Università della Calabria

Dipartimento di Chimica

Tesi di Dottorato di Ricerca

in Metodologie Chimiche Inorganiche

Sintesi e caratterizzazione di complessi metallici contenenti leganti chelanti biologicamente attivi

SUPERVISORE

Prof.ssa Daniela Pucci

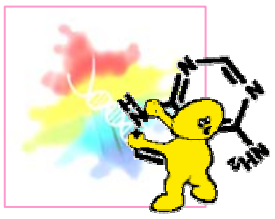
CANDIDATA

Dott.ssa Rossana Bloise

Coordinatore del Dottorato

Ch.mo Prof. Nino Russo

Anno Accademico 2006-07



SOMMARIO

In trent'anni di intense ricerche sono state sintetizzate e sperimentate diverse migliaia di nuovi composti con l'intento di estendere la gamma dei complessi di metalli di transizione, in particolare di Pt(II), come potenziali farmaci antitumorali, facendo si che la chimica di coordinazione diventasse in questo ambito, una delle applicazioni della chimica bioinorganica di maggiore successo.

La scoperta dei metallo-intercalatori e le evidenze sperimentali dell'attività citotossica di complessi organometallici di diversi metalli, contenenti leganti eteroaromatici intercalanti, ha orientato la ricerca verso la sintesi di una nuova generazione di complessi metallici che si discostano dalle classiche regole struttura-attività.

In questo contesto, sfruttando la chimica di coordinazione e la varietà di sistemi reattivi da essa forniti, talvolta provenienti dalla natura o dal mondo biologico, è stata progettata la sintesi di nuovi complessi di coordinazione a potenziale attività antitumorale, ottenuta attraverso un sinergismo d'azione. Per ottenere tale sinergismo d'azione è stato scelto l'approccio della bifunzionalità, ovvero, si è scelto di coordinare al metallo da un lato un legante O,O chelante con proprietà farmacologiche di per sè, e dall'altro completare la sfera di coordinazione con un legante avente una struttura potenzialmente intercalante, per ottenere un'unica molecola con caratteristiche farmacologiche superiori rispetto ai singoli leganti organici. I metalli scelti sono metalli con stato di ossidazione 2+, ovvero Pd(II), Pt(II) e Zn(II).

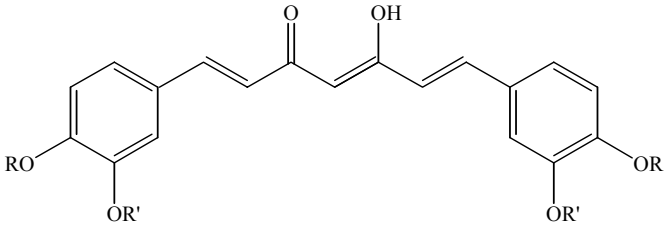
Seguendo questo approccio sono state ottenute tre classi chimicamente distinte di complessi mononucleari, tutte contenenti i leganti O,O chelanti tropolone e derivati curcuminoidi.

Complessi neutri di Pd(II)

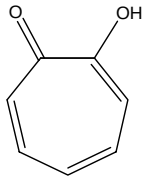
Questa prima classe comprende complessi in cui è stata testata la capacità coordinativa di leganti 2-fenilchinolinici, come agenti C,N chelanti ciclometallanti. I leganti 2-fenilchinolinici scelti derivano dalla funzionalizzazione del legante 2-fenilchinolina con gruppi di varia natura, per valutare l'influenza del grado di lipofilicità del complesso

metallico risultante sull'attività citotossica. In particolare sono stati introdotti gruppi esterei a lunga catena alifatica lineare e chirale, il colesterolo. L'introduzione di un'unità di colesterolo sulla 2-fenilchinolina ha indotto nei complessi carattere liquido-cristallino, offrendo loro un'ulteriore possibilità nella veicolazione.

Considerando che la ciclopalladazione di leganti 2-fenilchinolinici non era stata finora sperimentata è stata definita una strategia sintetica di successo che ha portato alla formazione di complessi binucleari di ciclometallazione necessari per l'ottenimento delle specie neutre mononucleari contenenti leganti O,O chelanti monoanionici, ovvero il tropolone e derivati curcuminoidi. Questi ultimi comprendono la curcumina e un derivato della curcumina, ottenuto dalla sua funzionalizzazione sostituendo i gruppi idrossilici con gruppi alcossilici a lunga catena alifatica.



curcumina



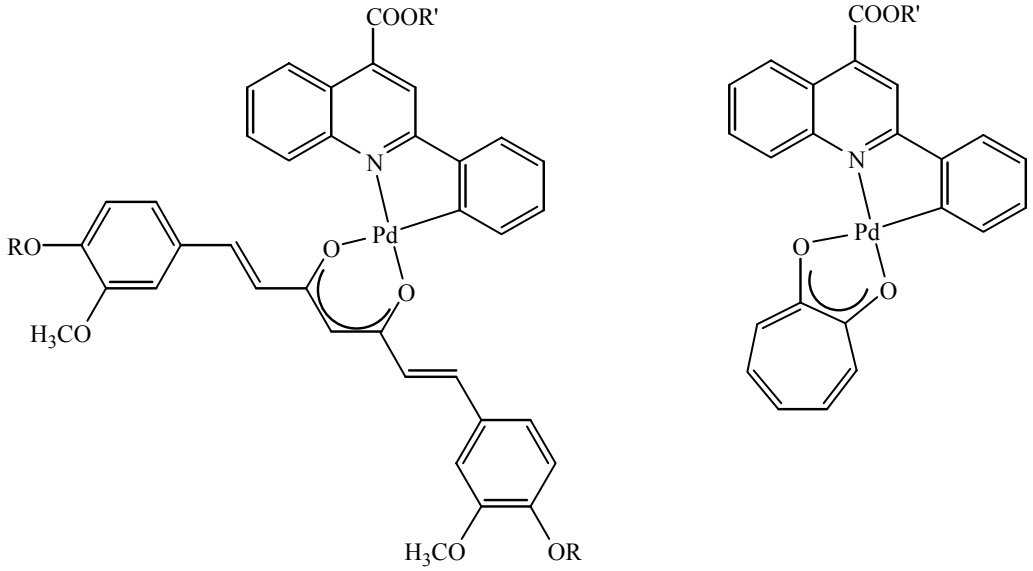
tropolone

La curcumina, come legante organico, presenta il problema dell'instabilità in ambiente acquoso a pH fisiologico, che ne limita l'uso terapeutico.

Con la complessazione della curcumina è stato sperimentato come, modificandone il profilo farmacocinetico *in vitro*, si possa modificare anche quello farmacodinamico.

La modificazione del profilo farmacocinetico *in vitro* è stato monitorata attraverso la spettroscopia UV/vis, ovvero mimando le condizioni fisiologiche *in vitro* è stata accertata la stabilità dei complessi rispetto alla curcumina.

La reazione di ciclometallazione dei leganti 2-fenilchinolinici è stata estesa sia nei confronti del Pd(II) che del Pt(II), tuttavia nel caso del Pt(II), a causa di fenomeni di decomposizione non è stato possibile ottenere i complessi mononucleari.



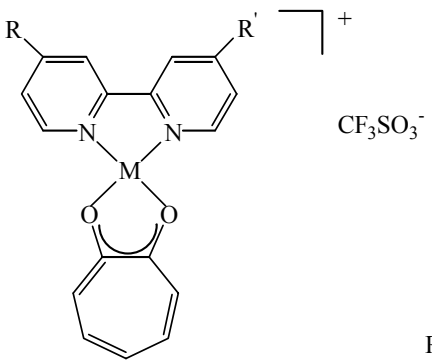
Le proprietà citotossiche sono state studiate, attraverso uno screening effettuato in solventi biocompatibili, su tutti i complessi, utilizzando la linea cellulare tumorale prostatica umana DU 145. La quantificazione dell'attività citotossica ha permesso di effettuare una discriminazione dei complessi più attivi per poter stabilire un'esatta corrispondenza tra progettazione chimica e attività biologica. Infatti i complessi della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina sono quelli più attivi con un range di inibizione della proliferazione simile per tutti i derivati della curcumina (IC_{50} = 0.1 μM).

Complessi ionici di Pd(II) e Pt(II)

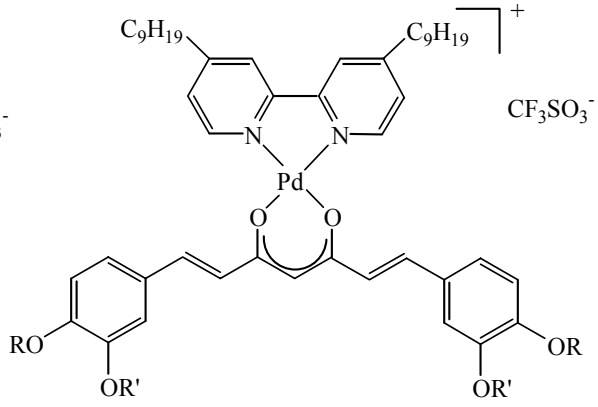
Allo scopo di ottenere complessi ionici contenenti i leganti O,O chelanti monoanionici tropolone e curcuminoidi, la sfera di coordinazione del Pd(II) e Pt(II) è stata completata da un legante N,N chelante 2,2'-bipiridinico, variamente sostituito in posizione 4,4' . In tutti i complessi il controione è lo ione triflato.

Nonostante gli sforzi sintetici non è stato possibile ottenere complessi del Pt(II) contenenti la curcumina, non potendo aumentare la nucleofilicità di quest'ultima per motivi d'instabilità chimica in soluzione.

Pertanto l'unico complesso ionico del Pt(II) ottenuto contiene, come legante O,O chelante il tropolonato, usato nella reazione sotto forma di sale che ne favorisce la coordinazione. Di questo complesso è stata risolta la struttura mediante diffrazione a raggi X su cristallo singolo.



M= Pd(II) e Pt(II)



Lo studio delle proprietà citotossiche è stato condotto su tutti i complessi, utilizzando le linee cellulari prostatiche umane DU 145 e LNCaP. Tutti i complessi hanno mostrano attività alla concentrazione di 25 μM e tutti i complessi del tropolone sono più attivi del tropolone in queste linee cellulari, mentre il complesso ionico del Pd(II) contenente la curcumina è attivo a concentrazioni maggiori rispetto alla curcumina. Per questo motivo è stato interessante approfondire gli studi per capire attraverso quale meccanismo è stata prodotta l'attività citotossica. E' stato condotto pertanto uno studio dettagliato degli effetti sui parametri metabolici delle cellule tumorali, mediante l'analisi del ciclo cellulare, risposta apoptotica e studio degli eventi proapoptotici.

Complessi ionici e neutri di Zn(II)

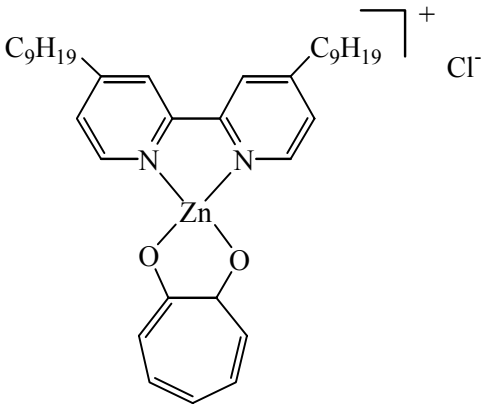
Nell'ambito della sintesi di complessi metallici con potenziale attività antitumorale, molto pochi sono gli esempi di complessi dello Zn(II) riportati in letteratura.

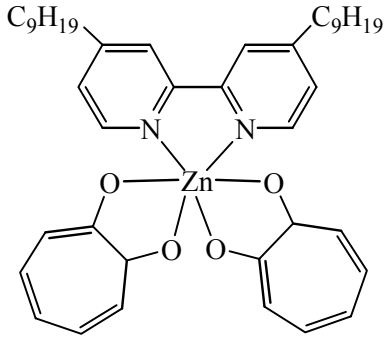
Per questo motivo e per la scarsa letteratura riguardante le capacità coordinative di questo metallo si è voluto innanzitutto esplorare la capacità coordinativa dello Zn(II) nei confronti dei leganti O,O chelanti curcuminoidi e tropolone, nonché testarli sulle stesse linee cellulari utilizzate per i complessi del Pd(II) e del Pt(II) e confrontare i dati.

Non essendo questo metallo un buon elettrofilo e come già detto prima, non potendo aumentare la nucleofilicità della curcumina, i tentativi di ottenere complessi della curcumina con questo metallo non hanno prodotto risultati. Potendo invece aumentare la nucleofilicità del tropolone, salificandolo, e utilizzandolo nell'opportuno rapporto stechiometrico sono stati ottenuti, grazie alla possibilità dello Zn(II) di dare luogo a differenti geometrie, un complesso ionico tetracoordinato e un complesso neutro esaccordinato, di cui è stato possibile risolvere la struttura attraverso analisi di diffrazione a raggi X su cristallo singolo.

Di entrambi i complessi sono state testate le proprietà citotossiche *in vitro* e sorprendentemente, considerando che lo Zn(II) finora non ha avuto molto successo in questo campo della ricerca, i complessi dello Zn(II) sono risultati i più attivi, con un range di attività compreso tra 1.5 e 6 μM rispetto a quelli isostrutturali di Pt(II) e Pd(II) che presentano attività citotossica a 25 μM.

Il complesso neutro esacoordinato dello Zn(II) risulta essere quello più attivo in assoluto con un IC_{50} di 2 μM, anche più attivo dell'analogo complesso ionico tetracoordinato, dimostrando come la differente geometria e carica nei due complessi influisce sull'attività citotossica *in vitro*.





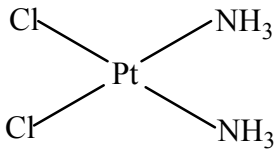
Dai dati dell'attività citotossica *in vitro* si può estrapolare uno studio di relazioni struttura-attività in quanto si evince che in quasi tutti i casi i complessi sono più attivi dei leganti. Paragonando poi complessi isostrutturali si evince che il metallo è determinante sull'attività, per cui quest'ultimo non rappresenta solo l'elemento che unisce due funzionalità biologicamente attive ma ogni elemento funziona in maniera additiva e/o sinergica nel produrre la citotossicità.

COMPLESSI METALLICI CON ATTIVITA' ANTITUMORALE

I.1 DRUG DISCOVERY E IMPLICAZIONI PER IL DESIGN IN COMPLESSI METALLICI.

I.1.1 Dal *cis*-DDP ai metallointercalatori

Sebbene il trattamento chirurgico e radiante possano essere efficaci nell'estirpazione di tumori localizzati, i maggiori successi nella terapia del cancro, una volta divenuto sistemico e disseminato, sono stati ottenuti, finora, mediante l'impiego di farmaci antitumorali. Tuttavia, malgrado la disponibilità di numerosi farmaci, la chemioterapia non può essere considerata ancora soddisfacente. L'identificazione, infatti, e la realizzazione di nuovi farmaci antineoplastici, è un'attività in continua evoluzione.
L'interesse verso lo sviluppo di farmaci antitumorali basati su composti del platino risale al 1960 con la casuale scoperta, da parte di Rosemberg, dell'inibizione della divisione cellulare da parte del *cis*-platino, o *cis*-DDP [1]. L'attività antitumorale del *cis*-DDP ha reso questo complesso metallico di transizione il più famoso composto inorganico usato in chemioterapia.



***cis*-platino**, $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$

L'evidenza sperimentale che l'isomero *trans* del *cis*-DDP fosse privo di attività biologica, ha fin da subito affascinato i chimici inorganici e fornito le basi per stabilire le prime correlazioni struttura-attività di una nuova classe di farmaci antitumorali che stava nascendo. Nondimeno, la preferenza stereochimica del DNA verso questo farmaco, che costituisce il *target* molecolare della sua attività citotossica, ha enfatizzato la necessità di approfondire gli studi d'interazione tra il Pt e il DNA.

Ancora oggi, nonostante si conosca il meccanismo d'azione del *cis*-DDP (figura I.1), rimangono da chiarire i meccanismi molecolari che portano dai danni prodotti al DNA all'induzione alla morte apoptotica, e le basi biochimiche della selettiva citotossicità verso alcune linee cellulari tumorali [2].

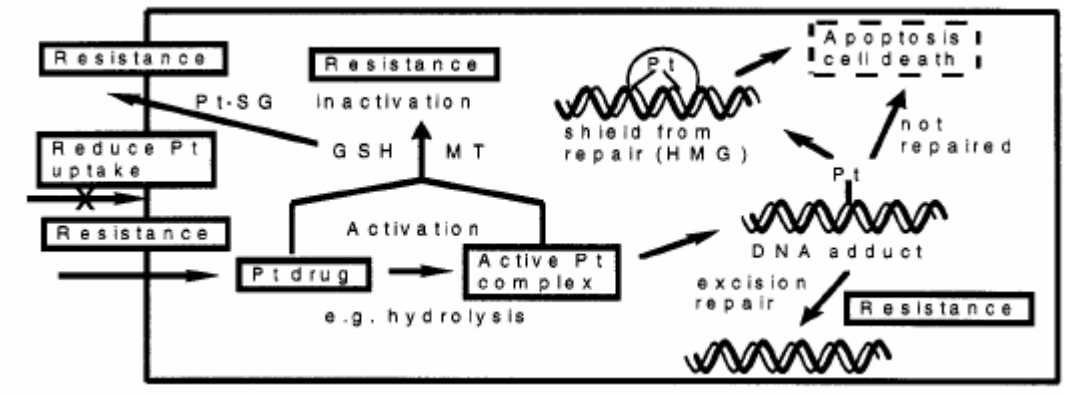


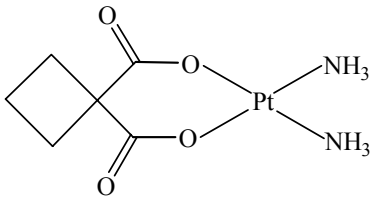
Fig. I.1 Sommaria schematizzazione dei processi implicati nell'attività antitumorale del *cis*-DDP

Questo perché, nel controllare l'attività biologica di un composto esogeno, il target molecolare è solo uno degli aspetti da considerare per avere un farmaco attivo, a causa delle numerose variabili che entrano in gioco all'interno della larga matrice organica quali idrolisi, legame alle proteine, trasporto attraverso le membrane cellulari.

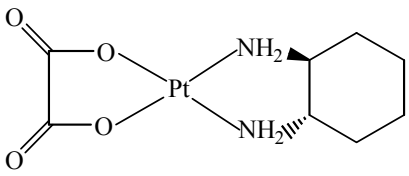
Tutti questi processi biologici sono quelli responsabili del successo e dei limiti terapeutici del *cis*-DDP, per questo la maggior parte delle metodologie seguite per lo sviluppo di nuovi e più efficaci congeneri si sono basate e si basano tuttora, sulla

modificazione graduale della molecola bioattiva, secondo gli studi delle relazioni struttura-attività.

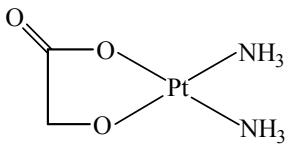
Così i complessi di Pt(II) di seconda e terza generazione, ovvero carboplatino, oxaliplatino e nedaplatino, in cui i due leganti cloruri del *cis*-DDP sono stati sostituiti con leganti chelanti cineticamente meno labili, quali dicarbossilato, ossalato e glicolato, mostrano, pur reagendo con il DNA allo stesso modo del *cis*-DDP, una serie di caratteristiche favorevoli quali una maggiore stabilità e una cinetica d'idrolisi più lenta, che garantiscono un tempo di vita superiore e un più limitato profilo tossicologico [1].



carboplatino



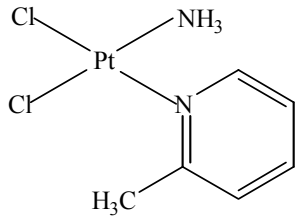
oxaliplatino



nedaplatino

Questi primi derivati sono pertanto un po' più selettivi rispetto al *cis*-DDP, ma non hanno risolto l'altro problema importante che i ricercatori, impegnati nel lavoro di sintesi di nuovi complessi metallici, stanno affrontando ancora oggi, ovvero, quello di superare la resistenza al *cis*-DDP, sia in quelle linee cellulari in cui risulta essere inattivo dalla prima somministrazione, che in quelle in cui lo diventa dopo trattamento continuato.

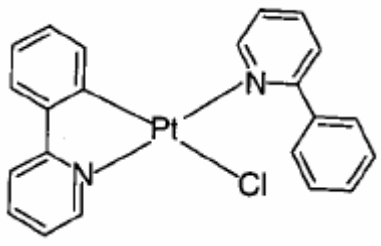
In questo senso, complessi contenenti leganti stericamente impediti, come il *cis*-amminodicloro(2-metilpiridina)platino(II) o ZDO473, sono stati sintetizzati con l'intento di sfavorire la reattività del complesso verso i tioli intracellulari, responsabili dell'inattivazione dello stesso complesso [3].



