno il massimo di assorbimento è

⁹⁶ L. Shen, H.-F. Ji, *Spectrochim. Acta A*, **2007**, 67, 619.

⁹⁷ M. Bernabè-Pineda, M. T. Ramirez-Silva, M. Romero-Romo, E. Gonzalez-Vergara, A. Rojas-Hernandez, *Spectrochim. Acta A*, **2004**, 10, 91.

pari a 430- 434 nm, fatta eccezione per il metanolo che presenta un picco tra 423 e 428 nm (Tabella II.1).

Solvente	Assorbimento λ_{abs}, nm	Emissione λ_{fl}, nm	Resa quantica di emissione (ϕ)
Cloroformio	419	503	0.094
Benzene	418	464	0.052
Etanolo	430	549	0.033
Metanolo	428	546	0.028
DMSO	434	535	0.050
Cicloesano	429	471	0.014
Acetonitrile	418	538	0.075
Acetato d' etile	419	494	0.105

Tab. II.1. Proprietà fotofisiche in soluzione della curcumina (in vari solventi)

Lo spettro di fluorescenza, il massimo di fluorescenza e la resa quantica di emissione della curcumina dipendono fortemente dalla natura del solvente, con uno shift che varia da 2000 a 6000 cm^{-1} (circa 30-140 nm): in solventi aprotici come cloroformio, acetonitrile ed acetato d' etile il massimo di fluorescenza mostra variazioni da 494 a 538 nm, mentre in solventi donatori o accettori di legami ad idrogeno, come alcoli o DMSO si ha uno shift che va da 535 a 560 nm (Tabella II.1). La resa quantica di emissione ha un valore trascurabile in solventi protici come metanolo ed etanolo, mentre ha valori molto più interessanti in solventi come acetonitrile, benzene e cloroformio (Tabella II.1). In generale la resa quantica di emissione risulta essere non molto elevata, evidentemente perchè i processi non radiativi sono predominanti su quelli

radiativi.^{95,98,99,100} Il maggiore interesse nei confronti della curcumina come potenziale agente antitumorale da parte di molti ricercatori che lavorano nei più svariati campi, ha permesso di studiare ed esplorare il suo uso in varie aree comprese la fotochimica e la fotobiologia. Studi molto approfonditi in tali settori hanno dimostrato che la curcumina possiede diversi target all' interno dei sistemi biologici: è in grado di interagire con i fattori di trascrizione, i fattori di crescita, gli ormoni, i fattori nucleari ed altri recettori impegnati in tutti gli stadi tumorali, anche se esistono pochi dati che spiegano la natura di tali interazioni. Ciò che risulta, però, particolarmente significativo è il cambiamento delle sue proprietà di fluorescenza, che variano al variare del target considerato. Tale caratteristica può dunque essere sfruttata per comprendere la natura delle interazioni della curcumina a livello molecolare.

II. 3 Curcumina - farmacologia

La curcumina è usata nella medicina tradizionale indiana e in quella cinese come disintossicante dell'organismo, in particolare del fegato; come coleretico e colagogo per i disturbi digestivi,¹⁰¹ nell'insufficienza epatica lieve con rallentato flusso biliare; come antinfiammatorio, immunostimolante e antiossidante.¹⁰² Queste proprietà salutari attribuite alla curcumina dalla tradizione e dagli usi popolari, sono le stesse che oggi le sono riconosciute dalla medicina ufficiale alla luce delle numerosissime ricerche scientifiche (Figura II.6); sono confermate le

⁹⁸ S. M. Khopde, K. I. Priyadarsini, D. K. Palit, T. Mukherjee, *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 72, 625.

⁹⁹ P.-H- Bong, *Bull.Korean. Chem. Soc.*, **2000**, 21, 81.

¹⁰⁰ R. Adhikary, P. Mukherjee, T. W. Kee, J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 5255.

¹⁰¹ A. Goel, A. B. Kunnumakkara, B.B. Aggarwal, *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, 75, 787.

¹⁰² B. B. Aggarwal, K. B. Harikumar, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2009**, 41, 40.

attività farmacologiche tradizionali, associate a una bassissima tossicità, ma sono state evidenziate anche altre importanti proprietà, come quella antitumorale.^{103,104} Studi hanno dimostrato come nei paesi asiatici, in particolare l'India, in cui la curcumina è utilizzata abitualmente come alimento, la popolazione presenta una bassissima incidenza di tumori.

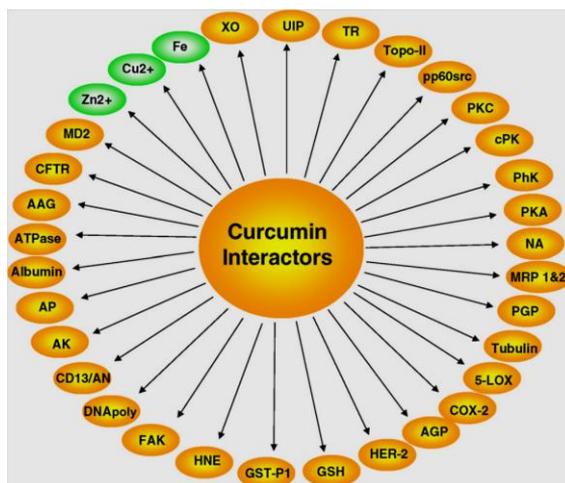


Fig. II.6. Substrati con i quali la curcumina interagisce

II.3.1 Attività antinfiammatoria

E' noto che il processo infiammatorio gioca un ruolo cruciale nella maggior parte delle malattie croniche, incluse quelle neurodegenerative e neoplastiche. La curcumina è stata riconosciuta come un potente bloccante dell'attivazione del fattore nucleare NF-kB, che regola l'espressione di numerosi fattori di trascrizione, citochine, proteine chinasi ed enzimi che sono legati ai processi infiammatori come la COX-2, il TNF- α , la ciclina D1, il c-myc, il Bcl-2, l' iNOS e le interleuchine

¹⁰³ R. Wilken, M. S. Veena, M. B. Wang, R. S. Srivatsan, *Mol. Cancer*, **2011**, 10, 12.

¹⁰⁴ R. K. Maheshwari, A. K. Sing, J. Gaddipati, R, C. Sirmal, *Life Sci.*, **2006**, 78, 2081.

IL-6 ed IL-8.^{101,104,105,106} Questo fattore di trascrizione gioca un ruolo cruciale nella via di trasduzione del segnale coinvolta nei disturbi infiammatori sia cronici che acuti, ma anche in vari tipi di cancro. Nello stato inattivo il fattore nucleare NF-kB è localizzato nel citoplasma: la sua attivazione prevede la traslocazione dal citoplasma al nucleo; affinché quest'ultima avvenga sono necessarie: l'attivazione di varie chinasi e la fosforilazione e la degradazione dell'IkB, cioè l'inibitore citoplasmatico dell'NF-kB. L'azione della curcumina si esplica proprio a questo livello attraverso l'inibizione dei segnali che portano all'attivazione del fattore nucleare quali l'inibizione della fosforilazione e della degradazione dell'IkB.¹⁰⁵

In aggiunta all' inibizione del fattore nucleare NF-kB, la curcumina ha anche altri effetti ed in modo particolare è stato dimostrato che la curcumina interferisce nella cascata dell' acido arachidonico ed inibisce la biosintesi della prostaglandina E2 con azione diretta, inibizione l' enzima microsomiale prostaglandina E2 sintetasi-1.¹⁰⁷

II.3.2 Attività antiossidante

Una delle funzioni più importanti della curcumina è l'effetto antiossidante, basato sull'attività di scavenger dei radicali liberi dell'ossigeno: molto probabilmente tale meccanismo sta alla base dei vari effetti che prevengono i danni cellulari ed in modo particolare la perossidazione lipidica (processo che indica la degenerazione ossidativa lipidica a livello della membrana). La perossidazione lipidica gioca un

¹⁰⁵ C. Jobin, C. A. Bradham, M. P. Russo, B. J. Juma, A. S. Narula, D. A. Brenner, R. B. Sartor, *J. Immunol.*, **1999**, 3474.

¹⁰⁶ S. M. Plummer, K. A. Holloway, M. M. Manson, R. L. J. Munks, A. Kaptein, S. Farrow, L. Howells, *Oncogene*, **1999**, 18, 6013.

¹⁰⁷ A. Koeberle, H. Northoff, O. Wertz, *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, 8, 2347.

ruolo rilevante in una grande varietà di disordini patologici come l'aterosclerosi, i processi infiammatori ed il cancro; e proprio attraverso una reazione a catena mediata dai radicali liberi, si ha la produzione di idroperossidi lipidici con conseguente distruzione della membrana che determina diminuzione della fluidità, danneggiamento delle proteine (recettori ed enzimi) e diminuzione della fuoriuscita di ioni. La risposta del nostro corpo si traduce attraverso meccanismi antiossidanti per difendersi da queste situazioni con vari enzimi come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e la glutazione perossidasi, ed altri agenti come l' α -tocoferolo e l'ascorbato. Quando la funzionalità di questi meccanismi protettivi viene meno, nel nostro organismo si ha un aumento tossico dei valori dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) con conseguente accumulo tissutale; vari composti naturali, come il β -carotene, la vitamina E, il GSH ridotto, il tè verde, la curcumina e vari medicinali come l'acido acetilsalicilico ed il piroxicam, vengono utilizzati per le loro proprietà antiossidanti.¹⁰⁸

I curcuminoidi esibiscono differente attività antiossidante in diversi modelli *in vivo* ed *in vitro*. I primi studi sull'attività antiossidante dei curcuminoidi mostrarono come i gruppi idrossifenolici sull'anello aromatico fossero necessari per l'attività antiossidante e come la presenza di più di uno di questi gruppi conferisse una migliore attività rispetto ai curcuminoidi "puri". *In vivo* venne analizzato l'effetto della posizione del gruppo idrossifenolico e da diversi studi emerse che l'attività antiossidante è di gran lunga maggiore quando il gruppo idrossifenolico è in posizione 4 sull'anello benzenico. Inoltre il potere antiossidante viene rafforzato dalla presenza di uno o due gruppi metossi in posizione *orto* rispetto al gruppo idrossifenolico. Ciò spiega il motivo per il quale,

¹⁰⁸ K. M. Youssef, F. S. El-Shafie, H. A. Farag, O. A. Al-Deeb, S. A. A. Awadalla, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **2004**, 337, 42.

sebbene tutti e tre i composti curcuminoidi abbiano un'elevata reattività in termini di reazioni con i radicali liberi, la curcumina è più efficace rispetto al DMC, che è a sua volta più efficace del BDMC. In altri termini risulta che il legame ad idrogeno tra il gruppo idrossifenolico e il gruppo o-metossi nella curcumina influenza in maniera sostanziale l'energia del legame O-H e conseguentemente l'estrazione dell'atomo di H dai radicali liberi.^{108,109}

Tutto ciò ha suscitato molto interesse nei confronti di questa spezia indiana, soprattutto nella terapia preventiva di malattie neurodegenerative. Studi “*in vitro*” hanno dimostrato che la curcumina inibisce l'attività della lipossigenasi e della ciclo-ossigenasi nei fibroblasti di ratti in evidente stato infiammato,¹¹⁰ della xantina-ossigenasi nelle cellule NIH3T3¹¹¹ e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei macrofagi attivati nei topi.¹¹²

Un recente studio ha rivelato, inoltre, che la stimolazione ossidativa delle proteine G nella membrana delle cellule cerebrali umane da parte di pro-ossidanti metabolici, quali omocisteina e perossido di idrogeno, può essere notevolmente ridotta in seguito a somministrazione di curcumina.¹¹³ L'ipotesi dello stress ossidativo nell'invecchiamento precoce e nei disturbi legati all'età suggerisce gli effetti benefici antiossidativi della curcumina nella prevenzione e nella terapia di malattie neurodegenerative. Questi effetti della spezia sono stati studiati principalmente in modelli cellulari e animali. Uno dei pochi studi

¹⁰⁹ P. Anand, S. G. Thomas, A. B. Kunnumakkara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, B. Sung, S. T. Tharakan, K. Msra, I. K. Priyadarsini, K. N. Rajasekharan, B. B. Aggarwal, *Biochem, Pharmacol.*, **2008**, 76, 1590.

¹¹⁰ T.-S. Huang, S. C. Li, J.-K. Lin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1991**, 88, 5292.

¹¹¹ J.-K. Lin, C.-A. Shih, *Carcinogenesis*, **1994**, 15, 1717.

¹¹² B. Joe, B. R. Lokesh, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1224, 255.

¹¹³ V. Jefremov, M. Zilmer, K. Zilmer, N. Bogdanovic, E. Karelson, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2007**, 1095, 449.

effettuati sull'uomo ha mostrato che la curcumina, con un meccanismo dose-dipendente, aumenta l'attività delle proteine G nelle membrane di cellule della corteccia centrale. Questo effetto stimolatorio è risultato essere più marcato nell'anziano sano che non in quello affetto da Alzheimer. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che la progressione della patologia conduce ad una notevole alterazione dei livelli di proteina G nelle membrane cerebrali umane della corteccia centrale. La curcumina sembra inoltre avere un'azione agonista o modulatoria nei confronti dei recettori estrogenici nel cervello ed in periferia, che sono accoppiati alla proteina G.¹¹³ Vista la sua notevole lipofilia la curcumina è capace di attraversare la barriera emato-encefalica e questo suggerisce che gli effetti neuroprotettivi potrebbero implicare la stimolazione del recettore estrogenico mediato dalla proteina G. Precedenti ricerche avevano dimostrato che una modificazione ossidativa rilevante a carico delle proteine G in modelli di neurodegenerazione può iniziare o promuovere i segnali di morte neuronale. Così è stato evidenziato che la stimolazione ossidativa della proteina G da parte di agenti pro-ossidanti, ossitocina e perossido di idrogeno, altamente espressi durante l'invecchiamento precoce e nelle patologie neurodegenerative, potrebbe essere ridotta con la curcumina.

II.3.3 Attività antiaggregante

La curcumina inibisce la produzione di trombossani *in vitro* ed *ex vivo* ed aumenta la fibrinolisi. Impedisce inoltre l'aggregazione piastrinica indotta dall'ADP, dalla noradrenalina o dal collagene (efficacia pari all'aspirina) senza diminuire la sintesi di prostaciline nell'epitelio aortico (al contrario dell'aspirina).¹⁰²

II.3.4 Attività ipoglicemizzante

Le varie citochine infiammatorie e alcuni fattori di trascrizione come NF- κ B e NRF2, oltre che nelle patologie infiammatorie, sono implicate anche in vari disordini metabolici tra cui il diabete. In questa patologia, infatti, sia l'attivazione del TNF α che del NF- κ B sono correlate ad un'aumentata resistenza all'insulina. Nel diabete la curcumina può agire diminuendo i livelli di glucosio nel sangue e aumentando lo stato antiossidante delle cellule β pancreatiche.¹⁰² Alcuni studi hanno, infatti, valutato la correlazione esistente tra la stimolazione indotta dalla curcumina sulle cellule β del pancreas e l'attività ipoglicemica di questo composto, mostrando che la curcumina è capace di stimolare l'attività elettrica nelle cellule β pancreatiche del ratto, tramite l'attivazione del canale f anionico volume-regolato. Questa attivazione provoca una depolarizzazione delle cellule β pancreatiche e conseguente rilascio di insulina. Altro meccanismo ipotizzato per spiegare l'azione ipoglicemica della curcumina si basa sull'alterazione del flusso di ioni cloro e quindi di H₂O a livello delle cellule β pancreatiche. La curcumina ha anche un'azione sui livelli di colesterolo che spesso sono alterati in patologie metaboliche come il diabete. Nei ratti diabetici trattati con la curcumina è stato osservato un incremento significativo dei livelli di trigliceridi e fosfolipidi nel sangue legato all'aumento dell'attività della colesterolo-epatico-7 α -idrossilasi responsabile del catabolismo del colesterolo. Altri studi hanno evidenziato che la curcumina riduce drasticamente l'infiltrazione dei macrofagi del tessuto adiposo bianco, aumenta la produzione di adiponectina e diminuisce l'attività epatica nucleare dell'NF- κ B e dei marcatori dell'infiammazione, riducendo così le alterazioni infiammatorie e metaboliche associate al diabete.

II.3.5 Attività antitumorale

Diversi studi clinici hanno testato l'efficacia della curcumina anche in ambito oncologico. Il maggiore interesse, su tali studi, si è sviluppato a partire dagli anni '90 e sia *in vitro* che *in vivo* è stato dimostrato che questo pigmento giallo può inibire la crescita di molte cellule cancerose nei diversi organi tra i quali il sangue, il cervello, il sistema gastrointestinale, il pancreas e la prostata.⁹¹

I curcuminoidi hanno mostrato di esercitare la loro azione attraverso molteplici meccanismi e quindi di essere un rimedio multitasking che agisce ai vari livelli di inizializzazione, promozione, progressione e disseminazione tumorale (Figura II.7).^{114,115}

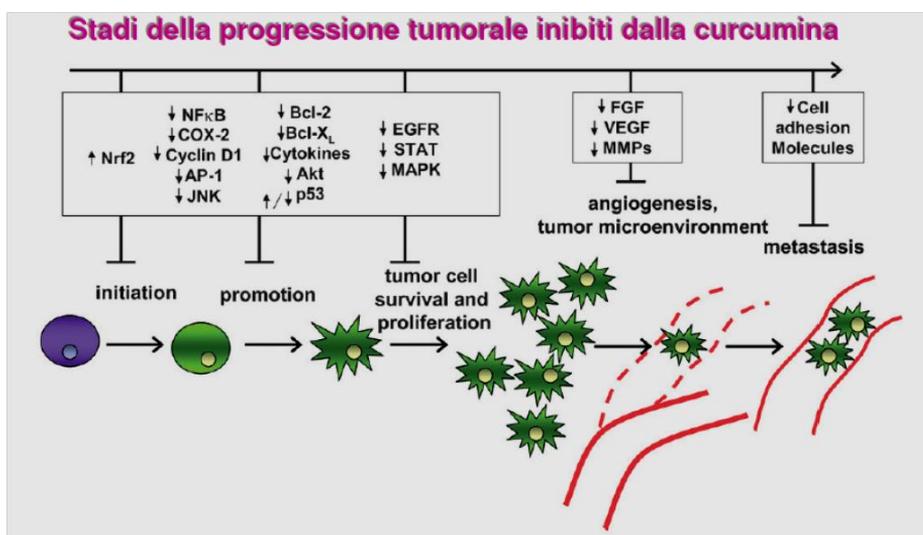


Fig. II.7. Stadi della progressione tumorale inibiti dalla curcumina

La curcumina è una sostanza potenzialmente anti-proliferativa, anti-invasiva ed anti-angiogenetica; è un mediatore della chemioresistenza e

¹¹⁴ J. Ravindran, S. Prasad, B. B. Aggarwal, *AAPS J.*, **2009**, 11, 495.

¹¹⁵ B. B. Aggarwal, B. Sung, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2008**, 30, 85.

della radioresistenza ed è un agente chemiopreventivo. Ha mostrato, infatti, una notevole efficacia come agente citotossico in linee cellulari cancerose di ratto MBT-2 ed umane UMUC.¹¹⁶

La curcumina sopprime l'attivazione del fattore trascrizionale NF-κB attraverso l'inibizione di IκB e quindi NF-κB rimane inattivo, legato a IκBα nel citoplasma e ciò gioca un ruolo chiave nei confronti degli effetti anti-angiogenici ed anti-metastatici, operando su fattori che controllano la stimolazione e la crescita di nuovi vasi sanguigni, l'adesione cellulare, l'invasione e il conseguente processo metastatico. Ha la capacità di essere un potente inibitore dell'espressione di una varietà di fattori di crescita, enzimi e fattori di trascrizione pro-angiogenici come il VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), PGF (platelet growth factor), angiopoetin-1 e 2, COX-2, metalloproteinasi della matrice (MMP-9).^{117,118} In relazione a ciò questa sostanza ha dimostrato un effetto anti-angiogenico *in vivo* in modelli di xenotrapianto in varie forme tumorali inclusi glioblastomi, carcinoma epatocellulare, carcinomi prostatici ed ovarici.¹¹⁹

Recenti studi hanno evidenziato che la curcumina potenzia gli effetti citotossici dei comuni agenti chemioterapici in varie linee cellulari attraverso proprio l'inattivazione di questo fattore trascrizionale NF-κB.¹²⁰ Un pre-trattamento con la spezia in linee cellulari di epatocarcinoma, ha causato un'inibizione tempo-dipendente dell'attività

¹¹⁶ P. Sindhvani, J. A. Hampton, M. M. Baig, R. Keck, S. H. Selman, *J. Urology*, **2001**, 166, 1498.

¹¹⁷ Z.-M. Shao, Z.-Z. Shin, C. H. Liu, M. R. Sartippour, V. L. Go, D. Heber, M. Nguyen, *Int. J. Cancer*, **2002**, 98, 234.

¹¹⁸ A. B. Kunnumakkara, P. Diagaradjane, P. Anand, H. B. Kuzhuvilil, A. Deorukhkar, J. Gelovani, S. Guha, S. Krishnan, B. B. Aggarwal, *Int. J. Cancer*, **2009**, 125, 2187.

¹¹⁹ S. Shankar, S. Ganapathy, Q. Chen, R. K. Srivastava, *Mol. Cancer*, **2008**, 7, 16.

¹²⁰ T.-C. Hour, J. Ken, C.-Y. Huang, J.-Y. Guan, S.-H. Lu, Y.-S. Pu, *Prostate*, **2002**, 51, 211.

di NF- κ B, indotta dalla doxorubicina.¹²¹ In altri studi condotti *in vitro*, la presenza della curcumina ha promosso gli effetti citotossici di farmaci utilizzati nella chemioterapia come il tamoxifene, il cisplatino, la camptotecina e la vincristina. La linea cellulare del mieloma multiplo umano è la meno sensibile alla vincristina ma il trattamento concomitante con la curcumina ne aumenta la citotossicità dal 10% al 70%.¹²²

La contemporanea somministrazione di curcumina ha notevolmente diminuito la concentrazione di paclitaxel richiesta per indurre una risposta antitumorale in linee cellulari umane di cancro cervicale.¹²³ Questo effetto è spiegabile attraverso la capacità della curcumina di favorire i processi apoptotici già dovuti all' agente chemioterapico. Infatti si è evidenziato che la curcumina va ad attivare a livello della fase G2 del ciclo cellulare il fattore di trascrizione p53 con conseguente upregulation di Bax (Figura II.8), la proteina proapoptotica che antagonizza Bcl-2, presente nella membrana mitocondriale.

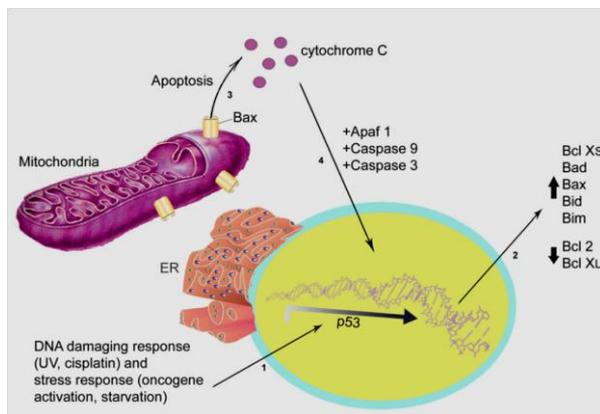


Fig. II.8. Processo apoptotico

¹²¹ S.-E. Chuang, P.-Y. Yeh, Y.-S. Lu, G.-M. Lai, C.-M. Liao, M. Gao, A.-L. Cheng, *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, 63, 1709.

¹²² A. C. Bharti, N. Donato, S. Singh, B. B. Aggarwal, *Blood*, **2003**, 101, 1053.

¹²³ S. V. Bava, V. T. Puliappadamba, A. Deept, A. Nair, D. Karunakaran, R. J. Anto, *J. Biolog. Chem.*, **2005**, 280, 6301.

Quando il rapporto Bax/Bcl-2 aumenta, l'effetto protettivo di Bcl-2 a livello della membrana mitocondriale diminuisce ed aumenta la permeabilità con conseguente rilascio di citocromo C nel citosol. Il citocromo C si lega ad Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) per formare un apoptosoma che porta all'attivazione della cascata delle caspasi e quindi a morte cellulare con distruzione enzimatica delle proteine citoplasmatiche e del DNA.¹⁰⁴

Tale composto esibisce effetti citotossici su varie linee cellulari ed induce morte cellulare programmata (apoptosi) in linee cellulari leucemiche umane HL-60 ed in linee cellulari del carcinoma orale umano HSC-4.¹²⁴

E' stato anche dimostrato che induce apoptosi, con conseguente condensazione della cromatina e frammentazione del DNA, a livello delle linee cellulari di topo di origine embrionale e fibroblastica NIH3T3.¹²⁵

Inoltre l'utilizzo della curcumina, sempre tramite apoptosi, ha determinato la diminuzione del numero delle cellule del carcinoma ascite di Ehrlich (EAC) e delle cellule del melanoma B16-R resistente alla doxorubicina (antibiotico antineoplastico). La curcumina viene anche utilizzata nel cancro della prostata sia androgeno-dipendente che androgeno-indipendente sempre a causa dell'induzione dell'apoptosi.

Come già detto in precedenza la curcumina inibisce il metabolismo dell'acido arachidonico e ciò determina una diminuzione della formazione di leucotrieni e prostaglandine associate con la crescita tumorale. Si è anche visto che la curcumina ha un'importante azione inibitoria nei confronti della sintesi del DNA, che sicuramente gioca un ruolo importante per ciò che concerne la crescita tumorale ed il processo di

¹²⁴ A. Nogaki, K. Satoh, K. Wasaka, H. Takand, M. Takahama, Y. Ida, H. Sakagami, *Anticancer Rev.*, **1998**, 18, 34, 87.

¹²⁵ J.-K. Lin, Y.-C. Chen, Y.-T. Huang, S.-Y. Lin-Shiau, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **1997**, 28, 39.

cancerogenesi. Proprio tra l'inibizione della sintesi del DNA e l'inibizione del metabolismo dell'acido arachidonico sembra ci sia un netto collegamento: gli inibitori della 5-lipossigenasi inibiscono la sintesi del DNA in varie linee cellulari, mentre i suoi metaboliti come 5-HETE, leucotriene C₄ (LTC₄) e leucotriene D₄ (LTD₄) sono capaci di stimolare la sintesi del DNA.¹²⁶

La migliore attività della curcumina si esplica verso forme tumorali a livello della pelle, indotte dal 7,12-dimetilbenzoantracene (DMBA) che è un agente iniziante e dal 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA) che è un agente promovente. Il TPA a livello della pelle ha l'abilità di attivare la protein chinasi C (PKC) e di indurre l'espressione di proto-oncogeni come c-jun e c-fos. La somministrazione topica di curcumina in topi della linea CD-1 determina l'inibizione di queste azioni promosse dal TPA.¹²⁵ Oltre ad avere potenziale azione topica, è efficace su organi colpiti da tumore.

La curcumina presenta ottima attività a livello dei tumori del tratto gastro-intestinale, infatti la somministrazione di curcumina, in topi della linea A/J, sopprime del 50% la manifestazione tumorale e riduce del 75% il volume tumorale.

Inoltre, la somministrazione di curcumina anche per il tumore duodenale indotto da N-etil-N¹-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG), in topi della linea C57BL/6, determina una netta diminuzione dei tumori duodenali ed anche a livello del colon nel tumore indotto da azossimetano (AOM), in topi della linea CF-1, si ha diminuzione del 50% del tumore e del 43% del volume tumorale per topo.¹²⁶

Infine, la curcumina ha azione sopprimente nei confronti del carcinoma del seno. Esperimenti condotti su linee cellulari MDA-MB-231 hanno

¹²⁶ M.-T. Huang, H. L. Newmark, K. Frenkel, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **1997**, 27, 26.

dimostrato che la curcumina possiede anche effetti antiproliferativi che sono mediati dalla down-regulation di MMP-2 (matrice metalloproteinasi) e dall'up-regulation di TIMP-1 (tessuto inibitore di metalloproteinasi) (due comuni effettori che sono implicati nella regolazione della invasione cellulare tumorale). Esistono inoltre effetti inibenti dei due maggiori fattori angiogenetici VEGF e b-FGF.¹²⁷

Un altro aspetto interessante dell'attività della curcumina è la sua capacità di esercitare sia effetti radioprotettivi che radiosensibilizzanti nelle cellule cancerose. Sebbene i meccanismi attraverso i quali la spezia esplica questi effetti contrapposti non siano ancora molto chiari, tutto ciò suggerisce che la capacità di questo principio attivo naturale di ridurre lo stress ossidativo e di inibire la trascrizione di geni a questo correlati, potrebbe fornire la protezione contro gli effetti dannosi della radiazione, mentre l'attività radiosensibilizzante potrebbe essere dovuta ad una upregulation dei geni responsabili della morte cellulare¹²⁸. La curcumina, somministrata in concomitanza con la radioterapia, ha mostrato una notevole promozione dell'inibizione clonogenica indotta dalla radiazione e dell'apoptosi in linee cellulari di cancro prostatico PC-3.¹²⁷

Anche se fin qui ci siamo interessati essenzialmente delle interazioni della curcumina con le proteine (principale target macromolecolari), esistono delle recenti evidenze sperimentali che confermano l'interazione della spezia con il DNA.¹²⁹ Questa interazione, studiata con DNA naturale e sintetico avviene solo in ambiente leggermente acido, pH 6,5 e utilizzando ioni Na⁺ solo in un determinato range di concentrazione. Spettri di dicroismo circolare rivelano che l'interazione della curcumina

¹²⁷ G. C. Jagetia, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2007**, 595, 301.

¹²⁸ D. Chendil, R. S. Ranga, D. Meigooni, S. Satishkumar, M. M. Ahmed, *Oncogene*, **2004**, 23, 1599.

¹²⁹ F. Zsila, Z. Bikadi, M. Simonyi, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 2902.

avviene solo con la doppia elica e non con la singola elica del DNA ed è un'interazione non covalente, ovvero al solco minore (Figura II.9).

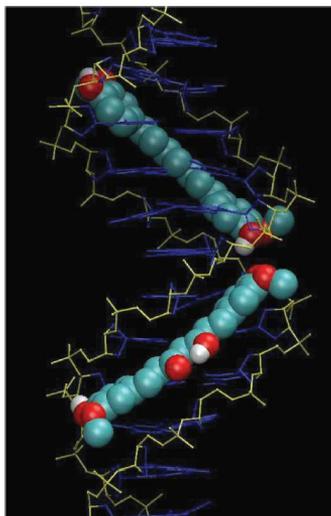


Fig. II.9. Due molecole di curcumina che si legano al solco minore del DNA

Per la curcumina, possiamo parlare di “groove binding”, che a differenza dell'intercalazione non induce ingenti cambiamenti conformazionali nel DNA e si può considerare come modello “lock-and-key” tra legante e macromolecola.¹³⁰ I “groove binders” sono stabilizzati da interazioni intermolecolari ed in questo caso specifico si è potuto constatare che la presenza di ioni Na^+ è essenziale per quest'interazione, in quanto questi cationi interagiscono con gli ossigeni negativi dei gruppi fosfati, determinando un restringimento del solco minore tale da favorire l'interazione con la curcumina. Questa tesi è supportata dal fatto che la maggior parte delle molecole leganti il solco minore preferiscono interagire con sequenze ricche della coppia di basi AT. Questo perché il potenziale elettrostatico in queste sequenze è più negativo, pertanto un certo potenziale elettrostatico richiede una certa concentrazione di Na^+

¹³⁰ R. Palchaudhuri, P. J. Hergenrother, *Curr. Op. Biotechnol.*, **2007**, 18, 497.

che favorisca la giusta alterazione strutturale tale da permettere l'accomodamento della curcumina. La sua capacità di legare gli acidi nucleici ci potrebbe aiutare in futuro a capire meglio l'attività anticancerogena e gli altri effetti farmacologici che presenta.

Questi e molti altri ancora sono i potenziali meccanismi farmacologici conosciuti ed in via di sperimentazione, molti sono i meccanismi molecolari attraverso i quali la curcumina esplica le sue attività anticancerose e molte sono le linee cellulari verso le quali è stata condotta la sperimentazione. Tutto ciò ci ha permesso di prendere in considerazione la curcumina come buon agente antitumorale.

II.3.6 Curcumina - effetti indesiderati e tossicità

La Food and Drug Administration (FDA) ha dichiarato la curcumina come “generally regarded as safe” (GRAS), che letteralmente tradotto significa “generalmente giudicata come sicura”. Sebbene esibisca una notevole varietà di attività farmacologiche ed abbia dimostrato di essere abbastanza sicura negli animali e nell'uomo, sono stati effettuati alcuni studi concernenti la sua tossicità.¹³¹

Il National Toxicology Program (NTP) ha valutato sia la tossicità che le proprietà carcinogeniche dell' oleoresina del turmeric.¹³² Questo estratto è comunemente aggiunto ai cibi e contiene il 79-85% di curcumina pari alla quantità di curcumina normalmente presente nella curcumina commerciale. L' ingestione in ratti di questa oleoresina è stata associata ad aumento di incidenza di ulcere, iperplasia, infiammazione dello stomaco, del colon e del cieco, ed in più, il report afferma che ci sono

¹³¹ M. Lopez-Lazaro, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, 52, 103.

¹³² E. Burgons-Moron, J. M. Calderon-Montano, J. Salvador, A. Robles, M. Lopez-Lazaro, *Int. J. Cancer*, **2009**, 126, 1771.

evidenze di attività cancerogeniche in ratti e topi con la comparsa di adenomi epatocellulari e carcinomi del piccolo intestino.

Sebbene siano stati pubblicati numerosi studi sull'effetto sinergico della curcumina con la chemioterapia, è stato anche dimostrato che la sua somministrazione abolisce l'effetto della ciclofosfamida sulla riduzione della massa tumorale nel cancro alla mammella.¹³³

Il motivo per cui la curcumina esibisce questi effetti contrapposti non è molto chiaro; è noto però, che svolge sia un'attività anti-ossidante che una pro-ossidante, e che queste attività opposte variano in base alla concentrazione. Si può così presupporre che questo meccanismo dose-dipendente sia implicato anche nella duplice e contrapposta attività di chemioresistenza e chemiosensibilizzazione. Non sono stati effettuati molti studi a lungo termine nei quali la curcumina abbia dimostrato la sua tossicità e i suoi effetti avversi. Sono necessarie molte ricerche sia sui roditori che sui soggetti umani per determinare la sicurezza della curcumina. L'evidenza epidemiologica disponibile, comunque, mostra che l'incidenza di molti tumori gastrointestinali è più bassa nelle popolazioni, per esempio indiana, che assumono curcumina in una quantità pari a circa 100-200 mg/dì per lunghi periodi di tempo.¹³⁴

II.3.7 Curcumina - farmacocinetica

Studi effettuati sia su campioni animali che sull'uomo hanno provato che la curcumina risulta essere estremamente sicura anche ad alto dosaggio, ma nonostante la sua efficacia non è ancora stata approvata come agente terapeutico; infatti, sono stati condotti vari trials clinici per confermare la

¹³³ S. Somasundaram, N. A. Edmund, D. T. Moore, G. W. Small, Y. Y. Shi, R. Z. Orolowski, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 3868.

¹³⁴ R. A. Sharma, A. J. Gescher, W. P. Steward, *Europ. J. Cancer*, **2005**, 41, 1995.

sua bassa tossicità e la sua buona tollerabilità. In particolare, in un trial è stata somministrata a 24 volontari sani, una polvere standardizzata estratta dalla curcumina (C3 ComplexTM, Sabinsa Corporation), in un' unica dose (500 mg/12000 mg): tutti i volontari hanno ben tollerato la somministrazione di curcumina in tutti i vari dosaggi, anche se, la spezia è stata individuata nel siero in piccole quantità, solo in due soggetti ai quali era stata somministrata una dose pari a 10000 mg e 12000 mg.¹⁰¹

La sua bassa biodisponibilità e la sua scarsa solubilità, infatti, sono stati evidenziati come i maggiori problemi della curcumina.¹³⁵

La biodisponibilità è una delle principali proprietà farmacocinetiche dei farmaci. In farmacologia, il termine viene utilizzato per descrivere quella parte di farmaco somministrato che raggiunge la circolazione sistemica senza subire alcuna modificazione di tipo chimico rispetto al totale. Un medicinale somministrato per via endovenosa avrà biodisponibilità pari al 100%, mentre nel caso di farmaci somministrati per altre vie (ad esempio per via orale, rettale, transdermica o sottocutanea), si avranno valori inferiori di biodisponibilità a causa del parziale assorbimento e degli effetti del metabolismo. La ridotta biodisponibilità di un qualsiasi agente terapeutico all'interno del corpo dipende da una bassa attività intrinseca, uno scarso assorbimento, un elevato tasso di metabolismo, un' inattività dei prodotti metabolici e una rapida eliminazione dal corpo.

Il profilo farmacologico della curcumina è oggetto di studio già dal 1978. Vari laboratori di ricerca, infatti, si sono occupati dell'assorbimento, della distribuzione e dell'escrezione di questa spezia.

Nell' uomo, quando viene somministrata con un dosaggio pari a 1g/Kg, approssimativamente il 75% della dose viene escreta attraverso le feci e le urine. Come è indicato dai livelli plasmatici e dall' escrezione biliare, la

¹³⁵ P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, B. B. Aggarwal, *Mol. Pharmaceutics*, **2007**, 4, 807.

curcumina presenta un basso assorbimento intestinale. Il picco della concentrazione plasmatica viene raggiunto dopo 1-2 ore dalla somministrazione orale, con un declino graduale nell'arco delle 12 ore successive.

Se la somministrazione avviene per via endovenosa ed intraperitoneale, viene attivamente trasportata nella bile.

Il suo scarso assorbimento determina una scarsa distribuzione tissutale e plasmatica. Dati sperimentali evidenziano che, dopo somministrazione orale di circa 1g/Kg di curcumina in topi, si hanno bassi livelli plasmatici di spezia ($0,5 \mu\text{M}$) a causa del suo scarso assorbimento intestinale. Ulteriori dati sperimentali confermano ciò, infatti si hanno bassi livelli plasmatici ($0,6 \mu\text{M}$), anche dopo somministrazione intraperitoneale (i.p.) di circa $0,1 \text{ g/kg}$ (Figura II.10).¹⁰¹

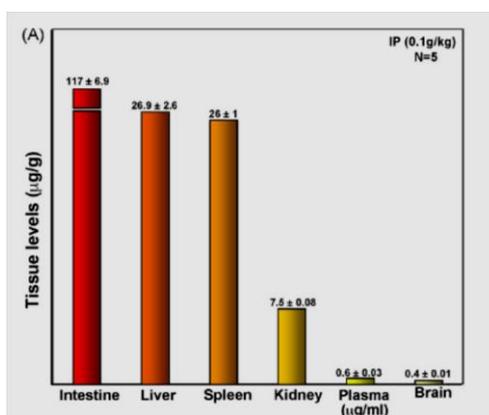


Fig. II.10. Distribuzione tissutale e plasmatica della curcumina somministrata per via intraperitoneale (i.p.) in topi (N=numero topi)

La curcumina subisce rapido metabolismo a livello dell'intestino ed in modo particolare a livello del fegato. Se somministrata oralmente è soggetta a sulfonazione e glucuronidazione, mentre dopo somministrazione per via endovenosa o intraperitoneale la curcumina

viene trasportata attivamente nella bile: i metaboliti biliari primari sono i glucuronidi della tetraidrocurcumina (THC) e della esaidrocurcumina (HHC), mentre il metabolita secondario è l'acido diidroferulico accompagnato da alcune tracce di acido ferulico (Figura II.11).¹³⁷

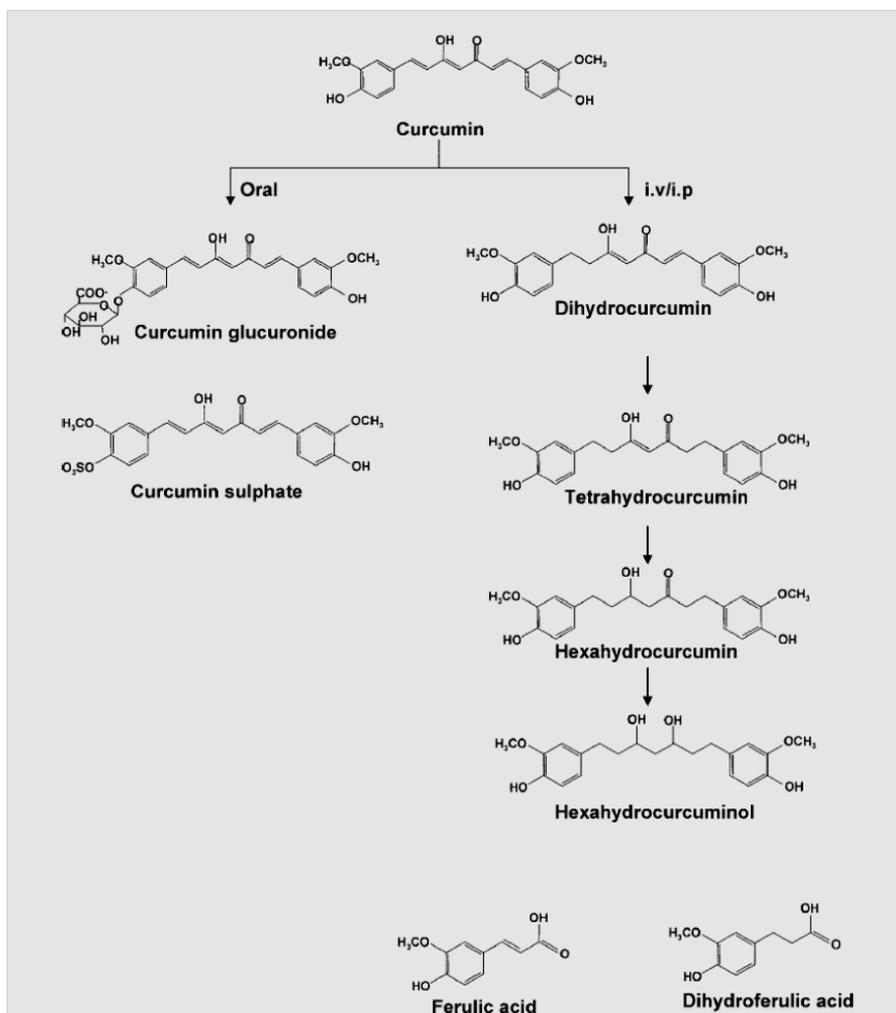


Fig. II.11. Struttura della curcumina e dei suoi metaboliti

Tutto ciò ha evidenziato come, nonostante questa molecola abbia un' elevata attività intrinseca che la rende efficace come agente terapeutico per diversi disturbi, il suo scarso assorbimento ed il suo rapido

metabolismo ne riduce sensibilmente la sua biodisponibilità. I fattori che limitano la biodisponibilità, grazie ai diversi studi condotti *in vitro* ed *in vivo* possono essere così riassunti:

- 1) bassi livelli di concentrazione nel siero,
- 2) limitata distribuzione nei tessuti,
- 3) rapido metabolismo e quindi un breve tempo di emivita (cioè il tempo necessario per ridurre del 50% la concentrazione del composto nel plasma o nel siero sanguigno). Il fatto che la curcumina sia una molecola caratterizzata da un così ampio spettro di attività biologica e farmacologica e, allo stesso tempo, il fatto che tale molecola non possa essere sfruttata appieno e nel massimo della sua funzionalità a causa dei problemi di cui sopra, stimola da anni la ricerca di una molecola di curcumina innovativa, ossia di quella molecola che non presenti questi problemi ma la cui efficacia non subisca modifiche, se non in positivo. Le strategie usate nella ricerca di questa curcumina innovativa sono essenzialmente due: la formulazione e la sintesi di complessi metallici della curcumina.