ZDO473

I processi che danno luogo alla resistenza sono multifattoriali, tuttavia un importante enzima per la resistenza ai farmaci in molti tumori è il glutatione S-transferasi o GST. È noto che l'enzima citosolico GST rappresenti la principale difesa cellulare contro gli xenobiotici, catalizzando la coniugazione del glutatione o GS-H con il *cis*-DDP, primo step della sua eliminazione. È riportato che si verifica un'overespressione di questo enzima, specialmente della forma isomerica π, nelle cellule resistenti al *cis*-DDP [4].

Ma la natura e la geometria dei leganti che vengono sostituiti nella sfera di coordinazione del metallo incidono sulla resistenza al farmaco, oltre che per la reattività chimica, anche per il grado di idrofobicità del composto. Nel tentativo, infatti, di ottenere derivati del complesso ZDO473 più idrofobici rispetto al *cis*-DDP e ai suoi primi derivati, ovvero per valutare l'effetto dell'ingombro sterico assiale sull'accumulo del complesso nelle cellule e/o il grado di detossificazione, è stata riscontrata accidentalmente la forte citotossicità di un complesso ciclometallato della 2-fenilpiridina, il *cis*-[PtCl(2-$C_6H_4C_5H_4N$)($C_6H_5C_5H_4N$)] [5].



***cis*-[PtCl(2-$C_6H_4C_5H_4N$)($C_6H_5C_5H_4N$)]**

Questo complesso planare-quadrato del Pt(II), contenente due fenilpiridine, una ciclometallata, l'altra no, è più idrofobico del *cis*-DDP, e dati biologici dimostrano che, un'interessante attività citotossica di questo complesso su una linea cellulare *cis*-DDP-resistente, è da imputare ad un più efficiente accumulo di questo complesso nelle cellule. Ne deriva che uno dei fattori della resistenza al *cis*-DDP è il ridotto accumulo del farmaco nelle cellule.

Questo complesso metallico appartiene a quella classe di composti che sono stati progettati per assomigliare poco al *cis*-DDP e dovrebbero pertanto, formare differenti e irreparabili lesioni al DNA. In effetti, avendo un solo gruppo uscente labile, il cloruro, questo complesso non può formare legami covalenti bifunzionali *intrastrand* e *interstrand* con il DNA, ma si dovrà ipotizzare un differente meccanismo d'azione, coerente con i dati strutturali, e che giustifichi l'elevata attività citotossica.

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 molte tecniche provenienti dalla biologia molecolare sono in grado di studiare questi aspetti. Oggi possiamo dire che i complessi metallici possono legarsi al DNA reversibilmente o irreversibilmente. Sono legami irreversibili il legame covalente, che può essere bifunzionale (*intrastand* o *interstand*) o monofunzionale, mentre legami reversibili sono il legame al solco minore, l'intercalazione e l'inserzione (figura I.2 e I.3). Questi ultimi implicano interazioni elettrostatiche e/o legame a idrogeno. Il legame al solco minore avviene in genere da parte di molecole come pirroli, furani e benzeni connessi da legami che possiedono libertà torsionale [6].

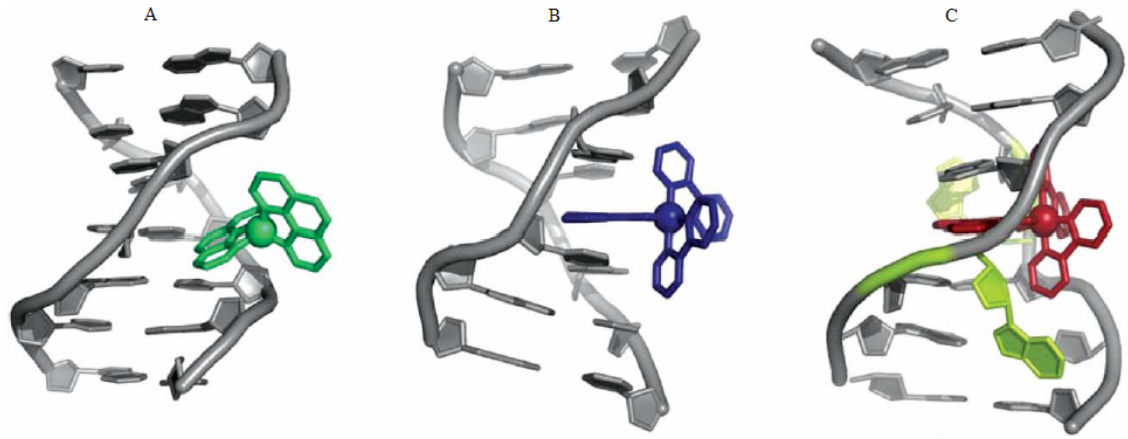


Fig. I.2 Legame al solco (A), metallointercalazione (B) e metalloinserzione (C)

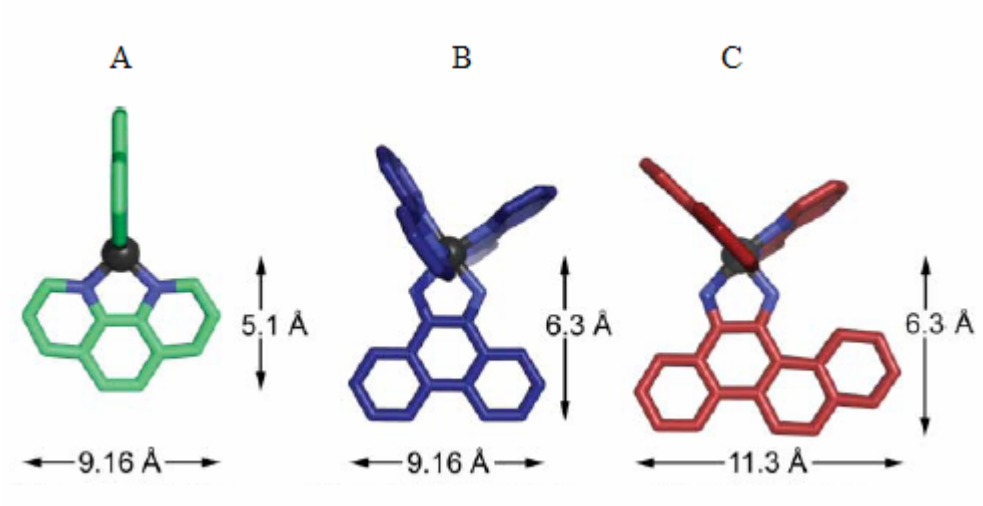
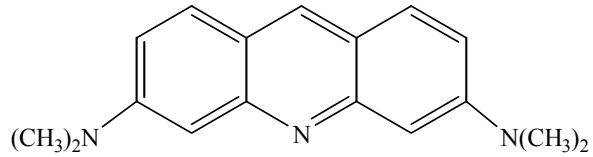


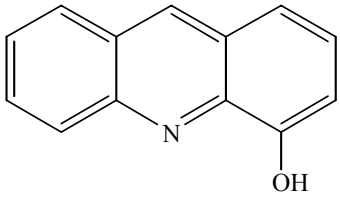
Fig. I.3 Legante al solco (A), metallointercalatore (B) e metalloinsertore (C)

I.1.2 Legame reversibile al DNA

Il concetto d'intercalazione fu proposto per primo da Lerman nel 1961 per spiegare il reversibile e non covalente legame delle acridine al DNA [7].



3,6-bisdimetilaminoacridina (Acridina Orange)



4-idrossiacridina

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 destrogira. 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.4), rendono massima la stabilizzazione della doppia elica attraverso legami a idrogeno [6].

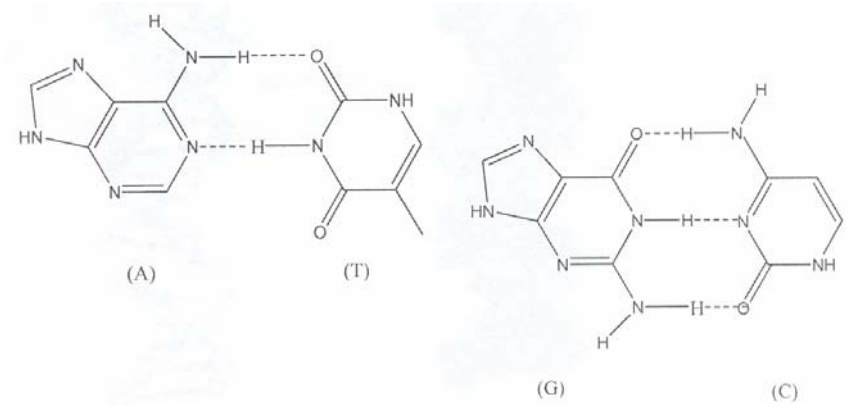


Fig. I.4 Coppie di legame AT e GC

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. I'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 [8].

L'allungamento risultante della doppia elica, conseguente all'intercalazione (figura I.5), 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 [9].

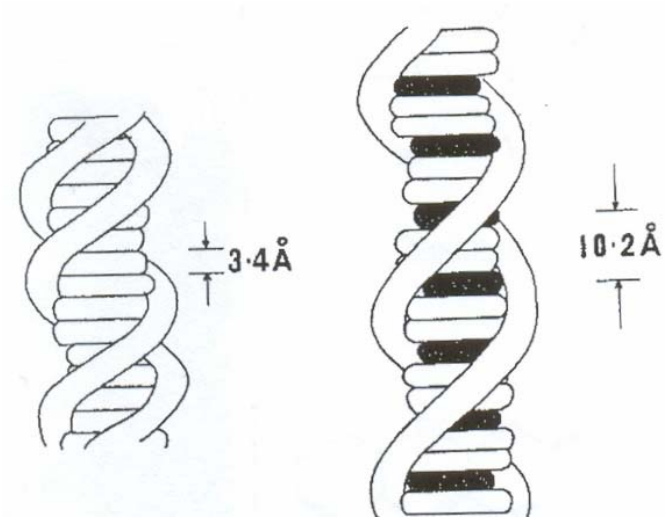


Fig. I.5 Modello semplificato di un tratto del DNA e del complesso intercalato

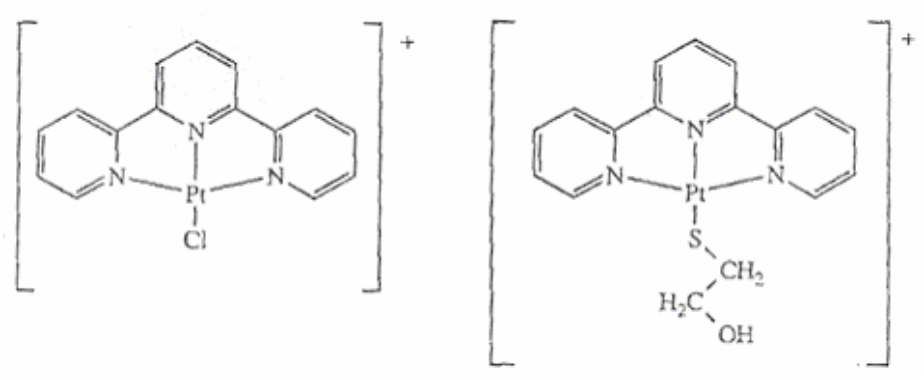
Secondo questo modello semplificato del DNA e del corrispondente complesso intercalato, proposto da Lerman, si esclude la possibilità d'inserzione di una seconda molecola d'intercalante nei siti immediatamente vicini, per cui quando il polinucleotide è saturato, si ottiene un'alternanza di siti vuoti e occupati.

A livello più macroscopico possiamo dire che l'intercalazione è un'interazione che si può definire 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 geometria planare 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.

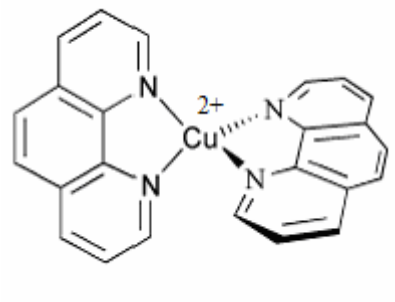
Un progenitore complesso che si lega in modo non covalente al DNA fu sintetizzato e studiato da Lippard e suoi collaboratori nel 1970, un complesso monocationico del Pt(II) planare-quadrato, il $[Pt(terpy)Cl]^+$ che viene attirato, grazie alla carica positiva, dallo scheletro esterno dei fosfati del DNA e si intercala con una costante di legame di 10^5 M^{-1} [9].



[Pt(terpy)Cl]$^+$ **[Pt(terpy)(HET)]$^+$**

Analogamente, con una costante di associazione dell'ordine 10^5-10^6 M^{-1} il complesso $[Pt(terpy)(HET)]^+$, lega in modo molto forte, ma del tutto reversibile il DNA. Questo complesso dimerizza sia in soluzione (K_{dimer}= 7(5)x10^3) 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 detti 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 $[Cu(phen)_2]^{2+}$ [10].



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

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-covalenetemente sono complessi cineticamente inerti, sono complessi ottaedrici d^6 e complessi quadrato-planari d^8, o in generale sono complessi con una struttura tridimensionale rigida o quasi del tutto rigida e in cui la stereochimica del complesso 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), $[Ru\ (phen)_3]^{2+}$, complesso ottaedrico della fenantrolina che interagisce con il DNA attraverso tre tipi di legame non-covalente: elettrostaticamente, legame idrofobico al solco minore e parziale intercalazione di una fenantrolina (figura I.6) [10].

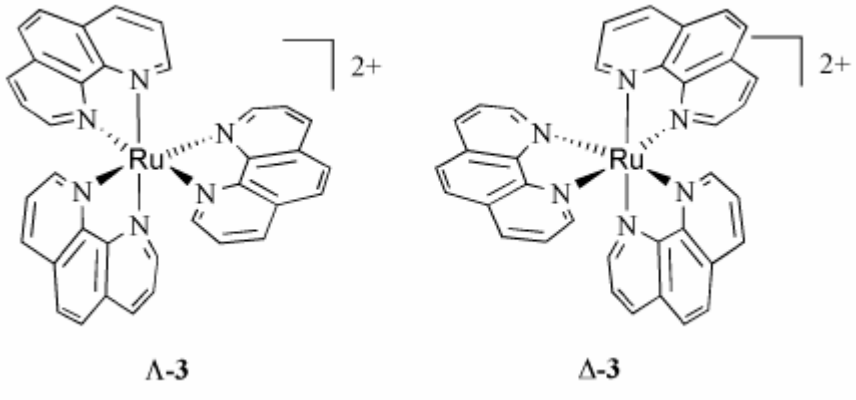
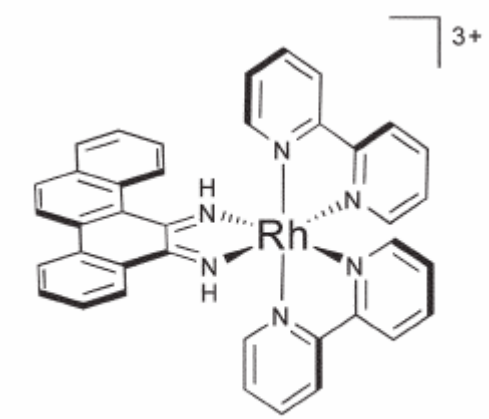


Fig. I.6 Isomeri di $[Ru\ (phen)_3]^{2+}$

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 s'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.

Un altro drastico effetto enantiomerico è stato osservato per un complesso di Rh(III), il complesso Δ-[$Rh(bpy)_2chrysi]^{3+}$, dove chrysi è il legante 5,6 diammino crisene chinone [11].



Δ-$[Rh(bpy)_2chrysi]^{3+}$

Eseguendo studi di "photocleavage" su questo complesso, ovvero di fotoattivazione utilizzando la luce UV, è venuto fuori che, mentre l'enantiomero Λ è completamente inattivo, quello Δ si lega e frammenta il DNA nel sito adiacente a quello destabilizzato, ovvero contenente una coppia di basi non accoppiata bene. Ulteriori studi sono stati effettuati per comprendere meglio l'interazione di questo complesso con il DNA, e dalla risoluzione della struttura del complesso co-cristallizzato con un polinucleotide contenente coppie di basi destabilizzate AC si vede che il complesso si lega in due modi differenti (figura I.7).

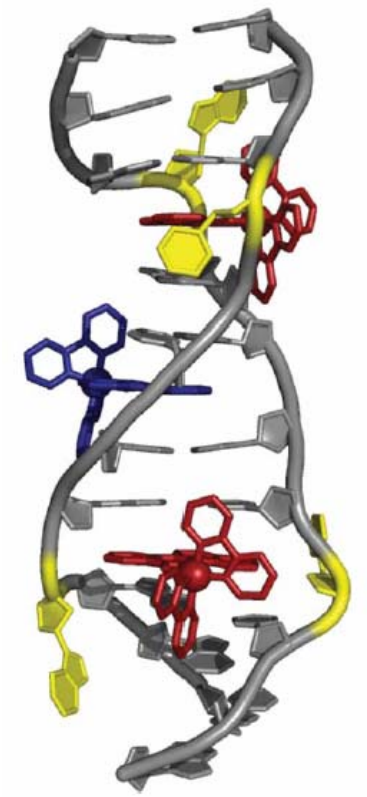
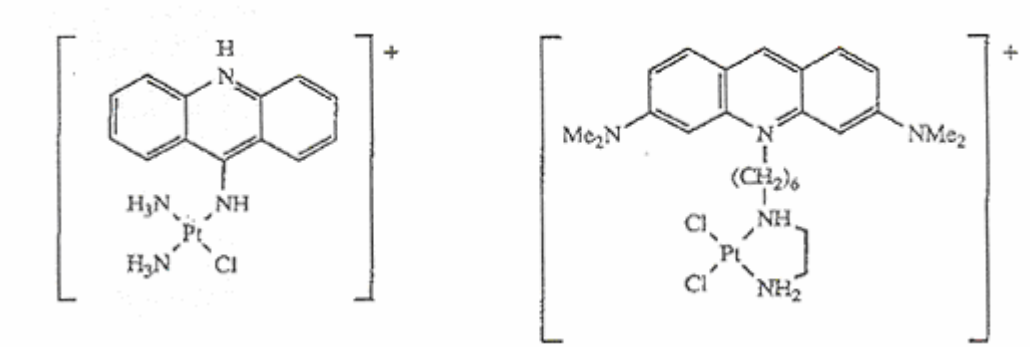


Fig. I.7 struttura del polinucleotide contenente il complesso legato al target AC

Come si può osservare dalla figura il complesso Δ-$[Rh(bpy)_2chrysi]^{3+}$ si lega in corrispondenza dei due siti "accoppiati male" in maniera differente all'intercalazione che avviene al centro del polinucleotide (complesso in blu), ovvero si lega in un modo che viene definito inserzione. L'inserzione o metallo-inserzione implica l'esplusione delle basi fuori dal piano e la parte intercalante del complesso (il legante chrysi), con un'interazione di stacking, va ad occupare il destabilizzato sito delle coppia di basi AC. Più è destabilizzata l'interazione tra la coppia di basi e più è favorita la metallo-inserzione. Infatti normalmente, cioè in corrispondenza delle consuete coppie di basi il legame di metallo-inserzione non avviene in quanto la prima interazione è abbastanza stabile, quindi più forte.

Di recente sviluppo è il design che precede la sintesi di complessi in cui un Pt(II) chimicamente reattivo ed un intercalatore sono legati direttamente o attraverso una catena alchilica [9].

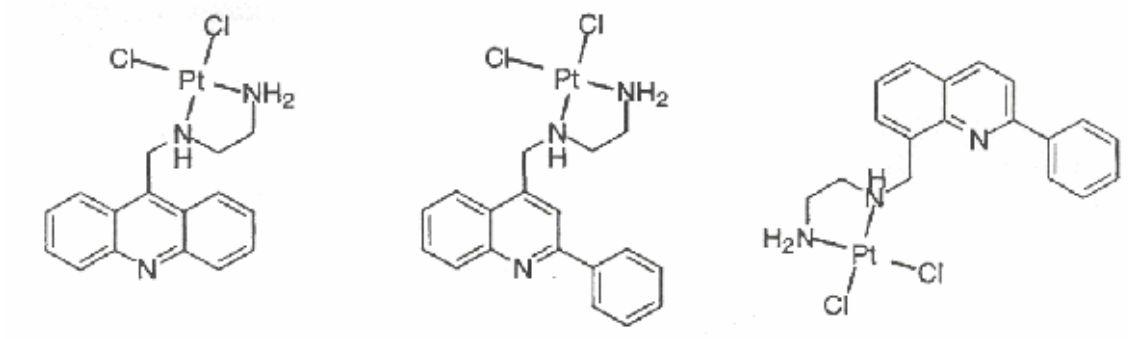


***cis*-[Pt(NH$_3$)$_2$(N9-9-AA)Cl]$^+$** **[Pt(AO(CH$_2$)$_6$en)Cl$_2$]$^+$**

Il legame del *cis*-DDP e suoi derivati ad intercalatori, è stato voluto per creare un sinergismo d'effetti derivante da queste due classi di composti antitumorali.

Così il complesso [Pt(AO(CH$_2$)$_6$en)Cl$_2$]$^+$, si lega covalentemente al DNA attraverso il gruppo [Pt(en)]$^{++}$ mentre il cromoforo acridina orange s'intercala in un sito più distante a quello del legame covalente e questa interazione multifunzionale destabilizza maggiormente il DNA. Risulta tuttavia, cineticamente difficile e stereochimicamente poco probabile, che complessi in cui l'intercalatore sia direttamente legato al gruppo amminico della parte metallica, come il *cis*-[Pt(NH$_3$)$_2$(N9-9-AA)Cl]$^+$, possano legarsi al DNA in entrambi i modi e la sua attività citotossica è imputabile solo al legame intercalativo.

Un complesso che differisce dal [Pt(AO(CH$_2$)$_6$en)Cl$_2$]$^+$ solo per la lunghezza della catena che lega l'acridina al gruppo [Pt(en)Cl$_2$], il *cis*-[PtCl$_2$(8-(2-aminoetil)aminometilacridina)], è stato sintetizzato insieme ad altri due complessi analoghi, ovvero due complessi, il *cis*-[PtCl$_2$(4-(2-aminoetil)aminometil-2-fenilchinolina)], e *cis*-[PtCl$_2$(8-(2-aminoetil)aminometil-2-fenilchinolina)], in cui l'unità intercalante è rappresentata dalla 4-metil-2-fenilchinolina e dalla 8-metil-2-fenilchinolina rispettivamente [12].



Struttura di *cis*-[$PtCl_2$(8-(2-aminoetil)aminometilacridina)]
***cis*-[$PtCl_2$(4-(2-aminoetil)aminometil-2-fenilchinolina)]**
***cis*-[$PtCl_2$(8-(2-aminoetil)aminometil-2-fenilchinolina)]**

Questi tre complessi sono stati messi a confronto, per quanto riguarda i dati biologici relativi alla loro citotossicità su due linee cellulari tumorali, alla loro permeabilità cellulare, e alla loro interazione con il DNA. Dai risultati si evince che il complesso acridinico non è citotossico a causa della minima permeabilità nelle cellule, a differenza dei complessi fenilchinolinici che, pur possedendo un'elevata capacità di penetrazione nelle cellule, devono la forte citotossicità alla loro importante capacità di legame al DNA. Quest'ultima è stata determinata attraverso spettri di fluorescenza variando la concentrazione di DNA, mentre studi di meccanismo molecolare evidenziano che un legame non covalente, di tipo intercalativo è cineticamente favorito per questi complessi. Ne deriva che la lunghezza della catena che lega l'unità metallica al cromoforo, e la differenza strutturale di quest'ultimo, sono fattori molto importanti che governano l'attività antitumorale di questi complessi. Relativamente al cromoforo possiamo dire che la 2-fenilchinolina, è stata definita "minimal intercalator", scongiurando il principio secondo il quale solo strutture tricicliche fuse, o in generale larghi cromofori sono molecole intercalanti (figura I.8) [13].

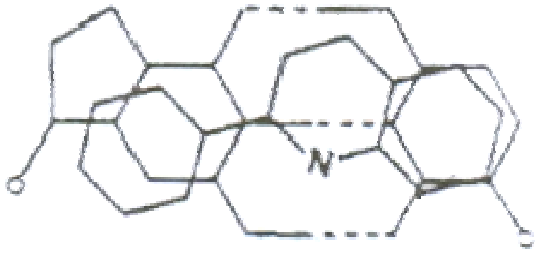
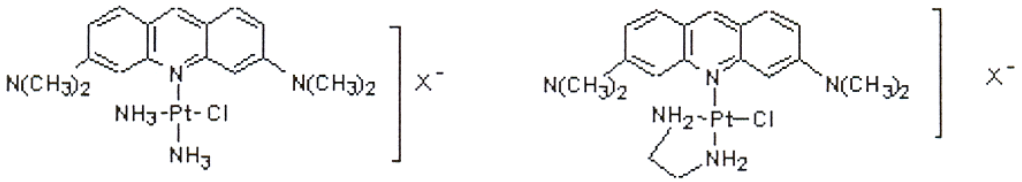


Fig. I.8 Probabile orientazione della 2-fenilchinolina per l'intercalazione

In effetti la 2-fenilchinolina, con la sua specifica e modesta dimensione strutturale, unitamente alla sua lipofilicità, presenta il vantaggio di sfuggire al legame "non specifico" con altre macromolecole cellulari, producendo un largo spettro d'attività e quindi una potente citotossicità, *in vitro* e *in vivo*, sia su leucemie che su tumori solidi.
Di recente nel nostro laboratorio sono stati sintetizzati una serie di complessi in cui l'intercalatore acridina orange è direttamente legata al Pt(II), attraverso la coordinazione dell'atomo di azoto endociclico (figura I.9) [14].



X = NO_3

X = PF_6

X = CF_3SO_3

X = BF_4

X = CF_3SO_3

Fig. I.9 Struttura dei complessi ionici acridinici

Auspicando il superamento della resistenza in alcune linee cellulari tumorali, per tutti questi derivati del *cis*-DDP è stata investigata l'attività citotossica su tre linee di melanoma umano (M14, JR8 e PLF2) e su due linee di neuroblastoma umano, SH-SY5Y e SH-SY5Y *cis*-DDP resistente. Dei complessi risultati più citotossici, ovvero $[Pt(NH_3)_2(Cl)(AO)]NO_3$ e $[Pt(en)(Cl)(AO)]BF_4$, è stato analizzato il ciclo cellulare da cui emerge che questi xenobiotici danneggiano il DNA irreparabilmente e a dosi alle quali, invece, il *cis*-DDP non mostra avere alcun effetto di perturbamento [15].
Inoltre, l'assenza di morte apoptotica rilevata, sta ad indicare che, anche se c'è un'overespressione della GSTP1, l'effetto citotossico è indipendente da questo sistema di detossificazione, come confermato dall'irreparabilità del danno provocato al DNA.

I.1.3 Complessi *ciclo*-metallati: classici metallointercalatori

Anche se non hanno dimostrato significativi vantaggi terapeutici, i primi derivati del *cis*-DDP hanno mantenuto il platino (II) come elemento metallico, in quanto i complessi del palladio (II), a causa della loro labilità nei fluidi biologici, non sono riusciti ad emergere per la loro attività antitumorale.
Tuttavia una rivalsa di questo metallo proviene dai complessi ciclopalladati, i quali presentano il vantaggio di essere più stabili e soprattutto meno tossici rispetto a quelli del Pt(II).
Il ridotto profilo tossicologico di questi complessi del Pd(II), infatti, suggerisce una maggiore selettività e quindi, una specificità d'azione in vivo [16].
Legami di tipo intercalativo con il DNA sono favoriti, come già ampiamente descritto, da quei complessi metallici contenenti leganti che hanno un largo sistema π, come terpiridine, bipiridine, fenantroline ecc., il cui piano di coordinazione del metallo coincide con quello del legante aromatico [17].

I complessi ciclometallati, o nello specifico ortometallati, sono complessi planari in cui leganti aromatici come fenilpiridine, fenantroline, fenilpirimidine e derivati simili sono legati al metallo contemporaneamente con un legame covalente ad un atomo donatore come N,C ed un legame σ attraverso l'atomo di carbonio dell'anello aromatico. I due siti di legame della molecola aromatica con il metallo possono essere ad una distanza che può variare dai tre ai sette termini.

L'effetto chelato è importante per la stabilità del complesso finale, per cui palladacicli contenenti leganti O-donatori sono poco abbondanti, poiché un metallo soft come il Pd(II) ha una forte preferenza per i leganti N-donatori.

D'altra parte il crescente interesse per i complessi ciclopalladati, come materiali biologicamente attivi, nasce dalla riscontrata stabilità e interessante attività antitumorale di C,N-cicli del Pd(II) verso diverse forme tumorali. Questi C,N cicli di Pd(II) sono complessi monomerici sintetizzati a partire dai precursori dimerici e hanno formula generale Pd(N-C)LX, dove (N-C) è il legante ciclometallante il cui atomo donatore è l'azoto di un'amina aromatica oppure alifatica, mentre L è un'amina e X è un legante cloruro o acetato (figura I.10) [16]. Di tutti i complessi è stata testata *in vitro* l'attività citotossica su un pannello di sette linee cellulari tumorali e tutti i complessi sono citotossici a concentrazioni μM.

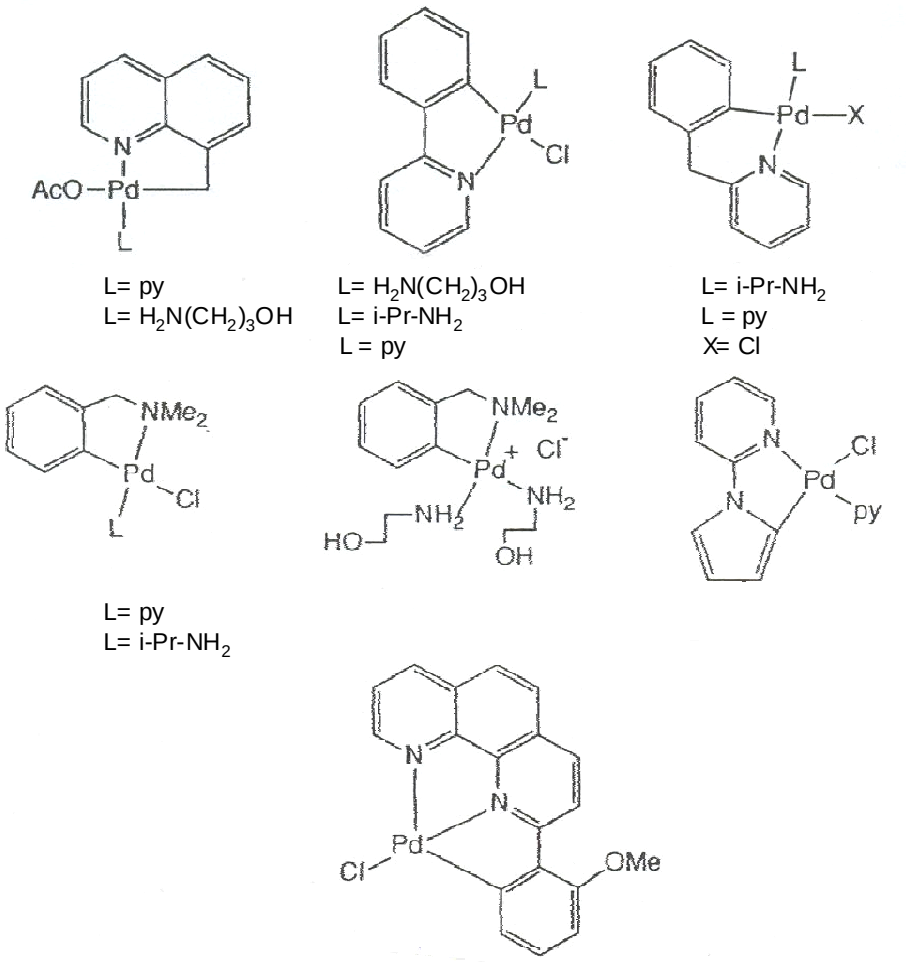


Fig. I.10 Struttura dei complessi ciclopalladati con formula generale Pd(N-C)LX

In particolare dal quadro dei risultati emerso si possono estrapolare le seguenti relazioni struttura-attività: a) L'attività di metallacicli a 5 termini è comparabile con quella di metallacicli a 6 termini; b) I complessi contenenti leganti acetato sono più citotossici rispetto ai complessi contenenti leganti cloruro, probabilmente a causa della loro maggiore solubilità; c) Il complesso ionico è il meno citotossico di tutti i complessi, probabilmente a causa della sua minore lipofilicità.

Un esempio più recente di complessi ciclopalladati che hanno dimostrato di possedere una specificità d'azione *in vivo*, contengono, da una parte un legante bifosfinico come

elemento comune, dall'altra un differente legante ciclometallante (figura I.11), per cui la specifica attività antitumorale osservata per ognuno di questi complessi dipende da fattori generati dalla struttura risultante [18].

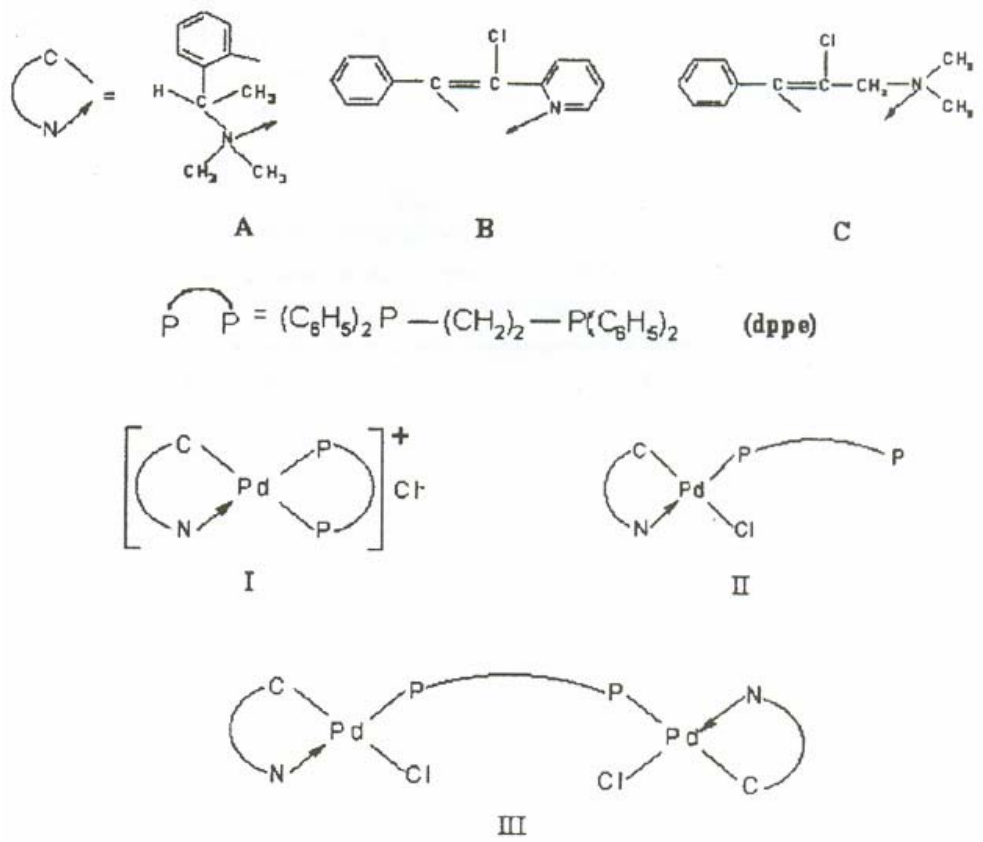


Fig. I.11 Complessi dei leganti bifosfinici

Questa famiglia di complessi ionici e neutri, contenenti leganti bifosfinici chelati o non, sono stati testati *in vitro* e *in vivo* su una linea cellulare di melanoma. Sulla base dei risultati ottenuti emergono le seguenti relazioni struttura-attività: a) la chelazione del legante bifosfinico non è un fattore cruciale per l'attività del complesso *in vivo*; b) esiste un'attività *in vitro* e *in vivo* enantioselettiva. Infatti tra i complessi che risultano essere attivi *in vitro*, solo uno è attivo *in vivo* ed è un complesso binucleare neutro del tipo III in cui il frammento C,N è il ciclo A, ovvero l'enantiomero S(-) dell'N,N-dimetil-l-fenetilamina o (dmpa).

Questo complesso interferisce con il metabolismo respiratorio delle cellule, e dopo 24 h d'incubazione, quindi con una cinetica lenta, causa la degradazione del DNA, in seguito probabilmente a reazioni d'intercalazione [18].

Quando il campo si restringe alla comparazione dell'attività tra complessi isostrutturali il ruolo giocato da apparentemente piccole differenze di struttura risulta più evidente.

Infatti, da studi di attività antiproliferativa, effettuati su complessi ciclometallati binucleari a ponte cloro e a ponte acetato di Pd(II) e Pt(II) contenenti lo stesso legante, l'N-(4-metossifenil)-α-benzoilbenzilidenamina (figura I.12), è emerso che, il grado di attività di questi complessi isostrutturali è funzione della chiralità, del metallo e del gruppo uscente [19].

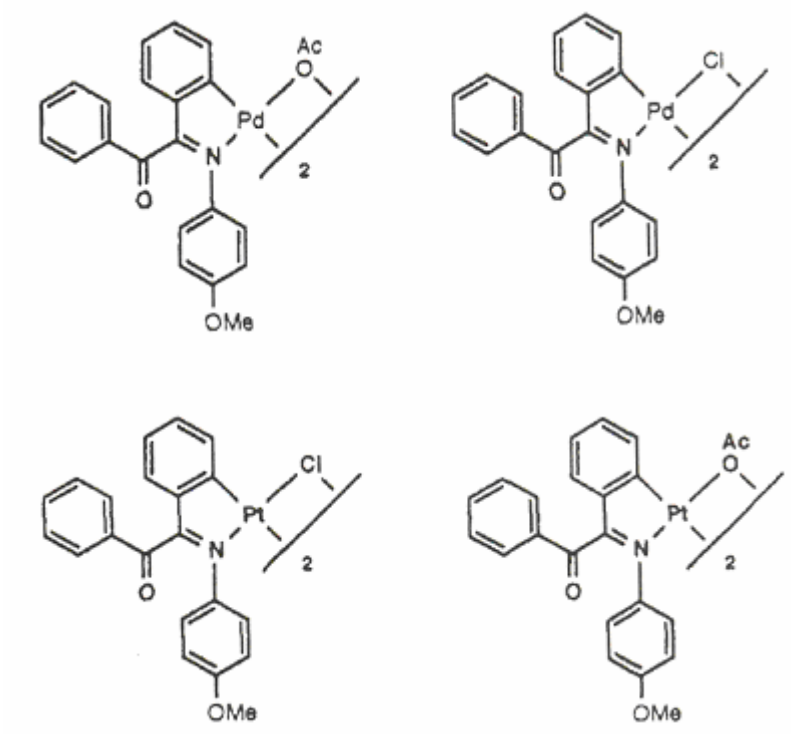


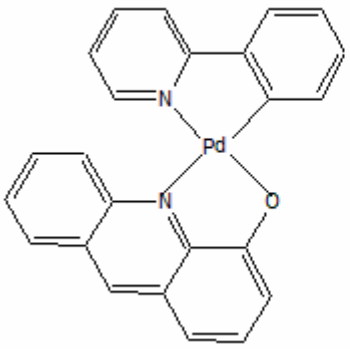
Fig. I.12 Struttura dei complessi ciclopalladati binucleari a ponte cloro e a ponte acetato della N-(4-metossifenil)-α-benzoilbenzilidenamina.

Nello specifico, ci sono delle differenze nell'attività antiproliferativa tra i due complessi del Pd(II), identici in tutti i parametri strutturali, ad eccezione della specifica orientazione del gruppo benzoile rispetto al legame chirale CO-CN.

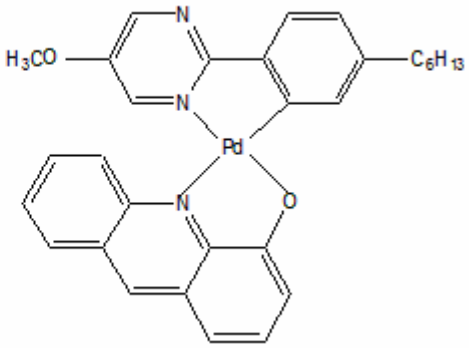
Inoltre i complessi del Pt(II) sono più citotossici degli isostrutturali del Pd(II) e, infine, tra quelli del Pt(II) il binucleare a ponte acetato è quello con più alta attività antiproliferativa.

Di recente nel nostro laboratorio è stata effettuata la sintesi di due complessi ciclometallati bifunzionali di Pd(II), il complesso [(2-fenipiridina)Pd(4-O-acridina)], e il complesso [(5-esil-2-(4'-metossi-fenilpirimidina)Pd(4-O-acridina)], e su uno dei due è stata effettuata l'investigazione dell'attività antiproliferativa contro tre linee cellulari di carcinoma ovarico [20].

Questi complessi sono sistemi che contengono un legante intercalante, la 4-idrossiacridina, che agisce nei confronti del Pd(II) come chelante bidentato (N,O) e differiscono per il frammento ciclopalladato.



[(2-fenipiridina)Pd(4-O-acridina)]



[(5-esil-2-(4'-metossi-fenilpirimidina)Pd(4-O-acridina)]

Entrambi i complessi si formano in seguito a rottura del ponte cloro del corrispondente precursore binucleare, e chelazione della 4-idrossiacridina favorita dall'ambiente alcalino. La 4-idrossiacridina come è stato in parte già detto per le acridine in generale,

è anch'essa una molecola intercalante la doppia elica del DNA, per cui è stata scelta come legante complementare nel tentativo di ottenere un effetto sinergico con il frammento ciclometallato a livello dell'attività citotossica, grazie all'estesa superficie intercalante del sistema risultante.

In effetti, un IC_{50} nettamente inferiore del complesso della 2-fenilpiridina rispetto al *cis*-DDP e alla 4-idrossiacridina suggerisce una specificità d'azione imputabile probabilmente ad intercalazione, favorita dalla geometria planare-quadrata del largo complesso.