I possibili vantaggi attribuibili a queste strategie sintetiche sono:

- 1) aumentato tempo di circolazione,
- 2) aumentata permeabilità cellulare,
- 3) aumentata resistenza ai processi metabolici.

II.4 Le formulazioni della curcumina

Per poter migliorare la biodisponibilità della curcumina si possono usare adiuvanti, nanoparticelle, liposomi, micelle, complessi fosfolipidici e pegilazione.

Gli adiuvanti sono stati selezionati sulla base della loro abilità nel prevenire il rapido metabolismo della curcumina, attraverso una loro interferenza con gli enzimi che lo catalizzano. Ne è un esempio la piperina, che agisce a livello epatico ed intestinale come inibitore della glucuronidazione, cioè quella reazione che rende, le molecole liposolubili (sia esogene che endogene), più polari e idrosolubili favorendo una loro più facile eliminazione dall'organismo. In questo modo si rallenta il processo metabolico della curcumina, con un conseguente aumento della sua biodisponibilità del 154%.¹³⁶

Le altre formulazioni, precedentemente menzionate, sono utilizzate soprattutto per aumentare l'assorbimento della curcumina nei tessuti. Le nanoparticelle possono fornire una maggiore penetrazione verso le barriere di membrana grazie alle loro piccole dimensioni. Sono stati condotti ancora pochissimi studi per quanto riguarda la curcumina e le nanoparticelle. Uno studio recente è stato condotto sulla sintesi e applicazioni antitumorali di un polimero basato su nanoparticelle della curcumina con dimensione inferiore ai 100 nm, che viene così chiamato "nanocurcumina". Questo studio ha dimostrato che la nanocurcumina, *in vitro*, ha un'attività simile alla curcumina libera per quanto riguarda le linee cellulari del tumore al pancreas. La nanocurcumina così come la curcumina inibisce l'attivazione del fattore trascrizionale NFκB e riduce i livelli delle citochine pro-infiammatorie come le interleuchine. Ulteriori ed approfonditi studi *in vivo* hanno mostrato un potenziale incremento dell'efficacia rispetto alla curcumina libera.¹³⁷

¹³⁶ G. Shoba, D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran, P. S. S. R. Srinivas, *Planta Med.*, **1998**, 64, 353.

¹³⁷ S. Bisht, G. Feldmann, S. Soni, R. Ravi, C. Karikar, A. Maitra, A. Maitra, *J. Nanobiotechnol.*, **2007**, 5, 1.

I liposomi, le micelle ed i complessi fosfolipidici possono ridurre l'idrofobicità della curcumina e possono inoltre aumentare la penetrazione verso le barriere di membrana attraverso un'interazione con i componenti della membrana stessa. I liposomi ad esempio, sono eccellenti trasportatori sia di molecole idrofile che di molecole idrofobiche. Alcuni studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* su cellule pancreatiche umane hanno dimostrato come la curcumina liposomiale non solo inibisce la crescita del tumore al pancreas ma mostra anche effetti antiangiogenici.¹³⁸ Nel caso delle micelle invece, studi farmacocinetici hanno dimostrato che la curcumina in formulazione polimerica micellare ha un tempo di emivita biologico 60 volte maggiore rispetto a quello della curcumina sciolta in una mistura di dimetilacetammide, polietilenglicole (PEG) e destrosio. Possiamo quindi affermare che le micelle migliorano l'assorbimento gastrointestinale della molecola di curcumina aumentandone conseguentemente la sua biodisponibilità.¹³⁹ I complessi fosfolipidici di curcumina hanno prodotto un tempo di emivita 1,5 volte maggiore rispetto a quello della curcumina libera.¹⁴⁰ Questi risultati indicano che un complesso fosfolipidico della curcumina può significativamente aumentare i livelli di circolazione della curcumina attiva. Altri studi hanno anche dimostrato che i complessi fosfolipidici della curcumina hanno prodotto una solubilità in acqua tre volte maggiore ed un effetto epatoprotettivo migliore della curcumina libera.¹⁴¹ Infine la pegilazione è usata soprattutto per aumentare la solubilità e diminuire la degradazione delle molecole-farmaco. Un recente studio riporta la sintesi di coniugati

¹³⁸ L. Li, F. S. Braiteh, R. Kurzrock, *Cancer*, **2005**, 104, 13, 22.

¹³⁹ Z. Ma, A. Shayeganpour, D. R. Brocks, A. Lavasanifar, J. Samuel, *Biomed. Chromatography*, **2007**, 21, 547.

¹⁴⁰ K. Maiti, K. Mukherjee, A. Gantait, B. P. Saha, P. K. Mukherjee, *Int. J. Pharmaceutics*, **2007**, 330, 155.

¹⁴¹ A. Liu, H. Lou, L. Zhao, P. Fan, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **2006**, 40, 720.

della curcumina al PEG, nei quali solo uno degli ossigeni fenolici della spezia sono legati al polimero. I coniugati sono testati nei confronti di varie linee cellulari umane, come PC-3 per la prostata e LS-174T per il colon ed hanno mostrato una maggiore citotossicità se comparate a quelle della curcumina libera.¹⁴² L' aumento della citotossicità è il risultato della solubilità in acqua che presenta il conigato PEG-curcumina, ciò dovrebbe spingere la ricerca a sintetizzare curcumine solubili in acqua e quindi iniettabili per applicazioni cliniche nel trattamento del cancro.

II.5 Complessi metallici di curcuminoidi

Il rapido metabolismo della curcumina è da ricondurre alla sua altrettanto rapida fotodegradazione, che è stata riscontrata sia in soluzione che allo stato solido, con la conseguente produzione di foto-prodotti che assorbono alla sua medesima lunghezza d'onda. La curcumina è particolarmente soggetta a fotolisi, se sciolta in solventi organici, ma è stato dimostrato che è l'esposizione alla luce solare che dà gli effetti di degradazione maggiori. Non è stato ancora individuato il meccanismo specifico che regola il fenomeno della degradazione, ma evidenze sperimentali sembrano provare che esso non sia legato alla presenza o assenza dei sostituenti idrossilici sui due gruppi fenolici, bensì alla rottura del legame β -dichetonico, che porta alla formazione di composti fenolici più piccoli.⁹⁵

Per questo motivo una strategia per migliorare l'attività biologica della curcumina è sembrata quella di coordinare questa molecola a centri metallici, dato che la sua struttura la rende un eccellente legante chelante.

¹⁴² A. Safavy, K. P. Raisch, S. Mantena, L. L. Sanford, S. W. Sham, N. R. Krishna, J. A. Bonner, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 6284.

In questo modo, dunque, vengono bloccati i siti attivi della curcumina impedendo l'equilibrio cheto-enolico e la sua rapida degradazione.

II.5.1 Complessi metallici omolettici della curcumina

E' stato riportato che la complessazione metallica altera le varie proprietà fisiologiche, migliorando specialmente la citotossicità e l'attività antitumorale di molti composti naturali.¹⁴³

Ad esempio, alcuni curcuminoidi sono stati sintetizzati attraverso condensazione di benzaldeidi sostituite con 2,4-pentanedione, ottenendo molecole con diversi sostituenti sugli anelli fenolici (Figura II.12).¹⁴⁴

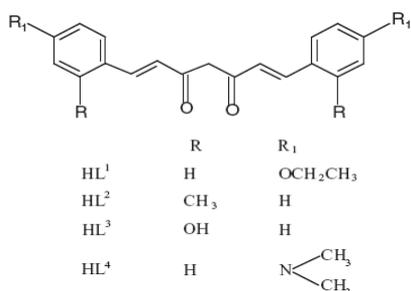


Fig.II.12. Curcuminoidi di sintesi

Questi curcuminoidi di sintesi sono stati poi complessati con gli ioni metallici VO(IV), Co(II), Ni(II) e Cu(II) così da dar origine a complessi omolettici (Figura II.13).¹³⁹

¹⁴³ M. J. Clare, P. C. Hydes, *Metals Ions in Biolog. Syst.*, **1979**, 14, 1.

¹⁴⁴ K. Krishnankutty, V. D. John, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, **2003**, 33, 343.

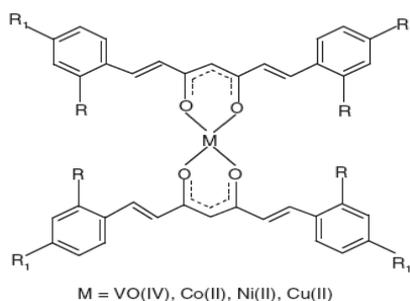


Fig. II.13. Complessi omolettici di curcuminoidi

L'attività citotossica di tali curcuminoidi e dei corrispondenti complessi metallici sono stati testati sul carcinoma ascite di Ehrlich. Dai risultati si evince, che, tra i curcuminoidi, è il composto con un -OH fenolico in orto e un H in para quello con maggiore attività antiproliferativa, suggerendo che la presenza del gruppo idrossilico sull'anello fenolico aumenta l'attività antitumorale. Inoltre, la presenza del metallo aumenta l'attività dei curcuminoidi ed a parità di struttura del complesso, è il Cu(II), il metallo, che rende il sistema più attivo. In figura II.14 possiamo vedere ulteriori leganti curcuminici, sintetizzati più recentemente, che hanno mostrato, anch'essi, di possedere buona attività citotossica.¹⁴⁵

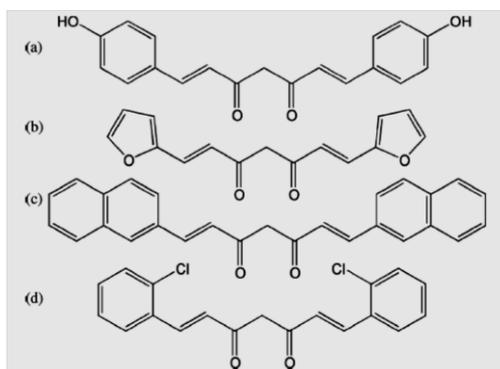


Fig. II.14. Leganti curcuminoidi: (a) 1,7-bis(4-idrossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione, (b) 1,7-di(2-furil)-1,6-eptadiene-3,5-dione, (c) 1,7-di(2-naftil)-1,6-eptadiene-3,5-dione, (d) 1,7-bis(2-clorofenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione

¹⁴⁵ V. D. John, K. Krishnankutty, *Appl. Organometal. Chem.*, **2006**, 20, 477.

Questi leganti sono stati coordinati con il Cu(II) in un rapporto metallo/legante 1:2 (Figura II.15) ed hanno mostrato un'aumentata attività antitumorale rispetto ai leganti di partenza.

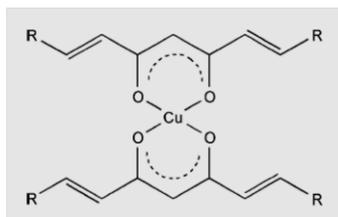


Fig. II.15. Complessi omolettici di rame con 1,7-diarileptanoidi

Tutti i composti hanno, infatti, citotossicità nei confronti delle linee cellulari L929 (cellule di fibroblasti polmonari): la loro concentrazione necessaria per determinare il 50% di inibizione è di 10 $\mu\text{g/ml}$ per i curcuminoidi come leganti liberi e di 5 $\mu\text{g/ml}$ per i complessi di rame. Anche in questo caso, si è dimostrato che il complesso di rame con un gruppo idrossilico sull'anello fenolico è molto attivo (1 $\mu\text{g/ml}$ produce $43 \pm 1,3\%$ di morte cellulare), rispetto agli altri complessi che non presentano gruppi idrossilici sull'anello fenolico. Oltre che *in vitro*, i complessi di rame sono stati studiati anche su topi albini svizzeri nel carcinoma ascite di Ehrlich (EAC) e nel linfoma ascite di Dalton, mostrando anche in questo caso buona attività e determinando una significativa riduzione del volume dei tumori solidi nei topi.

Lo ione vanadile, VO(IV) è stato preso in considerazione come candidato ad agente chemioterapico in quanto, presente in tracce nelle cellule, influenza la regolazione di molti segnali di traduzione. Alcuni complessi di VO(IV) contenenti come leganti il maltolo e l'etil maltolo hanno dimostrato di essere agenti antidiabetici per la capacità di inibire l'enzima tirosin-fosfatasi. Il vanadio, inoltre, possiede attività antiossidante e l'idea

della sua complessazione con la curcumina (Figura II.16) è nata dalla possibilità di ottenere un sinergismo d'azione a livello di varie attività biologiche.¹⁴⁶

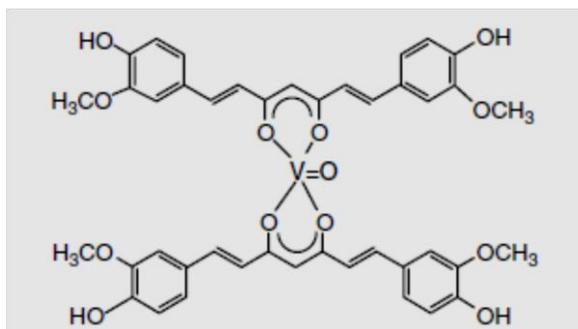


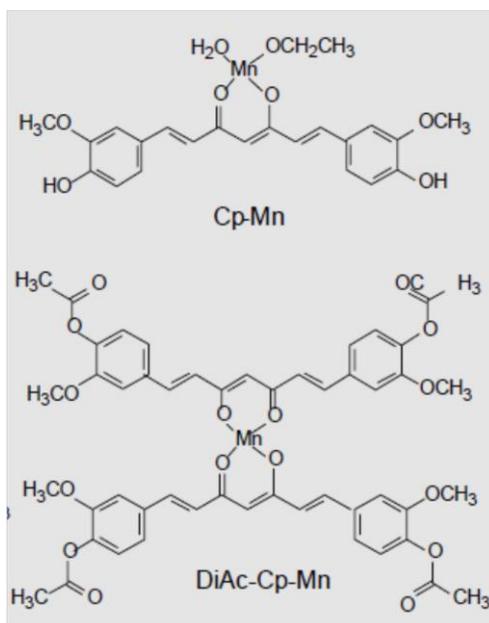
Fig. II.16. Complesso di vanadile della curcumina

Questo complesso non ha mostrato efficacia come antidiabetico, quindi ne è stata studiata l'attività antireumatica in sinoviociti, l'attività inibente l'angiogenesi in cellule muscolari lisce e l'attività antitumorale in linfoma di topo. Il complesso VO(curc)₂ ha dimostrato di essere più attivo come agente antitumorale, con una attività molto maggiore rispetto alla curcumina libera. Ha presentato un'attività antiartritica doppia rispetto alla curcumina e un'attività quattro volte maggiore, rispetto alla curcumina, nell'inibire la proliferazione delle cellule muscolari.

Nel tentativo di migliorare l'attività di scavenger della curcumina, nei confronti dei radicali liberi, sono stati sintetizzati un complesso di manganese con la curcumina (Cp-Mn) e un complesso di manganese con la diacetilcurcumina (DiAc-Cp-Mn).¹⁴⁷

¹⁴⁶ K. H. Thompson, K. Bohmerle, E. Polishchuk, C. Martins, P. Toleikis, J. Tse, V. Yuen, J. H. McNeill, C. Orvig, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 2063.

¹⁴⁷ Y. Sumanont, Y. Murakami, M. Tohda, O. Vajragupta, H. Watanabe, K. Matsumoto, *Life Sci.*, **2006**, 78, 1884



Questi complessi sono stati studiati a livello dell'attività neuroprotettiva in quelle patologie associate a neurotossicità indotta da eccessiva produzione di nitrossido (NO), ovvero nell'epilessia e in altri tipi di danneggiamenti neuronali da stress ossidativo. L'NO è un radicale libero che gioca diversi ruoli a livello cerebrale ed una sua eccessiva produzione induce neurotossicità. Attraverso tecniche di microdialisi sono stati studiati gli effetti *in vivo* di entrambi i complessi sugli aumentati livelli dell' NO indotti dall'acido kainico e dalla L-arginina nell'ippocampo di ratti. Entrambi i complessi hanno mostrato un'attività neuroprotettiva molto maggiore rispetto alla curcumina e alla diacetilcurcumina, grazie all' attività di scavenger dell'NO e quindi grazie all'attività antiossidante svolta.

Ancora più recentemente, infine, è stato condotto uno studio molto particolare ed interessante su un complesso mononucleare (1:1) di Zn(II) della curcumina (Figura II.17), preso in considerazione per la sua attività

antiulcera studiata in ratti nei quali l' ulcera gastrica è stata indotta dalla legatura del piloro.¹⁴⁸

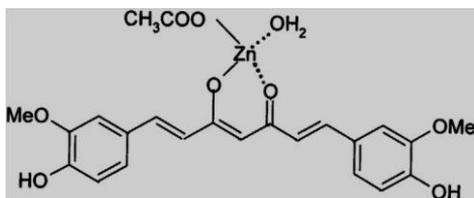


Fig. II.17. Complesso di Zn(II)-curcumina

L' effetto antiulcera del complesso potrebbe essere attribuita alla sua capacità di ridurre la secrezione gastrica acida ed aumentare i meccanismi di difesa attraverso la soppressione dell' NF-kB e successiva produzione di citochine pro-infiammatorie. Questa è la prima evidenza che la somministrazione orale di un complesso Zn(II)-curcumina abbia un' attività gastroprotettiva. Questi risultati mostrano che l' attività antiulcera ed antinfiammatoria del complesso non è solo relativa alla curcumina, ma è anche attribuibile allo Zn(II): gli effetti benefici del complesso Zn(II)-curcumina si manifestano grazie al sinergismo dello Zn(II) e della curcumina.

La ricerca è andata avanti in questa direzione e lo stesso complesso di Zn(II)-curcumina presenta anche effetti antidepressivi.¹⁴⁹ Questi studi hanno mostrato gli effetti antiulcerogeni ed antidepressivi del complesso Zn(II)-curcumina in ratti con ulcera gastrica indotta da CRS “cold-restraint stress” e ciò è stato anche confermato da tre test effettuati su topi: il FST “forced swimming test”, il TST “tail suspension test” ed il “head twitches test” (rapidi movimenti della testa con nessun o piccolo

¹⁴⁸ X. Mei, X. Luo, S. Xu, D. Xu, Y. Zheng, S. Xu, J. Lv, *Chem. Biol. Interaction*, **2009**, 181, 316.

¹⁴⁹ X. Mei, D. Xu, S. Xu, Y. Zheng, S. Xu, *Pharmacol. Biochem. Behavior*, **2011**, 99, 66.

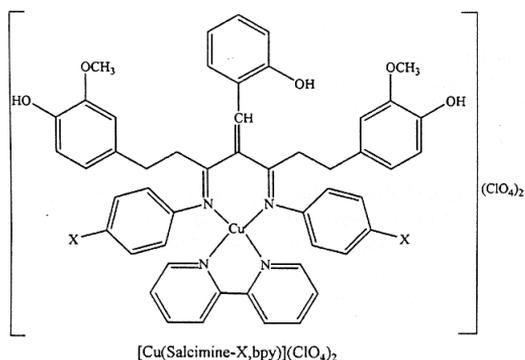
coinvolgimento del tronco) indotto dalla serotonina. Il “CRS” distrugge la mucosa del ratto inducendo ulcera gastrica per diminuzione dell’attività degli enzimi antiossidanti ed aumento dell’attività della $H^+-K^+-ATPasi$. Il pretrattamento con il complesso (12, 24, 48 mg/kg) va a modificare questo trend con una conseguente riduzione delle lesioni gastriche, dell’attività della $H^+-K^+-ATPasi$ e dall’ aumentata attività antiossidante dovuta alla riduzione dell’ iNOS nella mucosa. Nello stesso tempo la somministrazione del complesso (17, 34, 68 mg/kg) diminuisce significativamente il tempo d’immobilità nei test FST e TST, ed aumenta i rapidi movimenti del capo indotti dalla serotonina. Questi risultati dimostrano che il complesso Zn(II)-curcumina mostra buoni effetti gastroprotettivi ed antidepressivi sicuramente maggiori se paragonati a quelli della curcumina, confermando quel sinergismo tra la curcumina e lo zinco.

II.5.2 Complessi metallici eterolettici della curcumina

La ricerca si è, anche, interessata della sintesi di complessi metallici della curcumina, contenenti altri tipi di leganti chelanti, così da completare la sfera di coordinazione del metallo.

Un recente esempio è rappresentato dalla sintesi di complessi di Cu(II) contenenti un nuovo legante curcumino-dichetiminico (gli atomi di ossigeno sono sostituiti da quelli di azoto) insieme ai leganti complementari come la 1,10-fenantrolina e la 2-2’ bipyridina.¹⁵⁰

¹⁵⁰ J. Annaraj, S. Srinivasan, K. M. Ponvel, P. R. Athappan, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99, 669.



Si è visto che, questi complessi del rame, possono intercalarsi a livello del DNA determinando il suo danneggiamento. La possibile interazione con il DNA è stata analizzata tramite spettroscopia di assorbimento e da tale studio è emerso, che questi complessi interagiscono fortemente con la doppia elica del DNA intercalandosi, anche se non è ancora stato chiarito quale sia il frammento molecolare più significativo (fenantrolina/bipiridina o curcumina) in tale processo.

Un altro esempio di complesso eterolettico è il seguente complesso di Pd(II) riportato in figura II.18, in cui il legante complementare della curcumina è una 2-fenilchinolina sostituita in posizione 4.¹⁵¹

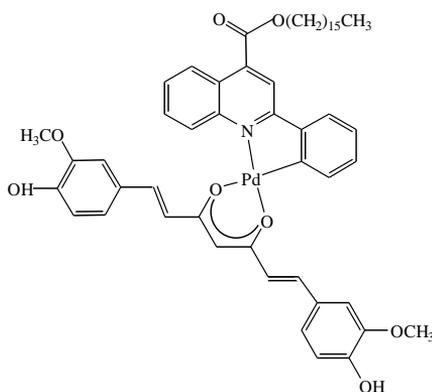


Fig. II.18. Complesso eterolettico di Pd(II) della curcumina

¹⁵¹ D. Pucci, R. Bloise, A. Bellusci, S. Bernardini, M Ghedini, S. Pirillo, A. Valentini, A. Crispini, *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, 101, 1013.

La 2-fenilchinolina, così come i suoi derivati sostituiti in posizione 4, appartiene ad un'importante classe di leganti aromatici bioattivi, la cui complessazione con il Pd(II) porta alla formazione di anelli ciclopalladati. Si tratta di anelli che contribuiscono alla stabilità del complesso rendendo l'intera specie più resistente alla dissociazione in soluzione, meccanismo che generalmente rende i farmaci a base di Pd(II) poco efficaci. La 2-fenilchinolina ed i suoi numerosi derivati presentano attività antibatterica, anti-ipertensiva, antitumorale e altre proprietà che sono principalmente dovute alla loro azione intercalante nei confronti del DNA e dell'RNA. La coordinazione delle due diverse unità sub molecolari, entrambe attive biologicamente, intorno ad un centro metallico ha permesso di ottenere un complesso attivo sulla linea cellulare cancerogena prostatica DU145 (0,1 μ M producono circa il 50% di morte cellulare), citotossicità maggiore rispetto alla curcumina non complessata. Gli ottimi risultati ottenuti, con questa strategia, hanno spinto la ricerca in tale direzione, arrivando alla sintesi di analoghi complessi di palladio ottenuti per sostituzione del legante ciclopalladato con un legante chelante azotato, la 2,2'-bipiridina sostituita nelle posizioni 4,4' con due catene alifatiche (Figura II.19).

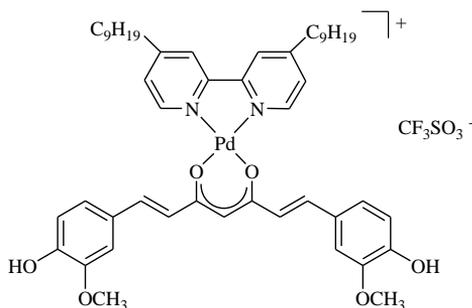


Fig. II.19. Complesso ionico di Pd(II) della curcumina

La presenza del legante azotato neutro ha dato origine, questa volta, ad un complesso ionico, che migliora le proprietà di citotossicità e di solubilità

non solo rispetto alla curcumina libera ma, anche, rispetto al precedente complesso di Pd(II) neutro.¹⁵² Il complesso è stato testato in vitro su differenti linee cellulari prostatiche umane (LnCaP, PC-3 e DU145). Questi studi indicano chiaramente che, mentre la curcumina produce una morte cellulare dovuta all'arresto in fase G2 del ciclo cellulare, il complesso induce inibizione della crescita cellulare per apoptosi. L'apoptosi osservata in cellule trattate con il complesso è mediata dall'attivazione di JNK (MAP chinasi), da depolarizzazione della membrana in associazione all'up-regulation di Bax (proteina pro-apoptotica) e down-regulation di Bcl-2 (proteina anti-apoptotica). Il complesso mononucleare è stato trovato non solo più efficace della curcumina ma anche più stabile grazie alla complessazione con Pd(II) che conferisce una maggiore stabilità alla specie.

Sempre utilizzando un legante N,N chelante sono stati recentemente effettuati studi sulla sintesi e sull'attività biologica di complessi di lantanidi con la curcumina e la 1,10-fenantrolina-5,6-dione, di formula generale REL_3L' con RE=Sm, Eu, Dy. (Figura II.20).¹⁵³

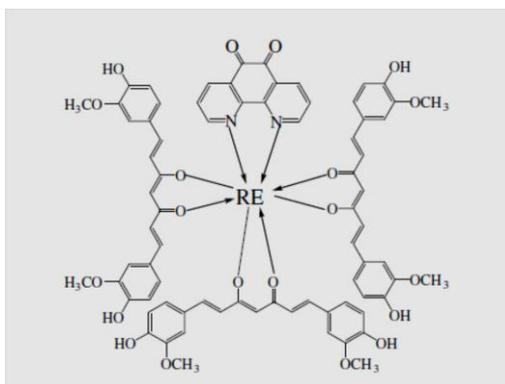


Fig. II.20. Complessi lantanidici della curcumina

¹⁵² A. Valentini, F. Conforti, A. Crispini, A. De Martino, R. Condello, C. Stellitano, G. Rotilio, M. Ghedini, G. Federici, S. Bernardini, D. Pucci, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 484.

¹⁵³ Y.-M. Song, J.-P. Xu, L. Ding, Q. Hou, J.-W. Liu, Z.-L. Zhu, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, 103, 396

Di questi complessi è stata testata l'attività antibatterica. I risultati indicano che i complessi hanno un' eccellente attività, maggiore di quella del legante curcumina. Possiedono una forte azione inibitoria nei confronti del batterio G(+) "Hay bacillus" e G(-) "Escherichia coli". Per avere ulteriori informazioni sull'attività biologica di questi complessi, sono state analizzate le interazioni con il DNA e da questi studi è emerso che il complesso $\text{SmL}_3\text{L}'$ è in grado di clivare il DNA plasmidico a pH e temperature fisiologiche. Questo studio ci permette di individuare nuovi ed efficaci farmaci della curcumina, nonché potenziali agenti in grado di clivare sequenze selettive di DNA.

Inoltre, lo studio della chimica di coordinazione di nuovi leganti curcuminoidi 1,7-(di-9-antracene-1,6-eptadiene-3,5-dione) (9Accm) ha permesso di ottenere due nuovi complessi di Cu(II),¹⁵⁴ in cui il legante curcumina ed il legante azotato sono in un rapporto stechiometrico 1:1 (Figura II.21).

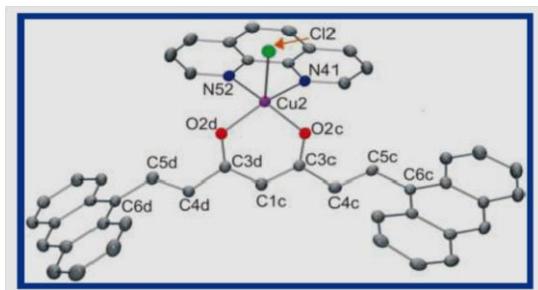


Fig. II.21. Struttura del complesso [(phen)CuCl(9Accm)]

A causa della natura planare ed aromatica del legante, l'intercalazione a livello del DNA era considerata una delle possibili vie di interazione. Sono stati condotti studi di binding del DNA e tutti gli esperimenti invece

¹⁵⁴ N. Aliaga-Alcalde, P. Marques-Gallego, M. Kraaijkamp, C. Herranz-Lancho, H. den Dulk, H. Gerner, O. Roubeau, S. J. Teat, T. Weyhermuller, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 9655.

confermano una mancanza di intercalazione tra i gruppi antracene o fenantrolinici ed il DNA, essendosi individuate solo delle deboli interazioni elettrostatiche. Allo stesso tempo, però, è stata testata l'attività citotossica di questi complessi che hanno mostrato una buona citotossicità, in modo particolare è risultato molto citotossico il complesso rappresentato in figura I.66, che è risultato attivo in varie linee cellulari al pari o anche più dello stesso *cis*-platino. Grazie alla fluorescenza intrinseca dei leganti e dei suoi complessi è stato possibile, con studi di microscopia a fluorescenza su linee cellulari di osteosarcoma umano, avere delle informazioni sui processi cellulari e quindi sul possibile meccanismo d'azione. Il complesso, infatti, si accumula in vacuoli fuori dal nucleo, suggerendo che il DNA non è il target primario di tali complessi e che la sua attività potrebbe svolgersi in diversi modi e con differenti reazioni a livello del citoplasma. Ciò potrebbe indirizzare la ricerca verso una nuova classe di potenziali farmaci metallo-antitumorali.

Capitolo III

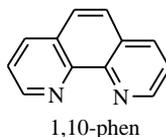
Gli studi che sono stati finora descritti hanno evidenziato l'importanza della curcumina in campo biologico e come la sua coordinazione ad un centro metallico come il Pd(II), in sinergia con altri leganti chelanti permette di migliorarne la biodisponibilità. Per questo motivo, il presente lavoro di ricerca è stato sviluppato in tale direzione, occupandosi della sintesi di nuovi complessi metallici di Zn(II) della curcumina, nei quali sono stati utilizzati come leganti azotati le 1,10-fenantroline, le 2,2'-bichinoline e le 2,2'-bipiridine opportunamente funzionalizzate.

A completare la sfera di coordinazione dello Zn(II) è stato utilizzato un legante monodentato labile come il cloro per dare origine alla formazione di complessi innovativi con geometria piramidale quadrata.

La presenza contemporanea del frammento curcuminoide e dello ione Zn(II), ci si aspetta che permetta di combinare in una singola molecola le proprietà antitumorali con una intrinseca fluorescenza, ottimo strumento per poter seguire il percorso farmacocinetico ed i target specifici in modo da esaminare il meccanismo d'azione del farmaco senza bisogno di ulteriori agenti esterni.

III.1 Sintesi e caratterizzazione di complessi di Zn(II) della curcumina con derivati 1,10-fenantrolinici

La 1,10-fenantrolina (phen) è un legante azotato chelante bidentato tra i più classici utilizzati nella chimica di coordinazione.

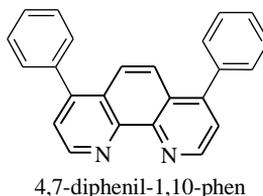


Tale molecola dà il nome ad una famiglia di composti costituiti da tre anelli benzenici condensati, che formano un sistema aromatico rigido planare, idrofobico e povero di elettroni, in cui sono però presenti due atomi di azoto capaci di complessare molti ioni metallici. In soluzioni acquose i leganti fenantrolinici risultano essere basi deboli, ma con una particolare attitudine alla formazione di complessi ottaedrici in cui possono essere coordinate una o più molecole d'acqua. Considerando un generico metallo M si possono ottenere complessi del tipo: $[(\text{phen})\text{M}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, $[(\text{phen})_2\text{M}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{M}(\text{phen})_3]^{2+}$. Tali caratteristiche strutturali rendono la fenantrolina, i suoi derivati ed i complessi metallici che è in grado di formare, ottimi agenti intercalanti in grado di interagire con il DNA e l'RNA delle cellule¹⁵⁵, quindi la 1,10-fenantrolina è stata scelta come primo legante.

L'aumento dell'interesse nell'utilizzo della fenantrolina come legante è dovuto anche all'estrema facilità con cui è possibile funzionalizzare le diverse posizioni degli anelli aromatici, così da ottenere molecole con la medesima struttura complessiva ma con un diverso ingombro sterico e diverse proprietà elettroniche in base alla diversa natura chimica dei

¹⁵⁵ A. Bencini, V. Lippolis, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 2096.

sostituenti. Tendenzialmente si preferisce agire tramite sostituzione simmetrica e le sostituzioni più comuni interessano le posizioni 2,9 e 4,7. La 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (4,7-difenil-1,10-phen), in cui gli idrogeni sulle posizioni 4 e 7 sono stati sostituiti con due gruppi fenilici, è stata scelta come secondo legante.



Tale molecola possiede proprietà del tutto simili alla fenantrolina di partenza, eccezion fatta per la diminuita solubilità. Meno comuni risultano essere invece le sostituzioni simmetriche nelle posizioni 3,8 e 5,6. La perdita di simmetria non è però vincolante nella sintesi dei derivati fenantrolinici, anche se meno diffuse sono state sintetizzate anche fenantroline monosostituite, come nel caso della 5-nitro-1,10-fenantrolina (5-nitro-1,10-phen), che è stata scelta come terzo legante.



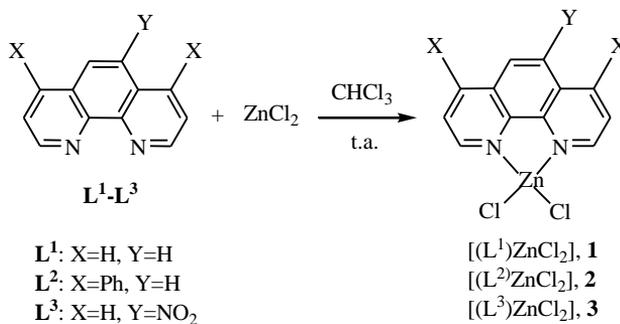
La 1,10-fenantrolina possiede una geometria molto rigida, dovuta alla condensazione dei tre anelli aromatici e tale struttura si riflette sulle sue caratteristiche fotofisiche. La 1,10-phen, in soluzione di diclorometano a temperatura ambiente, risulta caratterizzata da una debole fluorescenza con una resa quantica dello 0.87%, ed un tempo di vita di fluorescenza molto breve. Diversi approcci sono stati tentati allo scopo di migliorarne le proprietà emissive, ed è stato provato che la presenza di sostituenti, in

particolare nelle posizioni 2,9 e 4,7 aumenta la resa quantica di fluorescenza della molecola, infatti all' aumentare dell'ingombro sterico dei sostituenti, le proprietà di fluorescenza crescono sensibilmente. In particolare, l' aumento della delocalizzazione elettronica apportato dai sostituenti come del resto anche la presenza di sostituenti elettron-donatori, produce lo spostamento nel rosso ¹⁵⁶.

A partire da queste premesse, quindi tali leganti possono essere utili per la sintesi dei complessi eterolettici di Zn(II).

III.1.1 Sintesi e caratterizzazione dei complessi precursori $[(L^n)ZnCl_2]$, 1-3

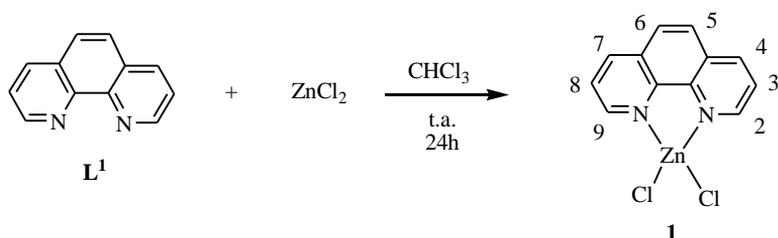
La procedura sperimentale che ha portato alla sintesi dei complessi curcuminici prevede per tutti i leganti l' iniziale sintesi di complessi precursori $[(L^n)ZnCl_2]$, dove il legante fenantrolinico risulta coordinato allo ione Zn(II).



Schema III.1 Schema generale di sintesi dei complessi precursori $[(L^n)ZnCl_2]$, 1-3

¹⁵⁶ G. Accorsi, A. Lisorti, K. Yoosaf, N. Armaroli, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 1690.

III.1.1.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **1**



Schema III.2

Ad una soluzione del legante **L¹** sciolto in cloroformio è stato addizionato un leggero eccesso di cloruro di zinco. La sospensione risultante è stata poi mantenuta a temperatura ambiente e sotto agitazione magnetica per 24 ore. Il prodotto, sotto forma di solido bianco cristallino, è stato filtrato ed infine lavato con etere di petrolio. E' stato ottenuto con una resa del 90%. Il complesso **1** risulta essere solubile in acqua e dimetilsolfossido (DMSO).

Il complesso **1** è stato successivamente caratterizzato mediante analisi elementare, e spettroscopie IR, ¹H-NMR ed UV-Vis.

Valutando i dati delle analisi sperimentali è stata confermata la stechiometria proposta nello schema III.2.

Lo studio comparato degli spettri, IR ed ¹H-NMR, ottenuti per il complesso **1** e per il legante libero (**L¹**) sono a loro volta indicativi e ne confermano l'effettiva complessazione e l'ottenimento del complesso desiderato.

Analizzando lo spettro IR del complesso **1** si osserva lo spostamento dei segnali a frequenze più alte rispetto al legante libero **L¹**, in particolare per quanto riguarda lo stretching (C=C) da 1586 cm^{-1} a 1622 cm^{-1} e la banda relativa allo stretching (C=N) da 1560 cm^{-1} a 1582 cm^{-1} , mentre risulta spostata a frequenze più basse la banda riconducibile allo stretching (C-H aromatici) da 3059 cm^{-1} a 3048 cm^{-1} .

Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 , invece, si osserva come tutti i protoni aromatici del complesso **1** si spostino a campi più bassi rispetto al legante libero. Inoltre, i protoni $\text{H}^{2,9}$ e $\text{H}^{4,7}$ cambiano molteplicità rispetto al complesso precursore, essi sono infatti associabili ad un segnale di doppietto, mentre nello spettro della fenantrolina presentano segnali distinti e separati.

La caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis del complesso **1** è stata effettuata preparando una soluzione in DMSO del complesso ad una concentrazione di $3.11 \cdot 10^{-5}$ M. Il complesso **1**, riportato in figura III.1B, presenta tre spalle di assorbimento a 294 nm, 314 nm e 326 nm, spostate lievemente verso il rosso rispetto al legante libero L^1 e questo è una conferma dell'avvenuta coordinazione del metallo al legante.¹⁵⁷ Infatti, lo spettro di assorbimento del legante L^1 (Figura III.1A) mostra tre spalle rispettivamente a 290 nm, a 309 nm ed a 324 nm. Il solvente utilizzato limita, inoltre, la possibilità di vedere gli interi spettri di assorbimento e quindi l'eventuale presenza di un massimo di assorbimento.

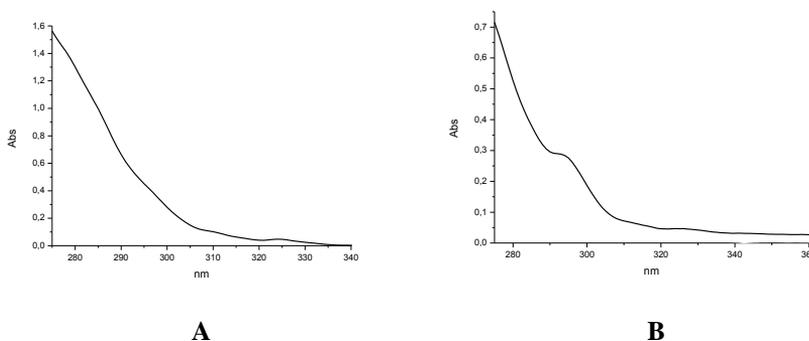


Fig. III.1. Spettri di assorbimento del legante L^1 (A) e del complesso precursore **1 (B) in DMSO**

¹⁵⁷ T. Ohno, S. Kato, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1974**, 47, 2953.

Allo stesso modo è possibile trarre delle conclusioni prendendo in considerazione gli spettri di emissione. Il legante L^1 , dopo l'eccitazione a 290 nm ha uno spettro di emissione caratterizzato da una banda centrata a 399 nm (Figura III.2A), molto simile a quella del complesso precursore **1** che, come riportato in figura III.2B, mostra un massimo di emissione a 396 nm, dopo essere stato eccitato sempre a 290 nm.

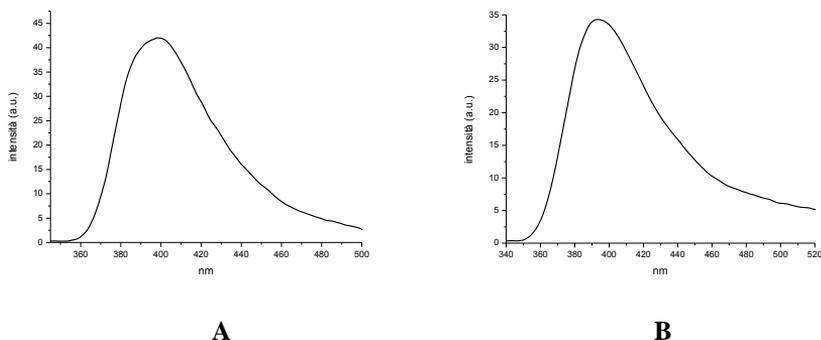
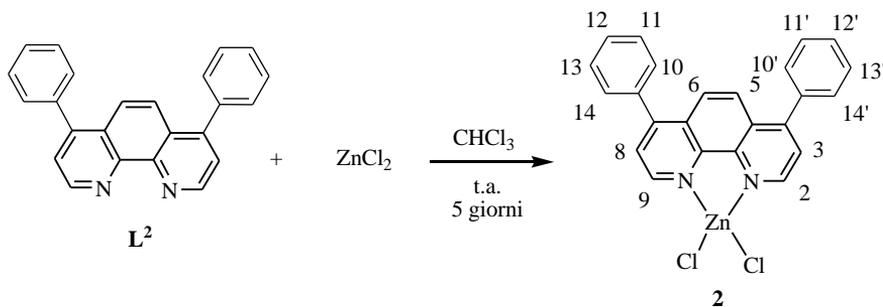


Fig. III.2. Spettri di emissione del legante L^1 (A) e del complesso precursore **1 (B) in DMSO**

E' stata calcolata la resa quantica di emissione del complesso **1**, utilizzando come standard la 2-amminopiridina, ottenendo un valore pari allo 0.6%, inferiore rispetto a quello del legante libero, che è pari al 4%.

III.1.1.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **2**

Il complesso **2** è stato sintetizzato con procedimento analogo al complesso **1**, secondo lo schema di reazione III.3:



Schema III.3

Ad una soluzione del legante L^2 (4,7-difenil-1,10-fenantrolina), sciolto in cloroformio, è stato aggiunto un leggero eccesso di cloruro di zinco. La soluzione risultante è incolore, anche in questo caso, ed è stata lasciata a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 5 giorni. Il prodotto finale è stato poi ricristallizzato da una miscela di cloroformio-etere etilico. Il complesso **2** si presenta come un solido cristallino di colore bianco ed è stato ottenuto con una resa del 92%. Il complesso **2** risulta essere solubile nei clorurati, in metanolo ed in DMSO.

Il prodotto è stato successivamente caratterizzato mediante analisi elementare, spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$ ed UV-vis.

Analizzando lo spettro IR e confrontandolo con quello della 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, si osserva il fondamentale spostamento della banda relativa allo stretching (C=C) da 1608 cm^{-1} a 1618 cm^{-1} , dunque a frequenze maggiori, oltre che a quello relativo allo stretching (C=N) che passa da 1553 cm^{-1} a 1559 cm^{-1} , confermando l'effettiva formazione del complesso.

Analizzando lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (in DMSO- d_6) del complesso **2**, risultano evidenti i segnali caratteristici dei protoni aromatici appartenenti alla 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, ma spostati a campi più bassi se confrontati con i valori relativi al legante libero. Si osserva, inoltre, lo sdoppiamento del segnale relativo ai protoni $\text{H}^{2,9}$ che nello spettro del legante appare

come doppietto, mentre nel complesso **2** appare sdoppiato in due singoletti distinti.