Questi risultati, così come l'investigazione dell'attività citotossica e dell'interazione con il DNA di altri due classici metallointercalatori, dimostrano come il drug design per ottenere "migliori" agenti chemioterapici, si possa basare sulla graduale costruzione di una molecola in cui vengano introdotte più funzionalità. È questo il caso di due complessi con geometria planare-quadrata e natura monocationica, che contengono lo stesso frammento cicloplatinato ma differiscono per il secondo legante coordinato al metallo e sono i complessi [Pt(6-fenil-2,2'-bipiridina)(2,4-diamino-6-(4-piridil)-1,3,5-triazina)]PF_6, e [Pt(6-fenil-2,2'-bipiridina)(pyridina)]PF_6 (figura I.13) [21,22].

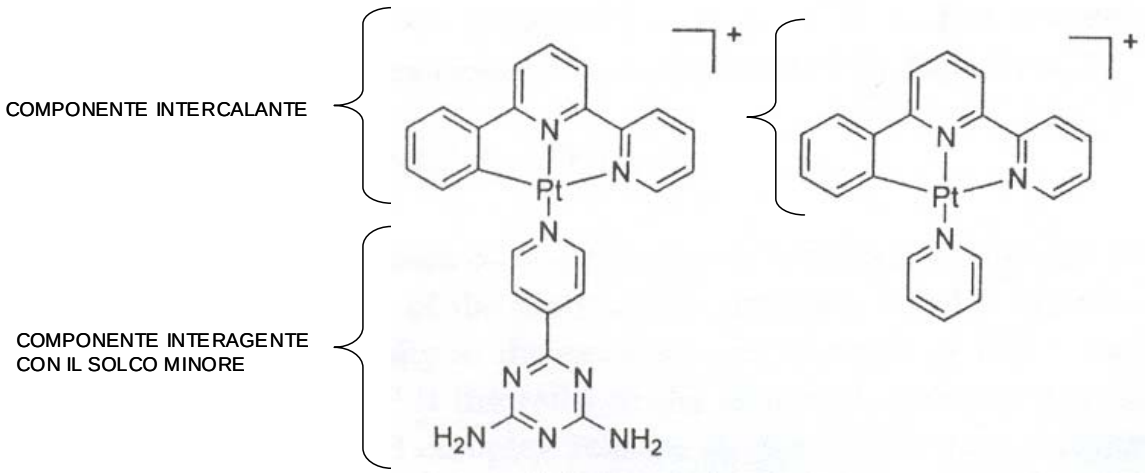


Fig. I.13 Struttura di [Pt(6-fenil-2,2'-bipiridina)(2,4-diamino-6-(4-piridil)-1,3,5-triazina)]PF_6, e [Pt(6-fenil-2,2'-bipiridina)(pyridina)]PF_6

In particolare, questi complessi hanno in comune la funzionalità intercalante, ma uno dei due contiene in aggiunta una componente legante il solco minore, attraverso un triplice sito di legame a idrogeno. Questa parte aggiuntiva del complesso rende ragione della sua maggiore attività citotossica su alcune linee cellulari tumorali rispetto all'altro complesso che interagisce con il DNA solo attraverso intercalazione. Inoltre il complesso bifunzionale rimane attivo contro due linee cellulari *cis*-DDP resistenti, mentre analizzando l'aspetto qualitativo della citotossicità è stato dimostrato che questa avviene attraverso apoptosi.

Questo dimostra come, modificando anche un solo sito strutturale del complesso, in questo caso R^1 (figura I.14) l'attività del complesso cambia, incluso sia il meccanismo di citotossicità che l'affinità di legame per il DNA.

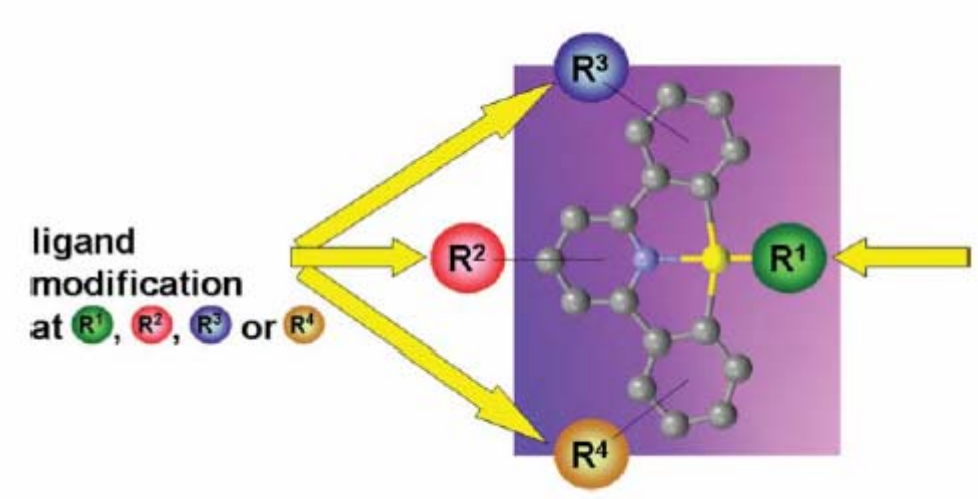


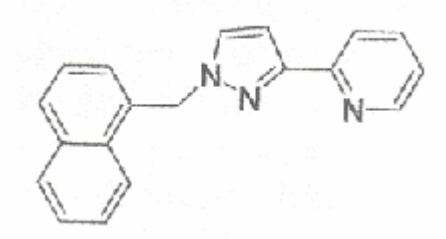
Fig. I.14 Possibili siti per la modificazione strutturale del complesso

I.1.4 Struttura e attività biologica di complessi di metalli alternativi al Pt(II) ed al Pd(II)

Da quanto emerso finora, l'intercalazione rappresenta uno dei modi di legame al DNA più importante attraverso cui i 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 valenze può dare luogo a differenti geometrie che possono influenzare il tipo di legame al DNA.

Un'esaustiva letteratura su metallointercalatori del Ru(II) e Rh(III) descrive lo studio d'interazione di questi complessi con il DNA, i quali, anche se hanno una geometria differente dalla classica quadrato-planare, sono complessi relativamente semplici [16]. 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.

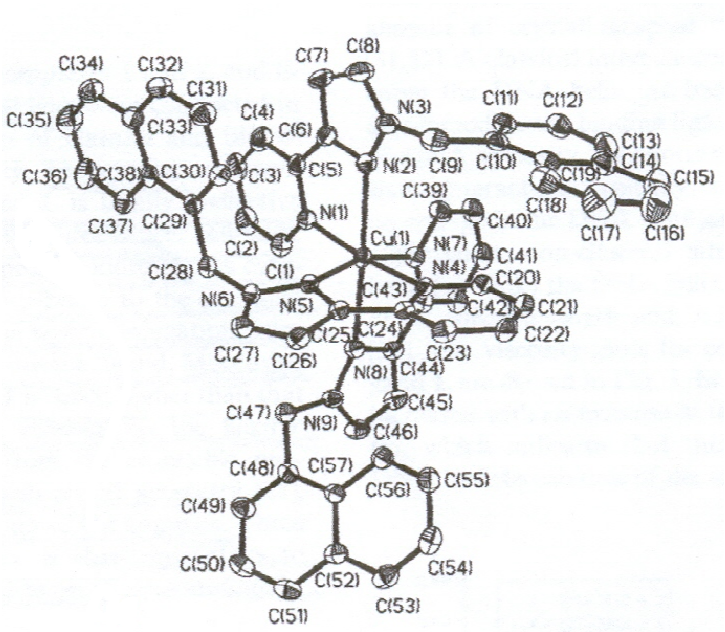
Un esempio di questi nuovi complessi metallici è rappresentato da due complessi di Cu(II) e Zn(II), il $[Cu(L)_3](ClO_4)_2$ e il $[Zn(L)_3](ClO_4)_2(H_2O)_2$, dove L è l'1-[3-(2-piridil)pirazol-1-ilmetil]naftalene [23].



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

Questi due complessi sono stati testati contro tre linee cellulari tumorali e la riscontrata attività è dovuta ad interazione con il DNA attraverso intercalazione grazie alla planarità del sistema metallo-legante.

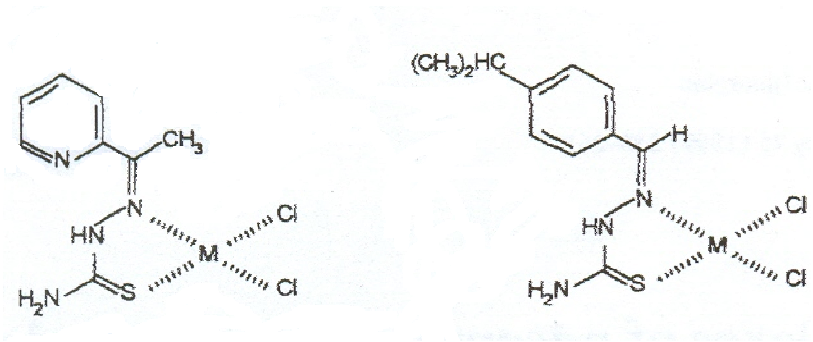
Inoltre la maggiore attività del Cu(II) è dovuta alla geometria distorta del complesso (figura I.15) derivante dalle proprietà elettroniche del sistema.



$[Cu(L)_3](ClO_4)_2$

Fig. I.15 Struttura del complesso di Cu(II) contenente il legante 1-[3-(2-piridil)pirazol-1-ilmetil]naftalene

Da uno studio effettuato invece sull'attività citotossica di complessi prima di Pd(II) e Pt(II) [24] e poi di Cd(II) e Zn(II) [25] con leganti tiosemicarbazonici (figura I.16) è emerso che i migliori potenziali agenti antitumorali sono i complessi dello Zn(II).



M= Pd(II), Pt(II), Zn(II) e Cd(II)

Fig. I.16 Complessi contenenti leganti tiosemicarbazonici

I leganti di questi complessi possiedono proprietà antibatterica, antivirale e antitumorale e considerando la loro capacità di coordinazione si è voluto indagare sulla loro potenzialità di aumentare le proprietà farmacologiche quando si coordinano al metallo. L'attività di questi complessi è stata testata quindi su linee cellulari sensibili e resistenti al *cis*-DDP e si è verificato che tutti i complessi sono attivi nelle linee cellulari *cis*-DDP resistenti. Tuttavia il complesso di Zn(II) mostra *in vitro* il miglior indice terapeutico, ovvero uccide le cellule a concentrazioni significativamente più basse rispetto a quelle che occorrono per uccidere le cellule sane, e questo avviene grazie alla specifica induzione all'apoptosi.

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 chimici sui leganti può ribaltare l'attività dell'intero complesso metallico.

Bibliografia del I capitolo

[1] E. Wong and C. M. Giandomenico, *Chem. Rev*. **1999**, 99, 2451-2466.

[2] P. J. Sadler and Z. Guo, *Pure and Appl. Chem*. **1998**, 70, 863-871.

[3] C. X. Zhang and S. Lippard, *Cur. Op. in Chem. Biol.* **2003**, 7, 481-489.

[4] V. Brabec and J. Kasparkova, *Drug Res. Updates* **2002**, 5, 147-161.

[5] T. Okada, I. M. El-Mehasseb, M. Kodaka, T. Tomohiro, K. Okamoto and H. Okuno, *J. Med. Chem*., **2001**, 44, 4661-4667.

[6] I. Haq and J. Ladbury, *J. Mol. Recognit*. **2000**, 13, 188-197.

[7] K. W. Jennette, S. J. Lippard, G. A. Vassiliades, W. R. Bauer, *Proc. Natl. Acad. Sci*. U.S.A., **1974**, 71, 3839.

[8] F. Cago, *A Comp. to Methods in Enzim*. **1998**, 14, 277-292.

[9] W. I. Sundquist and S. Lippard, *Coord. Chem. Rev*. **1990**, 100, 293-322.

[10] C. Metcalfe and J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev*. **2003**, 32, 215-224.

[11] B. M. Zeglis, V. C. Pierre and J. K. Barton, *Chem. Comm.* **2007**, 4565-4579.

[12] Y. Mikata, M. Yokoyama, K. Mogami, M. Kato, I. Okura, M. Cikira, S. Yano, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 279,51-57.

[13] G. J. Atwell, C. D. Bos, B. C. Baguley and W. A. Denny, *J. Med. Chem*. **1998**, 31, 1048-1052.

[14] A. Crispini, D. Pucci, S. Sessa, A. Cataldi, A. Napoli, A. Valentini and M. Ghedini, *New J. Chem*. **2003**, 27 1497-1503.

[15] A. Valentini, D. Pucci, A. Crispini, G. Federici and S. Bernardini, *Chimico-Biol. Inter*. **2006**, 161, 241-250.

[16] J. D. Higgins, L. Neely and S. Fricker, *J. Inorg. Biochem*. **1993**, 49, 149-156.

[17] K. E. Erkkila, D. T. Odom and J. K. Barton, *Chem. Rev*. **1999**, 99, 2777-2795.

[18] E. G. Rodrigues, L. S. Silva, D. M. Fausto, M. S. Hayashi, S. Dreher, E. L. Santos, J. B. Pesquero, L. R. Travassos and A. C.F. Caires, *Int. J. Cancer* **2003**, 498-504.

[19] C. Navarro-Ranninger, I. Lopez-Solera, J. M. Perez, J. Rodriguez, J. L. Garcìa-Ruano, P. R. Raithby, J. R. Masaguer and C. Alonso, *J. Med. Chem*. **1993**, 36, 3795-3801.

[20] D. Pucci, V. Albertini, R. Bloise, A. Bellusci, A. Castaldi, C. V. Catalano, M. Ghedini and A. Crispini, *J. Inorg. Biochem*. **2006**, 100, 1575-1578.

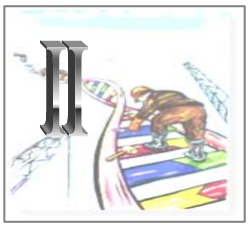
[21] D. Ma and C. Che, *Chem. Eur. J*. **2003**, 9, 6133-6144.

[22] R. Wai-Yin Sun, D. Ma, E. L. Wong and C. Che, *Dalton Trans.* **2007**, 4884-4892.

[23] H. Zhang, C. Liu, X. Bu and M. Yang, *J. Inorg. Biochem*. **2005**, 99, 1119-1125.

[24] A. G. Quiroga, J. M. Pèrez, I. Lòpez-Solera, J. R. Masaguer, A. Luque, P. Romàn, A. Edwards, C. Alonso and C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem*. **1998**, 41, 1399-1408.

[25] J. M. Pèrez, A. I. Matesanz, A. Martìn-Ambite, P. Navarro, C. Alonso and P. Souza, *J. Inorg. Biochem*. **1999**, 75, 255-261.

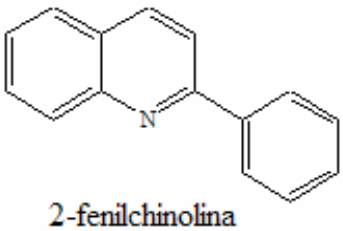


NUOVI FARMACOFORI PER IL DESIGN DI COMPOSTI ANTITUMORALI

II.1 2-FENILCHINOLINA: "MINIMAL INTERCALATOR"

II.1.1 Profilo farmacologico

Nel primo capitolo si è parlato della 2-fenilchinolina dicendo che la sua struttura aromatica triciclica 2+1, quindi non fusa, fa di questa piccola molecola un farmacoforo sufficientemente selettivo per il legame al DNA, attraverso intercalazione.



2-fenilchinolina

Da qui il crescente interesse verso la sintesi e la valutazione dell'attività biologica di una serie di derivati della 2-fenilchinolina. Ma prima ancora di essere una molecola intercalante la 2-fenichinolina è una molecola con elevata affinità di legame per il recettore estrogenico β (figura II.1) [26].

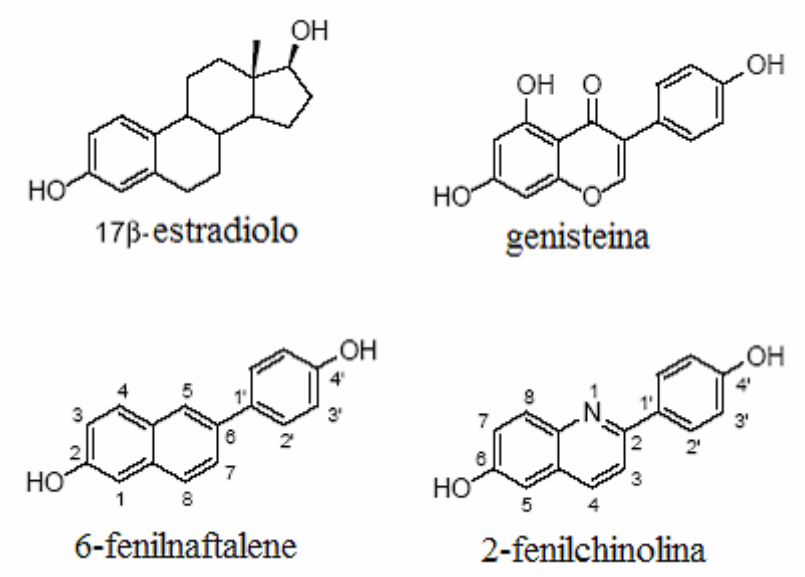


Fig. II.1 Evoluzione della struttura che lega il recettore ERβ

Il recettore estrogenico β, ERβ, è un fattore di trascrizione che viene attivato in seguito a legame con il legante 17β-estradiolo e gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e mantenimento delle funzioni del sistema riproduttivo mammario e di altri tessuti non sessuali come quello scheletrico, cardiovascolare e sistema nervoso centrale.

Lo sviluppo di selettivi agonisti del ERβ rappresenta un potenziale utilizzo terapeutico per il trattamento di malattie infiammatorie, ma soprattutto per il trattamento di tumori ormono-dipendenti.

Di recente una serie di 2-fenilchinoline variamente sostituite sono state identificate come una nuova classe di legante selettivo per il ERβ.

In particolare, la sostituzione in posizione 4, con gruppi elettronegativi, si è rivelata essenziale per la selettività di legame e alcuni di essi, con una affinità di legame a concentrazioni nanomolari, hanno dimostrato di essere più selettivi del fitoestrogeno genisteina.

L'evidenza sperimentale dell'RNA come target di nuovi farmaci antibiotici ha incrementato l'interesse nello sviluppo di nuovi composti con basso peso molecolare che legassero selettivamente l'RNA.

Così la strategia sintetica per lo sviluppo di nuovi agenti antibatterici ha prodotto la sintesi di un peptide ottenuto dall'incorporazione, in posizione 4 e 8 della 2-fenilchinolina, di catene amminoacidiche (figura II.2) [27].

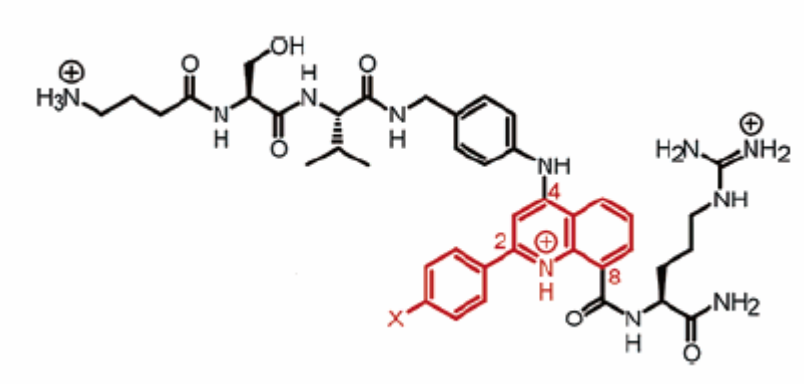


Fig. II.2 Peptide intercalante

Questo peptide basato sulla 2-fenilchinolina lega l'RNA allo stesso modo della peptide-acridina 4-9 disostituita, ma con un'affinità maggiore. Infatti il peptide contenente la 2-fenilchinolina lega l'RNA a concentrazioni nanomolari.

L'interesse in medicina riguardo allo sviluppo di nuovi agenti fotochimici che "taglino" selettivamente il DNA attraverso irradiazione con un raggio di luce ad una specifica lunghezza d'onda e in condizioni blande, senza utilizzare cioè agenti riducenti, ha condotto il molecular design verso la sintesi di sistemi ibridi, ovvero derivati della 2-fenilchinolina contenente carboidrati (figura II.3) [28].

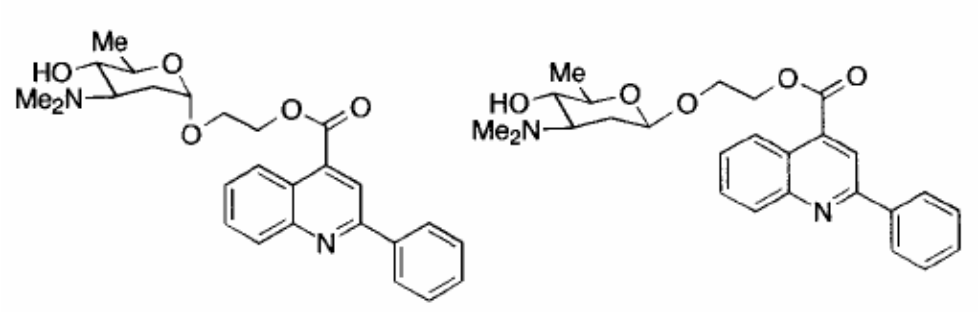


Fig. II.3

L'intento di ottenere agenti contenenti la 2-fenilchinolina, in grado di tagliare il DNA, si è basato sul fatto che il doppio legame coniugato C=N della 2-fenilchinolina può generare uno stato fotoeccitato $^3(n\rightarrow\pi^*)$ sotto fotoirradiazione che può avere un carattere radicalico e quindi in grado di tagliare o "cleavage" il DNA.
Così la presenza dell'amminozucchero favorisce l'intercalazione della 2-fenilchinolina che senza fotoirradiazione produce una citotossicità, rispettivamente di 12 e 18 μM per i due composti. Dopo fotoirradiazione l'IC_{50} si abbassa a 0.44 e 0.25 μM, indicando chiaramente che la citotossicità è correlabile con la capacità dei composti di tagliare il DNA.

II.1.2 Complessi ciclometallati della 2-fenilchinolina

La citotossicità del complesso ciclometallato di Au(III) della 2-fenilpiridina, $[AuCl_2(ppy)]$, [29], su una varietà di linee cellulari, ha determinato un crescente interesse nello sviluppo di complessi di oro con potenziali proprietà farmacologiche, ottenendo la ciclometallazione di altri leganti C,N.
Così, utilizzando la 2-fenil-4-(metilcarbossilato)chinolina, attraverso reazione di *trans*-metallazione, ovvero passando per un derivato del mercurio, si ottiene un complesso di Au(III) mononucleare, contenente cloruri come leganti complementari (figura II.4).

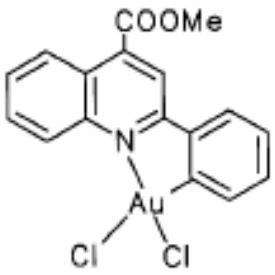


Fig. II.4

Utilizzando questo complesso come precursore poi, mediante sostituzione di un atomo di cloro, si è ottenuto un complesso, sempre mononucleare di oro, in cui un legante è monodentato, l'altro è ortometallato (figura II.5) [29].

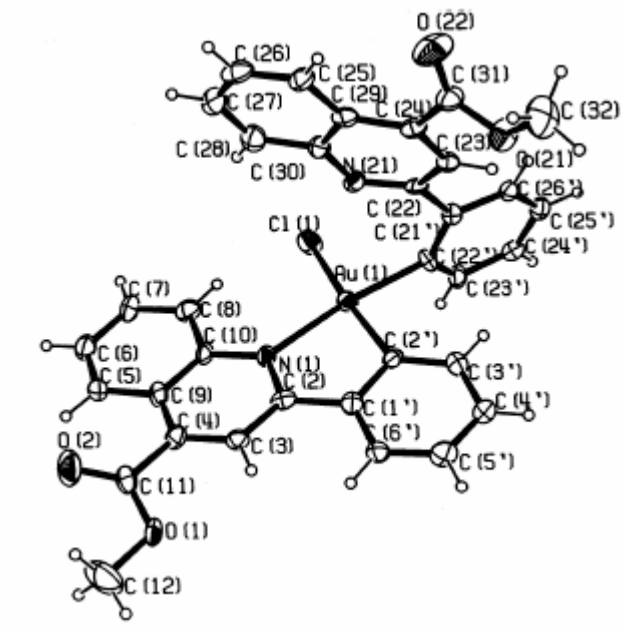


Fig. II.5

Anche la cicloplatinazione della 2-fenilchinolina è nota, infatti una serie di complessi di Pt(II) di formula generale $Pt(L\text{-}L^{'})(dppm)^{n+}$ sono stati sintetizzati per verificare come cambiano le proprietà fotofisiche del complesso variando il legante $L\text{-}L^{'}$. Infatti mentre il legante dppm che corrisponde al bis(difenilfosfino)metano viene mantenuto in tutti i complessi il legante $L\text{-}L^{'}$ è stato variato scegliendo tra leganti $C\text{^}C^{'}$, C^N e N^N. Tra i leganti C^N fa parte anche la 2-fenilchinolina che è stata cicloplatinata e il cui complesso è stato analizzato attraverso diffrattometria a raggi X, ottenendo la risoluzione della struttura (figura II.6) [30].

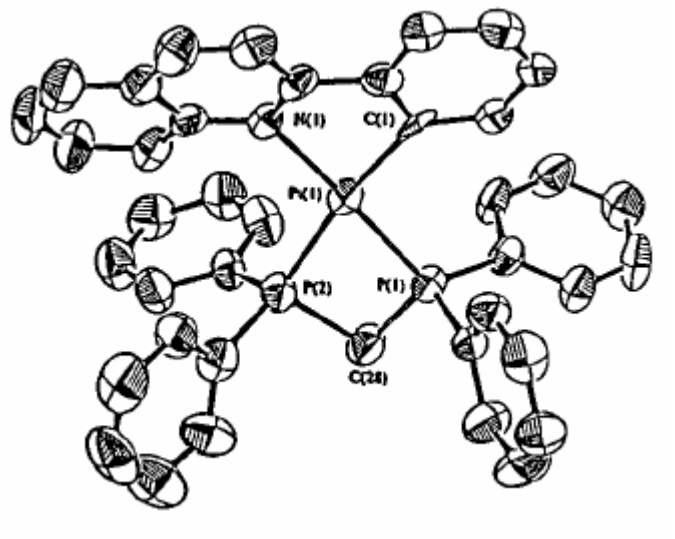


Fig. II.6

Una serie di copolimeri basati su monomeri di fluoreni in coniugazione con carbazoli e complessi di iridio(III) sono stati sintetizzati attraverso reazione di policondensazione per effettuarne un'investigazione elettrochimica. Questi complessi di iridio sono complessi contenenti due molecole di 2-fenilchinolina ciclometallata e vengono incorporati nel copolimero attraverso unità di legante ancillare β-dichetone che completa la sfera di coordinazione del metallo (figura II.7) [31].

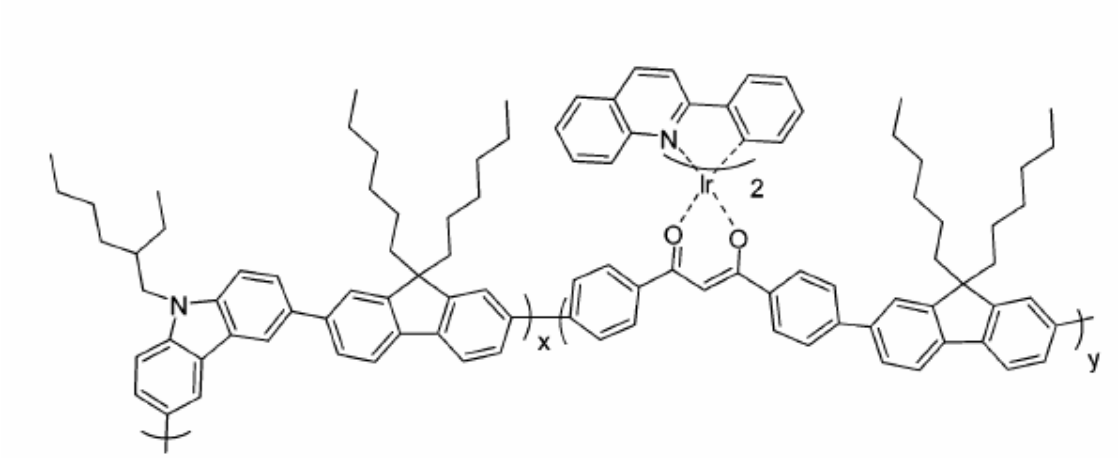


Fig. II.7

Con l'intento di sviluppare nuove sonde luminescenti che trovano una potenziale applicazione in bioanalitica, sono stati sintetizzati e caratterizzati per quanto riguarda le proprietà fotofisiche ed elettrochimiche, una serie di complessi ciclometallati di iridio(III) contenenti una bipiridina funzionalizata, la 4-(N-((2-biotinamido)etil)amino-metil)-4'-metil-2,2'-bipiridina) (figura II.8) [32].

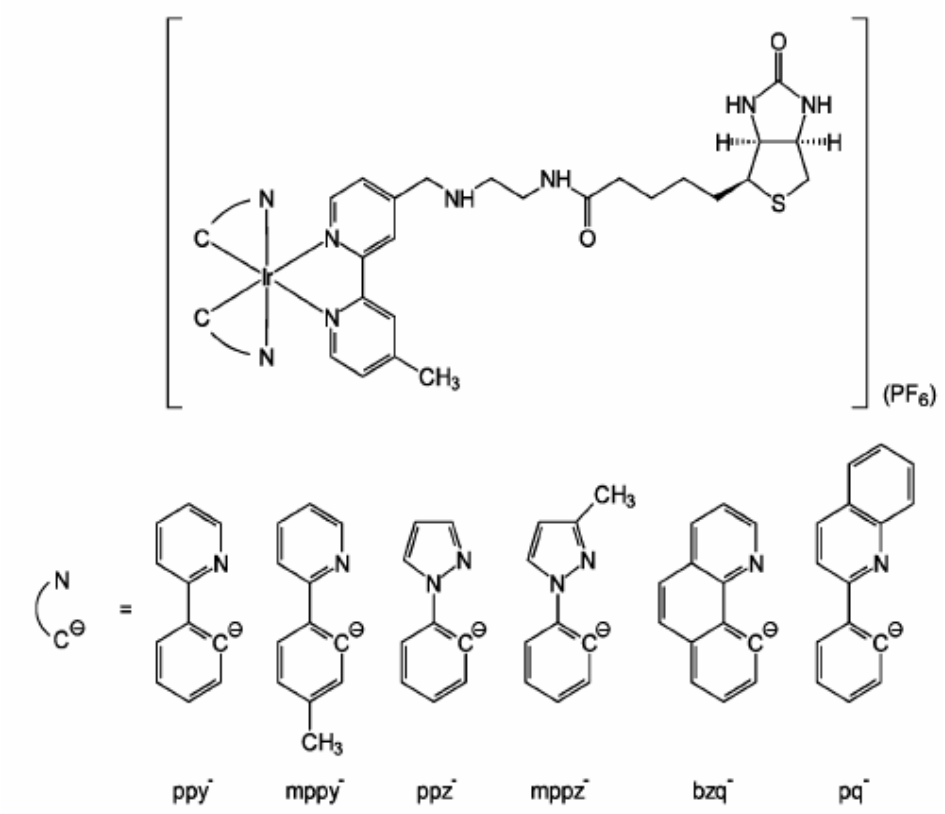


Fig. II.8

È stata fin qui descritta ciclometallazione della 2-fenilchinolina da parte di diversi metalli. Tuttavia finora non sono stati riportati in letteratura esempi di ciclopalladazione di questo legante ma esiste un complesso del Pd(II) in cui però la 2-fenilchinolina funziona da legante monodentato (figura II.9) [33].

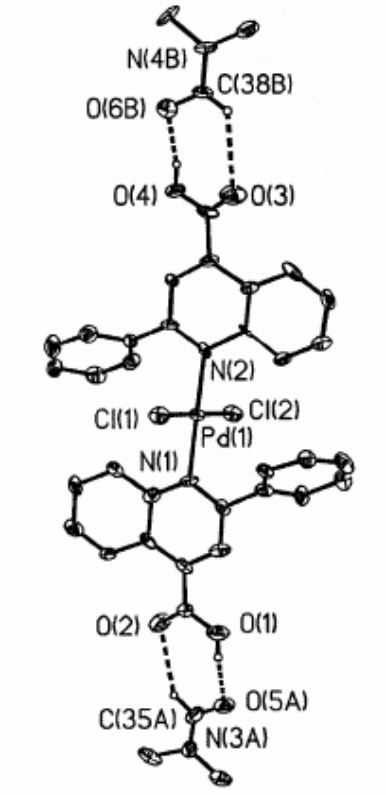


Fig. II.9

La sintesi di questo complesso rientra nel design di strutture supramolecolari, infatti con l'intento di ottenere polimeri con questo complesso è stata sfruttata la capacità dei gruppi di acidi carbossilici di formare legami a ponte di idrogeno come mostrato nella figura II.9.

La possibilità di ottenere i primi complessi ciclopalladati della 2-fenilchinolina ha rappresentato uno dei motivi per cui è stata scelta come legante di alcuni dei nuovi complessi facente parte di questo lavoro.

II.2 LA CURCUMINA, UN NATURALE β'-IDROSSI-α,β-CHETONE INSATURO CON MULTIFUNZIONALITA' FARMACOLOGICA

II.2.1 Struttura chimica della curcumina

La curcumina o (1,7-bis(4^{I}-idrossi-3^{I}-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione), ovvero diferuloilmetano, è un naturale componente (2-5%) del "turmeric" o *Curcuma Longa Linn*, una pianta erbacea perenne, appartenente alla famiglia delle Zingiberaceae e coltivata principalmente nel sud e sud-est dell'Asia tropicale.

La radice rizomatosa deve il suo colore giallo-arancio ai curcuminoidi che contiene. La curcumina infatti, è uno dei componenti della pianta, insieme ad altri curcuminoidi che sono la dimetossicurcumina o curcumina II e la bis-dimetossicurcumina o curcumina III (figura II.10) [34].

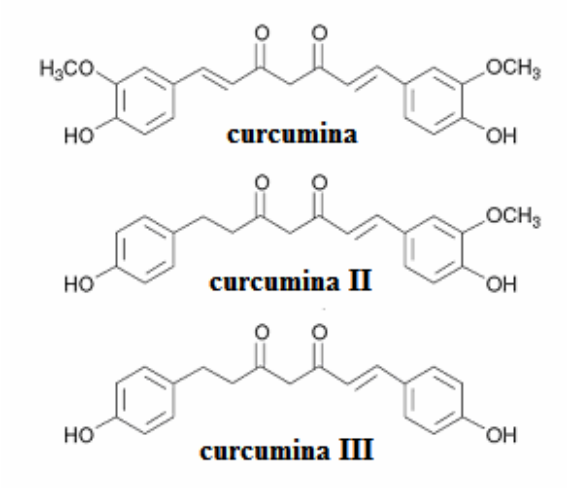


Fig.II.10 Struttura dei principali curcuminoidi contenuti nella *Curcuma Longa Linn*

La curcumina disponibile commercialmente contiene tutti e tre i componenti nella seguente percentuale: 77% di curcumina I, 17% di demetossicurcumina e 3% di bisdemetossicurcumina [33].

Più in generale questo ingrediente del curry e agente colorante dei cibi, farmaci e cosmetici si può definire come un farmacoforo contenente un frammento β'-idrossi-α,β-chetone insaturo (figura II.11) che è responsabile in parte delle sue molte attività farmacologiche [35].

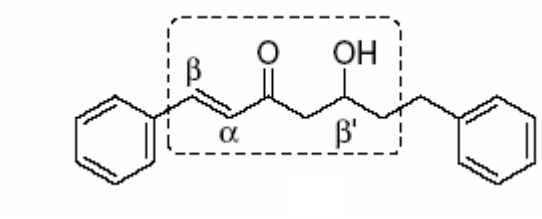


Fig.II.11 Struttura base dei curcuminoidi

II.2.2 Attività biologiche della curcumina

La curcumina per secoli è stata consumata come spezia alimentare e usata nella medicina tradizionale indiana per curare anoressia, disturbi biliari, epatici, reumatismi, sinusiti e altre malattie infiammatorie. Negli ultimi decenni, gli studi svolti sulla comprensione dei meccanismi molecolari responsabili delle attività biologiche di questo farmacoforo hanno allargato molto il suo spettro di attività (figura II.12) rispetto a quelle, per così dire, assodate che sono l'attività antiossidante, antinfiammatoria, anticarcinogenica e/o chemiopreventiva e antitumorale [36, 37].

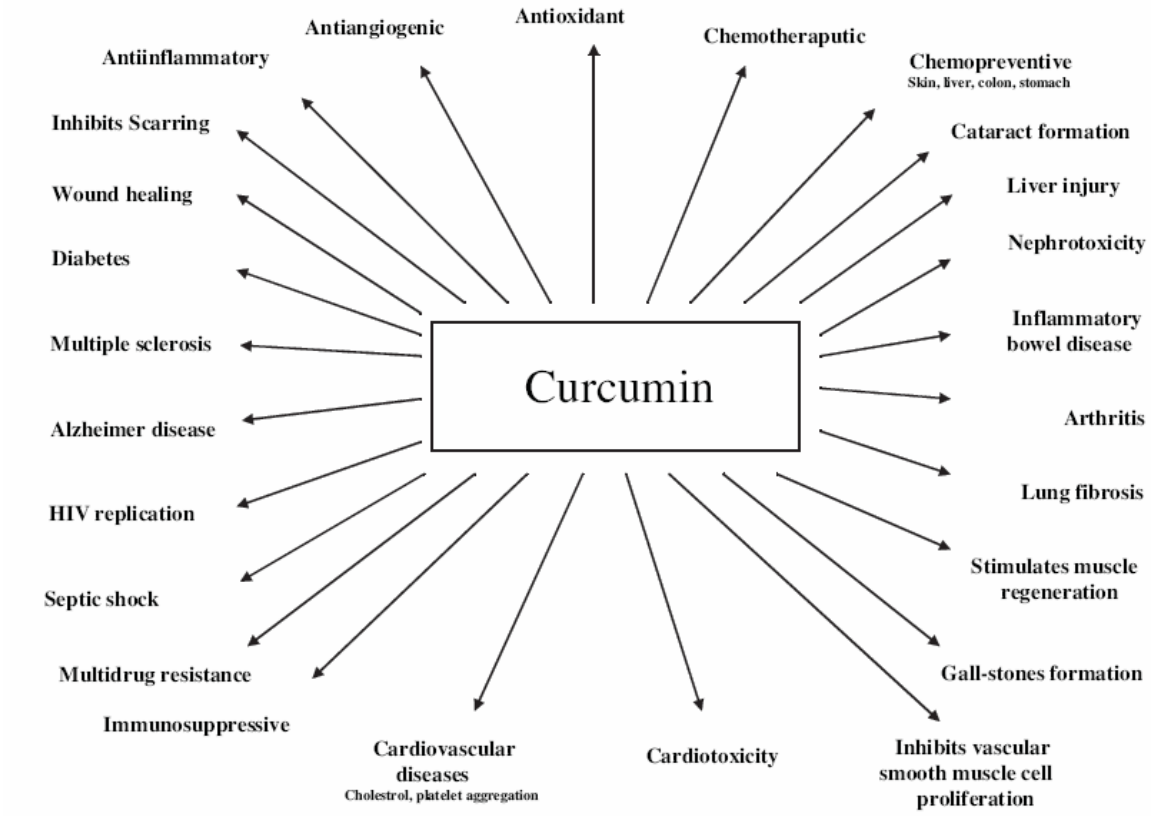


Fig.II.12 Spettro di attività della curcumina

I meccanismi attraverso cui la curcumina esplica queste attività non sono ancora del tutto chiari, tuttavia vari studi hanno dimostrato che questa molecola modula una varietà di target molecolari, inclusi i fattori di crescita, i recettori dei fattori di crescita, fattori di trascrizione, citochine, enzimi e geni che regolano l'apoptosi.

II.2.3 Attività antiossidante della curcumina

Lo stress ossidativo gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi di varie malattie come ischemia miocardica, aterosclerosi, infiammazione e cancro. La curcumina possiede maggiore attività antiossidante rispetto alla vitamina C ed E e quest'attività è dovuta alla sua capacità di inibire lo stress ossidativo attraverso inibizione della perossidazione lipidica [36]. Questa ha come conseguenza la degradazione lipidica, quindi citolisi e viene causata a sua volta, dall'accumulo di radicali liberi. In questo senso la curcumina agisce come un potente scavenger di varie specie radicaliche reattive dell'ossigeno, quale l'anione superossido, il radicale idrossilico, l'ossido nitrico agendo essa stessa come molecola antiossidante. Inoltre esercita attività antiossidante anche in maniera indiretta, ovvero modula l'attività di enzimi antiossidanti come superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi. Nel tentativo di estrapolare un quadro di relazione struttura-attività sono stati studiati analoghi della curcumina che sono in parte naturali, in parte di sintesi [38,39]. Da questo studio è emerso che gli analoghi fenolici sono più attivi degli analoghi non fenolici, per cui si deduce che i gruppi fenolici sono essenziali per l'attività scavenger. Non solo, ma la presenza dei gruppi metossi aumentano l'attività. Anche il frammento 1,3 dichetonico sembra essere un elemento strutturale essenziale per l'attività antiossidante della curcumina.

II.2.4 Attività antitumorale della curcumina

La curcumina agisce contro molte forme tumorali a differenti stadi dello sviluppo, come riportato in figura II.13, e questo si spiega con il fatto che agisce su un'infinità di meccanismi molecolari.