La stechiometria proposta nello schema III.3 è stata confermata, anche, dai dati dell'analisi elementare.

Gli spettri UV sono stati registrati in soluzione, e sulla base dei valori ottenuti è possibile fare ulteriori considerazioni. La figura III.3A riporta lo spettro di assorbimento del legante **L²** in etanolo ad una concentrazione di $3 \cdot 10^{-5}$ M che mostra un massimo di assorbimento a 273 nm ed una spalla a 310 nm, mentre lo spettro di assorbimento del complesso precursore **2**, che è stato registrato in una soluzione di DMSO ad una concentrazione di $3 \cdot 10^{-5}$ M mostra una spalla a 319 nm ed un massimo di assorbimento a 282 nm (Figura III.3B). Quest'ultimo valore giustifica l'avvenuta complessazione, in quanto il massimo di assorbimento subisce uno shift nel rosso rispetto al legante libero.

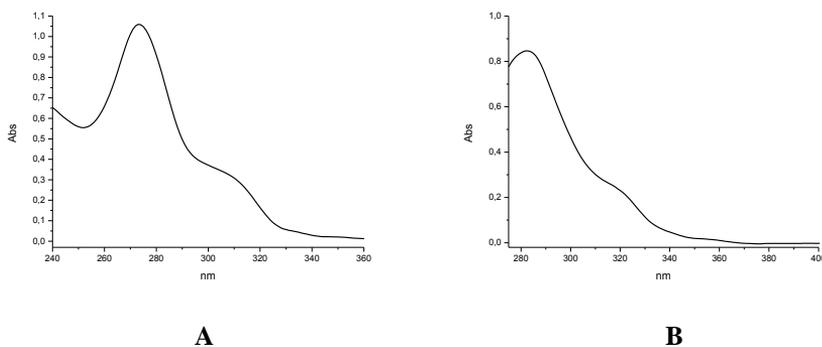


Fig. III.3. Spettri di assorbimento del legante **L² (A) in etanolo e del complesso precursore **2** (B) in DMSO**

Ulteriori informazioni possono essere dedotte dallo studio degli spettri di emissione registrati. Come mostrato in figura III.4A, dopo l'eccitazione a 273 nm, lo spettro del legante **L²** presenta un picco di emissione centrato a 378 nm che si può confrontare con il valore relativo al complesso precursore **2**, in cui il massimo di emissione è centrato a 383 nm e

presenta quindi un lieve shift nel rosso rispetto al legante di partenza (Figura III.4B).

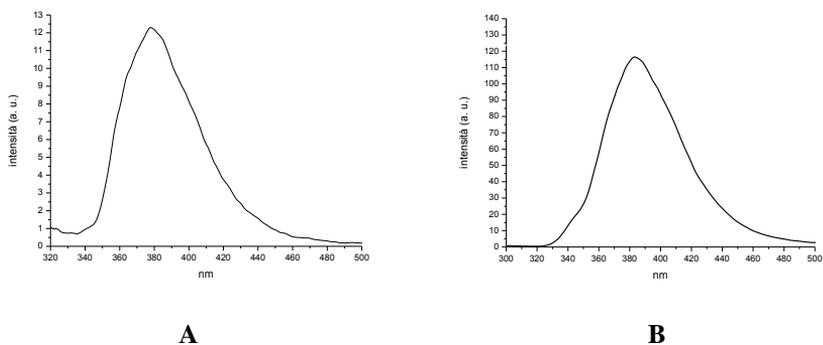
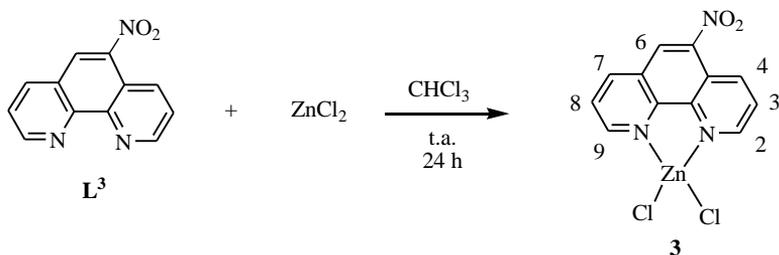


Fig. III.4. Spettri di emissione del legante L^2 (A) in etanolo e del complesso precursore **2 (B) in DMSO**

E' stata poi determinata la resa quantica di emissione del complesso precursore **2** utilizzando come standard la 2-amminopiridina ed il valore calcolato è del 1.88%, inferiore rispetto a quella del legante libero, che invece presenta un valore pari a 3.55%.

III.1.1.3 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **3**

Il complesso **3** in analogia ai complessi **1** e **2** è stato sintetizzato con la medesima procedura, secondo lo schema III.5:



Schema III.4

Ad una soluzione del legante **L**³ in cloroformio, limpida e di colore giallo, è stato addizionato un leggero eccesso di cloruro di zinco, sotto agitazione magnetica ed a temperatura ambiente. Dopo pochi minuti si ottiene la comparsa di un precipitato giallo e la sospensione risultante è stata lasciata a temperatura ambiente per 24 h. Il prodotto viene filtrato e lavato con cloroformio ottenendo un solido giallo, con una resa del 63%. Il complesso **3** è solubile in DMSO.

Tale prodotto è stato successivamente caratterizzato mediante analisi elementare, spettroscopie IR, ¹H-NMR ed UV-vis.

Dallo studio dello spettro IR relativo al complesso **3**, si osserva lo spostamento delle bande caratteristiche a frequenze diverse rispetto a quelle del precursore **L**³. In particolare la banda relativa allo stretching (C=C) passa da 1608 cm⁻¹ a 1619 cm⁻¹, la banda corrispondente allo stretching (C=N) si sposta a frequenze inferiori passando da 1590 cm⁻¹ a 1582 cm⁻¹, confermando l'avvenuta formazione del complesso.

Dall'analisi dello spettro ¹H-NMR (in DMSO-d₆) del complesso **3** risultano evidenti i segnali dei protoni associabili alla molecola del legante **L**³, anche se leggermente spostati a campi più bassi rispetto ai corrispondenti segnali del legante libero. Una sostanziale differenza è quella riscontrabile prendendo in considerazione i segnali relativi ai protoni H^{4,7}, che nel complesso **3** danno luogo ad un unico doppietto, mentre nel legante libero i protoni H⁴ ed H⁷ producono due doppietti distinti.

La stechiometria proposta nello schema III.4 è stata confermata, anche, dai dati dell'analisi elementare.

Per quanto riguarda la spettroscopia UV-vis, l'analisi è stata condotta preparando una soluzione in DMSO del complesso ad una concentrazione

di $4 \cdot 10^{-5}$ M. A differenza degli analoghi complessi **1** e **2**, il complesso **3** risulta particolarmente instabile in soluzione di DMSO, per cui il corrispondente spettro di assorbimento appare perfettamente sovrapponibile a quello del legante libero, caratterizzato da una banda centrata a 324 nm, come illustrato in figura III.5.

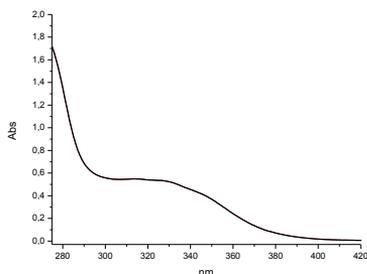


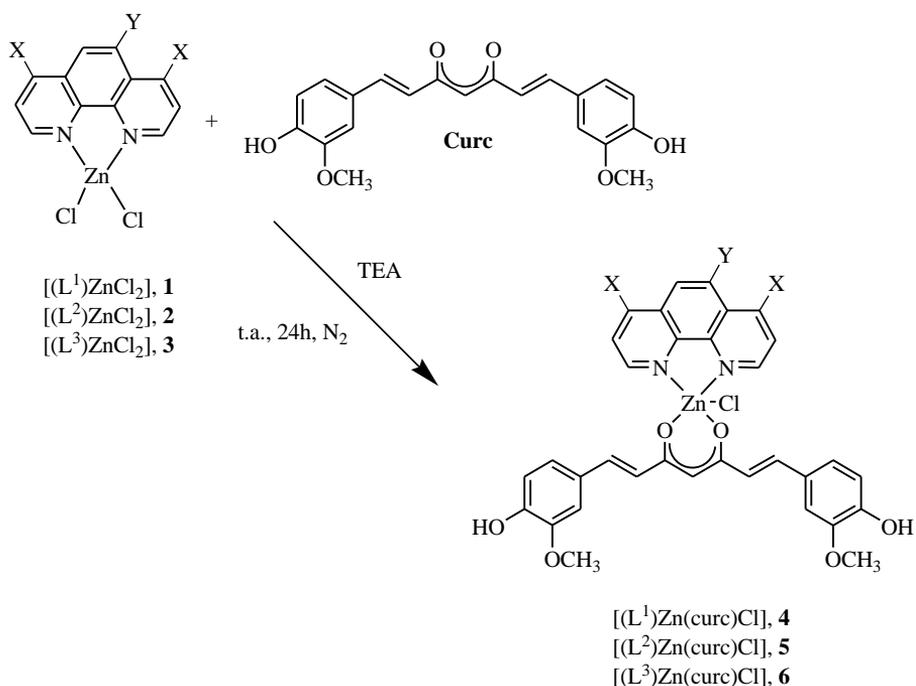
Fig. III.5. Spettro di assorbimento del legante L^3 in DMSO

Inoltre, così come il legante L^3 (5-nitro-1,10-fenantrolina) utilizzato per la sintesi, il complesso precursore **3** non mostra proprietà emissive.

III.1.2 Sintesi e caratterizzazione dei complessi curcuminici $[(L^n)Zn(curc)(Cl)]$, 4-6

I complessi precursori ottenuti sono stati utilizzati per la sintesi dei complessi curcuminici finali $[(L^n)Zn(curc)Cl]$, **4-6**, attraverso una reazione con la curcumina in rapporto equimolare.

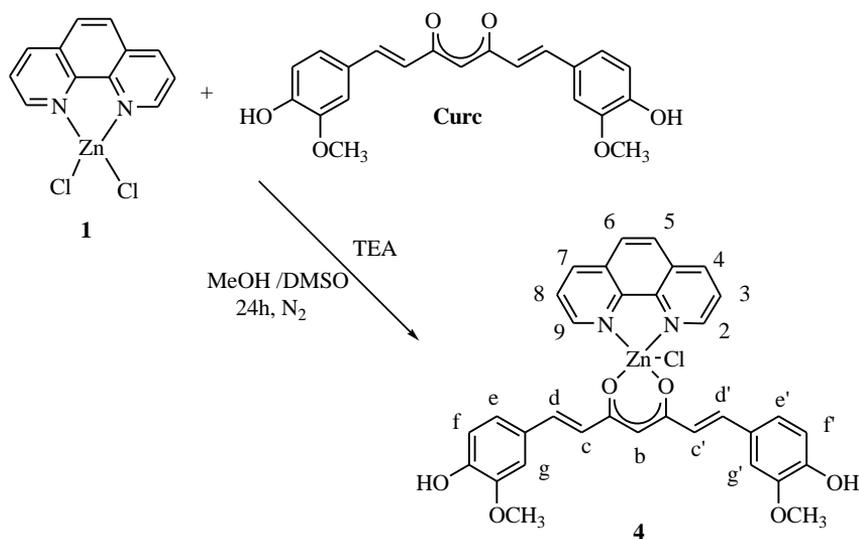
Nel processo sintetico viene sempre utilizzata la trietilammina in rapporto equimolare, in quanto è necessaria per deprotonare la curcumina e favorire la reazione di complessazione con il metallo.



Schema III.5. Schema generale di sintesi dei complessi $[(L^h)Zn(curc)Cl]$, 4-6

III.1.2.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso 4

Ad una soluzione in metanolo del legante curcumina, sotto agitazione magnetica e sotto azoto viene addizionata la trietilammina, ciò provoca un cambiamento di colore nella soluzione che da arancione passa immediatamente ad un colore rosso molto intenso. La soluzione viene lasciata nelle medesime condizioni per circa 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso precursore **1** sciolto in DMSO, quindi si ottiene un ulteriore cambiamento di colore. La soluzione ritorna ad essere nuovamente arancione e si ha la graduale formazione di un precipitato del medesimo colore. La sospensione così ottenuta è stata lasciata per 24 h sotto azoto e sotto agitazione magnetica. Quindi il prodotto finale è stato filtrato e poi lavato con MeOH a caldo.



Schema III.6

Il complesso **4** risultante è stato ottenuto come solido giallo scuro, con una resa del 54%. Il complesso **4** risulta essere solubile in DMSO.

Il complesso è stato successivamente caratterizzato mediante analisi elementare, spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$ e spettroscopia UV-vis.

Valutando lo spettro IR del complesso **4** si osserva lo spostamento delle bande caratteristiche rispetto a quelle del complesso precursore **1**, come la banda relativa allo stretching ($\text{C}=\text{N}$) che passa da 1582 cm^{-1} a 1589 cm^{-1} . Fondamentale è la presenza di altri segnali come la banda corrispondente allo stretching ($\text{C}=\text{O}$) relativa alla curcumina a 1625 cm^{-1} , ed anche la banda a 1513 cm^{-1} relativa allo stretching ($\text{C}-\text{C}-\text{C}$) nell'anello chelato risultante proprio della formazione del complesso.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 rivela la presenza dei picchi protonici tipici della curcumina e lo spostamento a campi più bassi dei segnali associabili ai protoni aromatici del legante fenantrolinico, se paragonati ai valori corrispondenti per il complesso precursore **1**. Si può evincere da questo spettro l'assenza del protone enolico della curcumina che

conferma la sua coordinazione allo ione Zn(II) ed inoltre le intensità dei segnali sono in accordo con la stechiometria proposta metallo-N,N legante-curc (1:1:1).

I risultati ottenuti dalle analisi elementari confermano la stechiometria proposta nello schema III.6.

Infine, sono state effettuate studi spettrofotometrici e sono stati condotti in soluzione utilizzando come solvente il DMSO ad una concentrazione pari a $3 \cdot 10^{-5} M$. Lo spettro di assorbimento del complesso **4** riportato in figura III.6B mostra delle spalle a 295 nm, 345 nm, 406 nm e 454 nm ed un massimo di assorbimento a 432 nm. Osservando tale spettro risulta chiaro come il massimo di assorbimento sia dovuto alla presenza del legante curcumina nel complesso sintetizzato, che ne conferma la sua formazione, infatti il legante curcumina presenta uno spettro di assorbimento caratterizzato da un massimo di assorbimento individuato a 435 nm ed una spalla a 454 nm, come illustrato in figura III.6A.

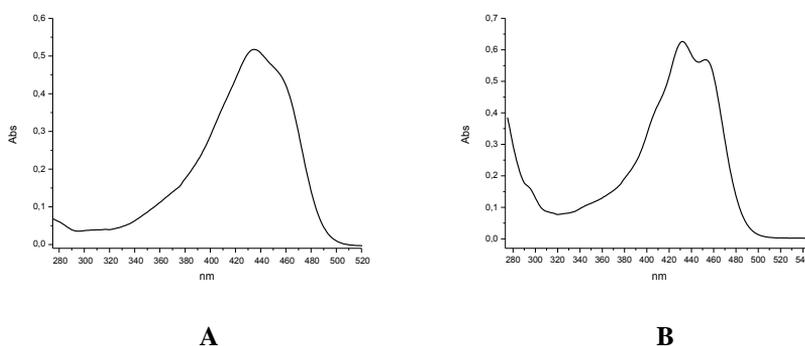


Fig. III.6. Spettri di assorbimento del legante curcumina (A) e del complesso 4 (B) in DMSO

Valutando poi gli spettri di emissione, è possibile fare ulteriori considerazioni. Il complesso **4**, come illustrato in figura III.7B, dopo essere stato eccitato a 432 nm, presenta una banda di emissione centrata a 545 nm e quindi nella regione giallo verde, che si origina dalla presenza

del legante curcumina nel complesso sintetizzato. Infatti l' emissione del legante libero (curcumina) dopo eccitazione a 435 nm, presenta uno spettro di emissione caratterizzato da una banda centrata a 545 nm, come illustrato in figura III.7A.

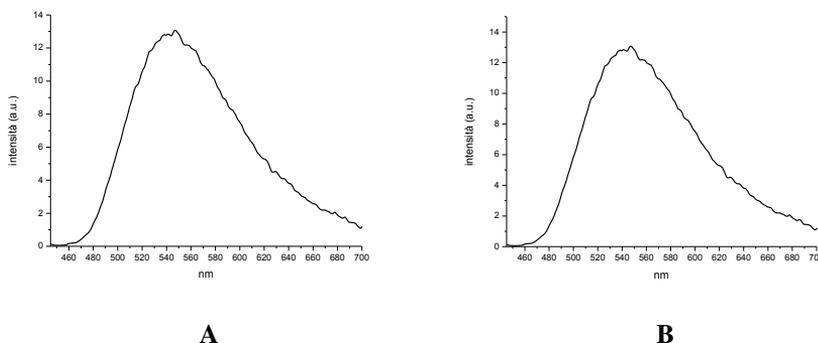


Fig. III.7. Spettri di emissione del legante curcumina (A) e del complesso 4 (B) in DMSO

Il massimo di emissione del complesso **4** mostra uno shift nel rosso notevole se paragonato ai massimi di emissione del legante **L¹** e del complesso precursore **1** rispettivamente a 399 nm ed a 396 nm.

Infine, è stata misurata la resa quantica di emissione utilizzando come standard $\text{Ru}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$ (bipy = 2,2'-bipiridina) ed il valore calcolato è pari al 5% per la curcumina ed al 6.8% per il complesso **4**, quindi la formazione del complesso di Zn(II) migliora le caratteristiche emissive della curcumina libera.

Prima di eseguire lo screening citotossico, è stata verificata la stabilità del complesso in ambiente acquoso. E' stata preparata una soluzione del complesso **4** in DMSO alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-4}$ M che in seguito è stata diluita con una soluzione acquosa tamponata con tampone fosfato (pH 7.4) così da avere una concentrazione finale dell'ordine di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in cui la concentrazione del DMSO non sia superiore al 5% (v/v). La

verifica della stabilità è stata effettuata attraverso spettroscopia UV-vis, come mostrato nelle curve di assorbimento del complesso **4** dopo 24 e 48 ore (Figura III.8B).

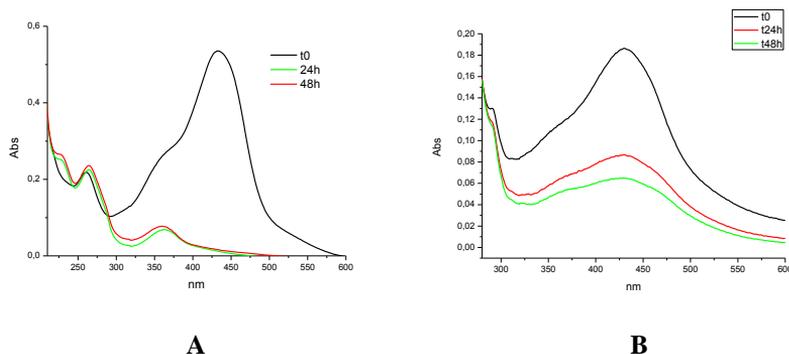


Fig. III.8. Spettri di assorbimento della curcumina (A) e del complesso 4 (B) a pH 7.4

Come si osserva dalle curve registrate nel tempo, nello spettro di assorbimento del complesso **4**, già dopo 24 ore, si può notare una diminuzione dei valori di assorbanza dovuti al fatto che in parte il complesso precipita in soluzione acquosa. Comunque, il complesso **4** dimostra di essere stabile e di non subire i processi di degradazione caratteristici del legante curcumina che si possono vedere in figura III.19B, che invece cambia notevolmente ed infatti si può notare l'assenza della banda a 425 nm.

L'attività antiproliferativa del complesso curcuminico **4** è stata testata nei confronti della linea cellulare umana di neuroblastoma SHSY-5Y. Sono stati effettuati studi preliminari ed è stato utilizzato come test colorimetrico l' MTT, così da valutare la percentuale di vitalità cellulare (espressa in percentuale) che questo complesso determina al variare della concentrazione e del tempo di esposizione. Nell' istogramma della figura III.9 si può notare come varia la percentuale di vitalità delle cellule trattate, dopo 24 ore, all' aumentare della concentrazione della molecola.

Questo complesso mostra attività antiproliferativa come gli altri due complessi testati ed in particolare il complesso **4** (verde nell' istogramma) è quello che esplica la migliore tossicità. Si può constatare che la concentrazione di 10 μM è sufficiente a dimezzare il numero delle cellule testate, così da raggiungere un valore pari a circa il 40% di vitalità cellulare.

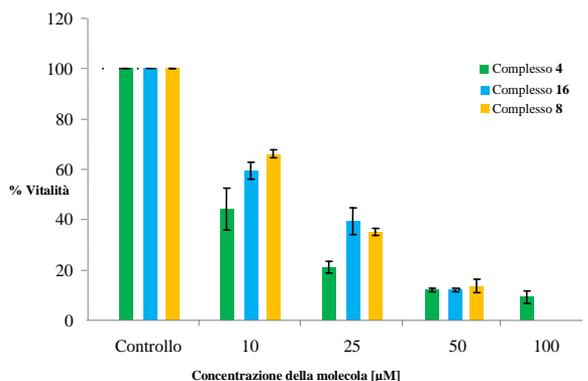


Fig. III.9. Vitalità delle cellule di neuroblastoma umano (SHSY-5Y) dopo 24h di trattamento con il complesso 4

Lo stesso test è stato ripetuto analizzando la vitalità delle cellule dopo 48 ore di trattamento (Figura III.10).

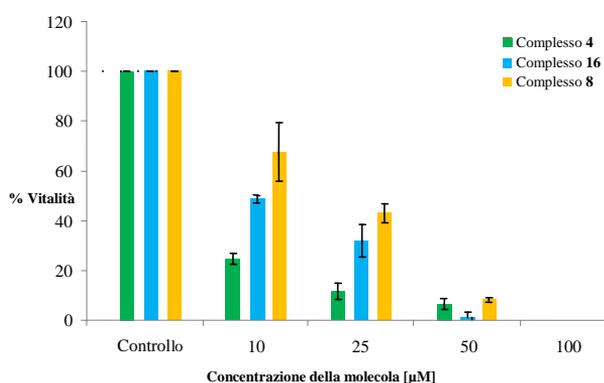
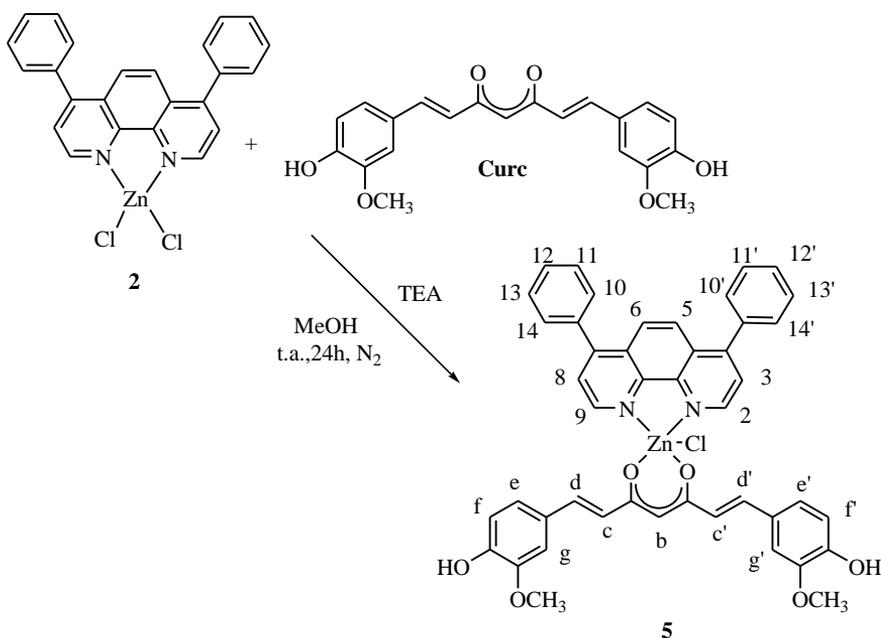


Fig. III.10 Vitalità delle cellule di neuroblastoma umano (SHSY-5Y) dopo 48h di trattamento con il complesso 4

Anche in questo caso, è sempre il complesso **4** che mostra la migliore attività antiproliferativa, e sempre alla stessa concentrazione di 10 μ M si ha una percentuale di vitalità che raggiunge un valore pari a circa il 20%.

III.1.2.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso 5

In analogia al complesso precedente è stato sintetizzato il complesso curcuminico della 4,7-difenil-1,10-phen, **5**. Ad una soluzione in metanolo del legante curcumina sotto agitazione magnetica e sotto azoto è stata addizionata la trietilammina. La soluzione inizialmente arancione ha assunto immediatamente una colorazione rossa molto intensa ed è stata lasciata sotto agitazione magnetica per circa 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso precursore dicloro **2** sciolto anch'esso in metanolo. Si ottiene un ulteriore cambiamento di colore, la soluzione ritorna nuovamente arancione e si ha una graduale formazione di precipitato del medesimo colore. La sospensione risultante è stata lasciata per 24 h sotto azoto e sotto agitazione magnetica ed infine il prodotto viene filtrato e quindi lavato con metanolo. Il complesso **5** è stato ottenuto come solido giallo scuro, con una resa del 65%. Il complesso **5** risulta essere solubile in DMSO.



Schema III.7

Il complesso è stato successivamente caratterizzato mediante analisi elementare, spettroscopie IR, ¹H-NMR e spettroscopia UV-vis.

Dall'analisi dello spettro IR si osserva lo spostamento delle bande caratteristiche rispetto a quelle del complesso precursore **2**, come la banda relativa allo stretching (C=N) che passa da 1559 cm⁻¹ a 1537 cm⁻¹, fondamentale è la presenza di altri segnali come la banda corrispondente allo stretching (C=O) relativa alla curcumina a 1623 cm⁻¹, e la banda a 1507 cm⁻¹, relativa allo stretching (C-C-C) nell'anello chelato risultante proprio dalla formazione del complesso.

Dall'analisi dello spettro ¹H-NMR (in DMSO-d₆) del complesso **5** si osservano invece i segnali caratteristici della curcumina e quelli dei protoni aromatici relativi al legante fenantrolinico che risultano spostati a frequenze più basse rispetto ai valori del complesso precursore. I protoni H^{5,6} e H^{3,8} danno origine ad un unico segnale di singoletto, diversamente dallo spettro del complesso precursore **2**, dove i protoni H^{5,6} danno origine

ad un segnale di singoletto ed i protoni $H^{3,8}$ ad uno di doppietto. Si può evincere da questo spettro l' assenza del protone enolico della curcumina che conferma la sua coordinazione allo ione $Zn(II)$ ed inoltre le intensità dei segnali sono in accordo con la stechiometria proposta metallo-N,N legante-curc (1:1:1).

I risultati ottenuti dalle analisi elementari confermano la stechiometria proposta nello schema III.7.

La caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis del complesso **5** è stata effettuata preparando una soluzione in DMSO con una concentrazione pari a $1.29 \cdot 10^{-5}$ M ed è stata anche determinata la resa quantica di luminescenza. Lo spettro di assorbimento del complesso **5** riportato in figura III.11 mostra delle spalle a 321 nm, 404 nm e 454 nm e due massimi di assorbimento rispettivamente a 278 nm e 432 nm. Osservando tale spettro risulta chiaro come il massimo di assorbimento si sposti verso il rosso rispetto al legante fenantrolinico ed al complesso precursore **2**. Lo spostamento è dovuto alla presenza del legante curcumina, che mostra un massimo di assorbimento a 435 nm (Figura III.6A), confermando la formazione del complesso.

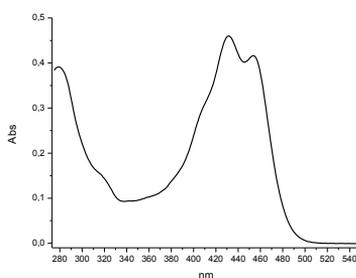


Fig. III.11. Spettro di assorbimento del complesso 5 in DMSO

È stato anche registrato lo spettro di emissione eccitando a 430 nm (Figura III.12). In tale spettro è evidente una banda di emissione nella

regione giallo-verde e centrata a 535 nm, analogamente a quanto osservato per il legante curcumina (Figura III.6B), che si origina per la presenza dello stesso legante nel complesso sintetizzato.

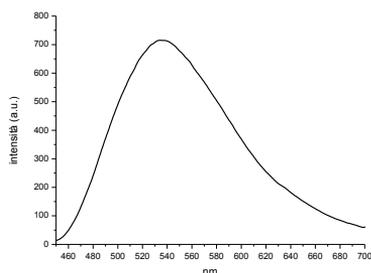


Fig. III.12. Spettro di emissione del complesso 5 in DMSO

Il massimo di emissione del complesso **5** mostra uno shift nel rosso notevole se paragonato ai massimi di emissione del legante **L**² e del complesso precursore **2**, rispettivamente a 378 nm ed a 383 nm.

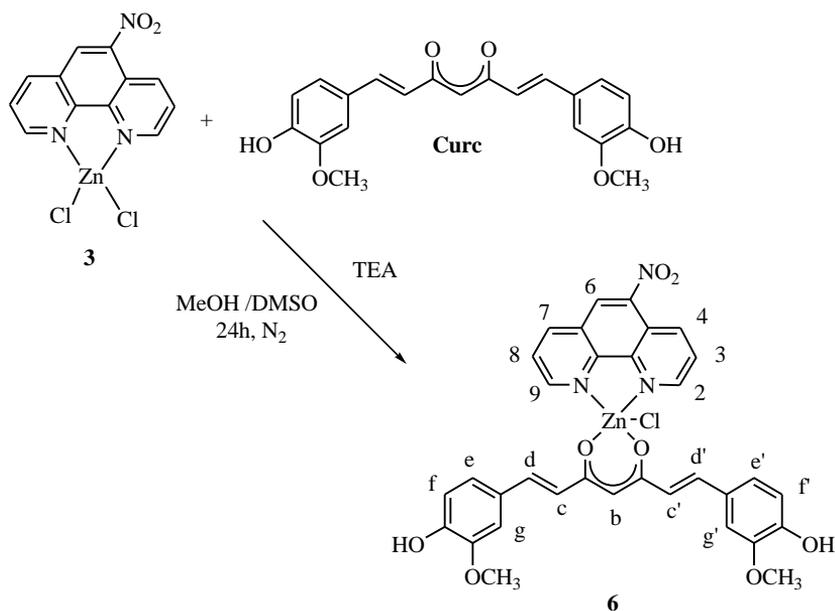
Infine, è stata misurata la resa quantica di emissione utilizzando come standard Ru(bipy)₃Cl₂ (bipy = 2,2'-bipiridina) ed il valore calcolato è pari al 9.9% per il complesso **5**, quindi la formazione del complesso di Zn(II) migliora le caratteristiche emissive della curcumina libera (5%).

Vista la scarsa solubilità del complesso **5** in DMSO non sono stati effettuati test di citotossicità *in vitro* e di conseguenza non è stata effettuata la stabilità del complesso in ambiente acquoso.

III.1.2.3 Sintesi e caratterizzazione del complesso 6

Analogamente ai complessi precedenti, è stato sintetizzato anche il complesso curcuminico della 5-nitro-1,10-phen, **6**. Ad una soluzione in metanolo del legante curcumina, sotto agitazione magnetica e sotto azoto è stata addizionata la trietilammina. La soluzione da arancione è passata

immediatamente ad un colore rosso molto intenso, ed è stata lasciata nelle medesime condizioni per circa 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso precursore **3** sciolto in acqua a caldo. Si è manifestato un ulteriore cambiamento di colore, la soluzione è passata nuovamente ad arancione e si ha una graduale formazione di un precipitato rosso. La sospensione così ottenuta è stata lasciata per 24 h sotto azoto e sotto agitazione magnetica, il prodotto finale è stato filtrato e poi lavato con metanolo. Il complesso **6** è stato ottenuto come solido giallo scuro con una resa del 40%. Il complesso è solubile solo in DMSO.



Schema III.8

Il complesso **6** è stato successivamente caratterizzato mediante analisi elementare, spettroscopia IR, $^1\text{H-NMR}$ e spettroscopia UV-vis.

Dall'analisi dello spettro IR si osserva lo spostamento delle bande caratteristiche del legante **L³** rispetto a quelle del complesso precursore **3**, come la banda relativa allo stretching (C=N) che passa da 1582 cm^{-1} a 1588 cm^{-1} , fondamentale è la presenza degli altri segnali come la banda

corrispondente allo stretching (C=O) relativa alla curcumina a 1621cm^{-1} , e la banda risultante proprio nella formazione 1495 cm^{-1} relativa allo stretching (C-C-C) associabile all'anello chelato risultante dalla formazione del complesso.

In questo ultimo caso lo spettro $^1\text{H-NMR}$ è risultato di difficile interpretazione a causa della sua bassa solubilità in tutti i solventi.

I risultati ottenuti dalle analisi elementari confermano la stechiometria proposta nello schema III.8.

Nonostante tutto, poiché la caratterizzazione UV-vis necessita di concentrazioni più basse, è stato possibile effettuarla. Gli spettri, anche in questo caso sono stati registrati in soluzione utilizzando come solvente il DMSO ad una concentrazione di $1\cdot 10^{-5}\text{ M}$ e valutandoli ci rendiamo conto di come lo spettro di assorbimento del complesso **6** sia analogo a quello degli altri complessi curcuminici sintetizzati **4** e **5**. Lo spettro mostra delle spalle a 352 nm e 414 nm ed un massimo di assorbimento a 435 nm (Figura III.13). Lo spettro di assorbimento associabile al complesso **6** rivela, anche in questo caso, una natura diversa di tale composto rispetto al complesso precursore **3**, come ulteriore prova dell'esito positivo della sintesi.

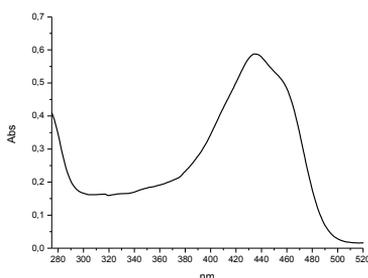


Fig. III.13. Spettro di assorbimento del complesso 6 in DMSO

Lo spettro di emissione, dopo un' eccitazione a 435 nm, mostra una banda centrata a 543 nm e quindi nella regione giallo-verde, sempre originata dalla presenza del legante curcumina nel complesso sintetizzato (Figura III.14).

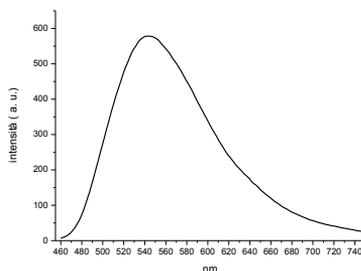


Fig. III.14. Spettro di emissione del complesso 6 in DMSO

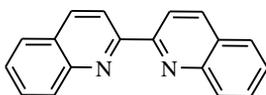
È dunque evidente come le caratteristiche fotofisiche del complesso **6** differiscano completamente da quelle del legante libero **L³** e del complesso precursore **3**. In particolare, il complesso **6** mostra proprietà emissive non riscontrate né per il legante libero né per il complesso precursore, ulteriore prova dell' avvenuta formazione di questo complesso.

E' stata poi misurata la resa quantica di emissione del complesso **6** utilizzando come standard $\text{Ru}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$ (bipy = 2,2'-bipiridina) ed il valore calcolato è pari a 6.5%, quindi la formazione del complesso di Zn(II) migliora le caratteristiche emissive della curcumina (5%).

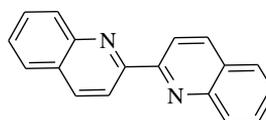
Vista la bassa solubilità del complesso **6** in DMSO non sono stati effettuati test di citotossicità *in vitro* e di conseguenza non è stata effettuata la stabilità del complesso in ambiente acquoso.

III.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso di Zn(II) della curcumina con un derivato 2,2' bichinolinico

Le 2,2'-bichinoline sono composti aromatici appartenenti alla famiglia delle ammine terziarie eterocicliche. Vengono comunemente utilizzate come agenti chelanti per ioni metallici, ma negli ultimi anni sono oggetto di studio per le loro proprietà fotofisiche. Questi leganti sono considerati non o poco fluorescenti, mentre è risaputo che siano fosforescenti. Tale proprietà sembra essere associata al cambiamento di conformazione. Per questi leganti, infatti, è possibile avere sia la conformazione *cis* che *trans*.



cis-2,2'-bichinolina



trans-2,2'-bichinolina

Nello stato fondamentale, la conformazione più stabile di questi leganti liberi è quella *trans*, mentre quella nei rispettivi complessi metallici è *cis*. È proprio nel caso di complessazione con metalli, che tali leganti dimostrano fosforescenza e si è dimostrato che questa proprietà non dipende dal metallo ma è dovuta principalmente ad un cambio di conformazione da *trans* a *cis* che comunque deve verificarsi affinché la complessazione avvenga.¹⁵⁸ Le proprietà delle 2,2'-bichinoline sono state sfruttate anche per produrre biosensori da utilizzare in campo biologico. Sono stati sintetizzati, infatti, nuovi complessi con derivati delle bichinoline (*N,N'*-bis(2-chinolilmetil)-*N,N'*-dialchiletildiammine (alchile = metile, etile, isopropile e *t*-butile) in cui il centro metallico è rappresentato da uno ione Zn(II). Molto interessante è quindi la possibilità

¹⁵⁸ M. Yagi, T. Kaneshima, Y. Wada, K. Takemura, Y. Yokoyama, *Photochem. Photobiol. A*, **1994**, 24.

di sviluppare sensori a base di zinco, fluorescenti, da usare per capire la differente distribuzione intracellulare di tale ione. A tal proposito come sonde fluorescenti per lo ione Zn(II) nella cellula sono stati utilizzati derivati bichinolinici (Figura III.15).

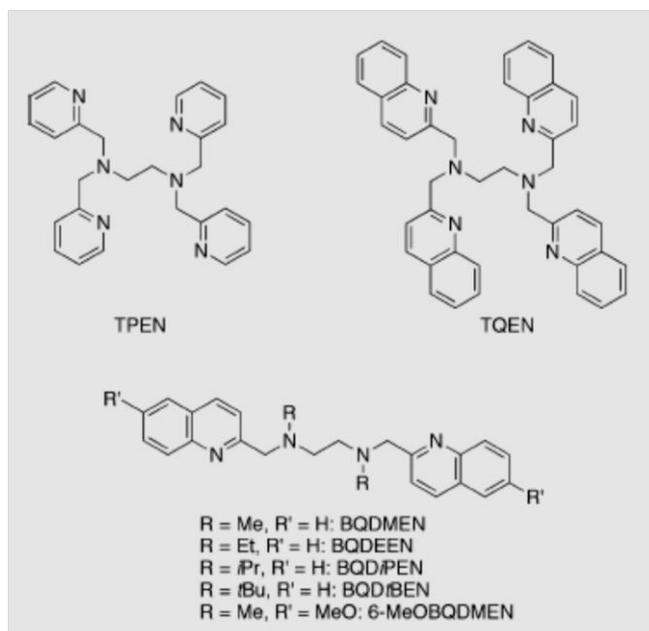


Fig. III.15. Derivati bichinolinici

Questi leganti infatti, in presenza dello ione Zn(II) in soluzione acqua/DMF al 50%, esibiscono fluorescenza, dimostrando di essere selettivi verso questo ione in particolari condizioni. Infatti l'intensità di fluorescenza è costante per valori di pH compresi tra 5 e 9, dimostrando, quindi, di essere ottimi probe per lo ione zinco nell'ambiente cellulare. In particolare i complessi riportati in figura III.16 presentano elevati valori di fluorescenza **a** ($\phi = 0.017$) e **b** ($\phi = 0.28$), risultati attribuibili allo smorzamento del quenching interchinolinico.

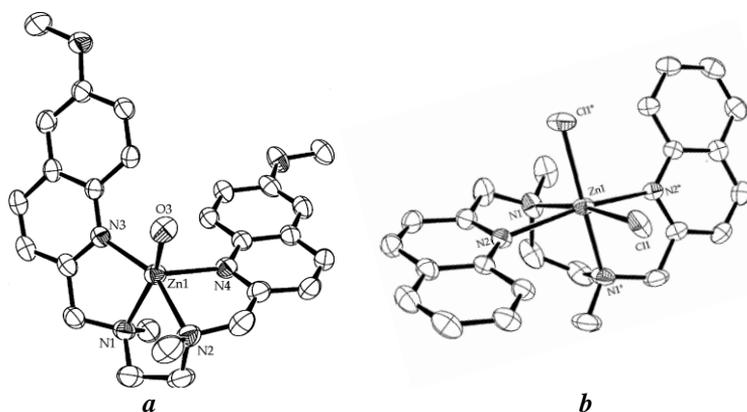


Fig. III.16. Struttura di [Zn(BQDMEN)Cl₂], a e [Zn(6-MeOBQDMEN)], b

Inoltre la parte chinolinica del complesso **b** può essere utilizzata anche come fluoroforo in tecniche come tomografia a emissione di positroni (PET). È una tecnica di medicina nucleare e diagnostica medica utilizzata per acquisire bioimmagini e ottenere informazioni di tipo morfologico¹⁵⁹. Oltre a scopi diagnostici l'uso di leganti bichinolinici si è esteso anche in campo medico come farmaci in grado di inibire l'espressione di cellule prioniche infette, responsabili della Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) nei bovini, delle scrapie nelle pecore, della Malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) e la sua variante clinica (vCJD) nell'uomo e di altre encefalopatie trasmissibili.¹⁶⁰

Infatti, da dati riportati in letteratura le proteine prioniche sembrano avere la capacità di legarsi al rame che ne stabilizza la sua conformazione.¹⁶¹

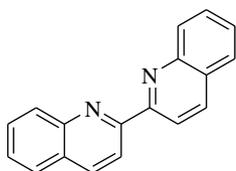
Si è pensato, perciò di utilizzare leganti in grado di chelare selettivamente tale metallo per inibire la propagazione di queste proteine. Sebbene

¹⁵⁹ Y. Mikata, A. Yamashita, A. Kawamura, H. Konno, Y. Miyamoto, S. Tamotsu, *Dalton Trans.*, **2009**, 3800.

¹⁶⁰ I. Murakami-Kubo, K. Doh-ura, K. Ishikawa, S. Kawatake, K. Sasaki, Jun-ichi Kira, S. Ohta, T. Iwaki, *J. Virology*, **2004**, 1281.

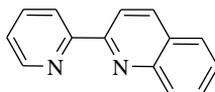
¹⁶¹ D. R. Brown, K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway, H. Kretzschmar, *Nature*, **1997**, 684.

l'esatto meccanismo d'azione sia ancora sconosciuto è stato dimostrato che in linee cellulari trattate con leganti quali le 2,2'-bichinoline o suoi derivati, sia diminuita l'espressione della proteina infetta. In modo particolare risultano avere una maggiore efficacia proprio le 2,2'-bichinoline rispetto alle chinine e alle chinoline.¹⁶²



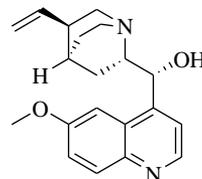
2,2'-bichinolina

IC₅₀ 0.01 μM



2-(2'-Piridil)chinolina

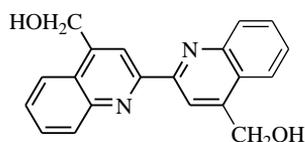
IC₅₀ 0.25 μM



Chinina

IC₅₀ 10 μM

A partire da queste premesse, si è deciso di utilizzare le 2,2'-bichinoline in quanto, nonostante abbiano delle buone caratteristiche come leganti N,N chelanti, non ci sono in letteratura studi sulla loro attività antitumorale. Quindi per completare la sfera di coordinazione del metallo, si è deciso di utilizzare come legante N,N chelante un derivato della 2,2'-bichinolina funzionalizzato in posizione para rispetto all'atomo di azoto per aumentare la solubilità nei solventi biocompatibili.

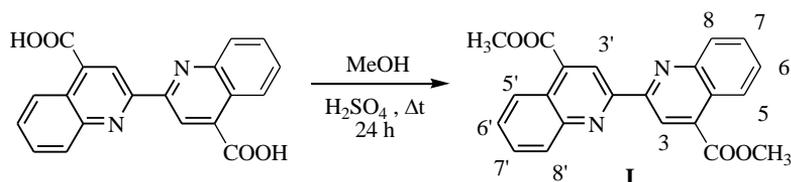


III.2.1 Sintesi e caratterizzazione del legante bichinolinico L⁴

La sintesi del legante L⁴ prevede dapprima una reazione di esterificazione di Fischer, che trasforma l'acido 4,4'-dicarbossilico-2,2'-bichinolina nel composto estereo corrispondente. La reazione viene condotta in metanolo,

¹⁶²T. Fukuuchi, K. Okuda, S. Yoshihara, S. Ohta, *J. Health Science*, **2009**, 586.

in presenza di acido solforico, per 24 h. Il prodotto finale è un solido biancastro ottenuto con una resa dell' 88 %.



Schema III.9

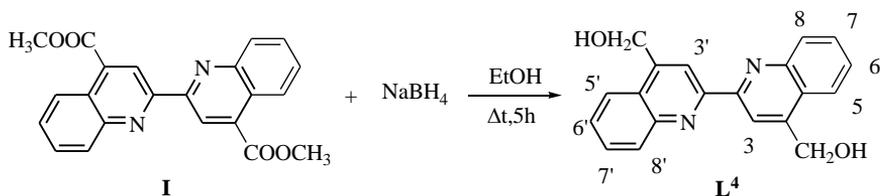
Tale composto è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$ ed analisi elementare.

La formazione del composto desiderato viene confermata, nello spettro IR, dall'assenza del segnale caratteristico degli stretching ossidrilici e dalle presenze delle bande relative agli stretching del gruppo carbonilico (C=O) a 1726 cm^{-1} e degli stretching del legame (C-H alifatico) a 2957 cm^{-1} .

Dall'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ è possibile individuare il singoletto corrispondente ai protoni del gruppo metilico a 4.19 ppm e l'assenza, rispetto al composto precursore, del picco relativo al gruppo ossidrilico a circa 11 ppm.

L'avvenuta reazione viene ulteriormente confermata dai dati fornita dall'analisi elementare che rispecchiano la stechiometria proposta per il composto desiderato.

Nel secondo step che porta alla formazione del legante L^4 , viene aggiunto un eccesso di NaBH_4 ad una sospensione in etanolo del composto **I**. Il prodotto finale è un solido bianco con una resa del 90%.



Schema III.10

Anche in questo caso il composto è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, ¹H-NMR, UV-vis ed analisi elementare.

Lo spettro IR conferma l'avvenuta reazione evidenziando la presenza della banda corrispondente agli stretching ossidrilici a 3202 cm⁻¹ e l'assenza della banda corrispondente agli stretching del gruppo carbonilico.

Nello spettro ¹H-NMR si osserva un tripletto a 5.74 ppm corrispondente ai protoni ossidrilici del gruppo CH₂OH ed un doppietto a 5.15 ppm attribuibile ai protoni del gruppo CH₂. L'avvenuta reazione viene, inoltre, confermata dall'assenza del segnale dei protoni del gruppo metilico.

Anche l'analisi elementare assicura l'avvenuta reazione confermando la stechiometria proposta per il composto desiderato.

La caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis è stata effettuata preparando una soluzione del legante L⁴ in DMSO con concentrazione di 3·10⁻⁵ M.

Lo spettro di assorbimento (Figura III.17) mostra delle spalle a 317 nm e 339 nm ed un massimo di assorbimento centrato a 328 nm.

Il legante non presenta proprietà emissive.

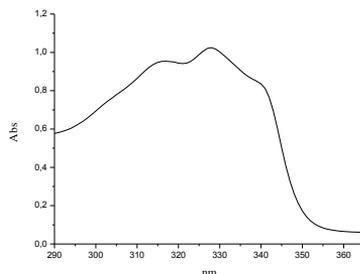
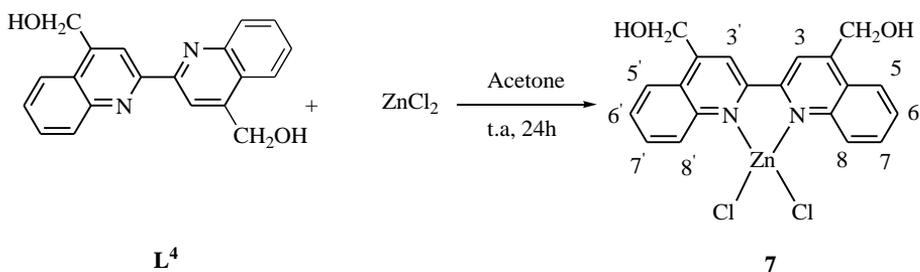


Fig.III.17. Spettro di assorbimento del legante L^4 in DMSO

III.2.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **7**

Il complesso **7** è stato sintetizzato aggiungendo un leggero eccesso di cloruro di zinco ad una soluzione di L^4 in acetone. La sospensione giallina ottenuta viene mantenuta sotto agitazione magnetica per 24 h e da questa viene isolato e purificato un solido di colore giallo tenue con resa del 82%. Il complesso risulta essere solubile in metanolo e DMSO.



Schema III.11

Il complesso **7** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Nello spettro IR si può notare il tipico segnale ossidrilico a 3517cm^{-1} e il fondamentale spostamento, rispetto al legante L^4 , degli stretching relativi

ai legami (C=C) da 1597 a 1614 cm^{-1} e quelli relativi ai legami (C=N) da 1551 a 1593 cm^{-1} che confermano l'avvenuta coordinazione del metallo. L'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO- d_6 rivela lo spostamento ($\Delta\delta = 0.03$ ppm) dei protoni aromatici $\text{H}^{3,3'}$ e $\text{H}^{5,5'}$ ($\Delta\delta = 0.05$ ppm) verso campi più alti rispetto al legante libero L^4 , confermando l'avvenuta formazione del complesso **7**.

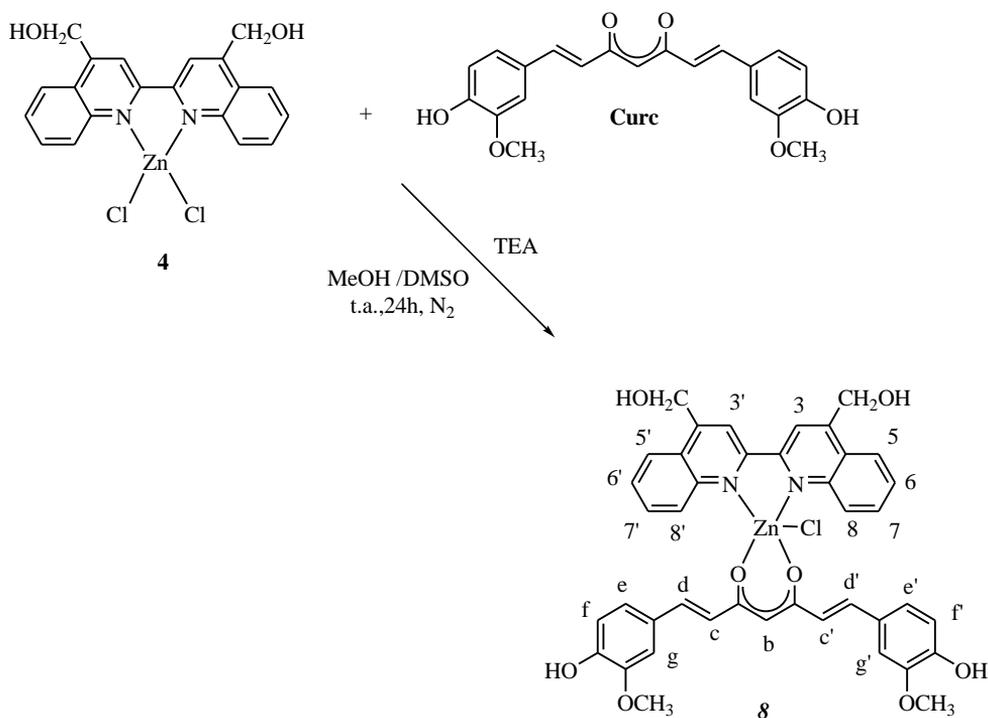
Infine, i risultati dell'analisi elementare rappresentano un ulteriore dato che conferma la formazione del complesso desiderato.

Per la caratterizzazione fotofisica del complesso precursore **7** è stata utilizzata una soluzione del complesso in DMSO con concentrazione di $3 \cdot 10^{-5}$ M. Lo spettro risultante è uguale al legante L^4 , segno che ne evidenzia una probabile instabilità nel solvente DMSO. Inoltre, così come il legante L^4 , il complesso **7** non ha proprietà emissive.

III.2.3 Sintesi e caratterizzazione del complesso **8**

Ad una soluzione in metanolo di curcumina, sotto agitazione magnetica e sotto azoto viene addizionata la trietilammina provocando un cambiamento di colore della soluzione da arancione a un colore rosso molto intenso. L'aggiunta della trietilammina è necessaria per deprotonare la curcumina, così da favorire la reazione di complessazione con il metallo. Il tutto è stato lasciato sotto agitazione per 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso precursore **7** precedentemente sciolto in DMSO. La soluzione subisce un ulteriore cambiamento di colore, assume infatti un colore rosso meno intenso, con la graduale formazione di un precipitato del medesimo colore. La sospensione così ottenuta è stata lasciata per 24 h sotto agitazione magnetica e sotto azoto. Il prodotto finale è stato filtrato e quindi lavato

con metanolo. Il complesso ottenuto è un solido rosso con una resa del 78%. Il complesso è solubile in DMSO.



Schema III.12

Il complesso **8** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, ¹H-NMR, UV-vis ed analisi elementare.

Lo spettro IR conferma l'avvenuta reazione evidenziando il fondamentale spostamento delle bande dello stretching relativo al legame (C=O) della curcumina da 1625 cm⁻¹ a 1590 cm⁻¹ e la presenza di quelle dello stretching a 3400 cm⁻¹ relativo al gruppo ossidrilico della curcumina e dello stretching, a 1510 cm⁻¹, relativo al legame (C-C-C) nell'anello chelato risultante proprio dalla formazione del complesso.

Lo spettro ¹H-NMR in DMSO-d₆ rivela la presenza dei picchi protonici della curcumina e lo spostamento, rispetto al complesso **7**, dei protoni

aromatici biperidinici, in particolare di H^{3,3'} ($\Delta\delta = 0.40$ ppm), di H^{8,8'} ($\Delta\delta = 0.25$ ppm), di H^{7,7'} ($\Delta\delta = 0.34$ ppm) e di H^{6,6'} ($\Delta\delta = 0.39$ ppm). Si può evincere da questo spettro l'assenza del protone enolico della curcumina che conferma la sua coordinazione allo ione Zn(II) ed inoltre le intensità dei segnali sono in accordo con la stechiometria proposta metallo-N,N legante-curc (1:1:1).

Anche i dati forniti dall'analisi elementare confermano la formazione del complesso.

Per la caratterizzazione fotofisica del complesso **8** è stata preparata una soluzione $9.6 \cdot 10^{-6}$ M in DMSO. Lo spettro di assorbimento (Figura III.18) mostra tre spalle a 313 nm, 340 nm e 451 nm e due massimi di assorbimento a 328 nm e 430 nm. Osservando tale spettro risulta evidente un netto spostamento nel rosso rispetto al legante bichinolinico ed al complesso precursore **7**. Lo spostamento è dovuto alla presenza del legante curcumina, che mostra un massimo di assorbimento a 435 nm (Figura III.6A), confermando la formazione del complesso.

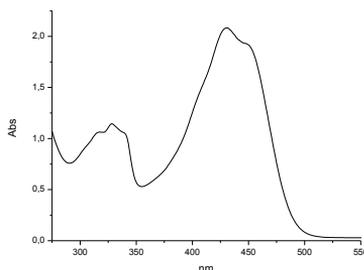


Fig. III.18. Spettro di assorbimento del complesso 8 in DMSO

A seguito di eccitazione a 430 nm si ha il seguente spettro di emissione (Figura III.19). In tale spettro è evidente una banda di emissione nella regione giallo-verde e centrata a 540 nm, analogamente a quanto

osservato per il legante curcumina (Figura III.6B), che si origina per la presenza dello stesso legante nel complesso sintetizzato.

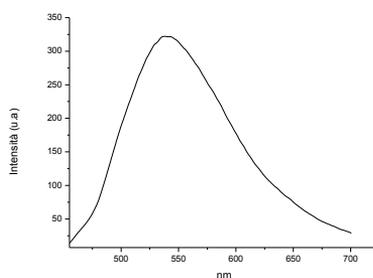


Fig. III.19. Spettro di emissione del complesso 8 in DMSO

È dunque evidente come le caratteristiche fotofisiche del complesso **8** differiscano completamente da quelle del legante libero **L⁴** e del complesso precursore **7**, in particolare il complesso **8** mostra proprietà emissive non riscontrate né per il legante libero **L⁴** né per il complesso precursore **7**, ulteriore prova della formazione di questo complesso.

E' stata poi misurata la resa quantica di emissione del complesso **8** utilizzando come standard $\text{Ru}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$ (bipy = 2,2'-bipiridina) ed il valore calcolato è pari a 7.6%, quindi la formazione del complesso di Zn(II) migliora le caratteristiche emissive della curcumina (5%).

Prima di eseguire lo screening citotossico, è stata verificata la stabilità del complesso in ambiente acquoso. E' stata preparata una soluzione del complesso **8** in DMSO alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-4}$ M che in seguito è stata diluita con una soluzione acquosa tamponata con un tampone fosfato (pH 7.4) così da avere una concentrazione finale dell'ordine di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in cui la concentrazione del DMSO non è superiore al 5% (v/v). La verifica della stabilità è stata effettuata attraverso spettroscopia UV-vis, come mostrato nelle curve di assorbimento del complesso **8** in soluzione acquosa tamponata registrate dopo 24 e 48 ore (Figura III.20).

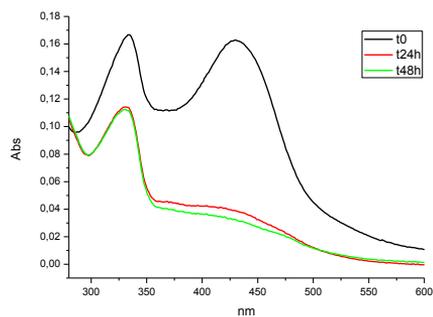


Fig. III.20. Spettri di assorbimento del complesso 8 a pH 7.4

Come si osserva dalle curve registrate nel tempo, nello spettro di assorbimento del complesso **8**, già dopo 24 ore, si può notare una diminuzione dei valori di assorbanza dovuti al fatto che in parte il complesso precipita in soluzione acquosa. Comunque, il complesso **8** dimostra di essere stabile e di non subire i processi di degradazione caratteristici invece del legante curcumina.

L'attività antiproliferativa del complesso curcuminico **8** è stata testata, per analogia con il complesso **4**, nei confronti della linea cellulare umana di neuroblastoma SHSY-5Y. Sono stati effettuati studi preliminari ed è stato utilizzato come test colorimetrico l' MTT, così da valutare la percentuale di vitalità cellulare (espressa in percentuale) che questo complesso determina al variare della concentrazione e del tempo di esposizione. Nell' istogramma della figura III.21 si può notare come varia la percentuale di vitalità delle cellule trattate, dopo 24 ore, all' aumentare della concentrazione della molecola. Il complesso **8** (giallo nell'istogramma) mostra attività antiproliferativa come gli altri due complessi testati ed in particolare questo complesso esplica una discreta tossicità, infatti si può constatare che la concentrazione di 25 μM è sufficiente a dimezzare il numero delle cellule testate, così da raggiungere un valore pari al 40% di vitalità cellulare.

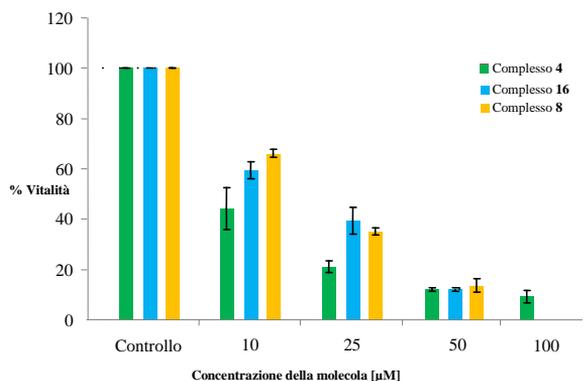


Fig.III.21. Vitalità delle cellule di neuroblastoma umano (SHSY-5Y) dopo 24h di trattamento con il complesso 8

Lo stesso test è stato ripetuto analizzando la vitalità delle cellule dopo 48 ore di trattamento (Figura III.22).

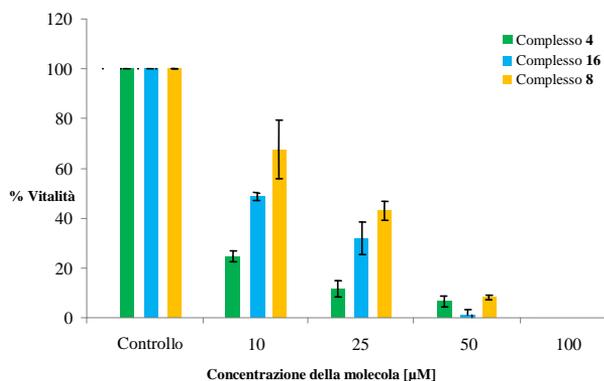
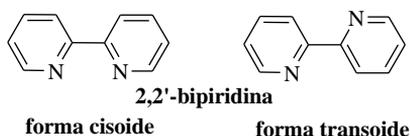


Fig.III.22 Vitalità delle cellule di neuroblastoma umano (SHSY-5Y) dopo 48h di trattamento con il complesso 8

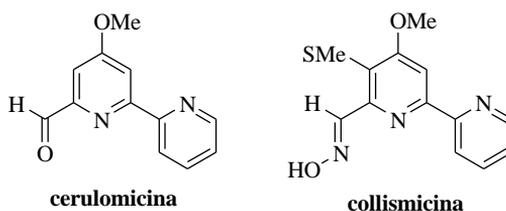
Anche in questo caso, il complesso 8 mostra sempre attività antiproliferativa, anche se la percentuale di vitalità cellulare non subisce grosse variazioni dopo le 48 ore di somministrazione, infatti alla concentrazione di 25 µM si ha una percentuale di vitalità che raggiunge sempre circa il 40% .

III.3 Sintesi e caratterizzazione di complessi di Zn(II) della curcumina con derivati 2,2' bipiridinici

Le 2,2'-bipiridine, composti aromatici appartenenti alla famiglia delle ammine terziarie eterocicliche, sono molecole molto versatili alla base di una importante area della chimica sopramolecolare e quindi molto usate nel campo sia dei materiali che in quello biologico.¹⁶³



Tali molecole sono anche presente in composti naturali come le cerulomicine o le collismicine, dotate di attività antibiotiche e citotossiche.¹⁶⁴

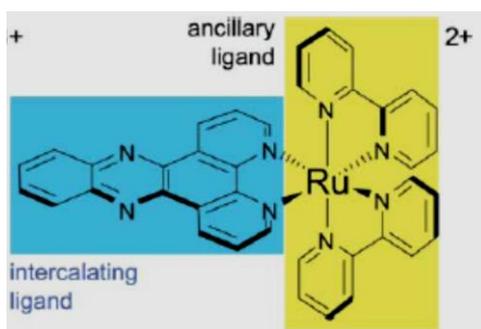


I leganti biperidinici hanno la capacità di coordinare numerosi metalli mediante gli azoti eterociclici e le loro proprietà possono variare in base al tipo di centro metallico ed ai sostituenti laterali eventualmente presenti. Le biperidine, infatti, coordinano metalli di transizione quali platino(II), palladio(II), oro(III), rutenio(II) e zinco(II) ed introducendo sostituenti alifatici nelle posizioni 3,3' oppure 4,4' possono migliorare la solubilità in acqua e le eventuali attività biologiche dei complessi. Recentemente

¹⁶³ G.R. Newkome, A.K. Patri, E. Holder, U.S. Schubert. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 335.

¹⁶⁴ F. Trècourt, B. Gervais, O. Mongin, C. Le Gal, F. Mongin, G. Quèguiner, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2892.

sono stati sintetizzati diversi complessi bipyridinici contenenti metalli di transizione, che hanno dimostrato di avere interessanti proprietà antineoplastiche dovute alla loro spiccata attività di metallo-intercalatori. Affinchè un intercalante possa trovare posto tra due basi del DNA è necessario che la doppia elica perda la sua conformazione standard. I metallo-intercalanti sono complessi metallici con al massimo un legante che funge da intercalante. Questi leganti, detti ancillari, sono orientati parallelamente rispetto alle coppie di basi, sporgono al di fuori del centro metallico e possono prontamente impilarsi nell'area π del DNA-duplex.²³ Un noto esempio di legante intercalante è rappresentato dal seguente complesso ottaedrico di rutenio:



Entra, dunque, nella doppia elica attraverso il major groove, infatti nel processo intercalativo il legante agisce come una nuova coppia di basi, anche se nessuna base è però espulsa dal DNA-duplex. Questo metallo-intercalante è stato studiato in modo da essere saturo da un punto di vista della coordinazione e inerte alla sostituzione così che non ci sia coordinazione diretta con le basi del DNA. Inoltre, di questi metallo-intercalatori sono state studiate le caratteristiche fotochimiche e fotofisiche in quanto particolarmente utili sia per investigare la loro intercalazione che per capire ulteriori vari aspetti della chimica degli acidi nucleici.

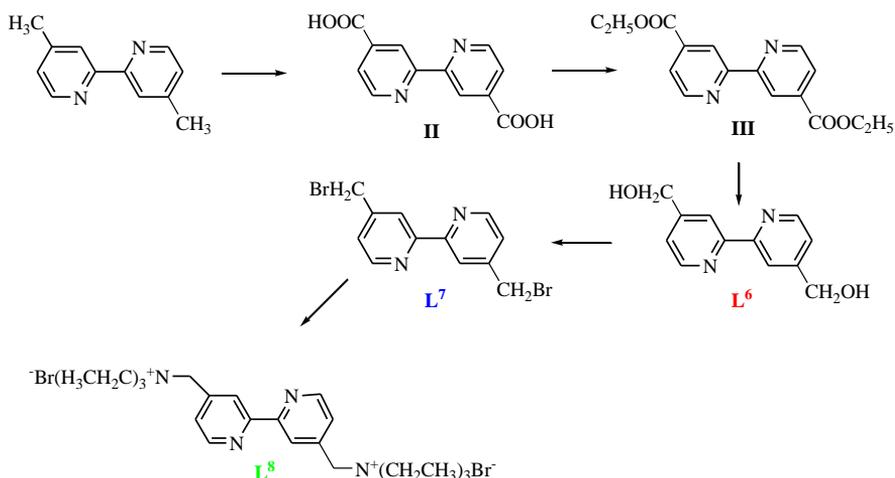
Partendo da queste premesse, per la sintesi di complessi eterolettici di Zn(II), come leganti azotati sono stati scelti ed utilizzati leganti biperidinici ed in particolare sono stati presi in considerazione la 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina (**L⁵**), la 4,4'-idrossimetil-2,2'-bipiridina (**L⁶**), la 4,4'-bromometil-2,2'-bipiridina (**L⁷**) e la 4,4'-trietilammonibromurometil-2,2'bipiridina (**L⁸**), mentre come legante O-O chelante è stata usata sempre la curcumina.

III.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei leganti 2,2' biperidinici

Escludendo il legante commerciale 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina, per gli altri leganti diversamente funzionalizzati in posizione para rispetto all' azoto è stata effettuata la sintesi. In particolare i sostituenti utilizzati sono:



La sintesi dei leganti N,N chelanti biperidinici prevede numerosi step che vengono qui di seguito riassunti mediante un semplice schema di sintesi:

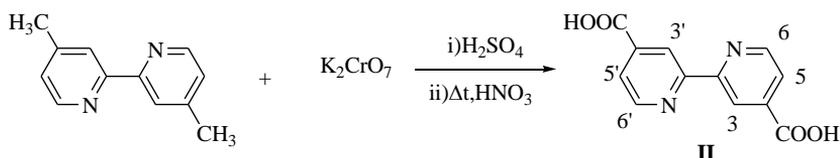


Schema III.13. Sintesi dei leganti 2,2' biperidinici

III.3.1.1 Sintesi e caratterizzazione del legante biperidinico L⁶

Il legante L⁶ è stato preparato in tre step, seguendo il metodo riportato in letteratura.¹⁶⁵

Il primo step di questa sintesi è una reazione di ossidazione che permette di trasformare la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina nel corrispondente acido 4,4'-dicarbossilico-2,2'-bipiridina (II), tramite l'utilizzo di un agente ossidante, quale il bicromato di potassio, in acido solforico. Per allontanare eventuali prodotti secondari di reazione, il composto ottenuto è stato purificato mediante riflusso in acido nitrico.



Schema III.14

In questo modo si ottiene un solido di colore bianco con una resa del 92%.

Per garantire l'avvenuta reazione il composto è stato caratterizzato tramite spettroscopie IR, ¹H-NMR ed analisi elementare.

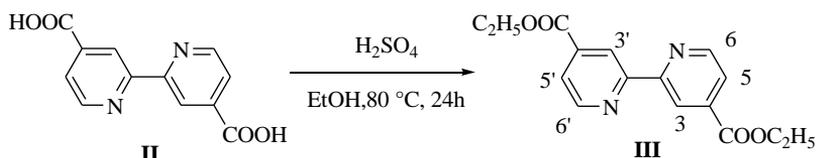
Un'accurata analisi dello spettro IR del prodotto conferma la formazione del composto desiderato grazie alla presenza del tipico segnale dello stretching ossidrilico a circa 3100 cm^{-1} e quello del gruppo carbonilico a circa 1730 cm^{-1} , mentre non si osserva la presenza degli stretching del gruppo metilico che, invece, caratterizzano lo spettro del precursore.

¹⁶⁵ G. Will, G. Boschloo, S. Nagaraja, D. Fitzmaurice, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 8067.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ si nota l'assenza del segnale relativo al gruppo metilico mentre è presente un singoletto a 13.77 ppm attribuibile ai due protoni dei gruppi carbossilici.

Un'ulteriore prova dell'avvenuta reazione viene fornita dai dati ottenuti mediante analisi elementare, la quale conferma la stechiometria proposta per il composto desiderato.

Nel secondo stadio il composto **II** è stato convertito mediante una reazione di esterificazione di Fischer nel corrispondente composto estereo (**III**), ad 80 °C in presenza di acido solforico, in etanolo. Il prodotto **III** è un solido di colore bianco ottenuto con resa del 91%.



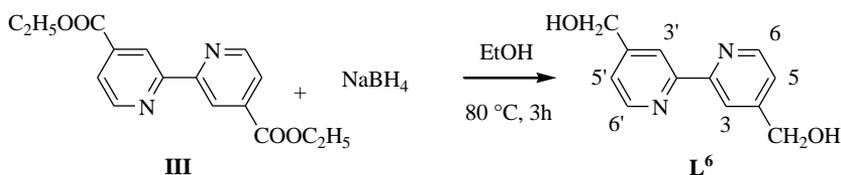
Schema III.15

Anche in questo caso il composto è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$ ed analisi elementare.

Lo spettro IR non mostra il caratteristico segnale dello stretching ossidrilico del precursore, mentre sono presenti gli stretching alifatici nella regione tra $2990\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$. Inoltre si nota lo spostamento, rispetto al composto **II**, dello stretching ($\text{C}=\text{O}$) da 1732 a 1726 cm^{-1} .

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$, oltre ai segnali dei protoni aromatici, si nota la presenza di un tripletto dovuto ai gruppi metilici e di un quadrupletto dovuto ai gruppi metilenici che confermano la formazione dell'estere. L'analisi elementare conferma la stechiometria proposta per il composto desiderato.

Il prodotto **III** così ottenuto è stato dunque trasformato, nel terzo stadio di reazione, nel corrispondente dialcol, mediante una reazione di riduzione con NaBH_4 , in presenza di etanolo, ottenendo il legante **L⁶**, un solido bianco, con resa del 95%. Il legante **L⁶** è solubile negli alcoli, in acetone, in DMSO ed in acqua.



Schema III.16

La formazione del composto desiderato viene garantita dai dati forniti da caratterizzazioni IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Dallo spettro IR si nota l'assenza degli stretching carbonilici e la presenza di quelli ossidrilici a 3400 cm^{-1} che indicano l'avvenuta reazione.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 si nota lo spostamento dei segnali caratteristici dei protoni aromatici a campi più alti, in particolare i protoni $\text{H}^{6,6'}$ e $\text{H}^{3,3'}$ si spostano di circa 0.6 ppm, mentre $\text{H}^{5,5'}$ di circa 0.3 ppm, rispetto al composto precursore **III**. Inoltre la presenza del gruppo ossidrilico a 5.53 ppm conferma l'avvenuta reazione.

I dati forniti dall'analisi elementare confermano la stechiometria proposta per il composto desiderato.

La caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis del legante **L⁶** è stata effettuata preparando una soluzione in DMSO del legante ad una concentrazione di $5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$. Lo spettro di assorbimento riportato (Figura III.23) mostra un massimo centrato a 285 nm e delle spalle a circa 275 nm e a 296 nm ed è diverso da quello dei precursori.

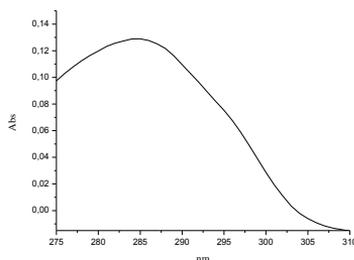
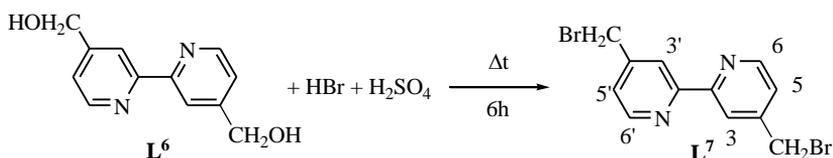


Fig.III.23. Spettro di assorbimento del legante L^6 in DMSO

Il legante non mostra proprietà emissive.

III.3.1.2 Sintesi e caratterizzazione del legante biperidinico L^7

La sintesi del legante L^7 ha come precursore il legante L^6 , che viene infatti sciolto in una miscela di acido bromidrico e acido solforico (in rapporto 3:1) a riflusso. Si ottiene una soluzione gialla che viene successivamente trattata con una soluzione satura di NaOH, con la risultante formazione di una sospensione rosa. Il prodotto finale (L^7) è un solido rosa ottenuto con una resa del 78%. Il legante è solubile nei clorurati, in acetone e DMSO.



Schema III.17

Il prodotto è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Lo spettro IR conferma l'avvenuta reazione evidenziando l'assenza degli stretching ossidrilici a 3400 cm^{-1} , originariamente presenti nello spettro IR del precursore **L**⁶.

Anche lo spettro ¹H-NMR in CDCl₃ conferma la formazione del composto desiderato evidenziando uno spostamento, rispetto al legante **L**⁶, dei picchi protonici H^{6,6'} di 0.30 ppm, H^{3,3'} di 1.08 ppm e H^{5,5'} di 1.22 ppm, mentre per il gruppo -CH₂ si osserva uno spostamento pari a 0.14 ppm. Inoltre nello spettro ¹H-NMR non si osserva il picco relativo ai protoni del gruppo -OH, presente invece nel legante di partenza.

Un'ulteriore prova dell'avvenuta reazione viene fornita dai dati ottenuti mediante analisi elementare che confermano la stechiometria proposta per il composto desiderato.

La caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis del legante **L**⁷ è stata effettuata preparando una soluzione in metanolo del legante ad una concentrazione di $3 \cdot 10^{-5}$ M. Lo spettro di assorbimento (Figura III.24) mostra un massimo centrato a 287 nm e delle spalle a circa 242 nm e 250 nm.

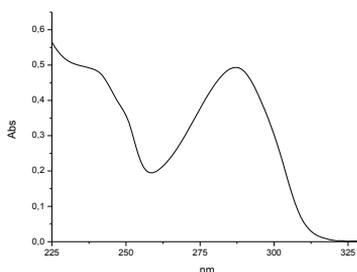
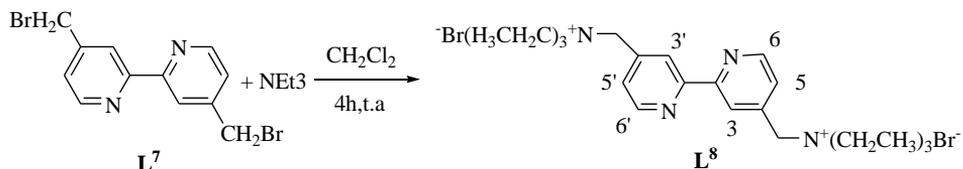


Fig. III.24. Spettro di assorbimento del legante **L⁷ in metanolo**

Il legante non mostra proprietà emissive.

III.3.1.3 Sintesi e caratterizzazione del legante biperidinico L^8

La sintesi del legante L^8 ha come precursore il legante L^7 : ad una soluzione rosa del legante L^7 viene aggiunto un eccesso di trietilammina. La soluzione risultante viene lasciata sotto agitazione magnetica per circa 5 ore. Si ottiene un precipitato rosa tenue con una resa del 97%. Il legante L^8 risulta essere solubile negli alcoli, in DMSO ed in acqua.



L'avvenuta reazione è stata confermata dai dati ottenuti mediante analisi IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Lo spettro IR conferma la formazione del composto desiderato evidenziando la presenza degli stretching relativi ai legami (C-H alifatici) a 2900 cm^{-1} , originariamente assenti nello spettro IR del legante precursore L^7 .

L'analisi $^1\text{H-NMR}$ in D_2O fornisce la medesima conferma mostrando un singoletto a 4.5 ppm relativo ai protoni del gruppo $-\text{CH}_2\text{N}$, un multipletto relativo ai protoni del gruppo $-\text{NCH}_2$ e un tripletto, a 1.4 ppm, relativo ai protoni del gruppo $-\text{CH}_3$.

Anche i dati forniti dall'analisi elementare assicurano l'avvenuta reazione confermando la stechiometria proposta per il composto desiderato.

La caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis del legante L^8 è stata effettuata preparando una soluzione in acqua ad una

concentrazione di $2 \cdot 10^{-5}$ M. Dallo spettro di assorbimento (Figura III.25) si notano due massimi di assorbimento a 287 nm ed a 237 nm.

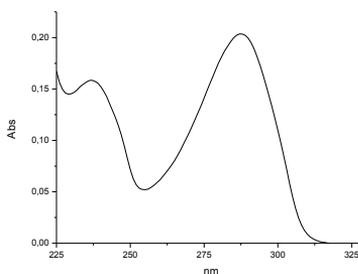


Fig. III.25. Spettro di assorbimento del legante L⁸ in acqua

Lo spettro di assorbimento risulta essere molto simile a quello degli altri due leganti utilizzati L⁶ ed L⁷, anche se l'introduzione delle catene alifatiche ha fatto sì che, a differenza degli altri due leganti, in seguito ad eccitazione a 295 nm, si può registrare uno spettro di emissione (Figura III.26) che evidenzia una banda centrata a 336 nm.

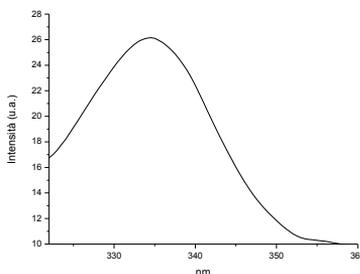
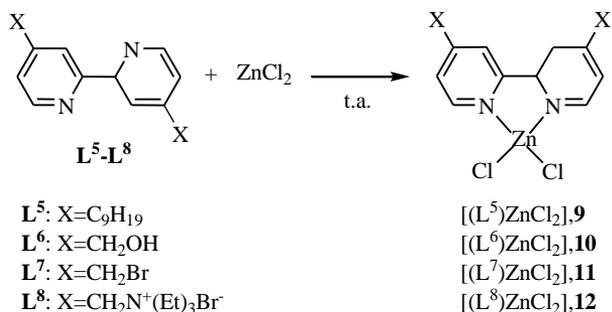


Fig.III.26 Spettro di emissione del legante L⁸ in acqua

III.3.2 Sintesi e caratterizzazione dei complessi [(Lⁿ)ZnCl₂], 9-12

La procedura sperimentale che ha portato alla sintesi dei complessi curcuminici prevede in tutti e tre i casi l'iniziale sintesi di complessi

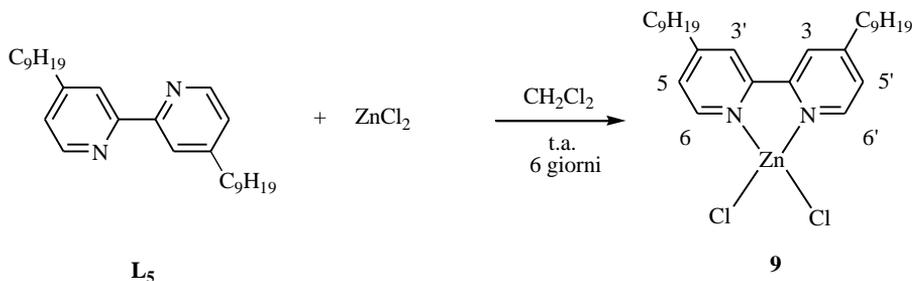
precursori $[(L^n)ZnCl_2]$, dove lo ione zinco risulta legato ad un legante bipyridinico ed a due atomi di cloro.



Schema III.19 Schema generale di sintesi dei complessi precursori $[(L^n)ZnCl_2]$, 9-12

III.3.2.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **9**

Il complesso **9** è stato ottenuto aggiungendo un leggero eccesso di cloruro di zinco ad una soluzione del legante 4,4'-dionil-2,2'-bipyridina **L₅** in diclorometano (Schema III.20).



Schema III.20

Dalla soluzione risultante, che è stata sotto agitazione magnetica per 6 giorni a temperatura ambiente, è stato isolato e purificato il prodotto, un solido cristallino bianco, con una resa del 78%. Il complesso risulta essere solubile nei clorurati, in acetone ed in DMSO.

Il complesso precursore **9** è stato caratterizzato attraverso spettroscopie IR, 1H NMR, UV-vis, ed analisi elementare.

Lo spettro IR del composto mostra i segnali caratteristici degli stretching alifatici tra 2900 e 2800 cm^{-1} e si osserva il fondamentale spostamento delle bande relative allo stretching (C=C) del sistema bipyridinico da 1596 cm^{-1} a 1617 cm^{-1} che indicano la coordinazione del legante al metallo.

L'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 rivela lo spostamento ($\Delta\delta = 0.9$ ppm) dei segnali protonici aromatici a campi più bassi, cioè risultano essere più deschermati per effetto della coordinazione della bipyridina al metallo.

I risultati ottenuti dall'analisi elementare rappresentano un ulteriore dato che conferma la formazione del complesso desiderato.

La caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis del complesso **9** è stata effettuata preparando una soluzione in etanolo del complesso ad una concentrazione di $1 \cdot 10^{-5}$ M. Lo spettro di assorbimento del complesso **9** riportato in figura III.27B mostra due spalle a 249 nm e 261 nm e due massimi di assorbimento a 294 nm e 305 nm, spostati verso il rosso rispetto al legante libero e questo è una conferma dell'avvenuta coordinazione del metallo al legante **L⁵**, che invece mostra due spalle a 242 nm e 249 nm ed un massimo a 283 nm (Figura III.27A).

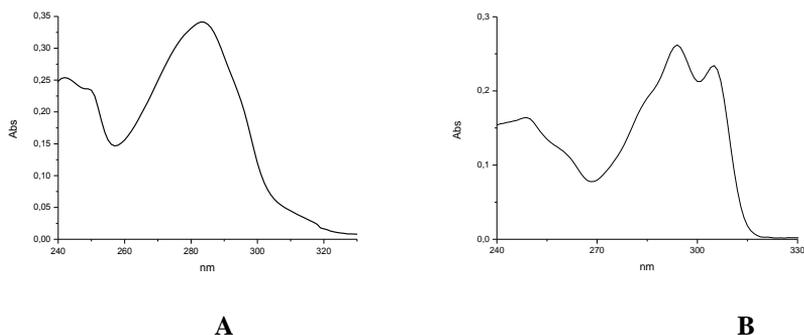


Fig. III.27. Spettri di assorbimento del legante **L⁵ (A) e del complesso precursore **9** (B) in etanolo**

E' stato registrato, anche, lo spettro di emissione del complesso precursore **9** (Figura III.28), che dopo eccitazione a 294 nm mostra una banda centrata a 328 nm e questo è un' ulteriore conferma della formazione del complesso in quanto il legante **L⁵** non mostra proprietà emissive.

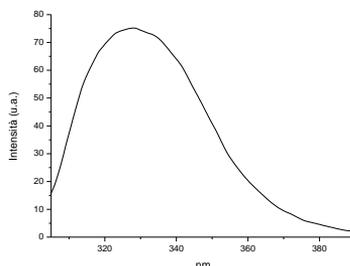
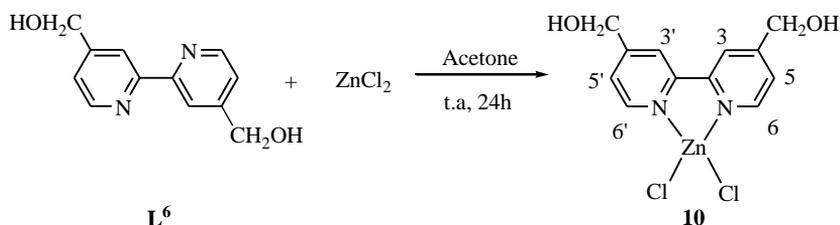


Fig. III.28. Spettro di emissione del complesso precursore 9 in etanolo

E' stata anche misurata la resa quantica di emissione utilizzando come standard la 2-amminopiridina ed il valore calcolato è del 6%.

III.3.2.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **10**

Il complesso **10** è stato sintetizzato aggiungendo un eccesso di cloruro di zinco ad una soluzione del legante **L⁶** in acetone. Dalla sospensione risultante, che è stata mantenuta sotto agitazione per 24 h, è stato isolato e purificato un solido di colore bianco con una resa dell' 88%. Il complesso risulta solubile in DMSO ed in acqua.



Schema III.21

Il complesso **10** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Nello spettro IR si può notare il tipico segnale ossidrilico a 3483 cm^{-1} ed il fondamentale spostamento, rispetto al legante libero **L⁶**, dello stretching relativo ai legami (C=C) da 1602 a 1619 cm^{-1} , che conferma l'avvenuta coordinazione del metallo.

L'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 rivela lo spostamento ($\Delta\delta = 0.14\text{ ppm}$) dei protoni aromatici $\text{H}^{6,6'}$ e $\text{H}^{3,3'}$ ($\Delta\delta = 0.23\text{ ppm}$) verso campi più alti rispetto al legante libero **L⁶**, confermando l'avvenuta formazione del complesso **10**.

Infine, i risultati dell'analisi elementare rappresentano un ulteriore dato che conferma la formazione del complesso desiderato.

Per la caratterizzazione fotofisica del complesso **10** è stata utilizzata una soluzione del complesso in acqua con concentrazione di $3 \cdot 10^{-5}\text{ M}$. Dallo spettro di assorbimento (Figura III.29) si notano due spalle a 246 nm e 283 nm e due massimi di assorbimento a 294 nm e 304 nm , spostati verso il rosso rispetto al legante libero e questo è una conferma dell'avvenuta coordinazione del metallo al legante **L⁶**.