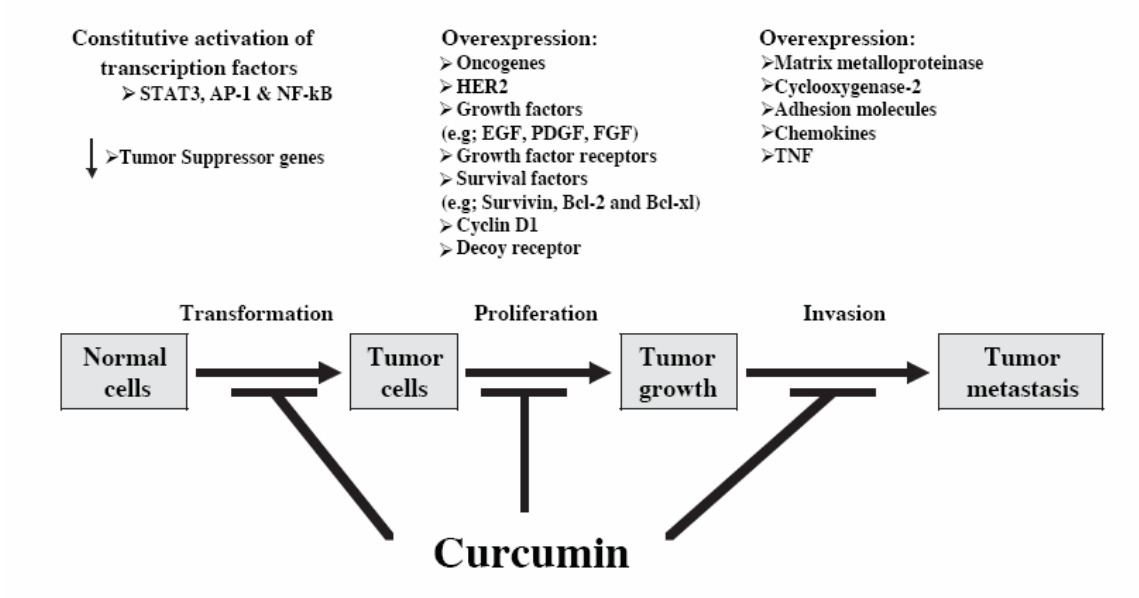


Fig.II.13 Proprietà antitumorali della curcumina

E' stato dimostrato, ad esempio, che la curcumina ha un'attività di downregulation del recettore per il fattore di crescita EGF e del protooncogene HER2/neu che stimolano la proliferazione del cancro del seno [36].

La curcumina opera anche sopprimendo il fattore di trascrizione nucleare kappa B o NF-κB necessario per l'espressione di geni implicati nella proliferazione cellulare, metastasi, angiogenesi e resistenza alla chemioterapia. Quest'ultima si verifica in quanto questo fattore di trascrizione inibisce l'apoptosi indotta dai chemioterapici.

Il ruolo di questo fattore di trascrizione è stato investigato anche nelle cellule tumorali prostatiche androgeno-indipendenti DU 145 e androgeno-dipendenti LNCaP [40]. In entrambe queste linee cellulari la curcumina induce apoptosi attraverso downregulation delle proteine antiapoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL [41] e attivazione della procaspasi-3 e procaspasi-8. Tuttavia il fattore di trascrizione NF-κB che è costitutivo nelle DU 145 ed inducibile nelle LNCaP gioca un ruolo essenziale nella resistenza all'apoptosi ed è stato dimostrato che la curcumina abroga questa sua attività. È riportato infatti che la curcumina da sola ad una dose di 50 μM inibisce completamente la proliferazione in entrambe le linee cellulari [40].

Ma la curcumina induce apoptosi attraverso meccanismi differenti e allo stesso tempo paralleli. Infatti i fattori NF-κB e AP-1 o proteina attivante-1, sono implicati nella regolazione del gene che esprime la GSTP1-1, isoforma della superfamiglia di emzimi citosolici deputati alla detossificazione di xenobiotici, tossine e carcinogeni in generale. E' stato riscontrato che c'è un'overespressione in alcune forme tumorali, di questa isoforma enzimatica, responsabile della multiresistenza ai farmaci e la curcumina induce apoptosi in queste linee cellulari tumorali inibendo l'espressione della GSTP1-1 e agendo pertanto a livello trascrizionale attraverso l'inibizione dell'attivazione dei fattori NF-κB e AP-1 [42].

Alcuni studi hanno dimostrato che la curcumina ha un'attività di downregulation dell'espressione della proteina ciclossigenasi-2 o COX-2 in molte linee cellulari tumorali, e questo molto probabilmente avvine sempre attraverso inibizione dell'attivazione del fattore NF-κB in quanto l'espressione della COX-2 dipende dalla sua attivazione [37].

La curcumina agisce anche a livello dell'espressione delle molecole di adesione sulla superficie cellulare. Le molecole di adesione sono importanti nel fenomeno della metastasi. È stato dimostrato che la curcumina causa soppressione dello sviluppo del tumore e induzione all'apoptosi attraverso downregulation del fattore NF-κB che a sua volta causa downregulation dell'espressione delle molecole di adesione sulla superficie di cellule endoteliali [43].

La metastasi e la crescita tumorale dipende oltre che dalla capacità di adesione intercellulare anche dall'angiogenesi, essenziale per molti tumori solidi, tra cui il cancro al seno. L'angiogenesi o formazione di nuovi vasi sanguigni, è essenziale in alcuni processi fisiologici come il regolare sviluppo embrionale, riproduzione e riparazione di tessuti. Un'angiogenesi incontrollata è associata a patologie quali artrite reumatoide, diabete e crescita tumorale. La curcumina ha dimostrato di essere un fattore antiangiogenico *in vitro*, sopprimendo la proliferazione di cellule endoteliali umane e *in vivo*, inibendo l'angiogenesi delle cellule prostatiche umane LNCaP [36].

Questi descritti sono solo alcuni dei complessi e intercorrelati meccanismi molecolari attraverso cui la curcumina esplica la sua attività di inibizione dello sviluppo e progressione tumorale. Si può riassumere dicendo che i targets macromolecolari della sua attività sono a livello genomico (DNA), a livello trascrizionale (RNA) e a livello enzimatico (proteine). A questi differenti livelli può agire in maniera simultanea o sequenziale.

II.2.5 Prime evidenze sperimentali di legame della curcumina al DNA

Fino a qualche anno fa lo studio sui meccanismi molecolari attraverso i quali la curcumina esplica le sue attività farmacologiche è stato focalizzato essenzialmente sulla interazione con le proteine, come suoi target macromolecolari.
Nel tentativo di studiare l'interazione della curcumina con il DNA si è scoperta per la prima volta un'interazione di una molecola polifenolica, la curcumina appunto, con il DNA [44]. 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 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.14).

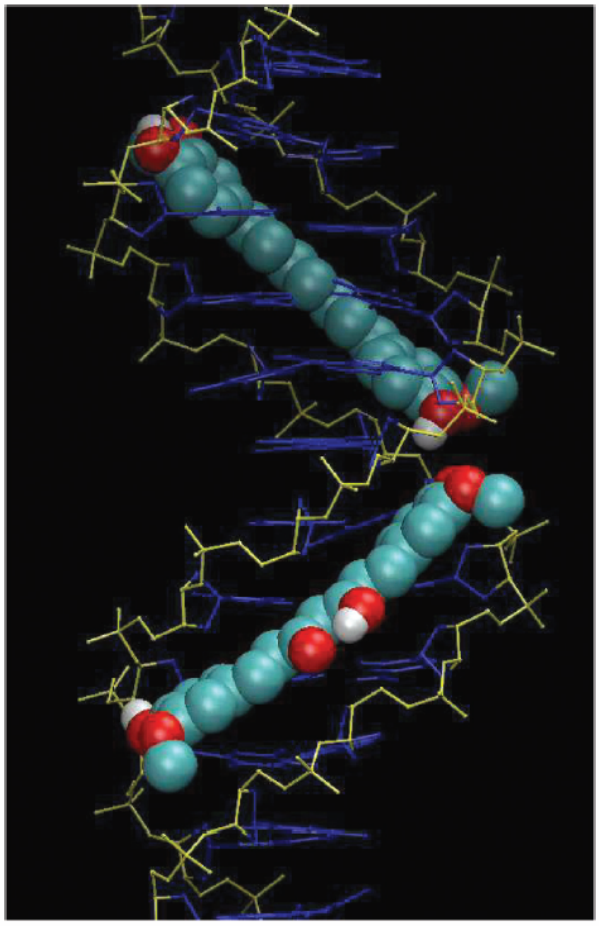


Fig.II.14 Due molecole di curcumina che si legano al solco minore del DNA

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 è più negativo in queste sequenze, pertanto un certo potenziale elettrostatico richiede una certa concentrazione di Na^+ che favorisca la giusta alterazione strutturale tale da permettere l'accomodamento della curcumina.

Questi studi dimostrano che determinati fattori chimico-fisici possono favorire o annullare l'interazione di una molecola con il DNA, influenzandone l'attività farmacologica.

II.2.6 Biodisponibilità della curcumina

Non sempre le condizioni ideali per un'interazione con il DNA sono le stesse che garantiscono l'integrità di una molecola. Infatti la curcumina presenta un grosso limite al suo uso terapeutico ed è rappresentato dalla sua bassa biodisponibilità, dovuta alla sua struttura chimica.

Questa molecola diarileptanoidica, con la sua unità β-dichetonica subisce tautomerizzazione cheto-enolica (figura II.15), per cui sia in soluzione che allo stato solido, esiste come molecola planare che forma un legame a idrogeno intramolecolare.

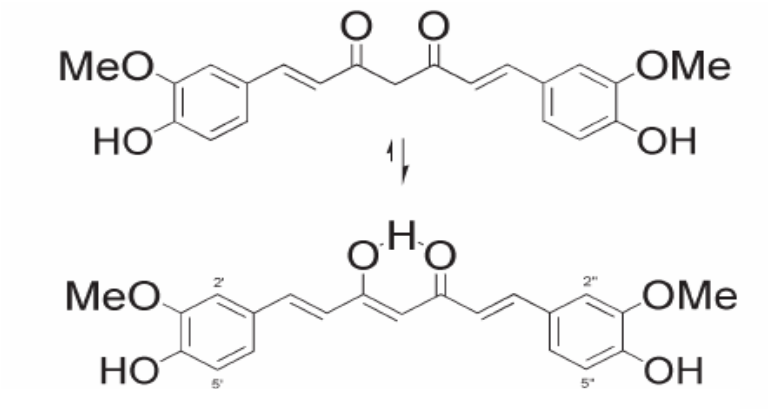


Fig.II.15 Equilibrio cheto-enolico della curcumina

La curcumina è scarsamente solubile in acqua. A pH basico la solubilità in acqua aumenta dovuta alla formazione dello ione fenolato, in seguito a dissociazione degli idrogeni fenolici. Tuttavia in soluzione basica la molecola è instabile e subisce rapidamente degradazione idrolitica. Sotto il pH 7, quindi a pH acido la curcumina è stabile però è insolubile in acqua in quanto prevale la forma neutra.

È stata studiata la cinetica di degradazione della curcumina in condizioni fisiologiche e da questi studi è emerso che, in seguito ad incubazione della curcumina in una soluzione a pH 7.2 a 37°C, contenente tampone fosfato 0.1 M, circa il 90% della molecola si degrada dopo 30 minuti [45]. La stessa degradazione è stata poi studiata in un range di pH tra 3 e 10 osservando che la decomposizione dipende effettivamente dal pH ed è più veloce in condizioni neutro-basiche. Attraverso analisi di spettrometria di massa e spettrofotometria sono stati identificati i maggiori prodotti di degradazione che sono quelli riportati in figura II.16.

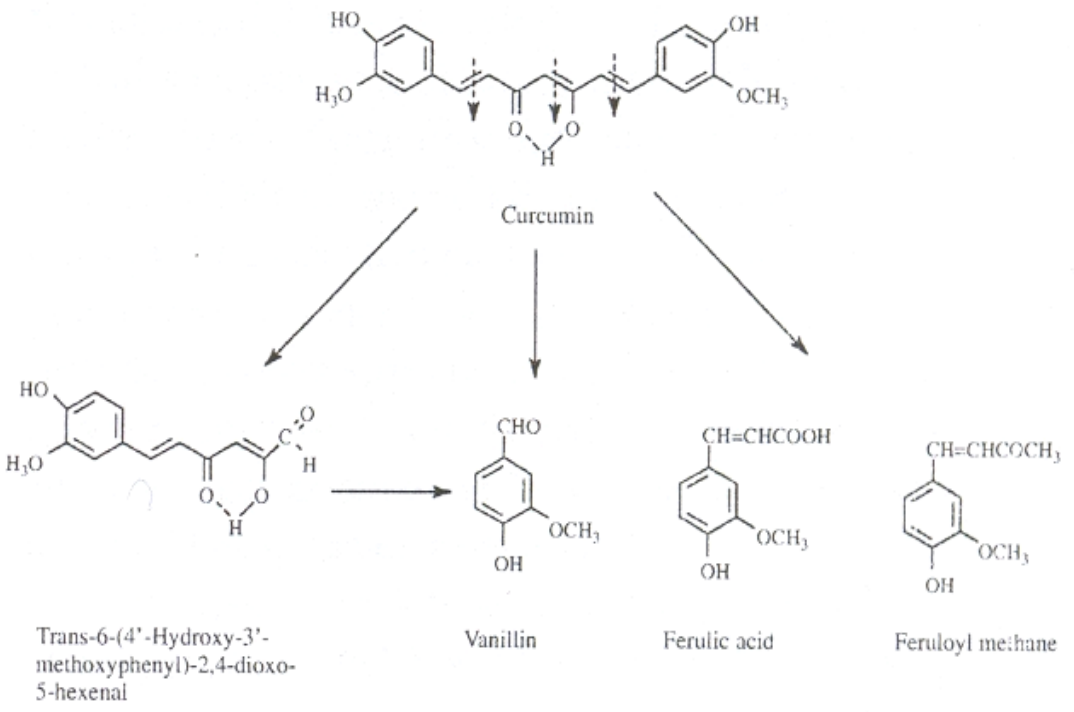


Fig.II.16 Principali prodotti di degradazione della curcumina

La bassa biodisponibilità della curcumina dipende anche dalle sue proprietà farmacocinetiche che sono state studiate su topi [37]. Per chiarire la natura dei suoi metaboliti il plasma è stato analizzato, dopo somministrazione della curcumina attraverso HPLC. I risultati degli esperimenti suggeriscono che la curcumina viene prima biotrasformata in diidrocurcumina e tetraidrocurcumina e questi composti vengono successivamente glucoronidati, generando la curcumina-glucoronide, diidrocurcumina-glucoronide e tetraidrocurcumina-glucoronide (figura II.17).

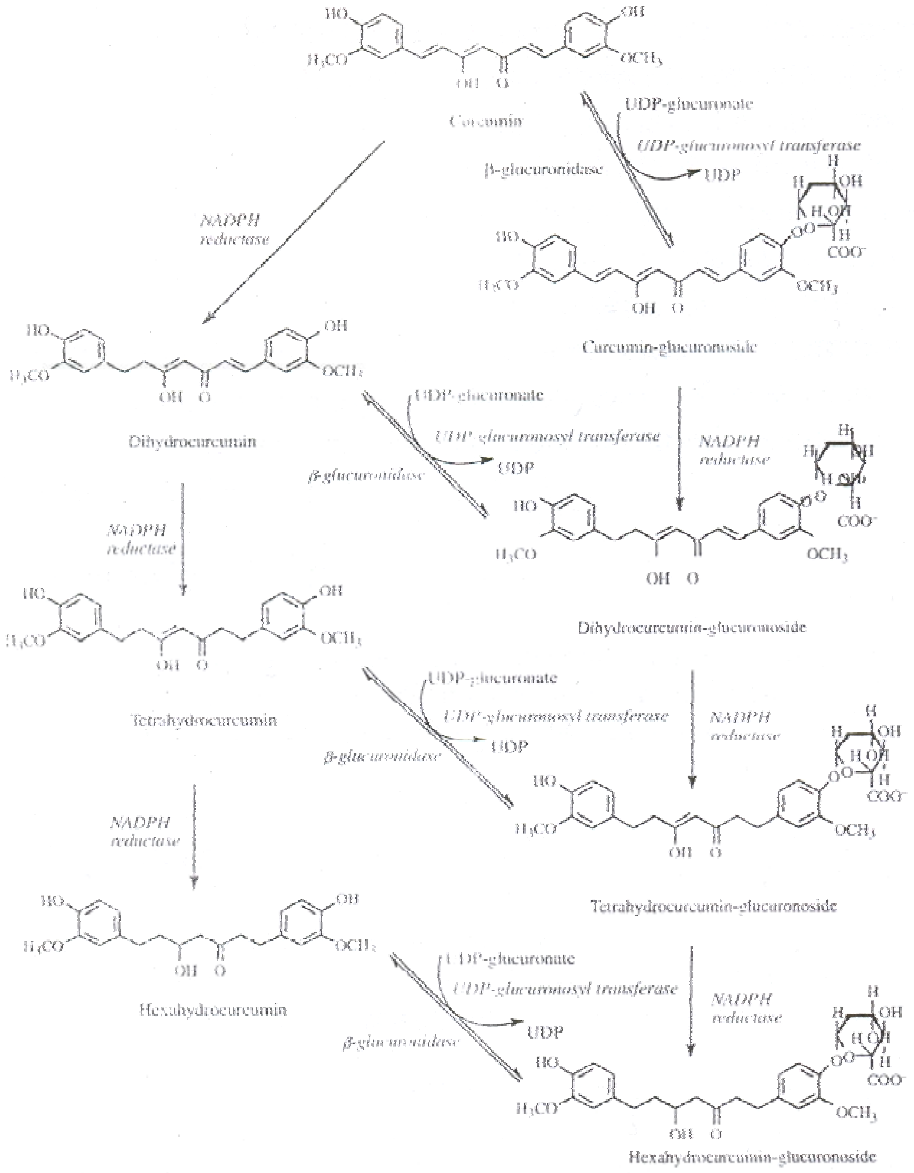
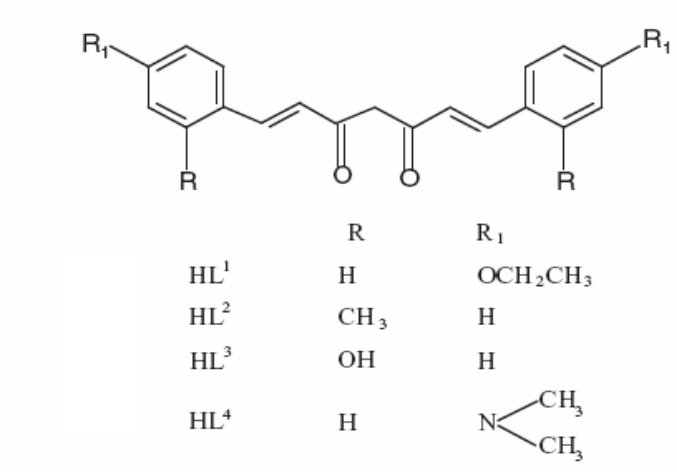


Fig.II.17 Biotrasformazione della curcumina

II.2.7 Complessi metallici della curcumina con attività biologica

In letteratura sono riportati esempi di complessazione della curcumina per verificare innanzitutto la sua reattività verso alcuni metalli e poi per alcuni dei complessi ottenuti è stata investigata l'attività antitumorale su alcune linee cellulari tumorali. Spesso la struttura base della curcumina è stata ottenuta sinteticamente.

Ad esempio alcuni curcuminoidi sono stati sintetizzati attraverso condensazione di benzaldeidi sostituite con 2,4-pentanedione, ottenendo molecole con diversi sostituenti sugli anelli fenolici [46] (figura II.18).



	R	R_1
HL^1	H	OCH_2CH_3
HL^2	CH_3	H
HL^3	OH	H
HL^4	H	$N(CH_3)_2$

Fig.II.18 Struttura dei curcuminoidi di sintesi

Questi curcuminoidi di sintesi sono stati poi complessati con gli ioni metallici VO(IV), Co(II), Ni(II) e Cu(II) e i complessi ottenuti sono complessi omolettici dei curcuminoidi (figura II.19).