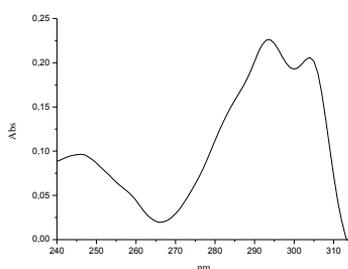


Fig. III.29. Spettro di assorbimento del complesso precursore **10** in acqua

In seguito ad eccitazione a 284 nm è stato registrato lo spettro di emissione (Figura III.30) che evidenzia una banda centrata a 325 nm , confermando la formazione del complesso precursore **10**. Infatti è la

presenza dello stesso Zn(II) che induce le proprietà emissive a differenza del legante di partenza che non emette.

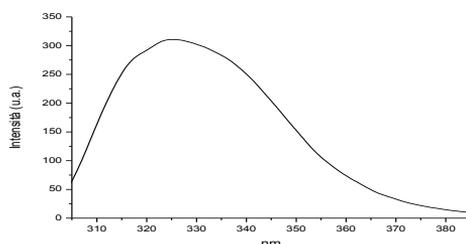
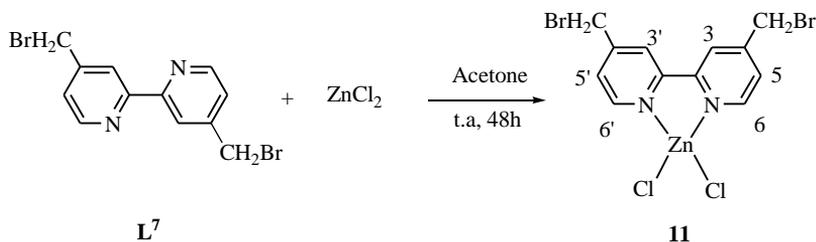


Fig.III.30. Spettro di emissione del complesso precursore **10** in acqua

E' stata anche misurata la resa quantica di emissione del complesso precursore **10** utilizzando come standard la 2-amminopiridina ed il valore calcolato è pari al 43%, che risulta essere molto elevato e quindi molto interessante da un punto di vista fotofisico.

III.3.2.3 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **11**

Il complesso **11** è stato sintetizzato attraverso l'aggiunta di un eccesso di cloruro di zinco ad una soluzione del legante **L⁷** in acetone. La sospensione risultante è stata mantenuta sotto agitazione magnetica per 48 h. Il precipitato ottenuto viene poi filtrato, ottenendo un solido bianco con una resa del 84%. Il complesso è solubile in acetone, DMSO ed acqua.



Schema III.23

Il complesso **11** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

L'analisi dello spettro IR conferma la formazione del composto mediante la presenza dello stretching a 2967 cm^{-1} dei legami (C-H) alifatici ed il fondamentale spostamento, rispetto al legante libero **L**⁷, dello stretching relativo ai legami (C=C) da 1593 cm^{-1} a 1611 cm^{-1} , che conferma l'avvenuta coordinazione del metallo.

Anche lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO- d_6 conferma la formazione del composto desiderato evidenziando uno spostamento, rispetto al legante **L**⁷, dei picchi protonici $\text{H}^{6,6'}$ di 0.04 ppm, $\text{H}^{3,3'}$ di 0.19 ppm e $\text{H}^{5,5'}$ di 0.26 ppm, mentre per il gruppo $-\text{CH}_2$ si osserva uno spostamento pari a 0.36 ppm.

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta reazione è l'analisi elementare che conferma la stechiometria del composto desiderato.

Per la caratterizzazione fotofisica del complesso **11** è stata preparata una soluzione $1.97 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ in metanolo. Dallo spettro di assorbimento (Figura III.31) si osservano delle spalle a 250 nm e 311 nm ed un massimo di assorbimento a 300 nm, spostati verso il rosso rispetto al legante libero e questo è una conferma della coordinazione del metallo al legante **L**⁷.

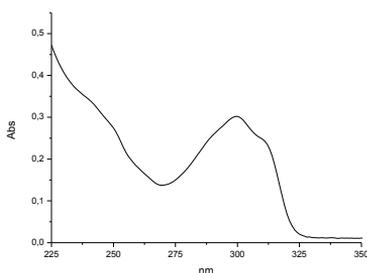


Fig. III.31. Spettro di assorbimento del complesso precursore 11 in metanolo

In seguito ad eccitazione a 285 nm è stato registrato lo spettro di emissione (Figura III.32) che evidenzia una banda centrata a 326 nm, che conferma la formazione del complesso in quanto il legante **L**⁷ non mostra proprietà emissive. Inoltre è stata calcolata la resa quantica di emissione utilizzando come standard la 2-amminopiridina ed il valore calcolato è del 1,5%.

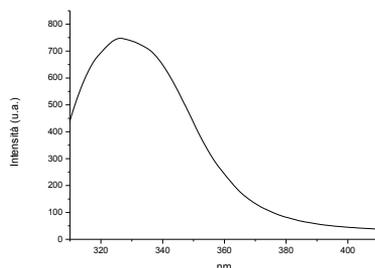
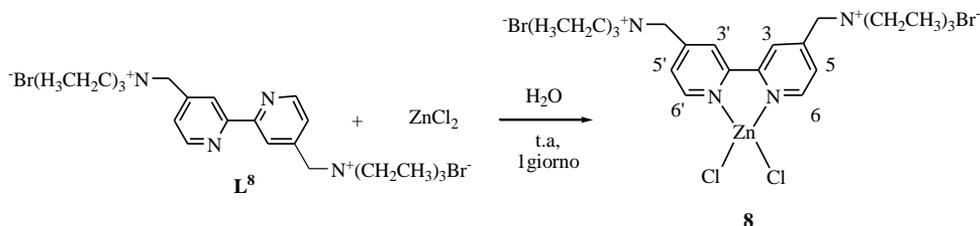


Fig. III.32. Spettro di emissione del complesso precursore **11** in metanolo

III.3.2.4 Sintesi e caratterizzazione del complesso precursore **12**

Il complesso **12** è stato sintetizzato attraverso l'aggiunta di un leggero eccesso di cloruro di zinco ad una soluzione del legante **L**⁸ in acqua. La sospensione risultante è stata mantenuta sotto agitazione magnetica per 1 giorno a temperatura ambiente. Il precipitato viene prima filtrato e poi lavato con etanolo, ottenendo un solido bianco con una resa del 77%. Il complesso risulta essere solubile in DMSO ed acqua.



Schema III.23

Anche in questo caso il complesso **12** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Lo spettro IR conferma l'avvenuta reazione evidenziando la presenza degli stretching relativi ai legami (C-H alifatici) da 2991 a 2978 cm^{-1} ed il fondamentale spostamento, rispetto al legante libero **L⁸**, degli stretching relativi ai legami (C=C) da 1594 a 1618 cm^{-1} .

L'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O rivela lo spostamento, rispetto al legante di partenza **L⁸**, ($\Delta\delta = 0.50$ ppm) dei protoni aromatici $\text{H}^{3,3'}$ e ($\Delta\delta = 0.36$ ppm) dei protoni aromatici $\text{H}^{5,5'}$, confermando l'avvenuta formazione del complesso precursore.

La formazione del complesso viene ulteriormente confermata dai dati forniti dall'analisi elementare, che rispettano la stechiometria del composto desiderato.

Per la caratterizzazione fotofisica del complesso **12** è stata preparata una soluzione $1,4 \cdot 10^{-5}$ M in acqua. Dallo spettro di assorbimento (Figura III.33) si notano dei massimi di assorbimento centrati a 237 nm e 288 nm.

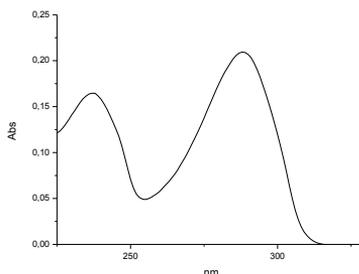


Fig.III.33. Spettro di assorbimento del complesso precursore 12 in acqua

In seguito ad eccitazione a 295 nm è stato registrato lo spettro di emissione (Figura III.34) che evidenzia una banda centrata a 335 nm.

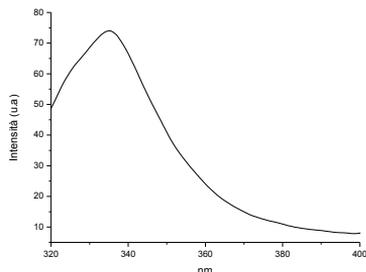
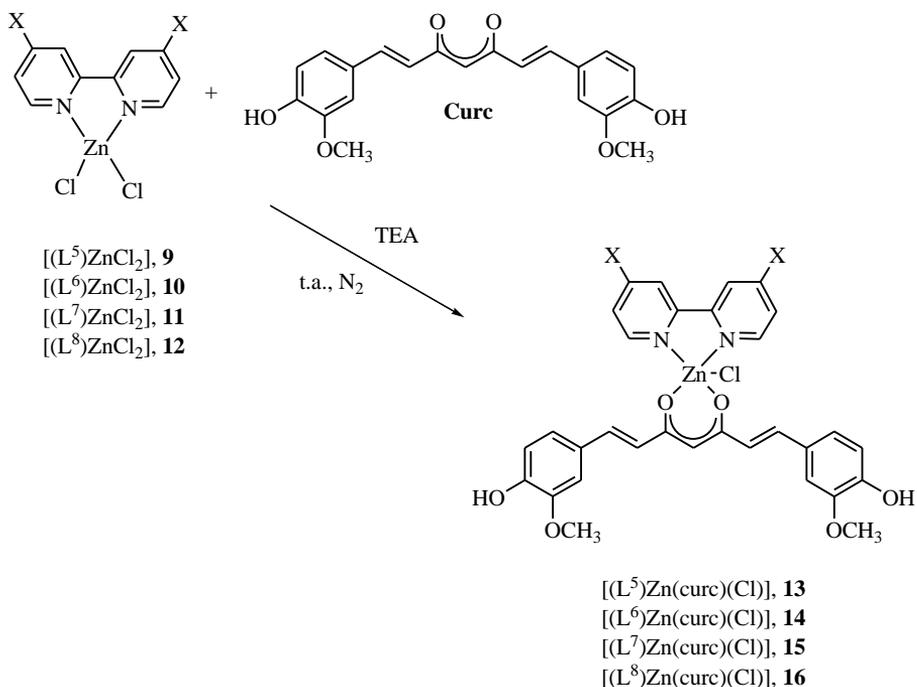


Fig. III.34 Spettro di emissione del complesso precursore 12 in acqua

Anche in questo caso è stata calcolata la resa quantica di emissione utilizzando come standard la 2-amminopiridina ed il valore calcolato è del 0.2%, che risulta essere inferiore a quella del legante libero **L**⁸.

III.3.3 Sintesi e caratterizzazione dei complessi curcuminici di Zn(II) [(Lⁿ)Zn(curc)Cl], 13-16

I complessi precursori ottenuti sono stati utilizzati per la sintesi dei complessi curcuminici finali [(Lⁿ)Zn(curc)Cl], **13-16**, attraverso una reazione con la curcumina in rapporto equimolare. Nel processo sintetico viene sempre utilizzata la trietilammina sempre in rapporto equimolare, in quanto è necessaria per deprotonare la curcumina e favorire la reazione di complessazione con il metallo.

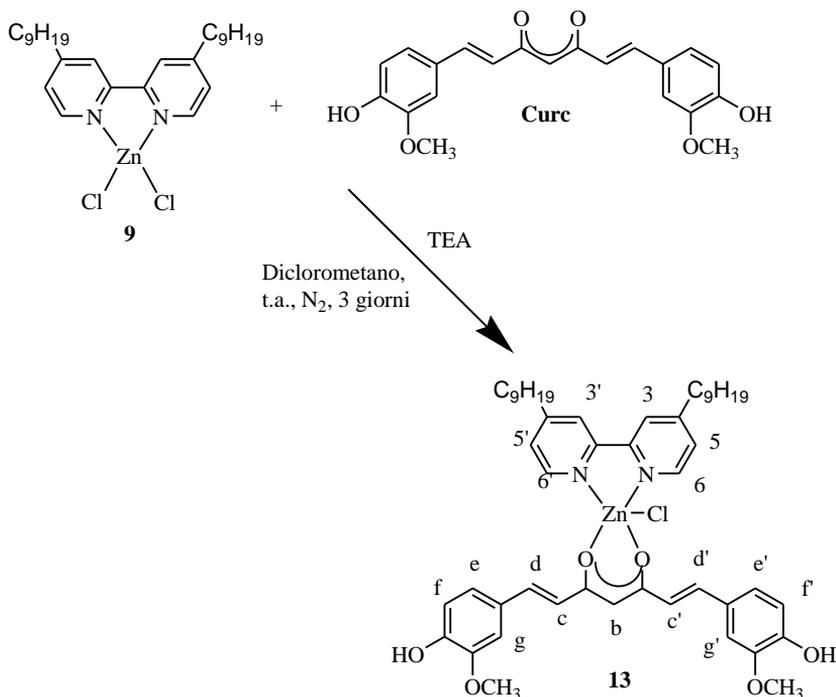


Schema III.24. Schema generale di sintesi dei complessi curcuminici 13-16

III.3.3.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso 13

Ad una soluzione in diclorometano di curcumina, sotto agitazione magnetica e sotto azoto viene addizionata la trietilammina provocando un cambiamento di colore della soluzione da arancione a un colore rosso molto intenso. Il tutto è stato lasciato sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso precursore **9** precedentemente sciolto in diclorometano. La soluzione subisce un ulteriore cambiamento di colore, assumendo un colore arancio. La soluzione è stata lasciata per tre giorni sotto agitazione magnetica e sotto azoto a temperatura ambiente. Dopo evaporazione del solvente a pressione ridotta, il rimanente residuo arancio è stato ricristallizzato da metanolo, così da ottenere un prodotto di colore giallo-verde con resa del 56%.

Il complesso **13** è solubile nei clorurati, negli alcoli, in DMSO e parzialmente in acqua.



Schema III.25

Il complesso **13** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, ¹H-NMR, UV-vis, analisi elementare e diffrazione a raggi X.

Lo spettro IR del complesso **13** mostra i segnali caratteristici degli stretching alifatici tra 2926 e 2853 cm⁻¹, in più si osserva una banda a 3418 cm⁻¹ che indica la presenza degli -OH della curcumina; si ha il fondamentale spostamento a frequenze più basse, rispetto alla curcumina, della banda relativa allo stretching (C=O) da 1625 cm⁻¹ a 1605 cm⁻¹ ed inoltre si può rilevare la presenza dello stretching a 1510 cm⁻¹ del legame (C-C-C) dell'anello chelato risultante dalla formazione del complesso.

Lo spettro ¹H-NMR in CDCl₃ rivela la presenza dei picchi protonici tipici della curcumina e lo spostamento a campi più alti del segnale relativo ai protoni aromatici del legante biperidinico ed in particolare del protone

legante curcuminoide chelato ad atomi di Ru 88.30(12) e 88.01(11) ¹⁶⁶e quelli recentemente trovati in un legante curcuminoide chelato ad uno ione di Cu in un derivato pentacoordinato di fenantrolina ¹⁶⁷ (tra 93.25° e 93.94°). La coordinazione allo ione zinco induce una conformazione lineare al legante curc, rendendolo più simile ai polimorfi 2 e 3 della curc in cui la molecola è lineare e planare, a differenza del polimorfo 1, per il quale si trova una conformazione curvata e leggermente distorta. ¹⁶⁸ Nella curcumina coordinata si ha un leggero twist attorno al legame O(1)-C(29), dove l'angolo di torsione di 157.6(2)° induce una deviazione dalla planarità tra i due piani principali passanti tramite gli anelli fenilici liberi di ruotare di 16.2(1)°. Analogamente al polimorfo 1 che è il più comune polimorfo del legante curcumina, i due gruppi metossido sugli anelli fenilici a libera rotazione puntano in direzioni opposte, ed entrambi gli atomi di idrogeno dell'idrossile sono coinvolti in legami a ponte d'idrogeno intramolecolari O-H---O con gli atomi O(4) e O(6) rispettivamente. Le molecole adiacenti sono connesse tramite legami a ponte d'idrogeno O-H---O con l'associazione complementare dei gruppi idrossile e metossi di uno degli anelli fenilici a libera rotazione, formando un macrociclo del tipo R²₂(10) (Figura III.35). Questo tipo di associazione è completamente assente nel polimorfo più stabile del legante curcumina dove le connessioni tramite legami a ponte d'idrogeno sono prevalentemente collegate alla presenza del frammento cheto-enolico.

^[166] F.Kuhlwein and W.Beck, *Z anorg. allg. Chem*, **1997**, 623, 1211-1219

^[167] N. Alida-Alcade, P.Marghès-Gallego, M.KraaijKamp, C.Herranz-Lancho, H. den Dulk, H.Gorner, O.Roubeau, S.J. Teat, T.Weyhermuller and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 955.

^[168] P. Sanphui, N.R. Goud, U.B. Rao Khandavilli, S.Bhanothb and A. Nangia, *Chem. Commun*, **2011**, 47, 5013.

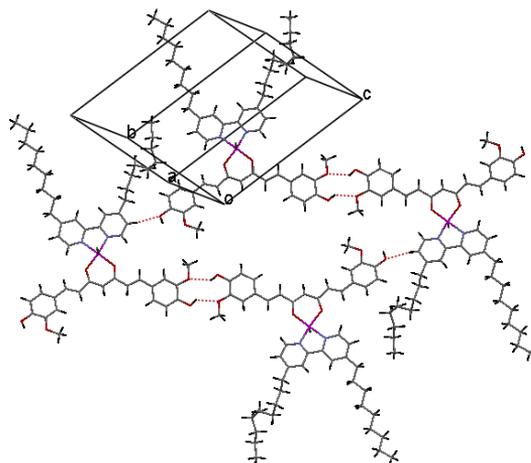


Fig. III.35. Rappresentazione grafica di legami a ponte d'idrogeno con la formazione dei relativi macrocicli

Dal lato opposto di una delle curcumine coordinate le interazioni C-H---O tra il gruppo metossi e la bipyridina di una molecola vicina inducono l'associazione di quattro molecole in un macrociclo planare a legami idrogeno del tipo $R^4_4(62)$ (Figura III.35). Soltanto i leganti cloruro e la catene alifatiche distorte si trovano fuori da questi piani.

Inoltre, sono stati effettuati gli studi utilizzando l' AFM (microscopia a forza atomica) per indagare sulla morfologia del complesso **13** in nanoscala e testare l' effetto di differenti substrati e solventi sulla forma e l' aggregazione della molecola stessa. L' energia di superficie di differenti substrati influenza fortemente la deposizione dello strato monomolecolare del complesso. Quando il complesso **13**, dopo essere stato sciolto in cloroformio, è stato depositato su mica tramite tecnica Langmuir-Blodgett (LB) si ottiene una copertura uniforme del substrato come si può vedere dalla figura III.36.

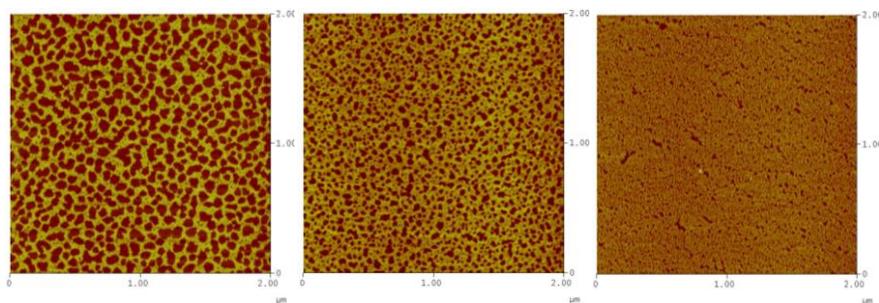


Fig. III.36. Deposizione su mica tramite LB del complesso 13, sciolto in cloroformio, a differenti pressioni 5mN/m (sinistra), 12mN/m (centro) and 18 mN/m (destra)

Quindi, da queste misure effettuate con l' AFM è stata confermata la formazione di uno strato monomolecolare che presenta un' altezza di circa 1,2 nm, concludendo che sono in accordo.

Sono state effettuate, inoltre, deposizioni tramite spin-coating utilizzando come substrato sia la mica (Figura III.37) che il silicio. Le molecole sono state, anche in questo caso, sciolte in cloroformio, oltre che in etanolo ed acqua (solventi biocompatibili).

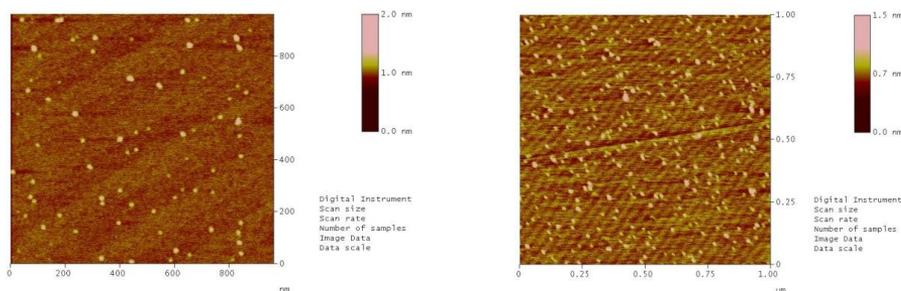


Fig. III.37. Deposizione su mica tramite spin-coating del complesso 13 sciolto in cloroformio (sinistra) ed acqua (destra)

Dalle deposizioni, in cloroformio ed acqua, su mica è stato possibile osservare la formazione di piccoli aggregati molecolari e misurando la loro altezza possiamo comparare i dati ottenuti con quelli della diffrazione cristallografica, infatti i dati sull' altezza di questi aggregati molecolari

ottenuti dalle misure AFM sono in accordo con i dati dei raggi X a cristallo singolo.

Quando, invece, la soluzione in etanolo del complesso **13** viene depositata sempre su mica tramite spin-coating (Figura III.38), anche se la solubilità molecolare del complesso in etanolo è più alta rispetto agli altri solventi, sono visibili chiaramente larghi aggregati che presentano un' altezza media di circa 300 nm e quindi si può affermare che l' etanolo non è un buon solvente per la deposizione di questo complesso.

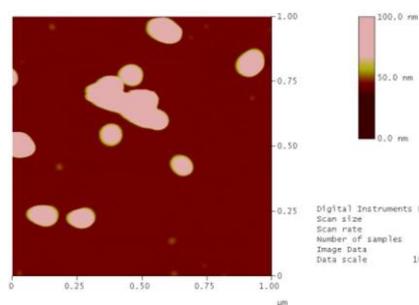
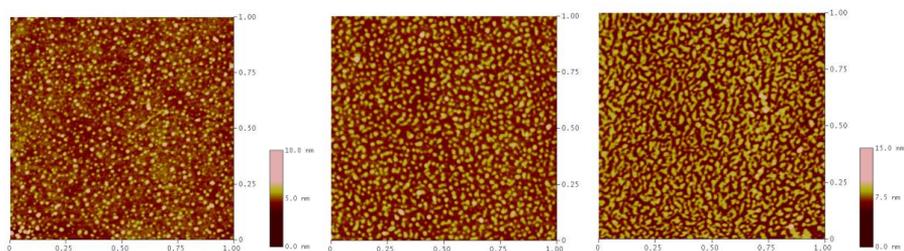


Fig. III.38. Deposizione su mica tramite spin-coating del complesso 13 sciolto in etanolo

Inoltre, la stessa problematica si presenta quando viene utilizzata la tecnica di Langmuir Schaefer (LS) o quella di spin-coating utilizzando come substrato il silicio (Figura III.46), quindi si può affermare che quest' ultimo non è un buon substrato per la deposizione.

a)



b)



Fig. III.39. A) Deposizione su silicio tramite LS del complesso 13 a differenti pressioni 5mN/m (sinistra), 12mN/m (centro) and 18 mN/m (destra). B) Deposizione su silicio tramite spin-coating del complesso 13, sciolto in cloroformio (sinistra) ed etanolo (destra)

Da tutto ciò si può constatare che le immagini del complesso **13** nelle quali è presente come substrato la mica sono buone ed i solventi che possono essere utilizzati sono sia il cloroformio che l'acqua. La possibilità, quindi, di poter utilizzare l'acqua come solvente ci permette di effettuare studi sul DNA utilizzando la microscopia AFM, infatti si stanno effettuando tali studi ed i risultati preliminari indicano una possibile intercalazione nel DNA. Questi dati preliminari studiati con l'AFM sembrano molto promettenti e quindi si cercherà di approfondirli nei lavori futuri.

Infine, la caratterizzazione fotofisica mediante spettroscopia UV-vis del complesso **13** è stata effettuata preparando una soluzione in etanolo con una concentrazione pari a $1.4 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ed è stata anche determinata la resa quantica di luminescenza. Lo spettro di assorbimento del complesso **13** riportato in figura III.40 mostra delle spalle a 261 nm, 294 nm, 305 nm e due massimi di assorbimento a 425 nm e 446 nm. Osservando tale spettro il massimo di assorbimento risulta essere spostato nel rosso rispetto al legante **L⁵** ed al complesso precursore **9**. Lo spostamento è dovuto alla presenza del legante curcumina, che mostra un massimo di assorbimento a 435 nm (Figura III.6A), confermando la formazione del complesso.

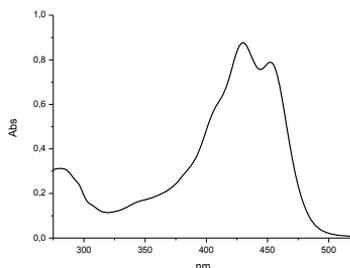


Fig. III.40. Spettro di assorbimento del complesso 13 in etanolo

È stato anche registrato lo spettro di emissione eccitando a 470 nm (Figura III.41). In tale spettro è evidente una banda di emissione nella regione giallo-verde e centrata a 543 nm, analogamente a quanto osservato per il legante curcumina (Figura III.6B), che si origina per la presenza dello stesso legante nel complesso sintetizzato.

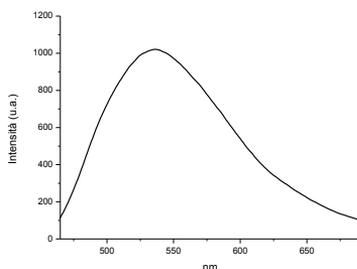


Fig. III.41 Spettro di emissione del complesso 13 in etanolo

E' dunque evidente come le caratteristiche fotofisiche del complesso **13** differiscano da quelle della biperidina di partenza che non mostra proprietà emissive e del complesso precursore **9** che invece emette a 328 nm. Infine, è stata misurata la resa quantica di emissione per il complesso **13** utilizzando come standard $\text{Ru}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$ ($\text{bipy} = 2,2'$ -biperidina) ed il valore calcolato è pari al 20.4%, quindi la formazione del complesso di $\text{Zn}(\text{II})$ migliora le caratteristiche emissive della curcumina libera (5%).

Vista l'elevata solubilità del complesso **13** in etanolo, solvente biologicamente compatibile, è stato possibile eseguire i test di citotossicità *in vitro*. Prima di eseguire lo screening citotossico, è stata verificata la stabilità del complesso in ambiente acquoso. E' stata preparata una soluzione del complesso **13** in etanolo alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in seguito diluita con una soluzione acquosa tamponata con un tampone fosfato (pH 7.4) con una concentrazione finale dell'ordine di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in cui la concentrazione dell'etanolo non risulta essere superiore al 5% (v/v). La verifica della stabilità è stata effettuata attraverso spettroscopia UV-vis, come mostrato nelle curve di assorbimento del complesso **13** in soluzione acquosa tamponata registrate dopo 24 e 48 ore (Figura III.42).

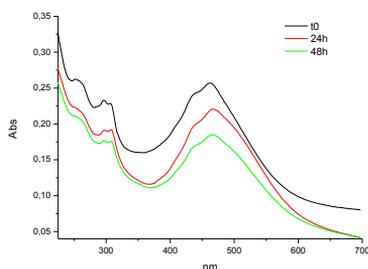


Fig. III.42. Spettri di assorbimento del complesso 13 a pH 7.4

Come si osserva dalle curve registrate nel tempo, nello spettro di assorbimento del complesso **13**, già dopo 24 ore, si può notare una lieve diminuzione dei valori di assorbanza dovuti al fatto che in parte il complesso precipita in soluzione acquosa. Comunque, il complesso **13** dimostra di essere stabile e di non subire i processi di degradazione caratteristici del legante curcumina (Figura III.8A).

III.3.3.1.1 Caratterizzazione biologica del complesso 13

E' stata testata *in vitro* l' attività antiproliferativa del complesso **13** e di tutti i suoi precursori come il legante **L⁵**, la curcumina ed il complesso precursore **9** nei confronti di tre differenti linee cellulari prostatiche umane DU145, LNCaP e PC-3. Le tre linee cellulari prostatiche tumorali differiscono tra di loro in quanto la linea DU145 è ormone-resistente, ha una moderata attività metastatica e non esprime il PSA (antigene prostatico specifico) mentre le linee LNCaP e PC-3 sono ormone-sensibili ed esprimono entrambe il PSA. L'unica differenza è che la linea LNCaP ha una bassa attività metastatica mentre la linea PC-3 ha un'alta attività metastatica.

E' stato utilizzato l' MTS come test colorimetrico per calcolare l' IC₅₀ per ogni composto analizzato (Tabella III.1).

Composto	IC ₅₀ (μM) ± SD DU145	IC ₅₀ (μM) ± SD Pc3	IC ₅₀ (μM) ± SD LNCaP
Curc	2.3±0.7	2.0±2.2	7.8±1.5
L⁵	> 100	> 100	> 100
9	32.3±2.5	28.3±2.2	45.3±2.1
13	12.5±2.6	21.5±8	34±1.3

Tab. III.1. Valori di IC₅₀ di leganti e complessi di Zn(II) nei confronti di linee cellulari prostatiche umane

Mentre la curcumina pura induce il 50% di citotossicità a dosi più basse di 10 μM, il legante bipyridinico libero non esibisce significativi effetti citotossici. In particolare, il trattamento delle linee cellulari prostatiche con **L⁵** non mostra alcuna tossicità nel range di dosaggio che va da 1 a 50 μM, infatti risulta essere tossico ad una concentrazione più alta di 100 μM con solo il 45% di inibizione della proliferazione cellulare.

Sorprendentemente, dopo la coordinazione allo ione metallico, il complesso precursore **9** mostra una marcata attività citotossica. Comunque, l'introduzione della curcumina nel complesso di Zn(II) determina un notevole aumento della citotossicità del complesso **13**. Infatti è attivo ed inibisce la proliferazione delle cellule cancerose in un basso range di dosaggio che va da 12 a 34 μM . In particolare, il complesso **13** mostra una marcata attività inibente della proliferazione cellulare specificatamente nei confronti della linea cellulare DU145 con un valore di IC_{50} pari a 12.5 μM .

Comunque, la selettività di un farmaco è di importanza fondamentale per il suo successo per uso clinico, quindi ulteriori esperimenti sono stati condotti su altre linee cellulari umane ed in particolare sono state prese in considerazione le linee cellulari di neuroblastomi SHSY-5Y e LAN-5 (Tabella III.2).

Composto	IC_{50} (μM) \pm SD SHSY-5Y	IC_{50} (μM) \pm SD LAN-5
Curc	13.6 \pm 5.6	24 \pm 2.2
L⁵	> 100	> 80
9	19.1 \pm 3	36 \pm 2.2
13	16 \pm 8.1	13.2 \pm 9

Tab. III.2. Valori di IC_{50} dei leganti e dei complessi di Zn(II) nei confronti di linee cellulari di neuroblastoma

Come mostrato in tabella III.2, il legante libero non esibisce un significativo effetto citotossico per SHSY-5Y, mentre nei confronti della linea cellulare LAN-5 mostra un IC_{50} pari a circa 80 μM . Al contrario, la curcumina ed il complesso **13** induce il 50% di citotossicità a dosaggi compresi tra 13 e 24 μM . Il complesso **13** mostra una forte inibizione della crescita dose-dipendente su entrambe i neuroblastomi (SHSY-5Y e LAN-5) con valori di IC_{50} comparabili tra le due linee cellulari. In

particolare, il complesso **13** è più efficace nei confronti della linea cellulare LAN-5 con un valore di IC_{50} pari a 13.2 μ M, inferiore rispetto a quello della stessa curcumina.

III.3.3.1.2 Caratterizzazione spettroscopica dell'interazione del complesso 13 con l'HSA

Tra tutti i biopolimeri, le proteine, grazie alla loro fluorescenza intrinseca, possono essere utilizzate per effettuare studi di interazione. Infatti, validata l'attività citotossica del complesso **13** nei confronti di cellule neoplastiche e dunque, una sua potenziale applicazione come farmaco antitumorale, è stato effettuato lo studio dell'interazione dello stesso complesso con l'HSA (albumina sierica umana), mediante tecniche spettroscopiche di fluorescenza UV-vis, con l'obiettivo di giungere ad una comprensione del meccanismo di binding complesso-proteina. E' stato deciso di condurre questo studio, in quanto la farmacocinetica e la farmacodinamica di molti farmaci dipendono, ampiamente, dall'interazione che gli stessi hanno con l'albumina sierica umana, che è la più abbondante proteina presente a livello del plasma sanguigno. Lo studio è stato realizzato, monitorando il cambiamento delle proprietà fotofisiche, del complesso **13** e dell'albumina, in seguito alla loro interazione. Costituisce circa il 60% del totale delle proteine e gioca un importante ruolo nel trasporto di molti leganti endogeni ed esogeni come ormoni, acidi grassi e farmaci. E' una proteina globulare che consiste di un singolo peptide di 585 amminoacidi con 3 domini (I-III) α -elica, ognuno contenente due subdomini A e B. Le analisi cristallografiche

indicano che le principali reazioni di legame nell' albumina per i ligandi sono localizzate in due tasche idrofobiche nel subdominio IIA.¹⁶⁹

Il subdominio IIA ha un solo residuo di triptofano che determina l'intrinseca fluorescenza della proteina, quindi è per questa ragione che le modifiche della fluorescenza possono essere usate per determinare l'affinità di legame.^{170,171,172}

Da queste premesse, ma anche grazie alla fluorescenza intrinseca del complesso **13** è stato possibile indagare l'interazione tra questo complesso e l' HSA. In particolare, è stata aggiunta ad una soluzione di albumina a concentrazione nota tamponata con un tampone fosfato a pH 7.4, una quantità crescente di complesso sciolto in etanolo, senza superare il 10% di concentrazione del solvente organico e quindi evitare la denaturazione della proteina.

E' stata effettuata la fluorescenza dell' HSA alle differenti concentrazioni di tale complesso (Figura III.43), e ciò a permesso di evidenziare che la graduale addizione del complesso di Zn(II) alla soluzione contenente la proteina causa un graduale decremento nell'intensità della fluorescenza dell' HSA senza modificare la lunghezza d'onda e la forma del picco dell' emissione massima.

Tutto ciò conferma che il complesso di Zn(II) interagisce con l' HSA e quindi spegne la sua fluorescenza intrinseca.

¹⁶⁹ X. M. He, D. C. Carter, *Nature*, **1992**, 358, 209.

¹⁷⁰ M. Amiri, K. Jankeje, J. R. Albani, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **2010**, 51, 1097.

¹⁷¹ D. Zhong, A. Douhal, A. Zewail, *PNAS*, **2000**, 97, 14056.

¹⁷² S. Monti, I. Manet, F. Manoli, S. Sortino, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, 6, 462.

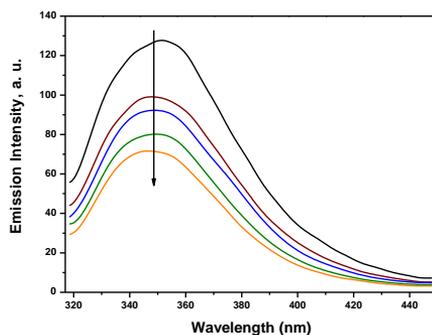


Fig. III.43. Spettro di fluorescenza dell' HSA ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) in buffer a differenti concentrazioni di complesso 13

Inoltre, l'interazione di legame tra l'HSA ed il complesso **13** è anche stata confermata dallo spettro di emissione del complesso in presenza ed assenza dell'albumina eccitando a 430 nm (Figura III.44). In assenza della proteina la luminescenza del complesso in soluzione mostra una unica banda a 627 nm. Dopo addizione della soluzione contenente le proteina, quando l'interazione tra HSA e complesso di Zn(II) si è verificata, lo spettro di luminescenza mostra sempre la banda a 627 nm, ma ne mostra una nuova a 510 nm.

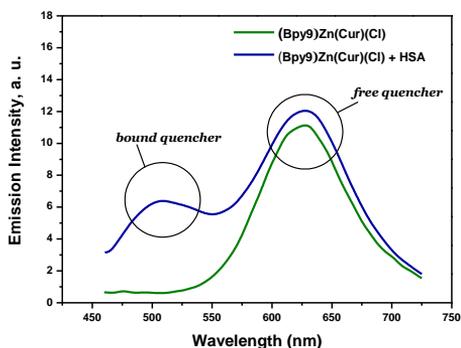


Fig. III.44. Comparazione tra lo spettro di emissione del complesso di Zn(II) ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) con o senza HSA in un mix buffer:etanolo (10:1)

La banda a più bassa energia è attribuibile al complesso libero, mentre la banda a 510 nm al complesso legato alla tasca idrofobica dell' HSA. Per

confermare ciò, lo spettro di emissione del complesso **13** è stato registrato in differenti solventi ed ha mostrato di essere solvatocromico, in particolare è stato osservato uno shift verso il rosso del suo massimo di emissione all' aumentare della polarità del solvente. Quindi, i risultati ottenuti convergono alla conclusione che il sito di legame del complesso all' albumina è localizzato in una tasca idrofobica del subdominio IIA della stessa.

III.3.3.1.3 Studio di incapsulazione nei nanotubi di carbonio del complesso 13

I nanotubi di carbonio (CNTs) hanno suscitato grande interesse soprattutto in ambito biologico e farmaceutico: infatti, adeguatamente modificati, sono utilizzati come piattaforme per il riconoscimento ultrasensibile di anticorpi, come sequenziatori di acidi nucleici, come bioseparatori, biocatalizzatori, bloccanti di canali ionici, come “*scaffolds*” per la crescita di tessuti neuronali e di legamenti per interventi rigenerativi nel sistema nervoso centrale e in siti ortopedici, come substrati per il riconoscimento ad alta specificità di anticorpi associati con le malattie autoimmuni, come carrier di agenti di contrasto per migliorare le immagini della risonanza magnetica e in sistemi per il rilascio controllato di farmaci. I CNTs sono molecole cilindriche cave costituite da atomi di carbonio ibridati sp^2 disposti in modo esagonale (distanza C-C di $\sim 1.4 \text{ \AA}$). Sono formati arrotolando uno o più strati di fogli di grafite in cilindri senza giunzioni. Si distinguono nanotubi di carbonio *single-walled* (SWNTs) e nanotubi di carbonio *multi-walled* (MWNTs) (Figura III.45). I SWNTs sono composti da un solo strato di grafite chiuso da entrambi i lati da arrangiamenti emisferici. Queste formazioni sono il

risultato dell'inclusione di strutture carboniose pentagonali ed eptagonali durante il processo di crescita. I MWNTs comprendono invece molte decine di gusci grafittici concentrici, ognuno dei quali forma un SWNT, con una separazione tra gli strati approssimativamente di 0.34 nm. Hanno, di conseguenza, un diametro esterno più grande (2.5-100 nm) rispetto ai SWNTs (0.6-2.4 nm).

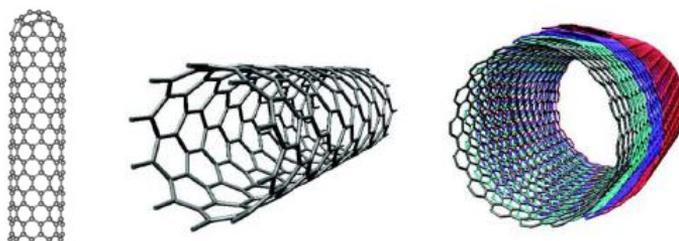


Fig. III.45

Come precedentemente riportato, i nanotubi di carbonio sono materiali innovativi utili in svariati campi di applicazione, tra cui quello biomedicale e farmaceutico è senz'altro quello in più rapida espansione.¹⁷³

Negli ultimi anni, infatti, molti gruppi di ricerca hanno dimostrato come sia SWNTs che MWNTs possono essere facilmente internalizzati da diversi tipi di cellula per poi rilasciare agenti terapeutici o diagnostici.¹⁷⁴

Tuttavia, l'esatto meccanismo di penetrazione dei CNTs all'interno delle cellule è ancora oggetto di discussione da parte della comunità scientifica. I CNTs possono fungere da veicoli per il rilascio modificato di farmaci mediante due principali meccanismi: il primo consiste nel legare covalentemente il farmaco sulla loro superficie mediante legami che

¹⁷³ X. L. Luo, C. Matrangola, S.S. Tan, N. Alba, X. Y. T. Cui, *Biomaterials*, **2011**, 32, 6316.

¹⁷⁴ L. Lacerda, S. Raffa, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Nanotoday*, **2007**, 2, 38.

possono essere scissi all'interno della cellula (es. legami esterei o ammidici) con conseguente rilascio dell'agente terapeutico; oppure possono fungere da sistemi di incapsulazione, cioè il farmaco può essere caricato all'interno della loro cavità da cui esce poi per diffusione una volta che il sistema è entrato nella cellula.¹⁷⁵

Basandoci su queste considerazioni generali, lo scopo del presente studio è stato quello di realizzare un sistema per il rilascio del complesso **13** utilizzando MWNTs.

La sintesi dei CNTs è stata effettuata mediante la “chimica vapour deposition” nella variante aerosol (Figura III.46).¹⁷⁶

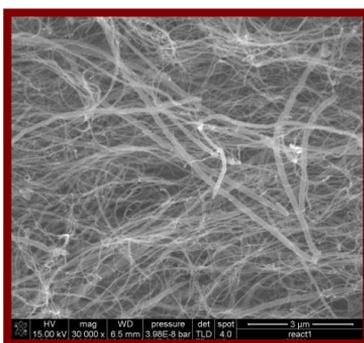


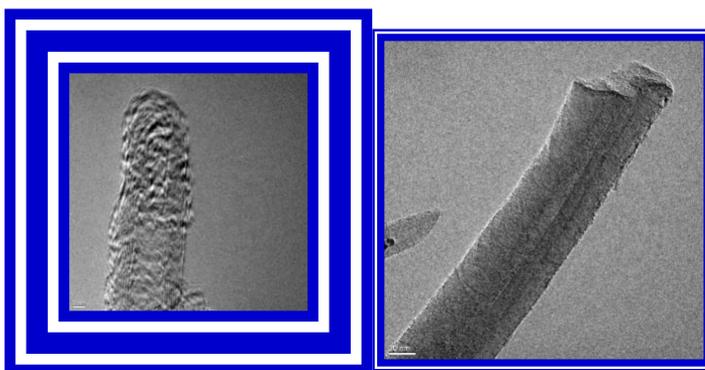
Fig. III.46

Il processo di caricamento del farmaco prevede la preventiva ossidazione dei CNTs per ottenere l'apertura delle loro estremità. Nello specifico, si ha un processo di ossidazione acido indotta e i CNTs così ottenuti sono stati caratterizzati mediante microscopia TEM (Figura III.47a) e spettroscopia XPS per dimostrare l'effettiva ossidazione (Figura III.47b).

¹⁷⁵ K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D. M. Shin, *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14, 1310.

¹⁷⁶ B. Krause, M. Ritschel, C. Täschner, S. Oswald, W. Gruner, A. Leonhardt, P. Pötschke, *Compos Sci. Technol.*, **2010**, 70, 151.

a)



b)

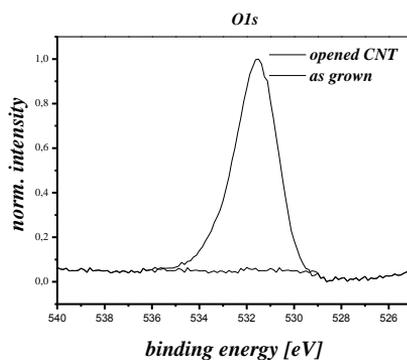


Fig. III.47

Il processo di ossidazione, oltre a permettere l'apertura dei CNTs alle estremità per poter poi incapsulare il complesso **13**, permette inoltre di aumentare l'idrofilia del sistema con conseguente riduzione della tossicità.¹⁷⁷

Successivamente, il complesso **13** è stato incapsulato all'interno dei CNTs mediante una metodologia riportata in letteratura.¹⁷⁸

¹⁷⁷ G. Cirillo, S. Hampel, R. Klingeler, F. Puoci, F. Iemma, M. Curcio, O. I. Parisi, U. G. Spizzirri, N. Picci, A. Leonhardt, M. Ritschel, B. Buchner, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2011**, 63, 179.

¹⁷⁸ D. Haase, S. Hampel, K. Kraemer, D. Kunze, A. Taylor, J. Thomas, S. Oswald, M. Ritschel, R. Klingeler, A. Leonhardt, B. Buchner, *Carbon Nanostructures.*, **2011**, 247.

L'effettiva incapsulazione del farmaco all'interno dei CNTs è stata confermata mediante microscopia TEM (Figura III.48).

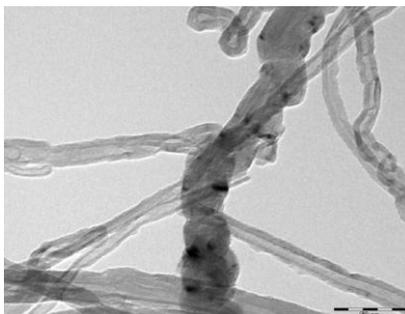


Fig. III.48

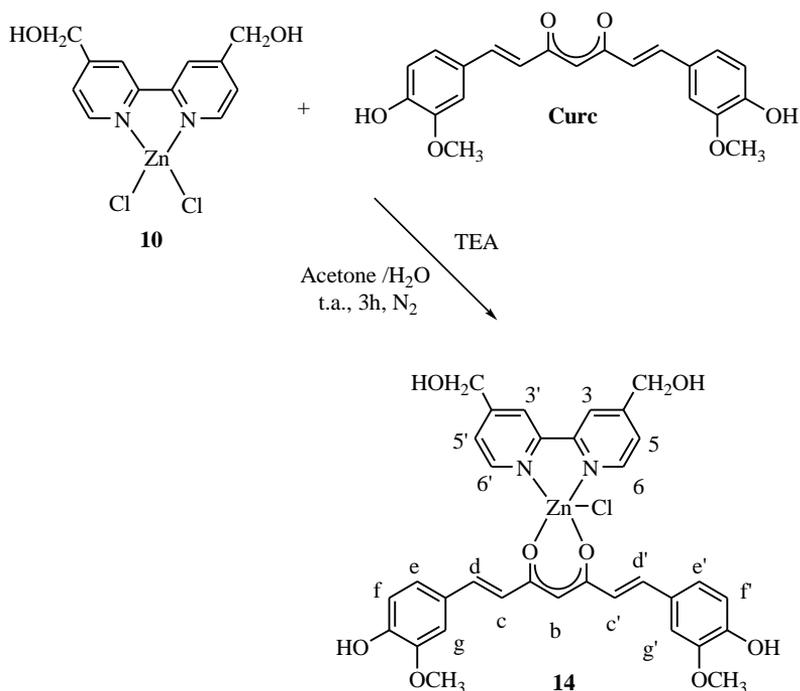
Mediante analisi spettrofotometrica, e utilizzando l'equazione riportata in parte sperimentale, si è determinata l'efficienza di caricamento del farmaco che è risultata essere del $29 \pm 2 \%$.

Lo step successivo sarà quello di valutare i profili di rilascio del farmaco prima in vitro, al fine di valutare le cinetiche di rilascio, e successivamente in coltura cellulare per valutare l'efficacia del sistemi di rilascio proposto.

III.3.3.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso 14

Ad una soluzione in acetone di curcumina, sotto agitazione magnetica e sotto azoto viene addizionata trietilammina provocando un cambiamento di colore della soluzione da arancione a un colore rosso molto intenso. Il tutto è stato lasciato sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso 10 precedentemente sciolto in acqua. La soluzione subisce un ulteriore cambiamento di colore, assume infatti un colore giallo, con la graduale formazione di un precipitato del medesimo colore. La sospensione così

ottenuta è stata lasciata per 3 ore sotto agitazione magnetica e sotto azoto. Si filtra e poi si lava con metanolo ottenendo un prodotto giallo con una resa del 77%. Il complesso risulta essere solubile solo in DMSO.



Schema III.26

Il complesso **14** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, ¹H-NMR, UV-vis ed analisi elementare.

Lo spettro IR conferma la formazione del complesso evidenziando il fondamentale spostamento delle bande relative allo stretching del legame (C=O) nella curcumina da 1625 cm⁻¹ a 1602 cm⁻¹ e la presenza delle bande relative allo stretching a 3421 cm⁻¹ relativo al gruppo ossidrilico della curcumina e di quelle relative allo stretching a 1508 cm⁻¹ del legame (C-C-C) dell'anello chelato risultante dalla formazione del complesso. Inoltre, in questo complesso è evidente una banda relativa allo stretching (C=O) dell' acetone, che ne conferma la sua presenza nel complesso.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 rivela la presenza dei picchi protonici tipici della curcumina e lo spostamento, rispetto al complesso precursore **10**, dei protoni aromatici biperidinici, in particolare di $\text{H}^{5,5'}$ ($\Delta\delta = 1.0 \text{ ppm}$) e di $\text{H}^{3,3'}$ ($\Delta\delta = 0.90 \text{ ppm}$) verso campi più bassi. Si può evincere da questo spettro l'assenza del protone enolico della curcumina che conferma la sua coordinazione allo ione Zn(II) ed inoltre le intensità dei segnali sono in accordo con la stechiometria proposta metallo-N,N legante-curc (1:1:1). Questi dati confermano l'avvenuta reazione e quindi la formazione del complesso desiderato. Anche lo spettro $^1\text{H-NMR}$ conferma la presenza della molecola per la presenza dei picchi protonici tipici di una molecola di acetone.

Tale conferma viene ulteriormente attestata dai dati dell'analisi elementare che confermano la stechiometria proposta nello schema III.26, solo se si considera la presenza di una molecola di acetone.

Per quanto riguarda la caratterizzazione fotofisica del complesso **14** è stata preparata una soluzione $1.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ in DMSO . Dallo spettro di assorbimento (Figura III.49) si notano delle spalle a 281 nm, 296 nm, 342 nm e due massimi di assorbimento a 429 nm e 451 nm. Osservando tale spettro si può notare uno spostamento verso il rosso del massimo di assorbimento, rispetto al legante **L⁶** ed al complesso precursore **10**, dovuto alla presenza del legante curcumina nel complesso sintetizzato, che ne conferma la sua formazione.

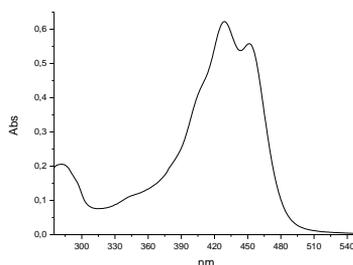


Fig. III.49. Spettro di assorbimento del complesso 14 in DMSO

In seguito ad eccitazione a 430 nm è stato registrato lo spettro di emissione (Figura III.50) che evidenzia una banda centrata a 531 nm, e quindi nel giallo-verde, originata dalla presenza del legante curcumina nel complesso sintetizzato.

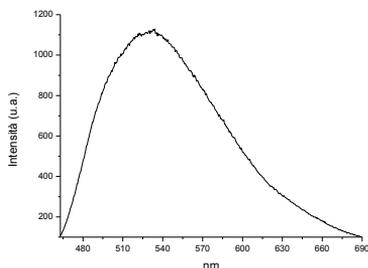


Fig. III.50. Spettro di emissione del complesso 14 in DMSO

Rispetto al legante bipyridinico che non emette, il complesso **14** mostra un massimo di emissione spostato nel rosso se paragonato al complesso precursore **10** che mostra un massimo di emissione a 396 nm.

Infine, è stata misurata la resa quantica di emissione per il complesso **14** utilizzando come standard $\text{Ru}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$ (bipy = 2,2'-bipiridina) ed il valore calcolato è pari all' 11.4%, quindi la formazione del complesso di Zn(II) migliora le caratteristiche emissive della curcumina libera (5%).

Prima di eseguire lo screening citotossico, è stata verificata la stabilità del complesso in ambiente acquoso. E' stata preparata una soluzione del complesso **14** in DMSO alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in seguito diluita con una soluzione acquosa tamponata (pH 7.4) con una concentrazione finale dell'ordine di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in cui la concentrazione del DMSO non risulta essere superiore al 5% (v/v). La verifica della stabilità è stata effettuata attraverso spettroscopia UV-vis, come mostrato nelle curve di assorbimento del complesso **14** in soluzione acquosa tamponata registrate dopo 24 e 48 ore (Figura III.51).

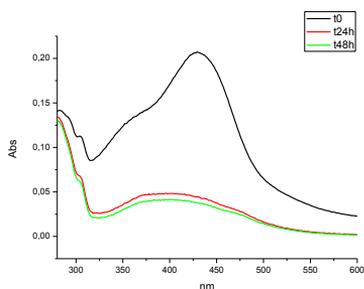


Fig. III.51. Spettri di assorbimento del complesso 14 a pH 7.4

Come si osserva dalle curve registrate nel tempo, nello spettro di assorbimento del complesso **14**, già dopo 24 ore, si può notare una diminuzione dei valori di assorbanza dovuti al fatto che in parte il complesso precipita in soluzione acquosa. Comunque, il complesso **14** invece dimostra di essere stabile e di non subire i processi di degradazione caratteristici della curcumina libera (Figura III.8A).

III.3.3.2.1 Caratterizzazione biologica del complesso 14

E' stata testata *in vitro*, così come per il complesso **13**, l'attività antiproliferativa del complesso **14** e di tutti i suoi precursori come il legante **L⁶**, la curcumina, il complesso precursore **10**, sempre nei confronti delle stesse tre linee cellulari prostatiche umane DU145, LnCaP e PC-3. E' stato utilizzato sempre l'MTS come test colorimetrico per calcolare l' IC_{50} di ogni composto analizzato (Tabella III.3).

Composto	IC ₅₀ (μM) ± SD DU145	IC ₅₀ (μM) ± SD Pc3	IC ₅₀ (μM) ± SD LNCaP
Curc	2.3±0.7	2.0±2.2	7.8±1.5
L⁶	54±2.2	51±5.0	>80
10	> 100	34±2.9	>80
14	34±3.8	37±0.6	27.4±0.6

Tab. III.3. Valori di IC₅₀ di leganti e complessi di Zn(II) nei confronti di linee cellulari prostatiche umane

Il legante **L⁶** ed il complesso precursore **10** non esibiscono significativi effetti citotossici, a differenza della curcumina pura che invece induce il 50% di citotossicità a dosi più basse di 10 μM. Infatti, solo con l'introduzione della curcumina nel complesso di Zn(II) si ha un notevole aumento della citotossicità. Il complesso **14** è attivo ed inibisce la proliferazione delle cellule cancerose in un basso range di dosaggio che va da 27 a 37 μM, quindi inferiore all'attività che presenta il complesso **13** come si può vedere nella tabella I.3. Inoltre, abbastanza interessante è anche la marcata attività del complesso **14** nei confronti delle linee cellulari DU145 ed LNCaP, nei confronti delle quali ha evidenziato un'attività maggiore con valori di IC₅₀ molto più bassi rispetto al complesso precursore dicloro **10**.

Comunque, la selettività di un farmaco è di importanza fondamentale per il suo successo per uso clinico, quindi ulteriori esperimenti sono stati condotti su altre linee cellulari umane ed in particolare sono state prese in considerazione le stesse linee cellulari di neuroblastomi SHSY-5Y e LAN-5 (Tabella III.4).

Composto	IC ₅₀ (μM) ± SD SHSY-5Y	IC ₅₀ (μM) ± SD LAN-5
Curc	13.6±5.6	24±2.2
L ⁶	>100	>80
10	> 100	26±7.6
14	36±3.8	25±0.7

Tab. III.4. Valori di IC₅₀ dei leganti e dei complessi di Zn(II) nei confronti di linee cellulari di neuroblastoma

Come mostrato in tabella III.4, il leganti L⁶ non esibisce un significativo effetto citotossico per SHSY-5Y, mentre nei confronti della linea cellulare LAN-5 mostra un IC₅₀ pari a circa 80 μM. Al contrario, la curcumina ed il complesso **14** inducono il 50% di citotossicità a dosaggi compresi tra 13 e 36 μM. Il complesso **14** mostra una forte inibizione della crescita dose-dipendente su entrambe i neuroblastomi (SHSY-5Y e LAN-5) con valori di IC₅₀ comparabili tra le due linee cellulari. In particolare, il complesso **14** presenta un'efficacia, nei confronti della linea cellulare LAN-5, simile a quella della curcumina con un valore di IC₅₀ pari a 25 μM.

III.3.3.3 Studio di interazione dei complessi **13** e **14** con oligomeri di DNA tramite fluorescenza a microscopia polarizzata

La potenziale capacità intercalante a livello del DNA è stata studiata, in modo innovativo, sfruttando le tecniche ottiche, come la microscopia a trasmissione polarizzata e la microscopia a fluorescenza polarizzata. Infatti è stato possibile caratterizzare con microscopia ottica la curcumina e i complessi **13** e **14** in presenza di DNA a doppio filamento grazie alla fluorescenza che presentano nel range del visibile. Invece, non è stato possibile effettuare ciò, sui leganti bipyridinici e sui complessi precursore dicloro **9** e **10** per assenza di fluorescenza. Come molecola di riferimento

è stata utilizzata l' etidinio bromuro (EB), un ben noto intercalatore fluorescente capace di interagire con il DNA.¹⁷⁹

La recente scoperta della possibile organizzazione di oligomeri di DNA (6-12 basi) in fasi ordinate liquido-cristalline (LC) ha aperto la strada a nuove metodiche per studiare l'interazione di molecole fluorescenti con il DNA.¹⁸⁰

Gli oligomeri di DNA provvedono a rendere l'ambiente più idrofobico, quindi più adatto a molecole poco solubili in acqua. Ciò assume notevole importanza, in quanto le molecole utilizzate presentano una bassa solubilità in acqua. Ogni composto è stato miscelato al DNA liquido-cristallino (LC) e la sua emissione fluorescente è stata fotografata in varie direzioni della polarizzazione incidente. L'emissione fluorescente è stata osservata all' interno dei domini LC, come mostrato in figura III.52, indicando co-localizzazione con il DNA.

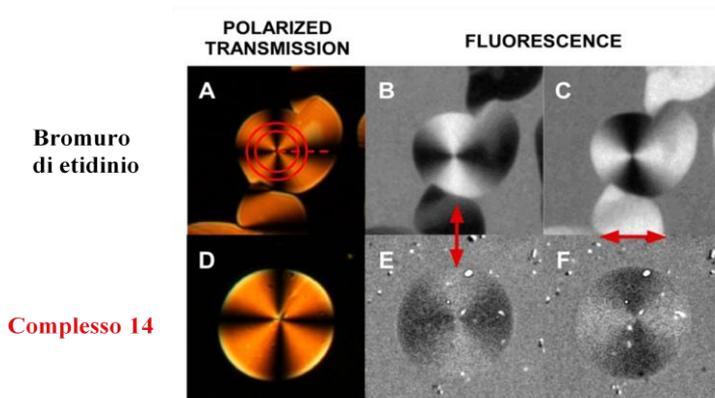


Fig. III.52. Miscela di DNA LC-molecola fluorescente osservata in trasmissione polarizzata (A,D) ed in fluorescenza polarizzata (B-C, E-F). I cerchi rossi indicano l' orientazione dell' elica di DNA all' interno del dominio LC, le frecce rosse indicano la direzione della polarizzazione della luce incidente.

¹⁷⁹ B. LePecq, C.A. Paoletti, *J. Mol. Biol.*, **1967**, 27, 87.

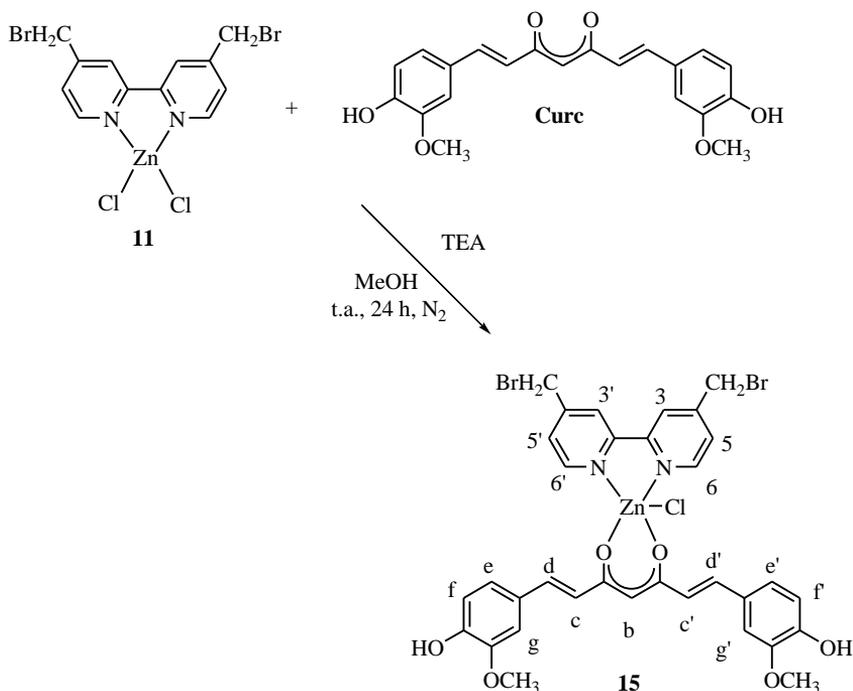
¹⁸⁰ M. Nakata, G. Zanchetta, B. D. Chapman, C. D. Jones, J.O. Cross, R. Pindak, T. Bellini, N. A. Clark, *Science*, **2007**, 318, 1276.

Inoltre, l' anisotropia di fluorescenza chiaramente corrisponde all' orientazione del DNA all' interno del dominio LC. Quando si modifica la direzione di polarizzazione della luce, da verticale (V) a orizzontale (H), si ha una netta modulazione angolare (vedi Figura III.52B nei confronti della Figura III.52C e Figura III.52E nei confronti della Figura III.52F), ciò dimostra la presenza di interazioni anisotropiche tra doppie eliche del DNA e molecole ospiti. Le analisi di anisotropia di fluorescenza permettono di determinare l' orientazione locale delle molecole ospiti. La maggiore fluorescenza indica che la polarizzazione e l' asse molecolare dei complessi di Zn(II) sono paralleli. Infatti, ciò si può evincere dalle figure B ed E nei settori superiore ed inferiore del dominio, in quanto ci fanno capire che l' assorbimento di dipolo delle molecole ospiti è verticale. Analogamente, nelle figure C e F le molecole ospite hanno il loro asse lungo a destra ed a sinistra dei domini e questa inversione è dovuta alla rotazione della polarizzazione di 90 gradi. Queste semplici osservazioni offrono notevoli evidenze sull' accoppiamento tra DNA e molecole ospiti e sul loro orientamento: le molecole ospiti sono orientate in modo perpendicolare agli assi delle eliche di DNA ed in modo predominante sono parallele alle nucleobasi, suggerendo chiaramente che il meccanismo di interazione tra DNA e molecole ospiti è rappresentato dall' intercalazione, come previsto per il bromuro di etidinio.

III.3.3.4 Sintesi e caratterizzazione del complesso 15

Ad una soluzione in metanolo di curcumina, sotto agitazione magnetica e sotto azoto viene addizionata la trietilammina, ciò provoca un cambiamento di colore della soluzione da arancione a un colore rosso molto intenso. Il tutto è stato lasciato sotto agitazione magnetica e sotto

azoto per 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso precursore **11** precedentemente sciolto in metanolo. La soluzione subisce un ulteriore cambiamento di colore, assume infatti un colore arancione, con la graduale formazione di un precipitato del medesimo colore. La sospensione così ottenuta è stata lasciata per 24 h sotto agitazione magnetica e sotto azoto. Quindi si filtra e poi si lava con metanolo ottenendo un prodotto arancione con una resa del 52%. Il complesso è solubile in DMSO.



Schema III.27

Il complesso **15** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Lo spettro IR conferma la formazione del complesso **15** evidenziando la presenza a 3435 cm^{-1} delle bande relative allo stretching del gruppo ossidrilico della curcumina e di quelle, a 1510 cm^{-1} , relative allo stretching del legame (C-C-C) dell'anello chelato risultante dalla

formazione del complesso, nonché il fondamentale spostamento delle bande relative allo stretching del legame (C=O) nella curcumina da 1625 cm^{-1} a 1602 cm^{-1} .

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 assicura l'avvenuta reazione mostrando innanzitutto la presenza dei picchi protonici caratteristici della curcumina ed evidenziando lo spostamento rispetto al complesso precursore dicloro **11** dei protoni aromatici bi piridinici, in particolare di $\text{H}^{6,6'}$ ($\Delta\delta = 1.11$ ppm), di $\text{H}^{3,3'}$ ($\Delta\delta = 0.86$ ppm) e di $\text{H}^{5,5'}$ ($\Delta\delta = 2.03$ ppm). Si può evincere da questo spettro l'assenza del protone enolico della curcumina che conferma la sua coordinazione allo ione Zn(II) ed inoltre le intensità dei segnali sono in accordo con la stechiometria proposta metallo-N,N legante-curc (1:1:1).

Il risultato dell'analisi elementare è un ulteriore dato che assicura l'avvenuta reazione confermando la stechiometria proposta nello schema III.27.

Per quanto riguarda la caratterizzazione fotofisica del complesso **15** è stata preparata una soluzione $1.20 \cdot 10^{-5}$ M in metanolo. Lo spettro di assorbimento (Figura III.53) mostra delle spalle a 250 nm, 312 nm e 399 nm e dei massimi di assorbimento a centrati a 299 nm, 421 nm e 443 nm. Osservando tale spettro risulta evidente come il massimo di assorbimento sia spostato verso il rosso rispetto al legante **L**⁷ ed al complesso precursore **11** e ciò dovuto alla presenza del legante curcumina nel complesso sintetizzato, che ne conferma la sua formazione.

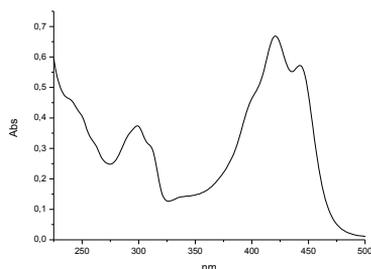


Fig. III.53. Spettro di assorbimento del complesso 15 in metanolo

A seguito di eccitazione a 420 nm lo spettro di emissione (Figura III.54) mostra un massimo centrato a 545 nm, e quindi nella regione giallo-verde dello spettro elettromagnetico, che si origina per la presenza della curcumina nel complesso sintetizzato.

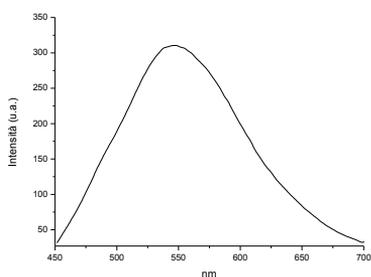


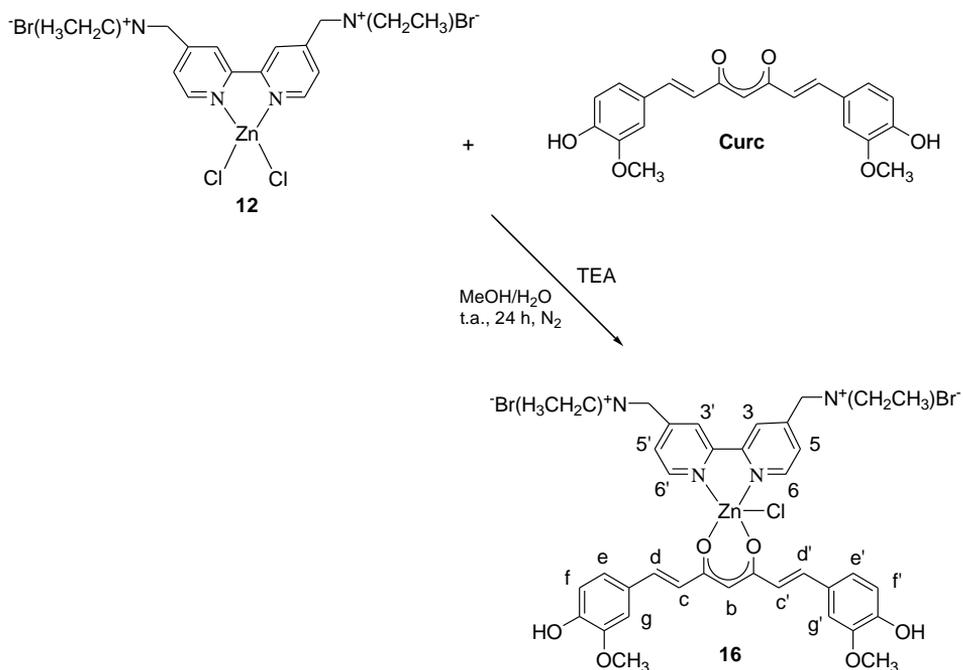
Fig. III.54. Spettro di emissione del complesso 15 in metanolo

E' dunque evidente come le caratteristiche fotofisiche del complesso **15** differiscano da quelle del legante libero **L⁷** che non mostra proprietà emissive e del complesso precursore **11** che invece emette a 326 nm. E' stata calcolata, anche, la resa quantica di emissione per il complesso **15** utilizzando come standard $\text{Ru}(\text{bipy})_3\text{Cl}_2$ (bipy = 2,2'-bipiridina) ed il valore è pari al 2%.

Vista la bassa solubilità del complesso **15** in DMSO non sono stati effettuati i test di citotossicità *in vitro* e di conseguenza non è stata effettuata la stabilità del complesso in ambiente acquoso.

III.3.3.5 Sintesi e caratterizzazione del complesso 16

Ad una soluzione in metanolo di curcumina, sotto agitazione magnetica e sotto azoto viene addizionata la trietilammina provocando un cambiamento di colore della soluzione da arancione a un colore rosso molto intenso. Il tutto è stato lasciato sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 15 minuti, trascorsi i quali è stato addizionato il complesso precursore **12** precedentemente sciolto in acqua. La soluzione subisce un ulteriore cambiamento di colore, assume infatti un colore rosso debole, con la graduale formazione di un precipitato del medesimo colore. La sospensione così ottenuta è stata lasciata per 24 h sotto agitazione magnetica e sotto azoto. Quindi si filtra e poi si lava con metanolo ottenendo un prodotto rosso chiaro con una resa del 62%. Il complesso **16** è solubile in DMSO.



Schema III.28

Il complesso **16** inoltre può essere sintetizzato a partire dal complesso **15**, mediante una reazione con la trietilammina in un rapporto stechiometrico 1:2, evitando in questo modo uno step di sintesi.

Il complesso **16** è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, ¹H-NMR, UV-vis ed analisi elementare

Lo spettro IR conferma la formazione del complesso desiderato evidenziando il fondamentale spostamento dello stretching relativo al legame (C=O) della curcumina da 1625 cm⁻¹ a 1590 cm⁻¹ e la presenza dello stretching a 3400 cm⁻¹ relativo al gruppo ossidrilico della curcumina, nonché lo stretching a 1510 cm⁻¹ relativo al legame (C-C-C) nell'anello chelato risultante dalla formazione del complesso.

Lo spettro ¹H-NMR in DMSO-d₆ conferma l'avvenuta reazione mostrando i caratteristici picchi protonici della curcumina e lo spostamento dei protoni aromatici biperidinici, rispetto al complesso precursore **12**, in particolare di H^{5,5'} ($\Delta\delta = 0.85$ ppm) e di H^{3,3'} ($\Delta\delta = 0.09$). Si può evincere da questo spettro l'assenza del protone enolico della curcumina che conferma la sua coordinazione allo ione Zn(II) ed inoltre le intensità dei segnali sono in accordo con la stechiometria proposta metallo-N,N legante-curc (1:1:1).

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta reazione viene fornita dai dati dell'analisi elementare che rispettano la stechiometria nello schema III.28.

Per la caratterizzazione fotofisica del complesso **16** è stata preparata una soluzione 9.6·10⁻⁶ M in DMSO. Lo spettro di assorbimento (Figura III.55) mostra delle spalle a 282 nm, 342 nm e 406 nm e dei massimi di assorbimento a 430 nm e 452 nm. Osservando tale spettro risulta chiaro come il massimo di assorbimento sia spostato verso il rosso rispetto al legante **L**⁸ ed al complesso precursore **12** e questo è dovuto alla presenza

del legante curcumina nel complesso sintetizzato, che ne conferma la sua formazione.

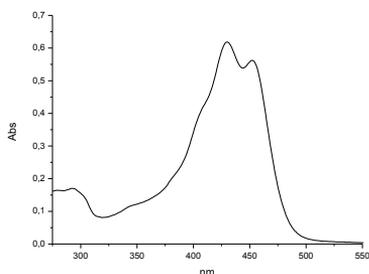


Fig. III.55. Spettro di assorbimento del complesso 16 in DMSO

A seguito di eccitazione a 430 nm lo spettro di emissione (Figura III.56) mostra un massimo centrato a 534 nm, e quindi nella regione giallo-verde dello spettro elettromagnetico, che si origina per la presenza della curcumina nel complesso sintetizzato.

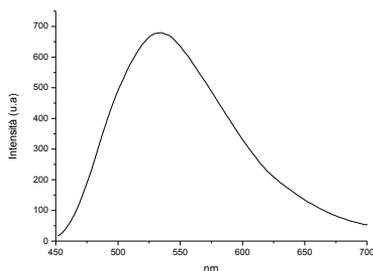


Fig. III.56. Spettro di emissione del complesso 16 in DMSO

Il massimo di emissione del complesso **16** mostra uno shift nel rosso notevole se paragonato ai massimi di emissione del legante **L**⁸ e del complesso precursore **12**, rispettivamente a 336 nm ed a 335 nm.

Infine, è stata misurata la resa quantica di emissione per il complesso **16** utilizzando come standard Ru(bipy)₃Cl₂ (bipy = 2,2'-bipiridina) ed il valore calcolato è pari al 6.3%, quindi la formazione del complesso di Zn(II) migliora le caratteristiche emissive della curcumina libera.

Prima di eseguire lo screening citotossico, è stata verificata la stabilità del complesso in ambiente acquoso. E' stata preparata una soluzione del complesso **16** in DMSO alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-4}$ M che in seguito è stata diluita con una soluzione acquosa tamponata con un tampone fosfato (pH 7.4) così da avere una concentrazione finale dell'ordine di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in cui la concentrazione del DMSO non è superiore al 5% (v/v). La verifica della stabilità è stata effettuata attraverso spettroscopia UV-vis, come mostrato nelle curve di assorbimento del complesso **16** in soluzione acquosa tamponata registrate dopo 24 e 48 ore (Figura III.57).

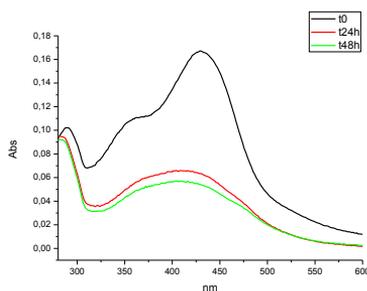


Fig. III.57. Spettri di assorbimento del complesso 16 a pH 7.4

Come si osserva dalle curve registrate nel tempo, nello spettro di assorbimento del complesso **16**, già dopo 24 ore, si può notare una diminuzione dei valori di assorbanza dovuti al fatto che in parte il complesso precipita in soluzione acquosa. Comunque, il complesso **16** dimostra di essere stabile e di non subire i processi di degradazione caratteristici del legante curcumina.

L'attività antiproliferativa del complesso curcuminico **16** è stata testata nei confronti della linea cellulare umana di neuroblastoma SHSY-5Y. Sono stati effettuati studi preliminari ed è stato utilizzato come test colorimetrico l' MTT, così da valutare la percentuale di vitalità cellulare (espressa in percentuale) che questo complesso determina al variare della concentrazione e del tempo di esposizione. Nell'istogramma della figura

III.58 si può notare come varia la percentuale di vitalità delle cellule trattate, dopo 24 ore, all' aumentare della concentrazione della molecola. Il complesso **8** mostra attività antiproliferativa come gli altri due complessi testati ed in particolare questo complesso (azzurro nell'istogramma) è esplicita una discreta tossicità, infatti si può constatare che la concentrazione di 25 μM è sufficiente a dimezzare il numero delle cellule testate, così da raggiungere un valore pari al 40% di vitalità cellulare.

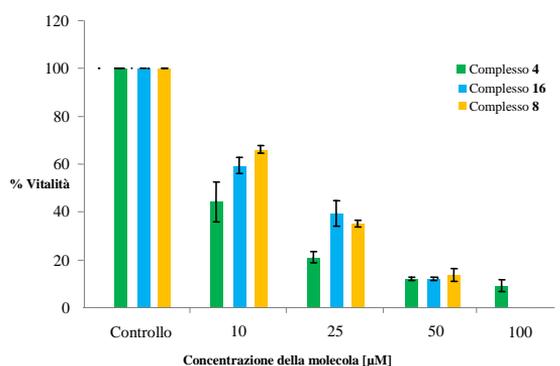


Fig. III.58. Vitalità delle cellule di neuroblastoma umano (SHSY-5Y) dopo 24h di trattamento con il complesso 16

Lo stesso test è stato ripetuto analizzando la vitalità delle cellule dopo 48 ore di trattamento (Figura III.59).

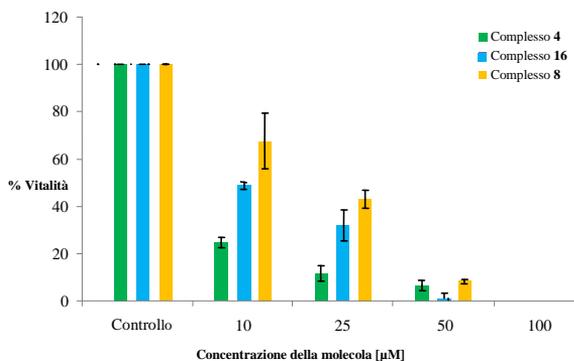


Fig. III.59. Vitalità delle cellule di neuroblastoma umano (SHSY-5Y) dopo 48h di trattamento con il complesso 4

Anche in questo caso, il complesso **16** mostra attività antiproliferativa, anche se la percentuale di vitalità cellulare non subisce grosse variazioni dopo le 48 ore di somministrazione, infatti alla concentrazione di 25 μM si ha una percentuale di vitalità che raggiunge un valore di poco inferiore al 40%.

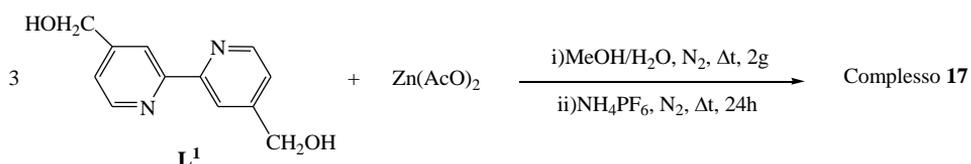
III.4 Sintesi e caratterizzazione di complessi omolettici di Zn(II) con derivati 2,2' bipyridinici

E' stata messa a punto anche la sintesi di complessi tris omolettici di Zn(II), in cui sono stati utilizzati come leganti esclusivamente le 2,2' bipyridine, in modo da avere una estesa superficie aromatica e quindi svolgere sia una potenziale attività intercalante che una potenziale stabilizzazione delle strutture G-quadruplex. Sono state utilizzate 2,2'-bipyridine che presentano differenti sostituenti in posizione para rispetto agli atomi di azoto, in modo da poter verificare gli effetti dei gruppi terminali sulla solubilità dei complessi e nello stesso tempo in modo che la solubilità in mezzi polari venga in questo modo favorita da interazioni elettrostatiche. Quindi, anche in questo caso, lo scopo ultimo resterà quello di sintetizzare complessi di Zn(II) che siano biologicamente attivi ed in particolare siano in grado di stabilizzare le strutture G-quadruplex.

III.4.1 Sintesi e caratterizzazione del complesso 17

Il complesso **17** è stato sintetizzato attraverso due step: nel primo step una soluzione del legante **L**⁶ in metanolo è fatta reagire con 1/3 di equivalenti di acetato di zinco precedentemente sciolto in acqua. La soluzione è

lasciata sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 2 giorni a riflusso. Successivamente, nel secondo step al complesso intermedio vengono aggiunti 5 equivalenti di NH_4PF_6 *in situ*. La soluzione, finora limpida, diventa una sospensione bianca. Quest'ultima viene mantenuta sotto agitazione magnetica, a riflusso per 24 ore. La sospensione viene filtrata per allontanare i sali e dalle acque madri è stato ottenuto, per lenta evaporazione, il prodotto sotto forma di cristalli rosa. Il complesso risulta essere solubile in metanolo, acqua e DMSO.



Schema III.29

Il complesso **17** viene ottenuto con una resa del 71% sotto forma di solido cristallino rosa ed è stato caratterizzato mediante spettroscopie IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis, analisi elementare.

Dallo spettro IR si nota la presenza degli stretching ossidrilici a 3390 cm^{-1} ed il fondamentale spostamento, rispetto al legante libero **L**⁶, dello stretching relativo ai legami (C=C) da 1602 cm^{-1} a 1618 cm^{-1} , che confermano l'avvenuta coordinazione del metallo ed inoltre è evidente la presenza della banda a 842 cm^{-1} che indica la presenza dell'anione esafluorofosfato.

L'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 rivela lo spostamento ($\Delta\delta=0.07 \text{ ppm}$) dei protoni aromatici $\text{H}^{6,6'}$ verso campi più alti rispetto al legante libero **L**⁶, e lo spostamento ($\Delta\delta=0.15 \text{ ppm}$) dei protoni aromatici $\text{H}^{3,3'}$ e ($\Delta\delta=0.29 \text{ ppm}$) di $\text{H}^{5,5'}$ verso campi più bassi. Inoltre, si osserva la presenza dei segnali aromatici del legante libero, quindi sono state effettuate innumerevoli prove di purificazione, anche se queste ultime

sono risultate vane, in quanto si ottiene sempre lo stesso spettro $^1\text{H-NMR}$. Dato che il prodotto ottenuto è sotto forma di cristalli rosa, è stato possibile condurre un'analisi a diffrazione a raggi X su cristallo singolo, che ha permesso di avere maggiori informazioni ed ottenere la seguente struttura (Figura III.60).

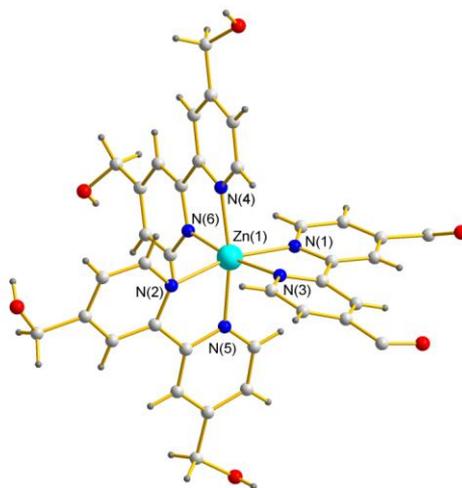


Fig. III.60

La struttura del composto è infatti costituita da un catione tris-chelato $[\text{Zn}(\text{bipyCH}_2\text{OH})_3]^{2+}$, ioni PF_6^- , molecole d'acqua e leganti bipyCH_2OH non coordinati e cocristallizzati. Interazioni elettrostatiche, legami a ponte idrogeno ed interazioni aromatiche di stacking assicurano la coesione del reticolo cristallino.

Il complesso **17** mostra una geometria ottaedrica distorta. Le distanze Zn-N variano in un range compreso tra 2.149(4) e 2.198(4) Å. La maggiore distorsione dalla geometria ideale dipende dal ridotto angolo di bite del legante chelante, con valori compresi tra 75.53(15) e 76.50(15). Gli atomi

N(3), N(4), N(5) ed N(6) dei leganti definiscono il miglior piano equatoriale intorno all'atomo di zinco.

Gli ioni PF_6^- formano legami a ponte idrogeno con il complesso metallico, che coinvolgono i gruppi $-\text{CH}_2\text{OH}$ e con le molecole d'acqua di cristallizzazione (Figura III.61). Stabiliscono inoltre numerose interazioni di tipo $\text{C-H}\cdots\text{F}$ con gli idrogeni aromatici degli anelli piridinici dei leganti coordinati e non. La presenza di molecole di bipyridine libere inoltre stabilizza ulteriormente la struttura mediante legami a idrogeno.

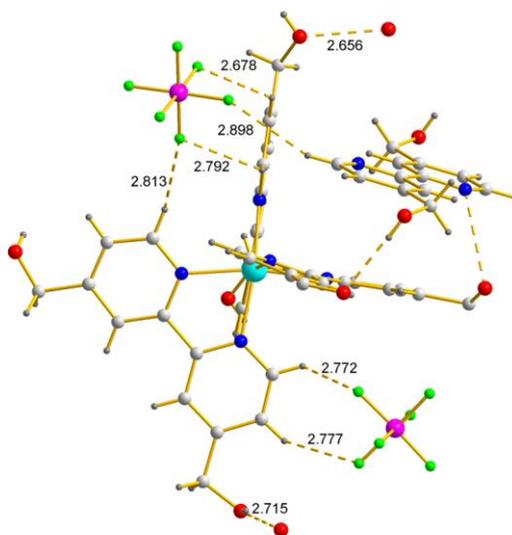


Fig. III.61

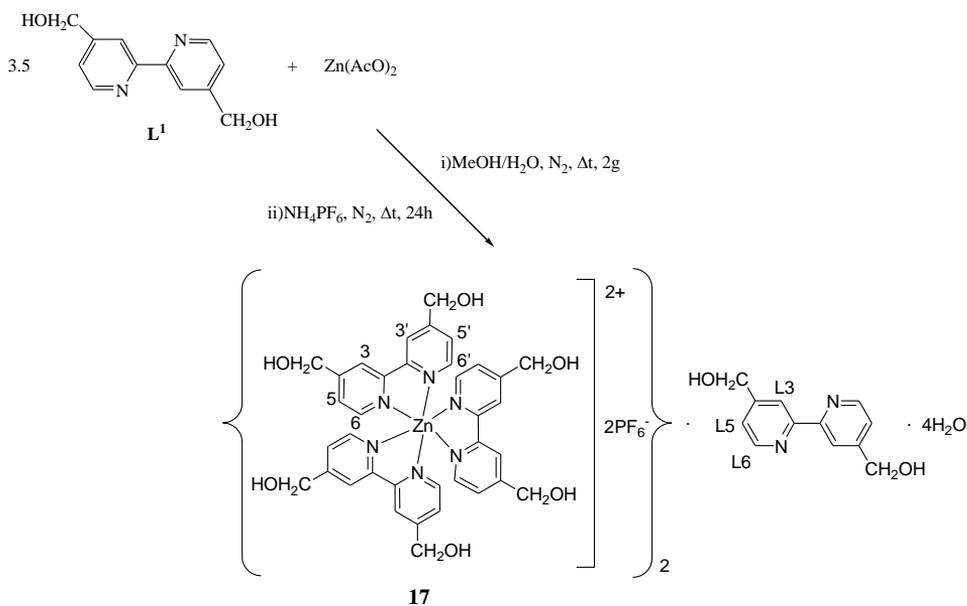
Tabella 1. Lunghezze di legame [\AA] ed angoli [$^\circ$].