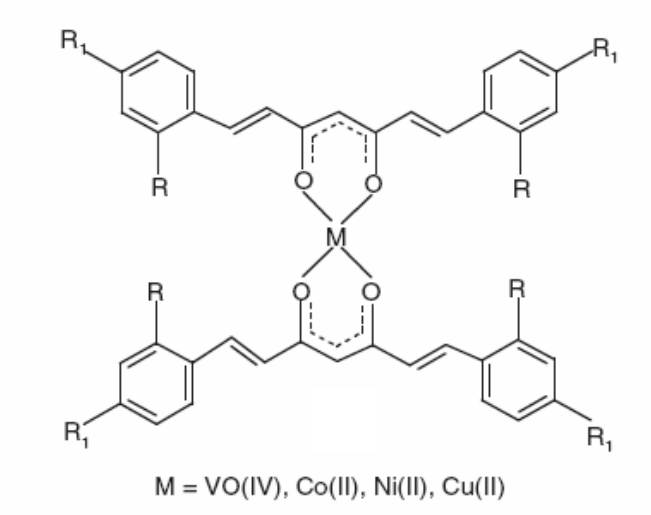


Fig.II.19 Struttura dei complessi con i curcuminoidi

L'attività citotossica di tutti i curcuminoidi e i corrispondenti complessi metallici sono stati testati sul carcinoma ascite di Ehrlich. Dai risultati si evince che tra i curcuminoidi quello con maggiore attività antiproliferativa è il composto che possiede un –OH fenolico in orto e un H in para, mentre tutti i complessi metallici sono più attivi dei leganti. Questo suggerisce che la presenza del metallo aumenta l'attività dei curcuminoidi e che a parità di struttura del complesso il Cu(II) è il metallo che rende il sistema quello più attivo.

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 maltolto e l'etilmaltolo 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.20) è nata dalla possibilità di ottenere un sinergismo d'azione a livello di varie attività biologiche [47].

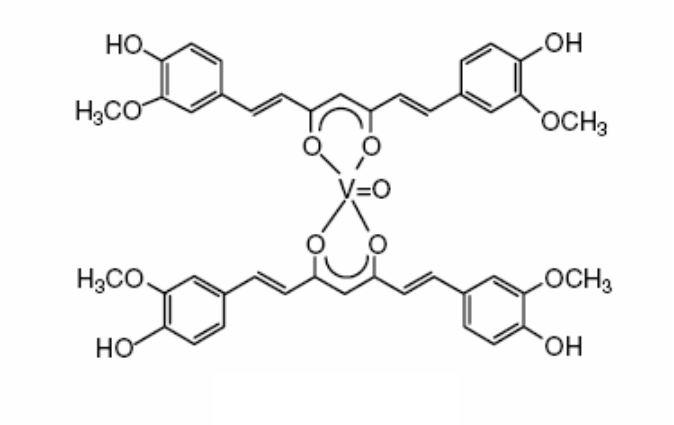


Fig.II.20 Struttura del complesso vanadil curcumina

Infatti di questo complesso è stata studiata l'attività antireumatica in sinoviociti, l'inibizione dell'angiogenesi in cellule muscolari liscie e l'attività antitumorale in un linfoma di topo. Di tutte queste attività il complesso $VO(curc)_2$ ha dimostrato di essere più attivo come agente antitumorale con una attività molto maggiore rispetto alla curcumina da sola nella stessa forma tumorale. Inoltre ha dimostrato un'attività antiartritica doppia rispetto alla curcumina e un'attività quattro volte maggiore rispetto alla curcumina nell'inibire la proliferazione delle cellule muscolari liscie.

Nel tentativo di migliorare l'attività 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) [48] (figura II.21).

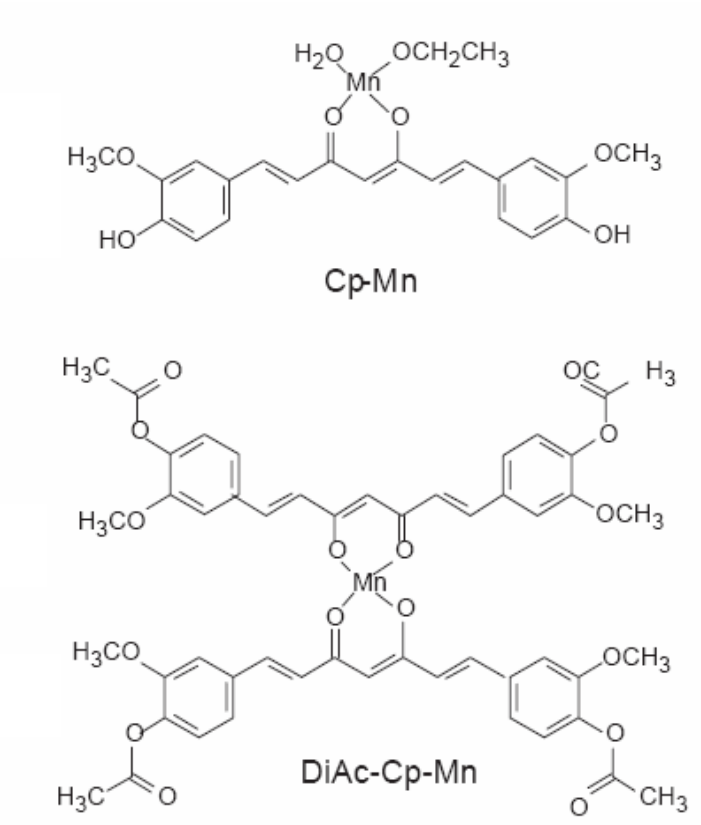


Fig.II.21 Struttura dei complessi Cp-Mn e DiAc-Cp-Mn

Questi complessi sono stati studiati a livello dell'attività neuroprotettiva in quelle patologie associate a neurotossicità indotta da eccessiva produzione di nitrossido o NO, ovvero nell'epilessia e in altri tipi di danneggiamenti neuronali da stress ossidativo. L'NO è un tipo di radicale libero che ha diversi ruoli nella funzionalità del cervello 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 dall'L-arginina nell'ippocampo di ratti. Entrambi i complessi hanno mostrato un'attività neuroprotettiva molto maggiore rispetto alla curcumina e alla diacetilcurcumina, sopprimendo l'innalzamento dei livelli di NO, attraverso probabilmente un'attività scavenger.

L'unico esempio di complessi eterolettici della curcumina è rappresentato da due complessi di Cu(II) (figura II.22), i quali contengono entrambi un derivato della curcumina, la salcimina-X, ottenuta dalla condensazione di Knoevenagel della (4-salicilidene-1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione) con 4-X-aniline, che differiscono per il legante complementare [49].

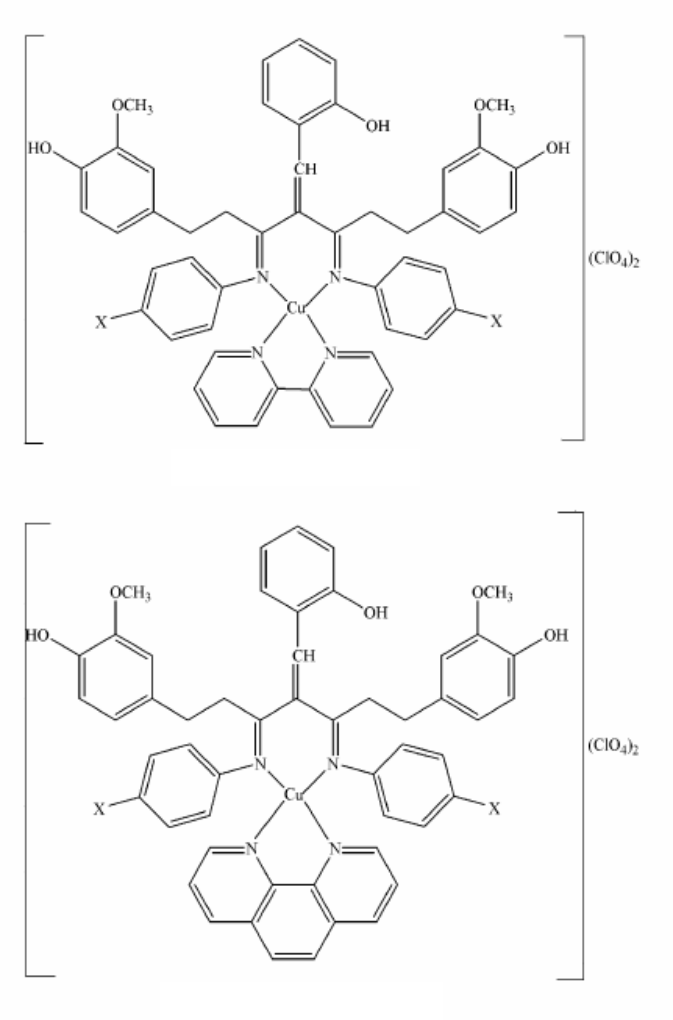


Fig.II.22 Struttura dei complessi eterolettici della salcimina-X

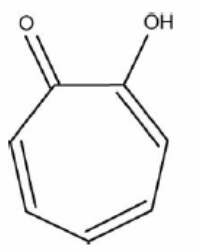
Entrambi i complessi sono ionici ma uno contiene una bipiridina mentre l'altro una fenantrolina. Studi svolti attraverso analisi spettroscopiche sull'interazione di questi complessi del rame con il DNA, hanno rivelato che l'interazione con il DNA è forte ed avviene attraverso intercalazione.

Tuttavia rimane da chiarire quale frammento della molecola sia responsabile di questo tipo di legame che porta a danneggiamento del DNA.

II.3 IL TROPOLONE, UN NATURALE E VERSATILE LEGANTE BIDENTATO DOTATO DI ATTIVITA' BIOLOGICA

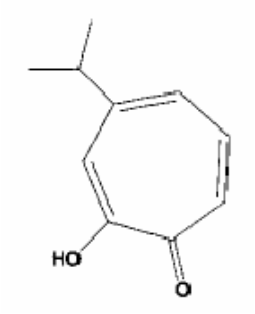
II.3.1 Struttura chimica e attività biologiche del tropolone

Il tropolone, HTrop, è un composto contenente un anello aromatico a sette membri, per l'esattezza, un α-idrossichetone o 2-idrossi-2,4,6-cicloeptetriene-1-one.



Tropolone

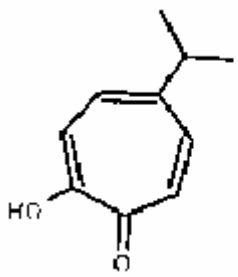
L'identificazione del tropolone risale al 1945, quando la sua struttura chimica fu proposta da Dewar [50]. Alcuni anni dopo la struttura fu confermata e si scoprì che che questo composto era un metabolita del batterio *Pseudomonas sp.* [51].
Di origine naturale (principale costituente del legno di Thujopsis dolabrata Sieb. e Zucc. Var. hondai) è anche l'inokitiolo o 2,4-isopropiltropolone, strutturalmente molto simile al tropolone e per questo le proprietà di entrambi sono state studiate in parallelo.



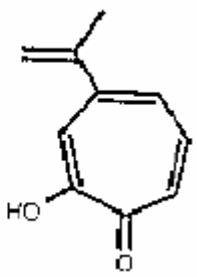
Inokitiolo

Infatti, esaminata l'attività insetticida di entrambi i composti su alcuni insetti, si è visto che il tropolone è più attivo del suo congenere [52]. Sempre in parallelo è stata studiata l'attività inibitoria di entrambi su metalloproteasi, carbossipeptidasi A, collagenasi e termolisina [52]. Tutti questi enzimi sono implicati in processi infiammatori e pertanto un'azione inibitoria riveste un importante ruolo in ambito farmacologico. Su tutti questi enzimi sia il tropolone che il 2,4-isopropiltropolone hanno mostrato di possedere una forte azione inibitoria rispetto all'1,10-fenantrolina utilizzata come riferimento, soprattutto sulla carbossipeptidasi A. Inoltre il tropolone rispetto al 2,4-isopropiltropolone ha mostrato un'attività antifungina contro alcuni funghi patogeni delle piante.

Il 2,4-isopropiltropolone ha dimostrato di possedere in vitro effetti citotossici su molte linee cellulari umane [53] e per cercare di estrapolare delle relazioni struttura-attività è stata investigata la citotossicità di altri due derivati naturali della stessa pianta da cui è stato estratto il 2,4-isopropiltropolone, il γ-thujaplicin e β-dolabrin.



γ-thujaplicin

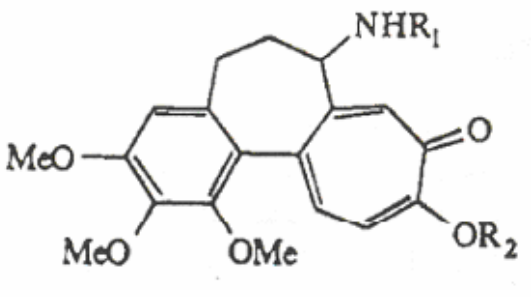


β-dolabrin

Questi analoghi del tropolone, strutturalmente molto simili al 2,4-isopropiltropolone o inokitiolo, hanno dimostrato un'attività citotossica su cellule tumorali dello stomaco e cellule del carcinoma dell'ascite di Ehrlich [54]. In particolare il γ-thujaplicin è più attivo di β-dolabrin su queste linee cellulari. Inoltre l'inokitiolo acetato non ha attività citotossica e dato che quest'ultimo differisce dagli altri composti per il gruppo acetato che blocca il gruppo α-idrossilico, si ipotizza come possibile meccanismo d'azione per queste molecole, una metallo-chelazione a livello del gruppo carbonilico e del gruppo idrossilico della struttura.

II.3.2 Complessi metallici del tropolone

L'anione tropolonato è un legante bidentato e può formare un anello chelato a cinque termini attraverso complessazione con diversi ioni metallici. Tuttavia, non vi sono finora complessi metallici del tropolone esaminati dal punto di vista della citotossicità.
L'unico esempio di complessi metallici di leganti con una struttura molto simile al tropolone indagati a livello biologico è rappresentato da complessi di Pt(II) e Ru(II) ottenuti dalla coordinazione degli antimitotici colchicina e acido trimetilcolchicinico ai frammenti metallici $Pt(bpy)^{2+}$ e $Ru(bpy)^{2+}$ [55].



Acido trimetilcolchicinico

Il tropolone è stato utilizzato solo per avere un riferimento del modo di coordinazione degli antimitotici, infatti solo i complessi degli antimitotici (figura II.23) sono stati investigati dal punto di vista dell'attività antitumorale.

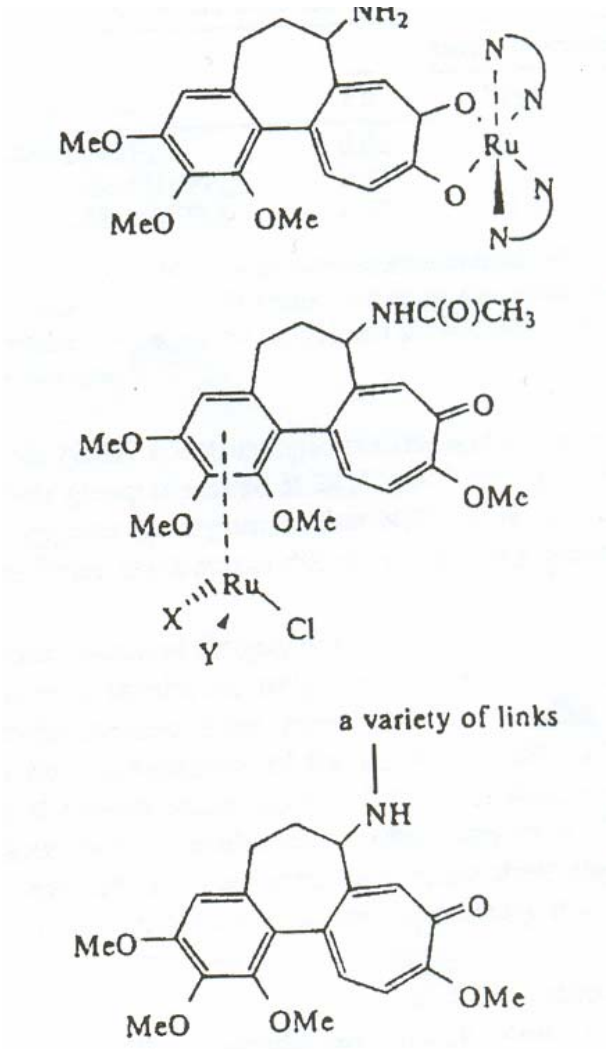


Fig.II.23 Modi di coordinazione dello scheletro colchicinico al metallo

Questi complessi sono stati testati su una linea cellulare leucemica e su una linea di adenocarcinoma del colon. Dai risultati emerge che l'attività dei complessi è comparabile sia con quella del *cis*-DDP che con quella dei leganti.

Tuttavia si presume che l'attività sia da attribuire al complesso integro, dato che è stata accertata la loro stabilità in condizioni fisiologiche.

Dal punto di vista delle proprietà chimico-fisiche, sono riportati in letteratura molti dati strutturali riguardo sia a semplici specie monomeriche che a specie polimeriche contenenti il tropolone. È riportata ad esempio la caratterizzazione strutturale di complessi dello zinco (II) contenenti il tropolone e l'inokitiolo [56]. In questi complessi ogni metallo chela due molecole, ma dalla risoluzione della struttura mediante analisi diffrattometrica si osserva delle differenze strutturali importanti.

Come si vede infatti dalle figure relative ai due complessi, il complesso del tropolone, $Zn(trop)_2$ (figura II.24 A), è una struttura polimerica, in cui ogni tropolone è chelato allo zinco. Ogni zinco poi, è legato a due ossigeni di due tropoloni adiacenti e il risultato è un polimero di coordinazione in cui i romboidi Zn_2O_2 si alternano in maniera ortogonale e per questo può essere considerato un ottaedro distorto.

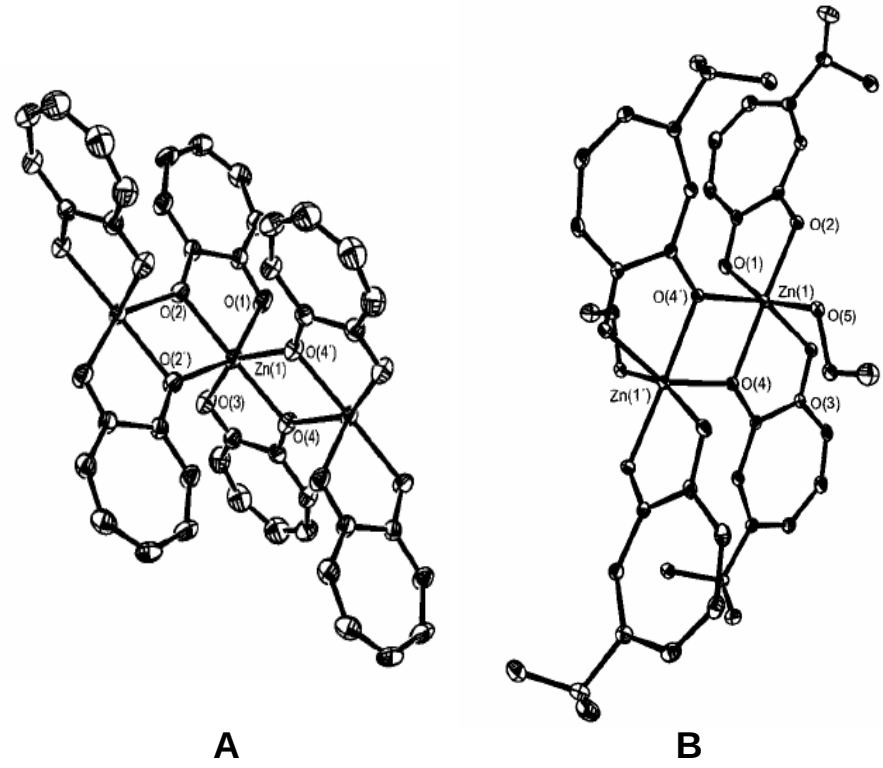


Fig.II.24 Struttura di $Zn(trop)_2$ (A), e $Zn(ino)_2$ (B)

Il complesso dell'inokitiolo invece, $Zn(trop)_2$ (figura II.24 B), può essere considerato un frammento dimerico della struttura $Zn(trop)_2$, in quanto due inokitioli sono sempre chelati ortogonalmente ad uno zinco, ma questo lega un solo ossigeno mentre la sfera di coordinazione dello zinco viene completata da una molecola di etanolo, e per questo viene chiamata addotto di etanolo. Ne risulta che il secondo ottaedro è più regolare del primo e questo è dovuto al legante monodentato più flessibile, l'etanolo.

Un esempio invece di complesso del tropolone altamente simmetrico è il bis(tropolonato)palladio(II) [57] (figura II.25).

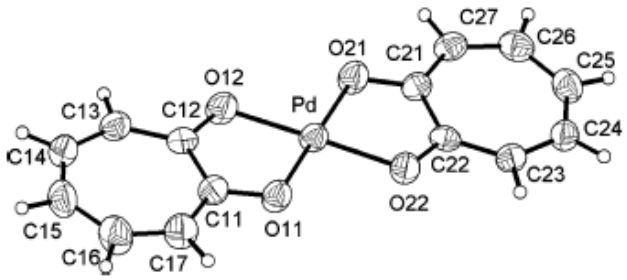


Fig.II.25 Struttura del $Pd(trop)_2$

Come si vede dalla figura I.43, il palladio è legato a due tropoloni con una geometria quadrato-planare.

Altri complessi bis-tropolonato sono complessi di Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II), UO_2(VI) e VO(IV) contententi alcuni 5-alcossi, 5-alchilamino e 5-alcanoil-tropolone (figura II.26) [58].