Zn(1)-N(4)	2.149(4)
Zn(1)-N(1)	2.172(4)
Zn(1)-N(6)	2.174(4)
Zn(1)-N(2)	2.183(4)
Zn(1)-N(5)	2.192(4)
Zn(1)-N(3)	2.198(4)

N(4)-Zn(1)-N(1)	94.05(16)
N(4)-Zn(1)-N(6)	76.50(15)
N(1)-Zn(1)-N(6)	96.41(16)
N(4)-Zn(1)-N(2)	98.98(16)
N(1)-Zn(1)-N(2)	165.51(16)
N(6)-Zn(1)-N(2)	92.79(16)
N(4)-Zn(1)-N(5)	167.64(16)
N(1)-Zn(1)-N(5)	92.86(15)
N(6)-Zn(1)-N(5)	92.55(16)
N(2)-Zn(1)-N(5)	75.53(15)
N(4)-Zn(1)-N(3)	98.34(16)
N(1)-Zn(1)-N(3)	75.81(15)
N(6)-Zn(1)-N(3)	170.50(15)
N(2)-Zn(1)-N(3)	95.92(15)
N(5)-Zn(1)-N(3)	93.28(16)

Un'ulteriore conferma dell' avvenuta formazione del prodotto **17** è data dall'analisi elementare che conferma la struttura ottenuta.

Quindi, dopo aver acquisito questi dati strutturali, la reazione è stata ripetuta nelle stesse condizioni precedenti, ma variando in modo opportuno il rapporto stechiometrico, che è pari a 3.5:1 (legante **L**⁶:Zn(AcO)₂) (Schema III.).

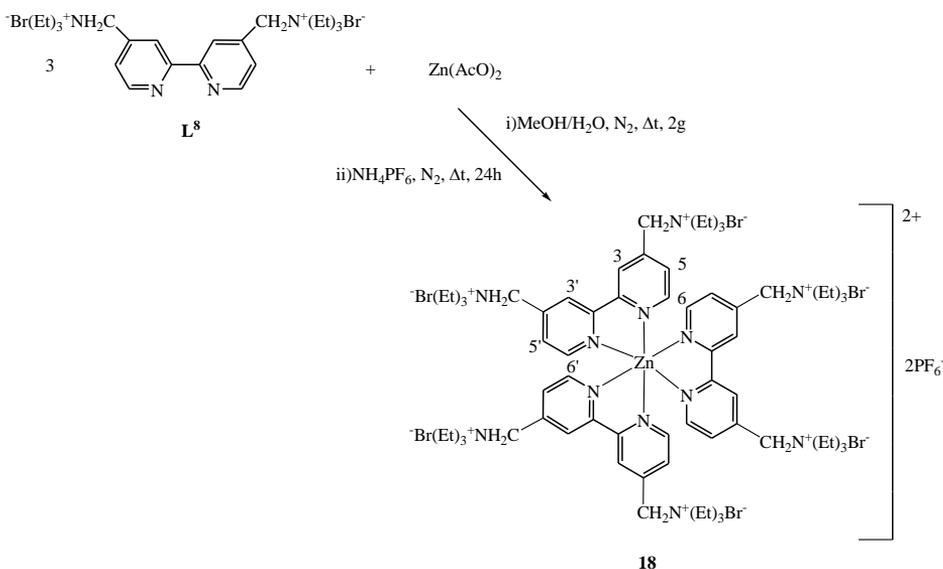


Il procedimento di reazione è identico a quello illustrato in precedenza. Si ottiene il prodotto sempre sotto forma di cristalli rosa con una resa dell' 84%, ovviamente migliorativa rispetto a quella eseguita con un rapporto stechiometrico di 3:1 (legante L^6 : $\text{Zn}(\text{AcO})_2$).

III.4.2 Sintesi e caratterizzazione del complesso 18

Il complesso **18** è stato sintetizzato attraverso due step: nel primo step una soluzione del legante L^8 in metanolo è fatta reagire con 1/3 di equivalenti di acetato di zinco precedentemente sciolto in acqua. La soluzione è lasciata sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 2 giorni a refluxo. Successivamente, nel secondo step al complesso intermedio vengono aggiunti 5 equivalenti di NH_4PF_6 in situ. La soluzione, finora limpida, diventa una sospensione bianca. Quest'ultima viene mantenuta sotto agitazione magnetica, a refluxo per 24 ore. La sospensione viene filtrata

per allontanare i sali e le acque madri sono evaporate a pressione ridotta e ricristallizzate da metanolo-etero etilico. Si ottiene un solido lievemente marrone con una resa del 53%. Il complesso è solubile in DMSO, metanolo ed acqua.



Schema III.31

Il complesso **18** è stato caratterizzato mediante spettroscopia IR, $^1\text{H-NMR}$, UV-vis ed analisi elementare.

Nello spettro IR si nota il fondamentale spostamento, rispetto al legante libero **L⁸**, degli stretching relativi ai legami (C=C) da 1594 cm^{-1} a 1620 cm^{-1} . È inoltre ben vibibile la banda riferita all'anione esafluorofosfato a 843 cm^{-1} che conferma l'avvenuta formazione del complesso **18**.

L'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$, rivela lo spostamento, rispetto al legante **L⁸**, ($\Delta\delta=0.12\text{ ppm}$) dei protoni aromatici $\text{H}^{6,6'}$ e ($\Delta\delta=0.44\text{ ppm}$) dei protoni aromatici $\text{H}^{3,3'}$ verso campi più bassi.

L'analisi elementare conferma la stechiometria proposta nello schema III.31.

III.4.3 Caratterizzazione fotofisica dei complessi 17-18

I complessi **17** e **18** sono stati caratterizzati anche dal punto di vista fotofisico. Sono state preparate due soluzioni dei complessi in acqua con una concentrazione di $7 \cdot 10^{-6}$ M. Entrambe i complessi presentano lo stesso spettro di assorbimento e di emissione, quindi per semplicità saranno mostrati solo gli spettri del complesso **17**. Dallo spettro di assorbimento (Figura III.62) si notano delle spalle a 291 nm e 304 nm e dei massimi di assorbimento centrati a 237 nm e 284 nm.

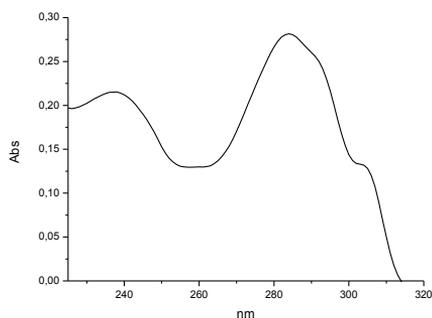


Fig. III.62. Spettro di assorbimento del complesso 17 in acqua

In seguito ad eccitazione a 295 nm è stato registrato il seguente spettro di emissione (Figura III.63),

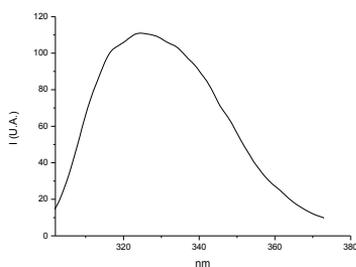


Fig. III.63. Spettro di emissione del complesso 17 in acqua

che evidenzia una banda centrata a 325 nm, ciò conferma la formazione dei due complessi **17** e **18**, in quanto il legante **L⁶** non emette ed il legante **L⁸** ha un massimo di emissione a 336 nm.

E' stata anche misurata la resa quantica di emissione utilizzando come standard la 2-amminopiridina ed i valori calcolati sono pari all' 1,1% per il complesso **17** ed allo 0.9% per il complesso **18**.

Vista l'elevata solubilità dei complessi **17** e **18** in acqua, è stata testata la stabilità dei complessi in ambiente acquoso. Sono state preparate due soluzioni del complesso **17** e **18** in acqua alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in seguito diluite con una soluzione acquosa tamponata (pH 7.4) con una concentrazione finale dell'ordine di $1 \cdot 10^{-4}$ M ed in cui la concentrazione dell'etanolo non risulta essere superiore al 5% (v/v). La verifica della stabilità è stata effettuata attraverso spettroscopia UV-vis, come mostrato nelle curve di assorbimento dei complessi **17** e **18** in soluzione acquosa tamponata registrate dopo 24 e 48 ore (Figura III.64).

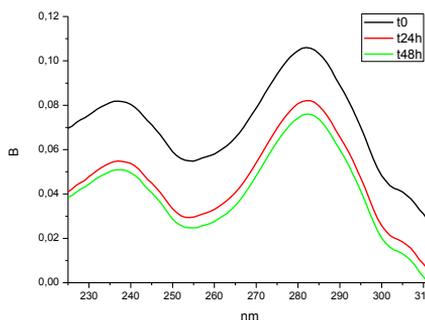


Fig. III.64. Spettri di assorbimento del complesso 17 a pH 7.4

I complessi **17** e **18** dimostrano di essere stabili in condizioni fisiologiche. Questi complessi saranno testati, così come lo sono stati i complessi eterolettici di Zn(II), sulle stesse linee cellulari umane prostatiche e neuronali. Inoltre, vista la loro buona solubilità in acqua e la loro elevata

estensione aromatica, questi complessi saranno utilizzati per effettuare vari test e comprendere se possono essere utilizzati come stabilizzatori dei G-quadruplex.

Capitolo IV

IV.1 Materiali e metodi

IV.1.1. Informazioni generali. I reagenti usati sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich eccetto la curcumina che è stata usata dopo separazione dei suoi componenti, secondo il metodo riportato in letteratura.¹⁸¹

La caratterizzazione dei prodotti è stata effettuata mediante analisi elementare e spettroscopie IR e ¹H-NMR.

Le analisi elementari sono state eseguite con uno strumento Perkin Elmer Series II CHNS/O Analyzer 2400.

Gli spettri IR sono stati registrati da 4000 a 400 cm⁻¹ con uno spettrometro Perkin Elmer FT 2000, in pasticche di KBr.

Gli spettri ¹H-NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker W-M 300, usando cloroformio, DMSO ed acqua come solventi deuterati e TMS come standard interno.

Sono state effettuate misure di conducibilità, per dimostrare la natura neutra dei complessi eterolettici. Tali misure sono state condotte in diclorometano, con un conduttimetro Inolab Cond Level 1-720 equipaggiato con una cella ad immersione LR 325/001.

IV.1.2 Fotofisica. La caratterizzazione fotofisica dei composti sintetizzati e' stata eseguita in soluzione ed è stata effettuata adoperando solventi puri per spettrofluorimetria (Carlo Erba) ed utilizzando uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 900 UV/Vis/NIR, munito di lampade al deuterio ed al tungsteno, tramite il quale sono stati registrati gli spettri di

¹⁸¹ D. Pucci, M. Ghedini, A. Crispini, S. Bernardini, M. Ghedini, S. Pirillo, A. Valentini, *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, 101, 1013.

assorbimento; tali spettri sono stati raccolti a temperatura ambiente. Gli spettri di emissione invece, sono stati ottenuti a temperatura ambiente, con uno spettrometro a luminescenza Perkin Elmer LS-50B, fornito di un tubo fotomoltiplicatore Hamamatsu R928, e/o utilizzando un sistema spettrofluorimetrico HORIBA Jobin-Yvon Fluorolog-3 FL3-211, fornito di una lampada ad arco allo Xenon da 450 W, monocromatori di eccitazione e di emissione, e un tubo fotomoltiplicatore Hamamatsu R928 (per le emissioni nel range UV-Vis), o un detector TBX-04-D (per il conteggio dei tempi di vita). L'errore associato alle lunghezze d'onda degli spettri di assorbimento e di emissione è rispettivamente di 1 e 2 nm. L'incertezza sui coefficienti di estinzione molare è del 10%.

Le rese quantiche di emissione sono state determinate utilizzando il metodo descritto da Demas e Crosby,¹⁸² con assorbanza alle lunghezze d'onda di eccitazione inferiori a 0.1. Sono stati utilizzati come standard Ru(bipy)₃Cl₂ (bipy = 2,2'-bipiridina) in acqua ($\Phi = 0.028$)¹⁸³ oppure la 2-amminopiridina in etanolo ($\Phi = 0,37$).¹⁸⁴

Gli spettri di eccitazione e di emissione sono stati corretti mediante curve di correzione standard.

Si ringraziano il Dott. Massimo La Deda e la Dott.ssa Loredana Ricciardi per gli studi fotofisici di interazione del complesso **13** con l'albumina

IV.1.3 Cristallografia a raggi X. L'analisi diffrattometrica del complesso **13** è stata eseguita presso l'European Synchrotron Radiation Facility di Grenoble (Francia). Si ringraziano la Prof.ssa Alessandra Crispini e la Dott.ssa Pilar-Garcia Orduna per la risoluzione della struttura che hanno effettuato utilizzando un diffrattometro Huber in un singolo

¹⁸² J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991.

¹⁸³ K. Nakamaru, *Bull. Soc. Chem. Jpn.* **1982**, 5, 2697.

¹⁸⁴ T. Mutai, J.-D. Cheon, G. Tsuchiya, K. Araki, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2002**, 2, 862.

asse con una radiazione sincrotrone monocromata ($\lambda = 0,73780 \text{ \AA}$). La struttura è stata risolta e raffinata usando i programmi SHELXS-97¹⁸⁵ e SHELXL-97.¹⁸⁶

L'analisi diffrattometrica del complesso **17** è stata eseguita presso il Laboratorio di DIFFrattometria a RAggi X (LDIFFRAX) del Centro di Eccellenza dell'Università della Calabria. Si ringrazia la Prof.ssa Alessandra Crispini e la Dott.ssa Teresa Mastropietro per la risoluzione della struttura del complesso **13** che hanno effettuato utilizzando un diffrattometro a raggi X per cristallo singolo Bruker-Nonius X8 Apex.

IV.1.4 Microscopia a forza atomica “AFM”. La caratterizzazione AFM dei film depositati del complesso **13** è stata condotta presso l'IPCF-CNR UOS Cosenza del Dipartimento di Fisica dell'Università della Calabria e si ringrazia per la collaborazione la Dott.ssa Federica Ciuchi e la Dott.ssa Caterina Maria Tone.

Per gli studi effettuati è stato utilizzato un microscopio a forza atomica “Nanoscope IIIA, Digital Instruments Bruker Inc. Santa Barbara, CA”, in modalità “*tapping mode*”. Per l'acquisizione dell'immagine topografica sono state utilizzate punte di silicio dello stesso produttore con una frequenza di risonanza di circa 300 KHz e raggio di curvatura di circa 10 nm.

Il complesso è stato depositato su differenti substrati: mica e silicio. Per la deposizione del complesso attraverso la tecnica di Langmuir è stata preparata una soluzione in cloroformio alla concentrazione di 0,9 mg/ml. I film sono stati preparati con acqua millipore (18,2 M Ω cm) usando una vasca NIMA 622/D1/D2. Sono state utilizzate differenti tecniche di Langmuir in relazione alle diverse energie di superficie dei substrati e

¹⁸⁵ Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.*, **1997**, 276, 307.

¹⁸⁶ R.H. Blessing, *Acta Cryst.*, **1995**, A51, 33.

nello specifico è stata utilizzata la tecnica Langmuir-Blodgett (LB) per la mica e quella Langmuir-Schaefer (LS) per il silicio. Inoltre, il complesso è stato depositato tramite tecnica di spin coating (3000 rpm) ed è stato utilizzato uno spin coater Calctec. In questo caso per la deposizione è stata preparata una soluzione in cloroformio, etanolo ed acqua rispettivamente alle concentrazioni di 0,9 mg/ml, 1 mg/ml e 10^{-4} mg/ml.

IV.1.5 Microscopia a fluorescenza polarizzata. La microscopia è stata utilizzata per studiare l' interazione tra i complessi eterolettici di Zn(II) **13** e **14** ed il DNA liquido-cristallino. Tale studio è stato effettuato presso il Dipartimento di chimica, biochimica e biotecnologie per la medicina dell'Università di Milano e si ringrazia il Prof. Tommaso Bellini ed il Dott. Giuliano Zanchetta per l'aiuto e la collaborazione.

Sono state utilizzate soluzioni acquose semi-diluite di oligomeri di DNA sintetici (PRIMM s.r.l., Italia), utilizzando acqua "milliQ" senza buffer. Le sequenze del DNA usate sono: 5'-CGCGAATTCGCG-3' e 5'-AGCGACGTCGCT-3'. Sono state scelte queste sequenze per le seguenti caratteristiche: (i) la capacità di formare LC (cristalli liquidi) colonnari, (ii) l' autocomplementarietà per garantire la formazione completa di eliche; (iii) una lunghezza adeguata ed un rapporto AT /CG così da avere una stabilità termica.

I composti sono stati aggiunti alla soluzione con un rapporto stechiometrico di una molecola di complesso per elica di DNA, così da ridurre al minimo le distorsioni dell' elica, tuttavia, a causa della scarsa solubilità dei composti in acqua (ad eccezione della molecola di Bromuro di etidinio), è rimasto pellet dopo miscelazione e centrifugazione, anche se, in base alla massa misurata di pellet, il rapporto finale complesso:elica è pari a $\approx 1/5$.

Un microlitro della soluzione è stato inserito tra due vetrini di vetro separati da distanziatori di Mylar ($\approx 10 \mu\text{m}$ di divario) ed è stato ulteriormente concentrato per evaporazione fino ad avere domini birifrangenti, quindi i vetrini sono stati sigillati con un olio fluorurato inerte. Le celle preparate con questo metodo sono state riscaldate più volte e molto lentamente tra i 25 e gli 80 °C così da rendere omogenea la concentrazione e quindi garantire la piena interazione tra DNA e composti. I domini LC formati sono rimasti stabili per alcuni giorni. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio Nikon TE200 invertito con una fotocamera DS-5M Nikon. I domini LC sono stati caratterizzati sia con microscopia a trasmissione polarizzata che con microscopia a fluorescenza polarizzata. Il segnale e l'ampiezza della birifrangenza dei domini LC sono stati misurati attraverso un compensatore Berek, che permette di ricostruire la posizione delle eliche all'interno dei domini. Nelle immagini di fluorescenza, la luce incidente è stata polarizzata verticalmente (V) o orizzontalmente (H) attraverso un polarizzatore rotante, così da individuare le molecole di complesso in relazione al loro orientamento all'interno del campione. Le immagini di fluorescenza acquisite con polarizzatore V o H, dopo la sottrazione del background, sono state normalizzate attraverso immagini scattate senza polarizzatore, per eliminare possibili disomogeneità nella concentrazione di complesso presente nel campione. Per effettuare le analisi, sono stati scelti domini LC circolari che hanno garantito una completa rotazione a 360° delle eliche del DNA attorno al difetto centrale. Inoltre, dato che non è possibile modulare l'orientamento lungo l'asse ottico, abbiamo scelto domini con eliche che giacciono nel piano, e si sono adattate le nostre analisi ad una geometria 2D.

Per ogni dominio e per ogni polarizzazione, è stata eseguita una media radiale, correggendo eventuali asimmetrie del dominio (rilevato in microscopia polarizzata trasmessa). L'anisotropia di fluorescenza è stata poi ottenuta dalla media su più domini LC nelle stesse condizioni.

IV.1.6 Citotossicità e inibizione della crescita cellulare. Le prove di citotossicità dei complessi **13** e **14** sulle linee cellulari prostatiche umane DU145, LNCaP e PC-3 e sui neuroblastomi umani SHSY-5Y e LAN-5 sono state eseguite presso l' "Institute of Neurobiology and Molecular Medicine" del CNR di Roma e si ringrazia la Dott.ssa Alessandra Valentini e la Dott.ssa Igea D'Agnano per il contributo dato.

Le linee cellulari prostatiche tumorali umane DU145, LNCaP e PC-3 sono state mantenute in coltura in un mezzo RPMI-1640 (Gibco) addizionato con il 10% di "Fetal Bovine Serum" (Gibco), il 5% di L-Glutammina (Gibco) ed antibiotici, ad una temperatura di 37 °C, contenente il 5% di CO₂ in atmosfera umidificata. La linea cellulare di neuroblastoma umano SHSY-5Y è stata acquistata dall'ATCC (American Type Culture Collection) ed è stata mantenuta in coltura in un mezzo 1:1 di Eagle's Minimum Essential Medium e F12 Medium (Gibco) addizionato con il 10% di "Fetal Bovine Serum" (Hyclone), 2 mM di L-Glutammina, lo 0.5% di amminoacidi non essenziali, lo 0,5% di piruvato di sodio e l' 1% di antibiotici. La linea cellulare di neuroblastoma umano LAN-5 è stata un regalo della Dott. ssa Doriana Fruci ed è stata mantenuta in coltura in un mezzo RPMI-1640 (Gibco) addizionato con il 10% di "Fetal Bovine Serum" (Gibco), 2 mM di L-Glutammina, 100 U/L di penicillina e l' 1% di antibiotici.

Per il saggio citotossico (MTS) e la valutazione della IC₅₀, le cellule sono state piastrate in ciascun pozzetto di una piastra a 96-pozzetti (Falcon-

CA) nel loro mezzo di coltura (100 μ l). In seguito, sia i precursori che i complessi sono stati diluiti nel mezzo di coltura ed un uguale volume di questa soluzione (100 μ l/pozzetto) è stato aggiunto alle cellule piastrate. Dopo l'aggiunta dei composti, le cellule sono state incubate per 72 h (questo trattamento è stato eseguito per tre volte in tre diversi esperimenti). Dopo 72h è stata valutata mediante saggio colorimetrico la sopravvivenza cellulare. In particolare, sono stati aggiunti 15 ml/pozzetto di una soluzione commerciale (Promega) contenente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). Le piastre sono state poi incubate per 2 h a 37 °C e la bioriduzione del colorante è stata quantificata mediante assorbimento a 490 nm. La citotossicità dei farmaci è stata espressa come percentuale del valore dell'assorbanza dei campioni rispetto ai controlli. Il valore della IC₅₀ di ciascun inibitore è stato espresso come la concentrazione in cui si misurerà una riduzione della vitalità cellulare del 50% rispetto ai controlli. Il valore è stato espresso come la media \pm SD di tre esperimenti. Infine, l'IC₅₀ valutata è stata calcolata utilizzando il programma GraFit32.

Le prove di citotossicità sui complessi **4**, **8**, **16** sono state effettuate, inoltre, sempre sulla stessa linea cellulare neuronale SHSY-5Y presso il CNR dell'Università della Calabria, e si ringrazia la Dott.ssa De Bartolo e la Dott.ssa Antonella Piscionieri per la loro collaborazione.

La vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il test MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). In questo test colorimetrico, l'MTT (giallo) è ridotto a formazano (viola) dalla deidrogenasi mitocondriale all'interno delle cellule. In breve, dopo 24h e 48 ore di trattamento con ogni composto, le cellule SHSY-5Y sono state lavate con PBS. Il terreno di coltura in ciascun pozzetto della piastra è

stata sostituito con 100 μ l di MTT (5 mg/ml). Le cellule metabolicamente attive trasformano il sale giallo di tetrazolio MTT in cristalli di formazano viola. Dopo 2 ore di incubazione a 37 C, la reazione è stata stoppata con l'aggiunta di 400 μ l di tampone di lisi (10% SDS, 0,6% di acido acetico in DMSO, pH 4,7). La quantità di formazano prodotto è direttamente proporzionale al numero di cellule vive metabolicamente attive. La densità ottica di ciascun pozzetto è stata misurata a 570 nm mediante l'uso di uno spettrofotometro. I risultati sono stati espressi come percentuale del substrato di controllo PSCD.

IV.1 7. Nanotubi di carbonio “CNTs”. L'incapsulazione del complesso **13** nei nano tubi di carbonio è stata effettuata presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università della Calabria e si ringrazia per la collaborazione il Dott. Giuseppe Cirillo, il Dott. Francesco Puoci ed il Prof. Nevio Picci.

I campioni ottenuti sono stati osservati mediante un microscopio elettronico a scansione (NOVA NanoSEM 200 [0-30 kV], Comm. FEI Company, Hillsboro, OR, USA) e un microscopio elettronico ad alta risoluzione e trasmissione (HRTEM/Tecnai F30 [300 kV] FEI company). La Spettroscopia Fotoelettronica a raggi-X (XPS/PHI 5600-CI, Physical Electronics, Chanhassen, MN, USA) è stata eseguita mediante Al K α radiation. I CNTs sono stati prodotti e forniti dal *Leibniz Institute for Solid State and Materials Research Dresden, Germany*.

La sintesi di CNTs *multi-walled* è stata condotta in un cosiddetto reattore a letto fisso secondo il metodo chiamato CVD (*chemical vapor deposition*) come descritto in letteratura.¹⁸⁷ Una soluzione ultrasonicata

¹⁸⁷ M. Ritschel, A. Leonhardt, D. Elefant, S. Oswald, B. Büchner, *J Phys Chem C*, **2007**, 11, 8414.

di ferrocene in m-xilene produce un aerosol. Il ferrocene si comporta come il precursore del catalizzatore e il m-xilene è la fonte di carbonio. Le goccioline di aerosol (reattore) prodotte dall'ultrasonificazione con una frequenza di eccitazione di 850 kHz o 1.7 MHz sono esposte ad un flusso di Argon in una fornace alla velocità di 100 sccm per rimuovere l'aria. Successivamente per la riduzione catalitica, oltre all'Argon viene aggiunto H₂ nella zona calda del tubo reattore che ha un diametro di 3.5 cm. In questa zona calda del tubo, il solvente evapora e il ferrocene si decompone producendo il catalizzatore di ferro richiesto nella reazione per ottenere i nanotubi. Successivamente, le particelle di ferro catalizzatore si depositano nella parte interna della zona calda del tubo reattore orizzontale (contenitore di quarzo), su un substrato e si comportano da centri attivi di nucleazione per la crescita dei CNTs. Il materiale così ottenuto si purifica al fine di eliminare il carbone amorfo e le particelle di catalizzatore. Ciò avviene usando un metodo a due step, che include un trattamento termico a 450 °C in aria per un'ora e un trattamento con acido cloridrico 6 N per 45 minuti.

La reazione di ossidazione è stata effettuata in accordo con i dati noti in letteratura.¹⁸⁸ 50 mg di CNTs sono stati dispersi in 50 ml di una miscela acido solforico/acido nitrico 3/1 v/v) e sonicati a 40°C per 6 ore. Al termine della reazione, i CNTs vengono filtrati e lavati con un eccesso di acqua distillata.

L'incorporazione del complesso **13** è stata realizzata come riportato in letteratura:¹⁸⁹ 50 mg di CNTs precedentemente ossidati sono stati immersi in 0.5 ml della soluzione del farmaco (1 mg/ml), tenuti sotto

¹⁸⁸ A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, *Curr. Op. Chem. Biol*, **2005**, 9, 674.

¹⁸⁹ M. Curcio, U. G. Spizzirri, F. Iemma, F. Puoci, G. Cirillo, O. I. Parisi, N. Picci, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, **2010**, 76, 50.

continua agitazione per tre giorni ad una temperatura di 40 °C e dopo filtrati ed essiccati a pressione ridotta costante.

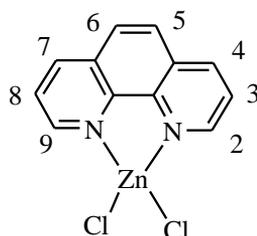
La percentuale dell'efficienza di incapsulazione del farmaco è stata determinata dalle analisi condotte mediante UV in accordo con la seguente equazione:

$$\text{Efficienza di caricamento (\%)} = \frac{C_i - C_0}{C_i} \times 100$$

In questa equazione C_i rappresenta la concentrazione di farmaco in soluzione prima del caricamento e C_0 rappresenta la concentrazione del farmaco in soluzione dopo il caricamento.

IV.2 Sintesi di complessi curcuminici di Zn(II)

IV.2.1. Sintesi di $[(L^1)ZnCl_2]$, 1



500 mg (2,77 mmol) di 1,10-Fenantrolina (L^1) si solubilizzano in circa 50 ml di cloroformio e successivamente si addiziona un leggero eccesso di $ZnCl_2$ (567,26 mg, 4,16 mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente e dopo pochi minuti la soluzione diviene torbida a causa della formazione di un precipitato bianco. La sospensione formata si viene mantenuta per 24 ore sotto agitazione

magnetica a temperatura ambiente. Successivamente si filtra il prodotto bianco che è stato ottenuto con una resa del 90%.

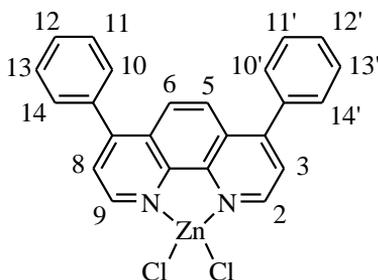
Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare : $316.49 \text{ g mol}^{-1}$
- ✚ Formula molecolare: $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{ZnCl}_2$
- ✚ Punto di fusione: $> 300 \text{ }^\circ\text{C}$
- ✚ Analisi elementare (%):

Teorico:	C= 45.54	H= 2.55	N= 8.55
Sperimentale:	C= 45.12	H= 2.51	N= 8.32
- ✚ IR(KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 1622 (C=C), 1582 (C=N), 3048 (C-H)
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 8.86$ (4H, d, $J=7.33 \text{ H}^{4,7}, \text{H}^{2,9}$), $\delta = 8.26$ (2H, s, $\text{H}^{5,6}$), $\delta = 8.01$ (2H, m, $\text{H}^{3,8}$) ppm.
- ✚ UV-vis in soluzione di DMSO

λ_{abs} ($\epsilon, \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$):	294 nm (8889), 314 nm (1866), 326 nm (1471)
λ_{em}	= 396 nm

IV.2.2 Sintesi di $[(\text{L}^2)\text{ZnCl}_2]$, 2



500 mg (1,5 mmol) di 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (L^2) vengono solubilizzati in circa 50 ml di cloroformio, successivamente si aggiunge

un leggero eccesso di ZnCl_2 (136,28 mg, 2,25mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta, che presenta un aspetto limpido, viene mantenuta per 5 giorni sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Successivamente si filtra su celite in modo da eliminare eventuali residui di ZnCl_2 non reagito, si concentrano le acque madri ed il prodotto viene precipitato da cloroformio-etere etilico. Il complesso **3** si presenta di colore bianco e di consistenza cristallina ed è stato ottenuto con una resa del 92%.

Caratterizzazione

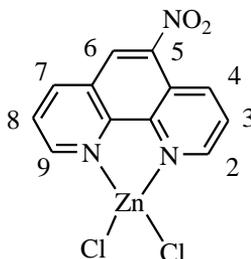
- ✚ Massa molecolare : $468.68 \text{ g mol}^{-1}$
- ✚ Formula molecolare: $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{ZnCl}_2$
- ✚ Punto di fusione: $> 300^\circ\text{C}$
- ✚ Analisi elementare (%):

Teorico:	C= 61.50	H= 3.44	N= 5.98
Sperimentale:	C= 61.31	H= 3.43	N= 5.81
- ✚ IR(KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 1618 (C=C), $\nu = 1559$ (C=N), 3055 (C-H)
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 9.07$ (1H, s, H^2), $\delta = 8.31$ (1H, s, H^9), $\delta = 8.13$ (2H, s, $\text{H}^{5,6}$), $\delta = 8.04$ (2H, d, $J=5.13$, $\text{H}^{3,8}$), $\delta = 7.66$ (10H, m, $\text{H}^{10,10'}$, $\text{H}^{11,11'}$, $\text{H}^{12,12'}$, $\text{H}^{13,13'}$, $\text{H}^{14,14'}$) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di DMSO

λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$):	282 nm (19840), 319 (5440)
---	----------------------------

$$\lambda_{\text{em}} = 383 \text{ nm}$$

IV.2.3 Sintesi di $[(L^3)ZnCl_2]$, 3



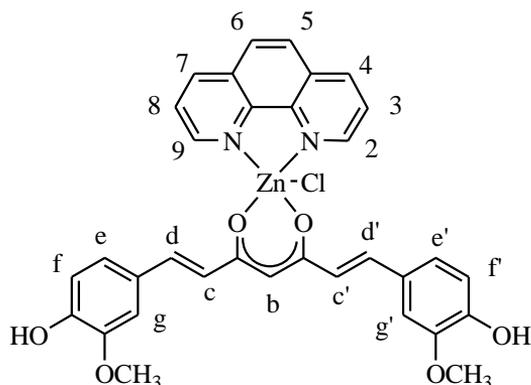
500 mg (2,22 mmol) della 5-nitro-1,10-fenantrolina (L^3) vengono solubilizzati in circa 60 ml di cloroformio, successivamente si addiziona la corrispondente quantità di $ZnCl_2$ (453.84 mg, 3,33 mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione magnetica ed a temperatura ambiente. La soluzione si presenta inizialmente limpida e di colore giallo, dopo circa 15 minuti si ha la formazione di un precipitato giallino. La sospensione formata si viene mantenuta per 24 ore sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Successivamente si filtra un solido giallino che è stato ottenuto con una resa pari al 75%.

Caratterizzazione

✚ Massa molecolare :	361.50 g mol ⁻¹
✚ Formula molecolare:	$C_{12}H_7N_3ZnCl_2$
✚ Punto di fusione:	>300°C
✚ Analisi elementare (%):	
Teorico:	C= 39.87 H= 1.95 N= 11.67
Sperimentale:	C= 39.72 H= 1.89 N= 11.53
✚ IR(KBr) (ν_{max}/cm^{-1}):	1619 cm ⁻¹ (C=C), 1582 cm ⁻¹ (C=N), 3055 cm ⁻¹ (C-H)

✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 9.29$ (1H, s, H⁶), $\delta = 9.18$ (2H, d, J=8.81Hz, H^{2,9}), $\delta = 9.08$ (2H, d, J=7.7Hz, H^{4,7}), $\delta = 8.15$ (2H, d, J=4.4Hz, H^{3,8}) ppm

IV.2.4 Sintesi di $[(\text{L}^1)\text{Zn}(\text{curc})(\text{Cl})]$, **4**

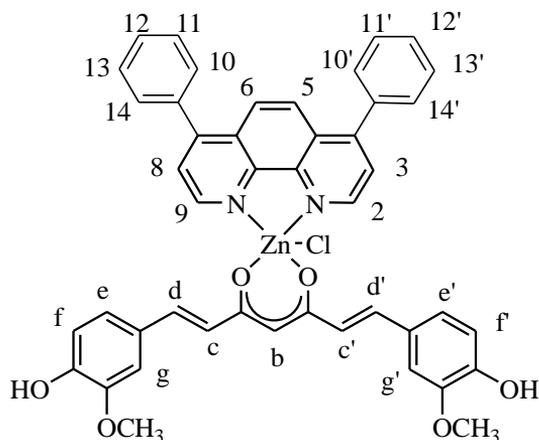


173,15 mg (0,47 mmol) di curcumina (curc) vengono solubilizzati a caldo in circa 50 ml di metanolo, quindi sotto azoto e sotto agitazione magnetica si aggiunge la trietilammina (47,56 mg, 0,47 mmol). La soluzione passa da arancione ad una colorazione rossa intensa. Si lascia la miscela, sempre, sotto agitazione magnetica per 10 minuti trascorsi i quali si aggiungono 150 mg (0,47 mmol) del complesso precursore **1** sciolto in 2 ml di DMSO. La soluzione cambia nuovamente colore divenendo arancione chiaro e si ha la formazione di un precipitato. Dopo circa 24 h, si filtra e si lava il prodotto isolato, un solido arancio chiaro, nuovamente con metanolo per eliminare eventuali residui di curcumina non reagita. Il prodotto è stato ottenuto con una resa pari al 54%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare : 648.49 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₃₃H₂₇O₆N₂ZnCl
- ✚ Punto di fusione: 240°C
- ✚ Analisi elementare (%):
 - Teorico: C= 61.12 H= 4.19 N= 4.33
 - Sperimentale: C= 61.04 H= 4.15 N= 4.18
- ✚ IR(KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1625 (C=O curc), 1589 (C=N), 1513 (C-C curc)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 9.49$ (2H, s, H^{2,9}), $\delta = 8.89$ (2H, d, J=7.67 Hz, H^{4,7}), $\delta = 8.27$ (2H, s, H^{5,6}), $\delta = 8.14$ (2H, s, H^{3,8}), $\delta = 7.50$ (2H, s, H^{d,d'}), $\delta = 7.27$ (2H, s, H^{g,g'}), $\delta = 7.10$ (2H, s, H^{e,e'}), $\delta = 6.78$ (2H, d, J=8.11 Hz, H^{f,f'}), $\delta = 5.72$ (2H, d, J=15.34 Hz, H^{c,c'}), $\delta = 5.72$ (1H, s, H^b), $\delta = 3.82$ (3H, s, OCH₃) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di DMSO
 - λ_{abs} (ϵ , mol⁻¹ dm³ cm⁻¹): 295 nm (5201), 406 (12925), 432 nm (20336), 453 nm (18440)
 - $\lambda_{\text{em}} = 545$ nm

IV.2.5 Sintesi di $[(L^2)Zn(curc)(Cl)]$, **5**



117,88 mg (0,32 mmol) di curc vengono solubilizzati a caldo in circa 50 ml di metanolo, successivamente sotto azoto e sotto agitazione magnetica si addiziona la trietilammina (32,38 mg, 0,32 mmol). La soluzione passa da arancione ad una colorazione rosso intenso. Si lascia sempre sotto agitazione magnetica per 10 minuti, quindi si addizionano 150 mg (0,32 mmol) del complesso precursore **2** sciolto in 6-8 ml di metanolo. La soluzione cambia nuovamente colore passando ad arancione, e si nota la graduale formazione di un precipitato del medesimo colore. Dopo circa 24h, si filtra e si lava il prodotto isolato, un solido arancio intenso, nuovamente con metanolo per eliminare eventuali residui di curc. La resa ottenuta è del 65%.

Caratterizzazione

✚ Massa molecolare :	801.75 g mol ⁻¹
✚ Formula molecolare:	C ₄₃ H ₃₆ O ₆ N ₂ ZnCl
✚ Punto di fusione:	225°C

✚ Analisi elementare (%):

Teorico: C= 67.41 H= 4.52 N= 3.51

Sperimentale: C= 67.13 H= 4.36 N= 3.44

✚ IR(KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1625 (C=O curc), 1589 (C=N),
 $\nu = 1513 \text{ cm}^{-1}$ (C-C curc)

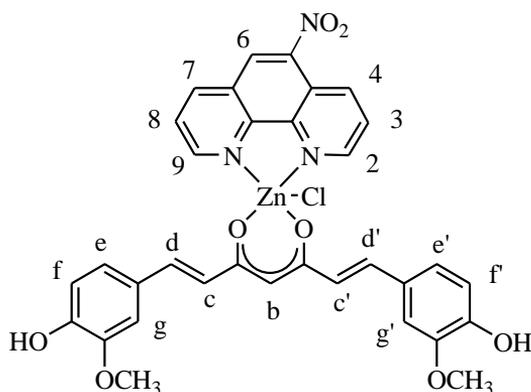
✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 9.57$ (2H, s, $\text{H}^{2,9}$), $\delta = 8.37$ (4H, s, $\text{H}^{5,6}$, $\text{H}^{3,8}$), $\delta = 7.15$ (10H, t, $\text{H}^{10,10'}$, $\text{H}^{11,11'}$, $\text{H}^{12,12'}$, $\text{H}^{13,13'}$, $\text{H}^{14,14'}$), $\delta = 7.27$ (2H, s, $\text{H}^{\text{g},\text{g}'}$), $\delta = 6.75$ (4H, s, $\text{H}^{\text{e},\text{e}'}$, $\text{H}^{\text{f},\text{f}'}$), $\delta = 6.68$ (2H, s, $\text{H}^{\text{c},\text{c}'}$), $\delta = 5.75$ (1H, s, H^{b}), $\delta = 3.81$ (3H, s, OCH_3) ppm

✚ UV-vis in soluzione di DMSO

λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$): 278 nm (30380), 320 (10922), 404 nm (21288), 431 nm (35711), 453 nm (32311)

$\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$

IV.2.6 Sintesi di $[(\text{L}^3)\text{Zn}(\text{curc})(\text{Cl})]$, **6**



150 mg (0,42 mmol) di curc vengono solubilizzati a caldo in circa 40 ml di metanolo, successivamente sotto azoto e sotto agitazione magnetica si addiziona la trietilammina (42,5 mg, 0,42 mmol). La soluzione passa da arancione ad una colorazione rossa intensa. Si lascia sempre sotto

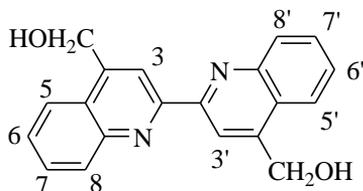
agitazione magnetica per 10 minuti, quindi si aggiungono 150 mg (0,42 mmol) del complesso precursore **3** sciolto in 5 ml di acqua. La soluzione cambia nuovamente colore schiarendo ad arancione, e si nota la graduale formazione di un precipitato rosso. Dopo circa 24 h, si filtra e si lava il prodotto isolato, come solido rosso, nuovamente con acqua e successivamente con metanolo per eliminare eventuali residui di complesso precursore o di curc non reagiti. La resa ottenuta è pari al 41%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare : $694.39 \text{ g mol}^{-1}$
- ✚ Formula molecolare: $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{N}_3\text{ZnCl}$
- ✚ Punto di fusione: $225 \text{ }^\circ\text{C}$
- ✚ Analisi elementare (%):

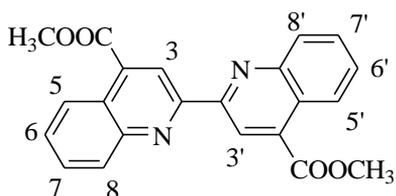
Teorico:	C= 57.09	H= 3.92	N= 6.05
Sperimentale:	C= 56.93	H= 3.82	N= 6.03
- ✚ IR(KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 1621 (C=O curc), 1588 (C=N), 1495 (C-C curc), 3065 (C-H aromatici)
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 9.26$ (5H, m, H^6 , $\text{H}^{4,7}$, $\text{H}^{2,9}$), $\delta = 8.11$ (2H, m, $\text{H}^{3,8}$), $\delta = 7.15$ (6H, m, $\text{H}^{\text{c,c'}}$, $\text{H}^{\text{g,g'}}$, $\text{H}^{\text{f,f'}}$), $\delta = 6.75$ (4H, m, $\text{H}^{\text{e,e'}}$, $\text{H}^{\text{d,d'}}$), $\delta = 5.85$ (1H, s, H^{b}), $\delta = 3.81$ (3H, s, OCH_3)
ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di DMSO :
 λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$): 351 nm (13142), 413nm (32232), 435 nm (41910), 456 nm (36044)
 $\lambda_{\text{em}} = 543 \text{ nm}$

IV.2.7 Sintesi del legante L⁴



Il legante L⁴ è stato preparato in due stadi:

I step, Sintesi del precursore I

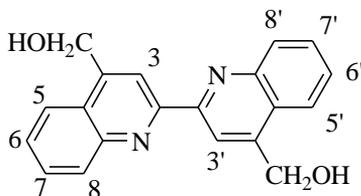


Ad una sospensione bianca in metanolo (300 ml) di acido 4,4'-dicarbossilico-2,2'-bichinolina (2 g, 5.8 mmol) vengono aggiunti 40 ml di acido solforico, ottenendo una sospensione gialla che viene lasciata sotto agitazione magnetica ed a riflusso fino a completa solubilizzazione (24h). Si concentra la soluzione a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato estratto da diclorometano ed una soluzione satura di idrossido di sodio. Si estrae la fase organica per tre volte, si anidifica con solfato di sodio anidro e si filtra. Dopo aver allontanato il solvente per evaporazione il residuo si ricristallizza da diclorometano/metanolo. Il prodotto è stato ottenuto come un solido bianco con una resa dell' 88%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: 372.38 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₂₂H₁₆N₂O₄
- ✚ Punto di fusione: 288 °C
- ✚ Analisi Elementare (%):
- | | | | |
|---------------|-----------|----------|----------|
| Teorico: | C = 70.20 | H = 5.35 | N = 7.44 |
| Sperimentale: | C = 70.43 | H = 5.21 | N = 7.09 |
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1732 (C=O)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ_{H} , 9.33 (2H, s, H^{3,3'}), 8.82 (2H, d, J_(H,H) = 8.4Hz, H^{8,8'}), 8.33 (2H, d, J_(H,H) = 8.43Hz, H^{5,5'}), 7.83 (2H, td, J_(H,H) = 7.7Hz, J_(H,H) = 1.5Hz, H^{6,6'}), 7.70 (2H, td, J_(H,H) = 7.95Hz, J_(H,H) = 1.29Hz, H^{7,7'}), 4.13 (6H, s, -CH₃) ppm

II step, Sintesi del legante L⁴



Ad una sospensione in etanolo (150 ml) del precursore **I** (1.9 g, 5.1 mmol) viene aggiunto un eccesso di boro idruro di sodio (4.6 g, 122.2 mmol), ottenendo una sospensione che viene lasciata sotto agitazione magnetica e a riflusso fino a completa solubilizzazione (5 h). La soluzione trasparente ottenuta viene fatta raffreddare e vi si aggiunge lentamente una soluzione satura di cloruro di ammonio fino alla formazione di un precipitato bianco. Si filtra il precipitato ottenuto e si

lava abbondantemente con acqua distillata e si ottiene un solido debolmente giallo con una resa del 90%.

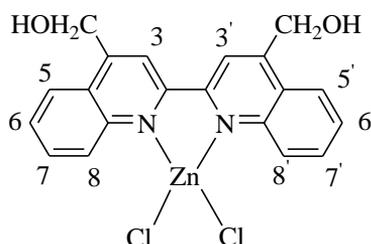
Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: $316.36 \text{ g mol}^{-1}$
- ✚ Formula molecolare: $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$
- ✚ Punto di fusione: $> 300 \text{ }^\circ\text{C}$
- ✚ Analisi Elementare (%):

Teorico:	C = 75.93	H = 5.10	N = 8.86
Sperimentale:	C = 75.85	H = 5.20	N = 8.44
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3202 (OH), 2849 (-CH₂), 1597 (C-C)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ_{H} , 8.93 (2H, s, H^{3,3'}), 8.21 (4H, d, $J_{(\text{H,H})} = 8.44\text{Hz}$, H^{8,8'}), 8.10 (4H, d, $J_{(\text{H,H})} = 8.07\text{Hz}$, H^{5,5'}), 7.82 (2H, t, $J_{(\text{H,H})} = 7.67 \text{ Hz}$, H^{7,7'}), 7.66 (2H, t, $J_{(\text{H,H})} = 7.66 \text{ Hz}$, H^{6,6'}), 5.74 (2H, t, $J_{(\text{H,H})} = 5.14\text{Hz}$, -OH), 5.15 (4H, d, $J_{(\text{H,H})} = 5.14 \text{ Hz}$, CH₂) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di DMSO

λ_{abs} ($\epsilon, \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$):	317 (30175), 328 (32395), 339 (26619)
--	---------------------------------------

IV.2.8 Sintesi di [(L⁴)ZnCl₂], 7



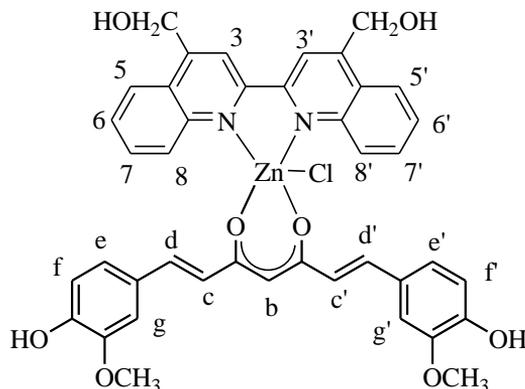
Ad una soluzione del legante L^4 (700 mg, 1.88 mmol) in acetone (140 ml) si aggiunge un leggero eccesso di $ZnCl_2$ (384.31 mg, 2.82 mmol). Si ottiene una sospensione gialla che viene mantenuta sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente per 24 h. Il prodotto viene isolato mediante filtrazione con resa del 82% e si presenta come un solido giallo.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: $452.64 \text{ g mol}^{-1}$
- ✚ Formula molecolare: $C_{20}H_{16}N_2O_2ZnCl_2$
- ✚ Punto di fusione: $>300^\circ\text{C}$
- ✚ Analisi Elementare (%):

Teorico:	C = 53.07	H = 3.56	N = 6.21
Sperimentale:	C = 53.20	H = 3.30	N = 6.10
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3517 (OH), 3121-3079(CH), 2907 (CH₂), 1614 (C-C)
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} , 8.90 (2H, s, $H^{3,3'}$), 8.20 (2H, d, $J_{(\text{H,H})} = 8.07\text{Hz}$, $H^{8,8'}$), 8.05 (2H, d, $J_{(\text{H,H})} = 7.7\text{Hz}$, $H^{5,5'}$), 7.82 (2H, t, $J_{(\text{H,H})} = 14.67 \text{ Hz}$, $H^{7,7'}$), 7.67(2H,t, $J_{(\text{H,H})} = 7.34 \text{ Hz}$, $H^{6,6'}$), 5.75 (2H, s, -OH), 5.15 (4H, d, $J_{(\text{H,H})} = 4.77 \text{ Hz}$, -CH₂) ppm

IV.2.9 Sintesi di $[(L^4)Zn(cure)(Cl)]$, **8**



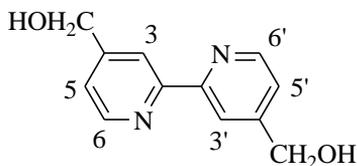
100 mg (0.27mmol) di curc vengono sciolti in 20 ml di metanolo ottenendo una soluzione arancione, alla quale viene aggiunta la trietilammina (27.42 mg, 0.27 mmol) sotto azoto ed a temperatura ambiente. In questo modo la soluzione subisce una variazione di colore da arancione a rosso acceso. Vengono poi aggiunti 122.5 mg (0.27 mmol) del complesso precursore **7** preventivamente sciolti in 1 ml di DMSO, ottenendo in questo modo una sospensione rossa. La soluzione viene lasciata sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 24 h. Si prosegue con una filtrazione, ottenendo un solido di colore rosso, con una resa del 54%.

Caratterizzazione

✚ Massa molecolare:	784.64 g mol ⁻¹
✚ Formula molecolare:	C ₄₁ H ₃₆ N ₂ O ₈ ZnCl
✚ Punto di fusione:	> 300°C
✚ Analisi Elementare (%):	
Teorico:	C = 62.76 H = 4.49 N = 3.58
Sperimentale:	C = 62.45 H = 4.34 N = 3.28

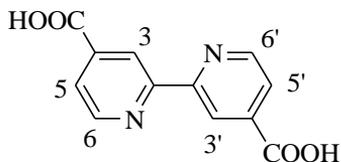
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400 (OH curcumina), 1619 (C=C), 1510 (C-C-C anello chelato curcumina), 1590 (C=O).
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ_{H} , 8.5 (s, 2H, $\text{H}^{3,3'}$), 7.82 (d, 2H, $\text{H}^{8,8'}$, $J = 20.54$ Hz), 7.71 (d, 2H, $\text{H}^{5,5'}$, $J = 24.95$ Hz), 7.48 (t, 2H, $\text{H}^{7,7'}$, $J = 38.51$ Hz), 7.28 (t, 2H, $\text{H}^{6,6'}$, $J = 20.72$ Hz), (s_{br} 2H $\text{H}^{\text{d,d'}}$), (s_{br} 2H $\text{H}^{\text{g,g'}}$), (s_{br} 2H $\text{H}^{\text{e,e'}}$), (s_{br} 2H $\text{H}^{\text{f,f'}}$), (s_{br} 2H $\text{H}^{\text{c,c'}}$), 5.33 (t, 1H, H^{b} , $J = 5.51$ Hz), 4.71 (d, 4H, CH_2 , $J = 5.13$ Hz), 3.37(s, 6H, OCH_3) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di DMSO
 λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$): 313 nm (17213), 340 nm (16372), 430 nm (32528), 450 nm (29854)
 $\lambda_{\text{em}} = 540$ nm

IV.2.10 Sintesi del legante **L**⁶



Il legante **L**¹ è stato preparato in tre step:

*I step: Sintesi del precursore **II***

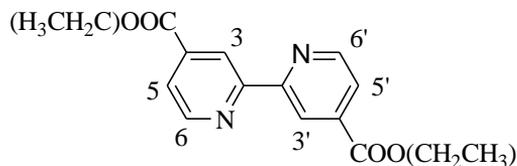


5.0 g (23.6 mol) di 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina sono stati sciolti in 175 ml di acido solforico. La reazione è stata condotta sotto agitazione e ad una temperatura di circa 70 °C. Alla soluzione risultante vengono aggiunti 32 g di dicromato di potassio, monitorando costantemente la temperatura affinché non superi gli 80 °C. Una volta che tutto il dicromato aggiunto è andato in soluzione, si lascia raffreddare la miscela fino a temperatura ambiente e viene poi addizionata lentamente ad una miscela di acqua e ghiaccio di circa 500 ml. Il precipitato ottenuto viene filtrato, lavato con acqua distillata e seccato a pressione ridotta. Il solido giallino risultante viene poi purificato ponendolo a riflusso in 175 ml di acido nitrico al 65%, sotto agitazione magnetica. Dopo sei ore, la soluzione giallina viene nuovamente versata in una miscela contenente acqua e ghiaccio ottenendo un precipitato che è stato filtrato, lavato con acqua e acetone e seccato a pressione ridotta. Il prodotto (**II**) è stato ottenuto come un solido bianco con una resa dell' 92%.

Caratterizzazione

✚ Massa molecolare:	244.20 g mol ⁻¹
✚ Formula molecolare:	C ₁₂ H ₈ O ₄ N ₂
✚ Punto di fusione:	> 300°C
✚ Analisi Elementare (%):	
Teorico:	C = 59.02 H = 3.30 N = 11.47
Sperimentale:	C = 58.90 H = 3.17 N = 11.38
✚ IR(KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$):	3113 (OH), 1732 (C=O), 1600-1450 (C-C)
✚ ¹ H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆):	δ_{H} , 13.77 (2H, s, OH), 8.91 (2H, d, H ^{5,5'}), 8.83 (2H, s, H ^{3,3'}), 7.91 (2H, d, H ^{6,6'}) ppm

II step: Sintesi del precursore **III**

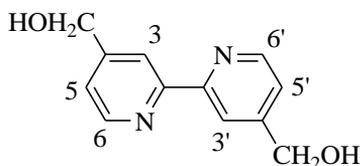


Una sospensione del precursore **II** (3.0 g) in 130 ml di etanolo e 7,5 ml di acido solforico è stata mantenuta sotto agitazione magnetica ad 80 °C per 24 h. Il solvente viene poi allontanato mediante evaporazione a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato estratto da cloroformio ed una soluzione satura di bicarbonato di sodio. Si estrae la fase organica per 4 volte, si anidifica con sodio solfato anidro e si filtra. Dopo aver allontanato il solvente per evaporazione il residuo si ricristallizza da cloroformio/metanolo. Il prodotto **III**, un solido bianco, è stato ottenuto con una resa del 91%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: 300.31 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₁₆H₁₆O₄N₂
- ✚ Punto di fusione: 150°C
- ✚ Analisi Elementare (%):
 - Teorico: C = 63.99 H = 5.37 N = 9.33
 - Sperimentale: C = 63.45 H = 5.11 N = 9.27
- ✚ IR (KBr) (ν_{max}/cm⁻¹): 2990-2908 (CH), 1726 (C=O), 1595-1450 (C-C)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ_H, 8.96 (s, 2H, H^{6,6'}), 8.87 (d, 2H, J_{(H,H)}} = 4.89 Hz, H^{5,5'}), 7.92 (d, 2H, J_{(H,H)}} = 4.89 Hz, H^{3,3'}), 4.46 (q, 4H, -OCH₂CH₃), 1.45 (t, 6H, J_{(H,H)}} = 7.21 Hz, -CH₃) ppm

III step: Sintesi del legante **L⁶**



Ad una soluzione del precursore **III** (3.17 g, 10.5 mmol), in 200 ml di etanolo, è stato aggiunto un eccesso di boro idruro di sodio (8 g, 221.67 mmol). La sospensione bianca ottenuta è stata lasciata a riflusso per 3 h. Si prosegue poi con l'aggiunta di 320 ml di una soluzione acquosa satura di cloruro di ammonio, mantenendo l'agitazione. Dalla soluzione risultante è stato allontanato l'etanolo a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato poi estratto con acetato di etile. Si anidrifca la fase organica con sodio solfato anidro, si filtra e dopo aver allontanato il solvente a pressione ridotta, si ricristallizza da etanolo/esano. Il prodotto **L⁶** è un solido bianco, ottenuto con una resa del 95%.

Caratterizzazione

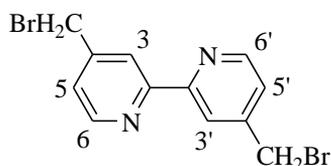
- ✚ Massa molecolare: 216.24 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₁₂H₁₂O₂N₂
- ✚ Punto di fusione: 181 °C
- ✚ Analisi Elementare (%):
 - Teorico: C = 66.59 H = 5.56 N = 12.95
 - Sperimentale: C = 66.55 H = 5.34 N = 12.70
- ✚ IR (KBr) (ν_{max}/cm⁻¹): 3369 (OH), 2886-2832 (CH), 1601-1458 (C-C)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ_H, 8.58(dd, 2H, J_{m(H,H)} = 0.74 Hz, J_{o(H,H)} = 20.46 Hz, H^{5,5'}), 8.36 (s, 2H, H^{6,6'}), 7.35 (dd, 2H,

$J_{m(H,H)} = 0.74$, $J_{o(H,H)} = 10.27$ Hz, $H^{3,3'}$, 5.53(s, 2H, -OH), 4.62
(d, 4H, $J_{(H,H)} = 4.4$ Hz, -CH₂) ppm

UV-vis in soluzione di DMSO

λ_{abs} (ϵ , mol⁻¹ dm³ cm⁻¹): 285 (12891)

IV.2.11 Sintesi del legante L⁷



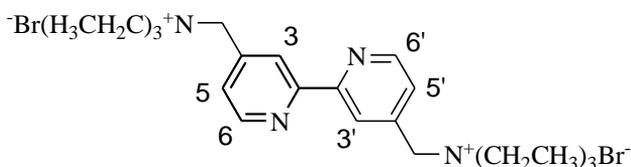
700 mg del legante L⁶ (2.87 mmol) vengono sciolti in una miscela di HBr e H₂SO₄ in un rapporto 3:1 (10.5 ml e 3.5 ml rispettivamente). Si ottiene in questo modo una soluzione giallina che rimane sotto agitazione magnetica, a riflusso, per sei ore. La soluzione viene poi raffreddata in un bagno di acqua/ghiaccio e viene poi trattata con una soluzione satura di idrossido di sodio, monitorando costantemente il pH, fino al raggiungimento della neutralità. La sospensione rosa così ottenuta viene poi filtrata, ottenendo un solido rosa con una resa del 78 %.

Caratterizzazione

Massa molecolare:	342.14g mol ⁻¹
Formula molecolare:	C ₁₂ H ₁₀ Br ₂ N ₂
Punto di fusione:	133 °C
Analisi Elementare (%):	
Teorico:	C = 42.12 H = 2.94 N = 8.22
Sperimentale:	C = 42.03 H = 2.73 N = 8.12

- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1596 (C=C), 1557 (C=N), 3020 (C-H alifatici)
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHCl_3): δ_{H} , 8.66 (d, 2H, $\text{H}^{6,6'}$ $J = 5.03$), 8.43 (s, 2H, $\text{H}^{3,3'}$), 7.36(d, 2H, $\text{H}^{5,5'}$, $J = 3.65$), 4.48 (s, 4H, $-\text{CH}_2$) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di metanolo
 λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$): 287 (16446), 250 (5803), 242 (15708)

IV.2.12 Sintesi del legante \mathbf{L}^8



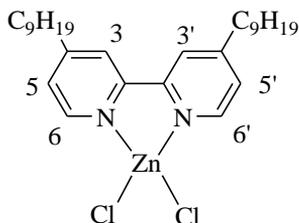
Il legante \mathbf{L}^8 è stato sintetizzato a partire dal legante \mathbf{L}^7 in unico step di sintesi. Ad una soluzione di 400 mg (1.08 mmol) del legante \mathbf{L}^7 in diclorometano (20 ml), viene aggiunto un leggero eccesso di trietilammina (0.302 ml). La soluzione viene lasciata sotto agitazione magnetica per circa 48 h. Successivamente si filtra il precipitato rosa tenue ottenuto con una resa del 97%.

Caratterizzazione

✚ Massa molecolare:	544.65 g mol ⁻¹
✚ Formula molecolare:	$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{Br}_2\text{N}_4$
✚ Punto di fusione:	decompone a 240° C
✚ Analisi Elementare (%):	
Teorico:	C = 52.92 H = 7.40 N = 10.33
Sperimentale:	C = 52.77 H = 7.17 N = 10.14

- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1594 (C=C), 1556 (C=N), 2991 (C-H alifatici)
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ_{H} , 8.75 (d, 2H, $\text{H}^{6,6'}$, $J = 5.15$ Hz), 8.15 (d, 2H, $\text{H}^{3,3'}$, $J = 1.02$ Hz), 7.64 (dd, 2H, $\text{H}^{5,5'}$, $J_{\text{m(H,H)}} = 1.763$ Hz, $J_{\text{o(H,H)}} = 10.37$ Hz), 4.5 (s, 4H, CH_2N), 1.4 (t, 18H, CH_3 , $J = 7.194$ Hz) ppm.
- ✚ UV-vis in soluzione in soluzione di H_2O
 $\lambda_{\text{abs}}(\epsilon, \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1})$: 237 (7919), 287 (10172).
 $\lambda_{\text{em}} = 336$ nm

IV.2.13 Sintesi di $[(\text{L}^5)\text{ZnCl}_2]$, **9**



Ad una soluzione di 4,4'-dionil-2,2'-bipiridina (L^5) (0.500 g, 1.22 mmol) in diclorometano (20 ml) è stato aggiunto in eccesso il cloruro di zinco (0.250 g, 1.83 mmol). La sospensione risultante è stata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per sei giorni, quindi filtrata su celite ed il solvente evaporato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo ottenuto è stato poi ricristallizzato da cloroformio-etero etilico per dare il prodotto pulito sotto forma di solido bianco, con una resa del 78%.

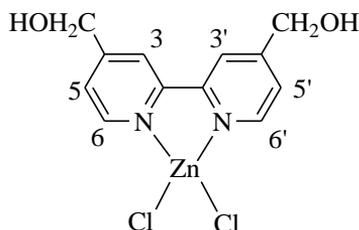
Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: $544.96 \text{ g mol}^{-1}$
- ✚ Formula molecolare: $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{ZnCl}_2$

- ✚ Punto di fusione: 150°C
- ✚ Analisi Elementare (%):

Teorico:	C = 61.71	H = 8.14	N = 5.14
Sperimentale:	C = 61.31	H = 8.11	N = 5.04
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2921, 2852 (CH), 1617 (C=C), 1556 (C=N)
- ✚ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} , 8.68 (d, 2H, $J(\text{H,H}) = 5.3$ Hz, $\text{H}^{3,3'}$), 8.01 (s, 2H, $\text{H}^{1,1'}$), 7.51 (d, 2H, $J(\text{H,H})=5.3\text{Hz}, \text{H}^{2,2'}$), 2.83 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 1.71 (m, 4H, CH_2CH_3), 1.27 (m, 24H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.88 (t, 6H, $J(\text{H,H}) = 6.6$ Hz, CH_3) ppm

IV.2.14 Sintesi di $[(\text{L}^6)\text{ZnCl}_2]$, **10**



Ad una soluzione del legante L^6 (800 mg, 3.7 mmol) in acetone (60 ml) si aggiunge un eccesso di cloruro di zinco (756.3 mg, 5.5 mmol). La sospensione ottenuta viene lasciata per 24 h sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente. Il precipitato ottenuto viene filtrato e lavato abbondantemente con acetone. Il complesso **10** è un solido bianco ottenuto con resa del 88%.

Caratterizzazione

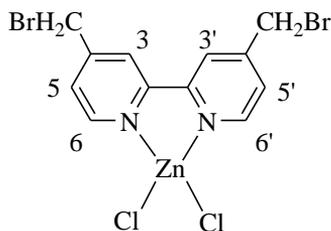
- ✚ Massa molecolare: 352.53 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{ZnCl}_2$

- ✚ Punto di fusione: >300°C
- ✚ Analisi Elementare (%):

Teorico:	C = 40.88	H = 3.43	N = 7.95
Sperimentale:	C = 40.67	H = 3.36	N = 7.88
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3483 (OH), 3080 (CH), 2920-2889 (CH₂), 1619 (C-C)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ_{H} , 8.50 (4H, d, $J_{(\text{H,H})} = 14.31\text{Hz}$, H^{5,5'}, H^{6,6'}), 7.58 (2H, s, H^{3,3'}), 5.72 (2H, s, -OH), 4.70 (4H, d, $J_{(\text{H,H})} = 5.5\text{Hz}$, -CH₂) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di acqua

λ_{abs} (ϵ , mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹):	246 (3395), 258 (1830), 282 (4907),
	293 (7962), 304 (7256)
λ_{em}	= 325 nm

IV.2.15 Sintesi di [(L⁷)ZnCl₂], **11**

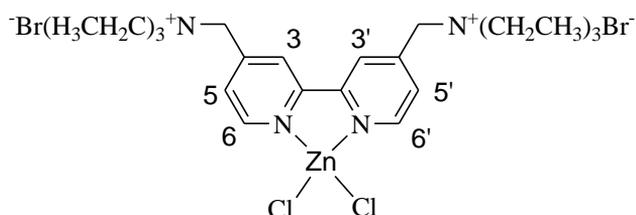


Ad una soluzione del legante **L**⁷ (350 mg, 0.945 mmol) in diclorometano (20 ml) si aggiunge un eccesso di cloruro di zinco (193 mg, 1.418 mmol). La sospensione ottenuta viene lasciata per 48 h sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente. Il precipitato ottenuto viene filtrato e lavato abbondantemente con acetone. Il complesso **11** è un solido rosa ottenuto con resa del 84%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: 478.43 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₁₂H₁₀N₂Br₂ZnCl₂
- ✚ Punto di fusione: 267°C
- ✚ Analisi Elementare (%):
 - Teorico: C = 30.01 H = 2.10 N = 5.88
 - Sperimentale: C = 29.92 H = 1.92 N = 5.72
- ✚ IR (KBr) (ν_{max}/cm⁻¹): 1611 (C=C), 1559 (C=N), 2967 (C-H alifatici)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ_H, 8.62 (m, 4H, H^{6,6'}, H^{3,3'}), 7.62 (s_{br}, H^{5,5'}, 2H), 4.84 (m, 4H, -CH₂) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di metanolo
 - λ_{abs} (ε, mol⁻¹ dm³ cm⁻¹): 250 (1396), 300 (1533), 311 (1217)
 - λ_{em} = 326 nm

IV.2.16 Sintesi di [L⁸ZnCl₂], **12**

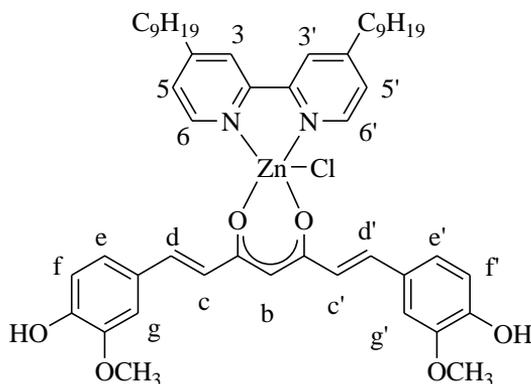


Ad una soluzione del legante **L⁸** (150 mg, 0.31 mmol) in acqua (10ml) si aggiunge il cloruro di zinco (63 mg, 0.46 mmol). La sospensione ottenuta viene lasciata per 48 h sotto agitazione magnetica ed a temperatura ambiente. Si il precipitato che viene lavato abbondantemente con etanolo. Il complesso **12** è un solido biancastro ottenuto con resa del 77%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: 608.94 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₂₄H₄₀N₄Br₂ZnCl₂
- ✚ Punto di fusione: 265°C
- ✚ Analisi Elementare (%):
 - Teorico: C = 42.33 H = 5.92 N = 8.26
 - Sperimentale: C = 42.17 H = 5.74 N = 8.05
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2978 (C-H alifatici), 1618 (C=C), 1563 (C=N), 3065 (C-H aromatici).
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ_{H} , (s_{br}, 2H, H^{6,6'}), 8.65 (s, 2H, H^{3,3'}), 8.0 (d, 2H, H^{5,5'}, J = 4.46 Hz), 4.66 (s, 4H, CH₂N), 1.41 (t, 18H, J = 7.06 Hz) ppm.
- ✚ UV-vis in soluzione di acqua
 - λ_{abs} (ϵ , mol⁻¹ dm³ cm⁻¹): 237 (11676), 288 (14838), 282 (4907).
 - λ_{em} = 335 nm

IV.2.17 Sintesi di [(L⁵)Zn(curc)(Cl)], 13



210 mg (0.56 mmol) di curc vengono sciolti in 10 ml di diclorometano ottenendo una soluzione arancione, alla quale viene aggiunta la

trietilammina (60 mg, 0.56 mmol) sotto azoto ed a temperatura ambiente. In questo modo la soluzione subisce una variazione di colore da arancione a rosso acceso. Vengono poi aggiunti 230 mg (0.56 mmol) del complesso precursore **9** preventivamente sciolti in 10 ml di diclorometano, ottenendo in questo modo una soluzione arancio che è stata lasciata sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 3 giorni a temperatura ambiente. Dopo evaporazione del solvente a pressione ridotta, il rimanente residuo arancio è stato ricristallizzato da metanolo, così da ottenere il prodotto puro di colore giallo-verde con una resa del 56%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: 876.89 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₄₉H₆₃N₂O₆ZnCl
- ✚ Punto di fusione: 200°C
- ✚ Analisi Elementare (%):

Teorico:	C = 67.12	H = 7.24	N = 3.19
Sperimentale:	C = 66.80	H = 6.93	N = 3.10
- ✚ IR (KBr) (ν_{max}/cm⁻¹): 3325 (-OH curc), 2925,2852 (C-H alifatici), 1624 (C=C), 1606 (C=O), 1545 (C=N), 1511 (C-C-C anello chelato)
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δH, 9.18 (d, 2H, J(H,H) = 5.1 Hz, H^{3,3'}), 7.94 (s, 2H, H^{1,1'}), 7.55 (d, 2H, J(H,H) = 15.4 Hz, H^{d,d'}), 7.46 (d, 2H, J(H,H) = 5.1 Hz, H^{2,2'}), 7.06 (d, 4H, J(H,H) = 7.3 Hz, H^{e,e',f,f'}), 6.90 (d, 2H, J(H,H) = 7.7 Hz, H^{g,g'}), 6.54 (d, 2H, J(H,H) = 15.8 Hz, H^{c,c'}), 5.83 (s, 2H, OH), 5.61 (s, 1H, H^b), 3.96 (s, 6H, OCH₃), 2.79 (t, 4H, J(H,H) = 7.5 Hz, CH₂(CH₂)₇CH₃),

1.54 (m, 4H, CH₂CH₃), 1.31 (m, 24H, (CH₂)₆CH₃), 0.87 (t, 6H, J(H,H) = 6.6 Hz, CH₃) ppm

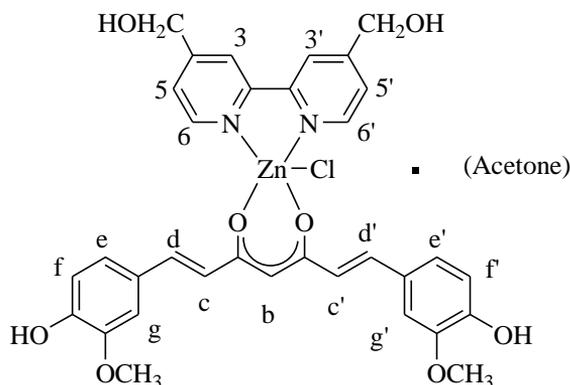
UV-vis in soluzione di etanolo

λ_{abs} (ϵ , mol⁻¹ dm³ cm⁻¹): 250 (17289), 261 (16316), 294 nm (16947), 305 nm (15282), 425 nm (60573), 446 nm (53969)

$\lambda_{\text{em}} = 543$ nm

LM ($c = 3.4 \times 10^{-5}$ mol/L in CH₂Cl₂): 1.85Ω⁻¹·cm²·mol⁻¹

IV.2.18 Sintesi di [(L⁶)Zn(curc)(Cl)]·(Acetone), 14

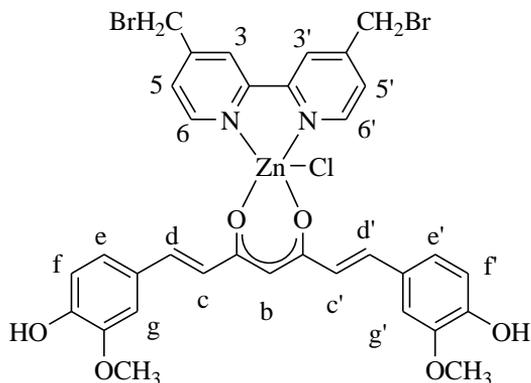


209 mg (0.57mmol) di curcumina purificata vengono sciolti in 10 ml di acetone ottenendo in questo modo una soluzione arancione, alla quale viene aggiunta la trietilammina (57.4 mg, 0.57 mmol). Tale aggiunta provoca una variazione del colore della soluzione da arancione a rosso acceso. Vengono poi aggiunti 200 mg (0.57 mmol) del complesso precursore **10** sciolti preventivamente in 2 ml di acqua. Si osserva sin da subito la formazione di un precipitato arancione. La sospensione viene lasciata sotto agitazione magnetica per circa 3 ore a temperatura ambiente e sotto azoto. Si filtra il solido giallo ottenuto con una resa del 77%.

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: 747.15 g mol⁻¹
- ✚ Formula molecolare: C₃₆H₃₇N₂O₉ZnCl
- ✚ Punto di fusione: 230°C
- ✚ Analisi Elementare (%):
- | | | | |
|---------------|-----------|----------|----------|
| Teorico: | C = 58.25 | H = 5.02 | N = 3.77 |
| Sperimentale: | C = 58.22 | H = 4.93 | N = 3.44 |
- ✚ IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3421 (OH curcumina), 3368 (OH bipy), 1699 (C=O acetone), 1625 (C=C), 1602 (C=O), 1532 (C=N), 1508 (C-C-C- anello chelato).
- ✚ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ_{H} , 9.50 (s, 2H, H^{5,5'}), 8.82 (m, 2H, H₃), 8.48 (s, 2H, H^{3,3'}), 7.67 (m, 2H, H^{6,6'}), 7.45 (d, 2H, J_{(H,H)}}=15.8 Hz, H^{d,d'}), 7.27 (s, 2H, H^{g,g'}), 7.10 (d, 2H, J_{(H,H)}}= 8.4 Hz, H^{e,e'}), 6.78 (d, 2H, J_{(H,H)}} = 8.07 Hz, H^{f,f'}), 6.67 (d, 2H, J_{(H,H)}} = 15.0 Hz, H^{c,c'}), 5.69 (s, 3H, H_b, OH aliphatic), 4.72 (s, 4H, CH₂ alifatici), 3.81 (s, 6H, OCH₃), 2.07 (s, 6H, CH₃ acetone) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di DMSO:
- λ_{abs} (ϵ , mol⁻¹ dm³ cm⁻¹): 261 (16316) 281 (20567); 296 (14989); 342 (10976); 429 (62212); 451 (55784).
- λ_{em} = 531 nm

IV.2.19 Sintesi di $[(L^7)Zn(cure)(Cl)]$, 15



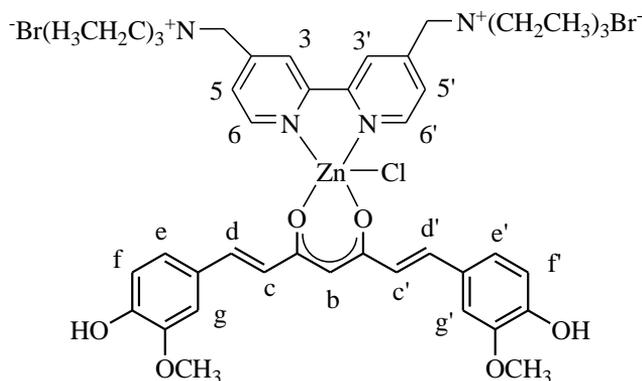
218 mg (0.59 mmol) di curc vengono sciolti in 20 ml di acetone ottenendo una soluzione arancione, alla quale viene aggiunta la trietilammina (60 mg, 0.59 mmol) sotto azoto ed a temperatura ambiente. In questo modo la soluzione subisce una variazione di colore da arancione a rosso acceso. Vengono poi aggiunti 300 mg (0.59) del complesso precursore **11** preventivamente sciolti in 5 ml di acqua, ottenendo in questo modo una sospensione giallo-arancio. La soluzione viene lasciata sotto agitazione magnetica e sotto azoto per 24 h a temperatura ambiente. Si filtra il solido arancione ottenuto con una resa del 52%.

Caratterizzazione

✚ Massa molecolare:	812.26 g mol ⁻¹
✚ Formula molecolare:	C ₃₃ H ₃₁ N ₂ O ₆ ZnClBr ₂
✚ Punto di fusione:	220°C
✚ Analisi Elementare (%):	
Teorico:	C = 48.79 H = 3.84 N = 3.44
Sperimentale:	C = 48.66 H = 3.30 N = 3.25

- IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3436 (-OH curc), 1617 (C=C), 1602 (C=O), 1510 (C-C-C- anello chelato).
- $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} , 9.65 (s, 2H, $\text{H}^{5,5'}$), 9.48 (s, 2H, $\text{H}^{3,3'}$), 7.51 (d, 2H, $\text{H}^{6,6'}$, $J = 15.87$ Hz), 7.29 (m, 6H, $\text{H}^{\text{d,d'}}$, $\text{H}^{\text{g,g'}}$, $\text{H}^{\text{e,e'}}$), 6.74 (m, 4H, $\text{H}^{\text{f,f'}}$, $\text{H}^{\text{c,c'}}$), 5.71 (s, 1H, H^{b}), 4.79 (m, 4H, - CH_2 alifatici), 3,81 (s, 6H, - OCH_3) ppm.
- UV-vis in soluzione di metanolo
 λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$): 250 (3408), 299 (3116), 312 (2446), 399 (3775), 421 (5571), 443 (4813).
 $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$

IV.2. 20 Sintesi di $[\text{L}^8\text{Zn}(\text{curc})(\text{Cl})]$, 16



16 mg (0.043mmol) di curcumina vengono sciolti in 3 ml di metanolo ottenendo una soluzione arancione, alla quale viene aggiunta la trietilammina (4.24 mg, 0.043 mmol). In questo modo la soluzione subisce una variazione di colore da arancione a rosso acceso. Vengono poi aggiunti 30 mg (0.04 mmol) del complesso precursore **12** preventivamente sciolti in 1 ml di acqua, ottenendo in questo modo una sospensione giallo-arancio. La sospensione viene lasciata sotto agitazione

magnetica e sotto azoto per 24 ore a temperatura ambiente. Si prosegue con una filtrazione, ottenendo un solido di colore arancione scuro, con una resa del 62%.

Caratterizzazione

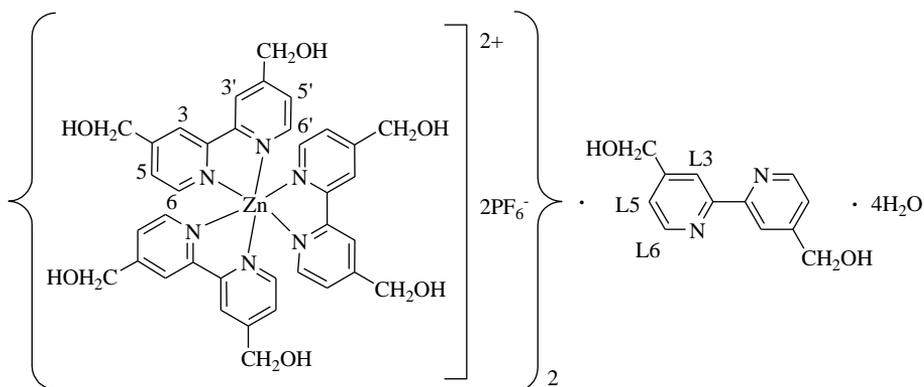
- + Massa molecolare: 1013.87 g mol⁻¹
- + Formula molecolare: C₄₅H₅₉N₄O₆ZnClBr₂
- + Punto di fusione: 275° C
- + Analisi Elementare (%):

Teorico:	C = 53.31 H = 5.86 N = 5.55
Sperimentale:	C = 53.03 H = 5.65 N = 5.38
- + IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1617 (C=C), 1590 (C=O), 1510 (C-C-C-anello chelato), 3400 (-OH curcumina).
- + ¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ_{H} , (s_{br}, 1H, H⁶), 8.85 (s, 2H, H^{5,5'}), 8.56 (s, 2H, H^{3,3'}), (s_{br}, 1H, H^{6'}), 7.40 (d, 2H, H^{d,d'}, J = 15.6 Hz), 7.24 (s, 2H, H^{g,g'}), 7.06 (s, 2H, H^{e,e'}), 6.77 (d, 2H, H^{f,f'}, J = 7.8 Hz), (s_{br}, 2H, H^{c,c'}), (S_{brb}, 1H, H^b), 4.63 (s, 4H, -CH₂N), 3.80 (s, 6H, -OCH₃), (m, 18H, -CH₃) ppm
- + UV-vis in soluzione di DMSO

λ_{abs} (ϵ , mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹):	293 (9727), 342 (6478), 382 (6897), 406 (22774), 430 nm (35344); 452 nm (32139)
λ_{em}	= 534 nm

IV.3 Sintesi di complessi omolettici di Zn(II)

IV.3.1 Sintesi di $\{[\text{Zn}(\text{L}^6)_3](\text{PF}_6)_2\}_2 \cdot \text{L}^6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, **17**



Ad una soluzione del legante **L⁶** (250 mg, 1.16 mmol), in metanolo (20 ml), si aggiunge acetato di zinco (84.6 mg, 0.39 mmol) in rapporto stechiometrico 3.5:1. La soluzione trasparente ottenuta è stata lasciata per 2 giorni a refluxo e sotto azoto. In seguito si aggiunge un eccesso di NH₄PF₆ (318 mg, 1.95 mmol) ottenendo una sospensione torbida e bianca che viene lasciata per 24 ore a refluxo e sempre sotto azoto. Si filtra la sospensione inorganica e le acque madri si concentrano, si aggiunge acqua e, per lenta evaporazione, si ottiene il prodotto che si presenta sotto forma di cristalli rosa. Il complesso **17** è ottenuto con una resa del 84%.

Caratterizzazione

✚ Massa molecolare:	2006.42 g mol ⁻¹
✚ Formula molecolare:	C ₈₄ H ₉₂ O ₁₈ N ₁₄ Zn ₂ P ₄ F ₂₄
✚ Punto di fusione:	225 °C

✚ Analisi Elementare (%):

Teorico: C = 43.93 H = 4.04 N = 8.54

Sperimentale: C = 43.78 H = 3.99 N = 8.23

✚ IR(KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3390 (-OH), 1618 (C-C), 842 (PF_6^-)

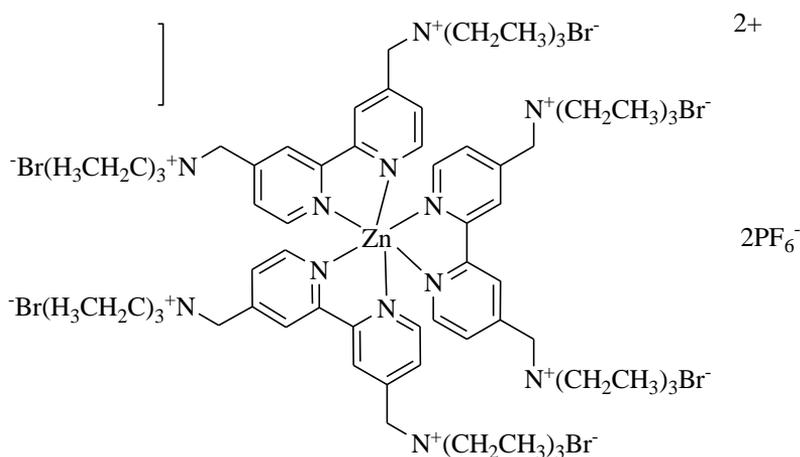
✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} , 8.51 (m, 14H, $\text{H}^{3,3'}$, $\text{H}^{6,6'}$, $\text{H}^{\text{L}3}$, $\text{H}^{\text{L}6}$), 7.64 (m, 7H, $\text{H}^{5,5'}$, $\text{H}^{\text{L}5}$), 5.67 (s, 7H, -OH), 4.74 (s, 14H, - CH_2) ppm

✚ UV-vis in soluzione di acqua

λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$): 237 (43195), 284 (56516), 291 (50964), 305 (26044)

$\lambda_{\text{em}}=325 \text{ nm}$

IV.3.2 Sintesi di $[\text{Zn}(\text{L}^8)_3](\text{PF}_6)_2$, **18**



150 mg del legante **L⁸** (0.26 mmol) sono sciolti in metanolo (15 ml), in seguito si aggiunge acetato di zinco (19 mg, 0.087 mmol) in rapporto stechiometrico 3:1. Si ottiene una soluzione lievemente rosa che viene lasciata a riflusso e sotto azoto per 2 giorni. Dopo due giorni si aggiunge

alla soluzione un eccesso di NH_4PF_6 (71 mg, 0.44 mmol) e si ottiene una sospensione torbida, lievemente marrone che viene lasciata per 24 ore sotto agitazione magnetica, a riflusso e sempre sotto azoto. Il precipitato ottenuto viene filtrato ed il complesso **18** è un solido lievemente marrone ottenuto ricristallizzando da etere etilico con una resa del 53% (92 mg).

Caratterizzazione

- ✚ Massa molecolare: $1989.1 \text{ g mol}^{-1}$
- ✚ Formula molecolare: $\text{C}_{72}\text{H}_{120}\text{Br}_6\text{N}_{12}\text{Zn}_1\text{P}_2\text{F}_{12}$
- ✚ Punto di fusione: $260\text{-}270 \text{ }^\circ\text{C}$, decompone
- ✚ Analisi Elementare (%):
 - Teorico: C = 43.49 H = 6.01 N = 8.45
 - Sperimentale: C = 43.19 H = 5.79 N = 8.42
- ✚ IR(KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 1620 (C=C), 844 (PF_6^-)
- ✚ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ_{H} , 8.87 (d, 2H, $\text{H}^{6,6'}$, $J=5.14 \text{ Hz}$), 8.59 (s, 2H, $\text{H}^{3,3'}$), 7.63 (d, 2H, $\text{H}^{5,5'}$, $J = 4.77 \text{ Hz}$), 4.66 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{N}$), 3.28(m, 12H, $-\text{NCH}_2$), 1.34 (t, 18H, CH_3 , $J = 6.97 \text{ Hz}$) ppm
- ✚ UV-vis in soluzione di acqua
 - λ_{abs} (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$): 237 (21597), 284 (28258), 291(25481), 305 nm (13022)
 - $\lambda_{\text{em}} = 326 \text{ nm}$