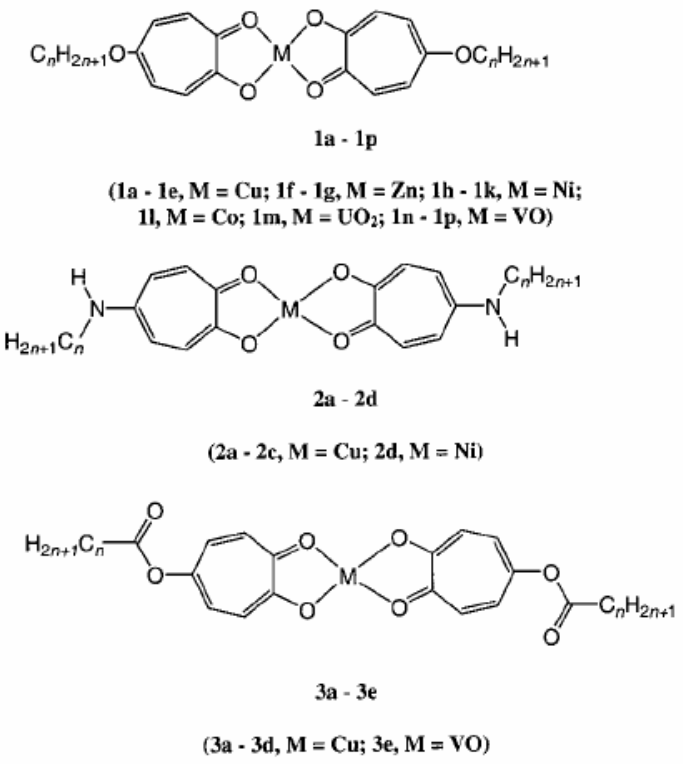


Fig.II.26 Formula generale dei bis-tropolonati

Tutti questi complessi sono stati studiati dal punto di vista delle proprietà mesomorfiche e da questo studio è emerso che le proprietà mesogeniche dipendono da alcuni fattori. Il primo fattore è legato al tipo e alla lunghezza della catena in posizione 5 dello scheletro tropolonico. Infatti per essere mesogenico il complesso bisogna utilizzare una catena alcossi con $n > 8$. il secondo fattore è legato alla natura del metallo. Sono mesogenici infatti, i complessi di Cu(II) e UO_2(VI).

Come si vede dal crystal packing della struttura cristallina del complesso bis(4-esadecilossitropolonato)Cu (figura II.27), esiste una forte interazione tra gli ossigeni e i Cu delle molecole vicine e questo è responsabile delle proprietà mesogeniche. Queste forti interazioni infatti non vi sono laddove ci sono catene alchiliche e quindi i complessi contenenti tropoloni con catene alchiliche o alchilaminiche non mostrano proprietà mesogeniche.

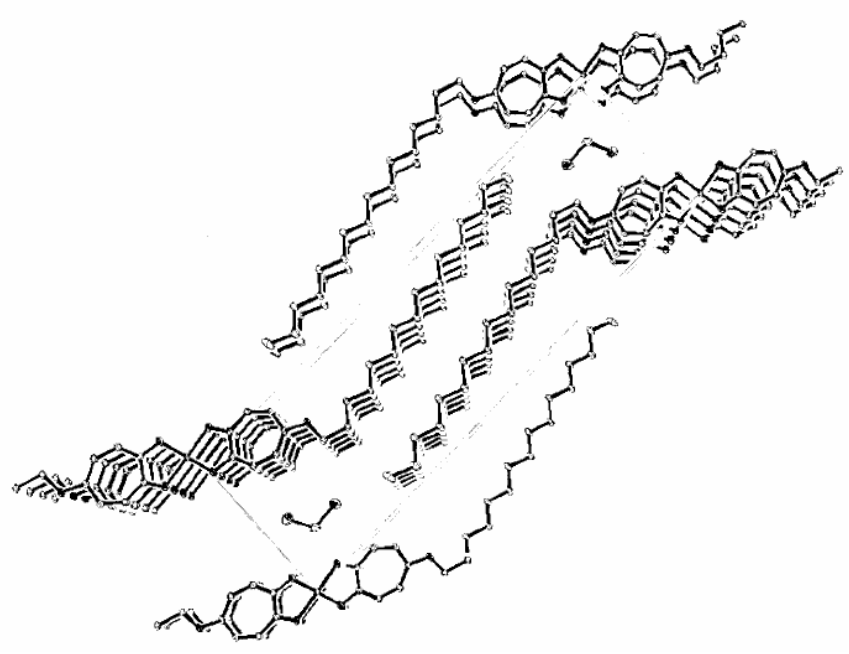
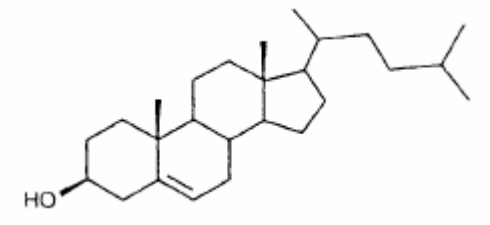


Fig.II.27 Crystal packing del complesso bis(4-esadecilossitropolonato)Cu

II.4 IL COLESTEROLO: UN NATURALE LEGANTE PROMESOGENICO E UN CARRIER BIOLOGICO

II.4.1 Natura del colesterolo e complessi metallici del colesterolo

Il colesterolo è un naturale componente delle membrane biologiche. Sebbene sia troppo idrofobico per formare, in dispersione pura, lamine bimolecolari, esso concorre alla struttura della membrana cellulare intercalandosi tra le molecole di fosfolipidi.



colesterolo

Il colesterolo viene utilizzato per ottenere materiali liquido-cristallini, gels organici, e altri tipi di materiali. La sua versatilità è dovuta alla sua struttura rigida contenente ben otto centri chirali che danno 256 stereoisomeri. Sorprendentemente solo un isomero è prodotto in natura ed è disponibile commercialmente a basso costo.

Per quanto riguarda le proprietà liquido-cristalline, i primi esempi di composti riportati aventi proprietà liquido-cristalline contengono il colesterolo e da allora sono riportati in letteratura oltre 3000 composti liquido-cristallini contenente un'unità colesterica. Tuttavia molto pochi sono i complessi di metalli contenenti un'unità colesterica, infatti i primi esempi di metallomesogeni non-convenzionali del colesterolo di Pd(II) e Cu(II) sono complessi di leganti dimesogenici bidentati riportati in figura II.28 [59].

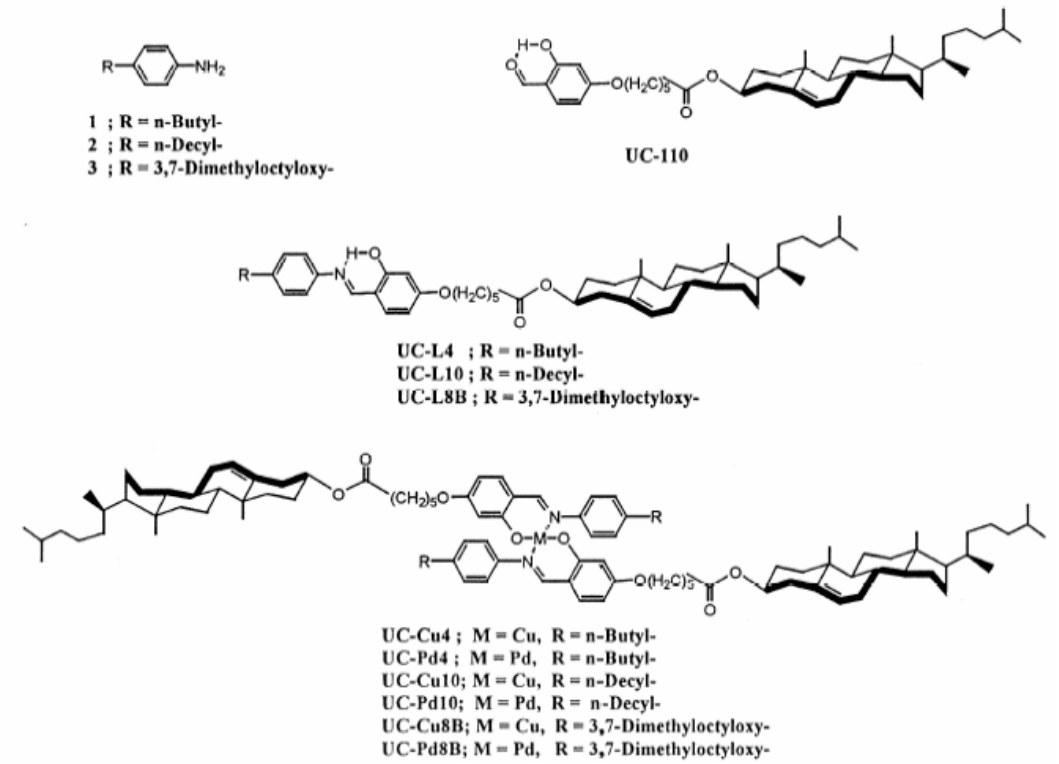


Fig.II.28 Metallomesogeni del colesterolo

I leganti sono basi di Shiff, salicilaldimine ottenuti dalla condensazione di aniline sostituite in posizione 4 con una salicilaldeide contenente un colesterolo esterificato. L'unità chirale colesteril estere è unita all'altra parte attraverso una catena polimetilenica e i leganti risultanti sono leganti non-simmetrici, versatili in quanto N,O chelanti e quindi possono complessarsi con molti metalli. In questo caso lo studio del comportamento termotropico dei leganti e dei loro complessi di Pd(II) e Cu(II) ha rivelato che, mentre i leganti mostrano più mesofasi, dipendentemente dalla lunghezza della catena in posizione 4 dell'anello iminico aromatico, i complessi mostrano una sola fase.

II.4.2 Applicazione in campo farmaceutico del colesterolo

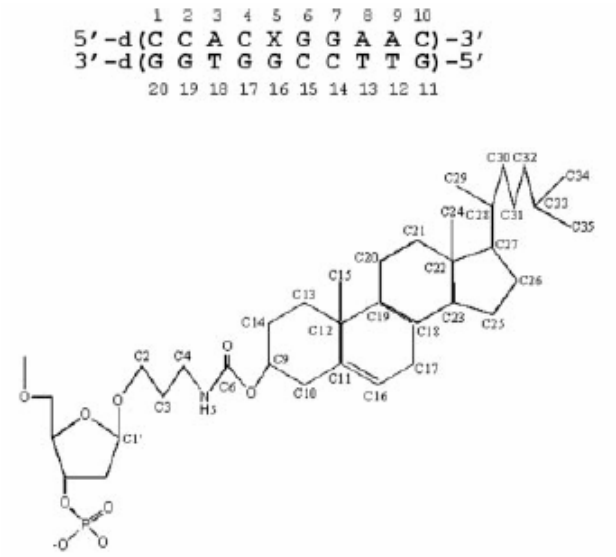
Si è detto che l'utilizzo terapeutico del *cis*-DDP è limitato da due principali fattori: sviluppo della resistenza fin da subito in alcuni tipi di tumori, e dopo trattamento prolungato in altri, ed elevata tossicità sistemica. Tra i fattori che sono stati individuati essere responsabili dell'insorgenza della resistenza vi è il ridotto accumulo del farmaco nelle cellule che è poi anche responsabile della tossicità [2]. Essendo il principale obiettivo dei ricercatori, nello sviluppo di nuovi farmaci antitumorali, quello di ottenere molecole più attive, più selettive e quindi meno tossiche, nuovi approcci vengono esplorati. Uno di questi consiste nell'incapsulamento della molecola attiva in liposomi.
Il colesterolo trova una vasta applicazione in questo senso, in quanto i liposomi, microsfere cave formati da uno o più doppi strati lipidici, contengono anche il colesterolo nelle stesse proporzioni della membrana delle cellule ospiti. Così questi depositi di farmaci, antigeni, allergeni, possono rilasciare il loro contenuto direttamente nelle cellule. Tuttavia anche questi sistemi presentano degli svantaggi, ad esempio un alto o basso contenuto di colesterolo può influenzare il rilascio del farmaco [60], oppure il liposoma può essere riconosciuto da parte del sistema immunitario come corpo estraneo ed essere così eliminato prima ancora di arrivare al bersaglio.

II.4.3 Effetti biologici del colesterolo

Recenti studi effettuati sui livelli sierici di colesterolo in pazienti affetti da cheratosi actinica e carcinoma della pelle hanno rivelato che il contenuto lipididico e di colesterolo nella pelle di questi pazienti è aumentato e che i livelli sierici di colesterolo e di fosfolipidi sono bassi [61]. Questo si giustifica con il fatto che c'è un aumentato assorbimento e di utilizzazione soprattutto di colesterolo nel tessuto maligno.

Il processo d'intercalazione, uno dei modi di legame di tipo reversibile al DNA, attraverso cui gli agenti tumorali esplicano la loro attività, è stato ampiamente descritto e come si può osservare lo studio di questo meccanismo avviene quasi sempre da parte di estese molecole planari aromatiche, mentre poche sono le informazioni sugli effetti di addotti di molecole non aromatiche sulla struttura del DNA. Il colesterolo è una estesa molecola non aromatica e di recente è stato azzardato il suo utilizzo nello studio dei meccanismi di riparo in seguito a lesioni del DNA [62]. In particolare, per studiare questo aspetto, un residuo di citosina è stato sostituito con un nucleotide contenente il colesterolo, per produrre lesioni in un decamero di DNA (figura II.29).

a)



b)

Fig.II.29 A) Schema della sequenza dell'oligonucleotide e b) derivato nucleotidico del colesterolo

Come si vede nella sequenza del nucleotide, in figura I.45, X è il nucleotide modificato, per il quale è stato determinato sia l'α-anomero che il β-anomero. È stato dimostrato che

la presenza del colesterolo induce distorsioni significative nella doppia elica del DNA e che tra i due anomeri quello β produce distorsione maggiore. Infatti le lesioni provocate dall'α-anomero possono essere riparate più efficientemente di quelle provocate dal β-anomero. Soprattutto è stato dimostrato che il colesterolo s'intercala tra le coppie di basi G4-G17 e G6-C15 come mostrato nella figura II.30.

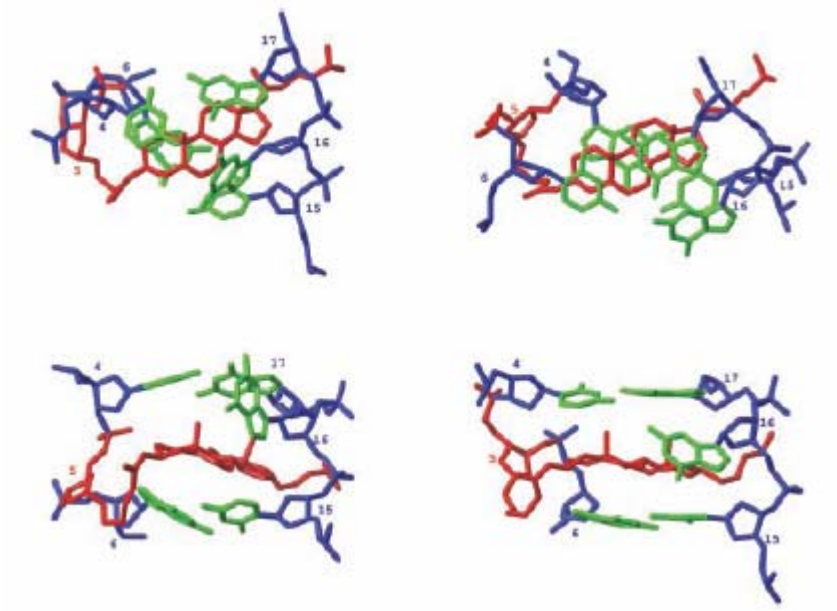


Fig.II.30 intercalazione a destra del β-anomero e a sinistra dell' l'α-anomero

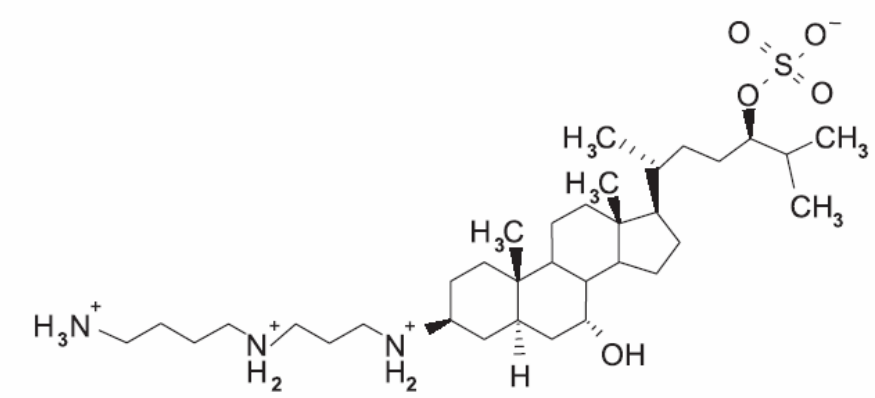
Il confronto con una soluzione di decamero di controllo, ovvero di DNA non modificato rivela che la presenza del colesterolo determina una diminuzione del grado di idratazione dell'oligomero, e questa diminuita idrofilicità è una conseguenza della presenza di un largo gruppo idrofobico nel centro della struttura, il colesterolo appunto.
La diminuita idrofilicità determina, a sua volta, una riduzione della densità di carica negativa attorno al solco minore. Inoltre l'intercalazione del colesterolo avviene dal solco maggiore, come avviene per la maggior parte degli intercalatori.
Tutte queste considerazioni, ovvero il sito di lesione e le distorsioni provocate dal colesterolo indicano che gli effetti provocati da questa molecola non aromatica sono

simili a quelli provocati da molecole aromatiche. Inoltre si è visto che le differenze nella stereochimica influenzano lo specifico modo d'interazione con la doppia elica del DNA e l'entità delle distorsioni prodotte, quindi l'efficienza dei meccanismi di riparo delle lesioni.

II.4.4 Composti steroidici con attività antitumorale

È stimato che tra il 1974 e il 1994 circa il 67% dei prodotti farmaceutici approvati per la terapia contro il cancrosono prodotti di origine naturale.

È ormai accertato e si già discusso sul ruolo dell'angiogenesi nella crescita e metastatizzazione del tumore. Recenti studi hanno focalizzato l'attenzione sulla potenziale applicazione nella terapia antitumorale di un prodotto di origine naturale con una struttura chimica steroidica, la squalamina o 7,24 diidrossilato 24-solfato colestano steroide [63].



Squalamina

Con questa struttura questa molecola si lega alle cellule endoteliali vascolari, inibendo lo scambio Na^+/H^+ a livello delle membrane. Questa preliminare azione previene alcuni step vitali dell'angiogenesi attraverso il blocco della polimerizzazione dell'actina, l'adesione cellula-cellula e la migrazione cellulare, inibendo la proliferazione cellulare. Questa molecola in combinazione con il *cis*-DDP ed altri antitumorali ha prodotto un miglioramento della loro attività.

Tutti gli esempi riportati su sostanze di origine naturale come la curcumina e il tropolone o meglio ancora di sostanze prodotte dallo stesso organismo umano come il colesterolo indicano che queste sostanze che in condizioni normali svolgono un'azione fisiologica o benefica, in determinate patologie o disordini possono avere una funzione specifica che può essere curativa. In questa sottile differenza tra il fisiologico e il patologico risiede, tuttora, che non esiste ancora un farmaco selettivo per il tessuto maligno, il motivo per cui, un numero sempre maggiore di molecole di origine naturale si affacciano nello scenario della ricerca sul farmaco nella lotta contro i tumori.

Bibliografia del II capitolo

[26] A. T. Vu, S. T. Cohn, E. S. Manas, H. A. Harris and R. E. Mewshaw, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4520-4525.

[27] M. Krishnamurthy, B. D. Gooch and P. A. Beal, *Org. Lett.* **2004**, 6, 63-66.

[28] K. Toshima, R. Takano, Y. Maeda, M. Suzuki, A. Asai and S. Matsumura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3733-3735.

[29] R. V. Parish, J. P. Wright and R. G. Pritchard, *J. Organomet. Chem*. **2000**, 596, 165-176.

[30] J. DePriest, G. Y. Zheng, N. Goswami, D. M. Eichhorn, C. Woods and D. P. Rillema, *Inorg. Chem*. **2000**, 39, 1955-1963.

[31] K. Zhang, Z. Chen, Y. Zou, C. Yang, J. Qin and Y. Cao, *Organomet.* **2007**, 26, 3699-3707.

[32] K. Kam-Wing Lo, J. S. Chan, L. Lui and C. Chung, *Organomet.* **2004**, 23, 3108-3116.

[33] Z. Qin, M. C. Jennings and R. J. Puddephatt, *Inorg. Chem*. **2002**, 41, 5174-5186.

[34] M.-T. Huang, H.L. Newmark, K. Frenkel, *J. Cell. Biochem. Suppl*. **1997**, 28/29, 39.

[35] J. M. Padròn, P. O. Miranda, J. I. Padròn and V. S. Martìn, *Bioorg. & Med. Chem*. **2006**, 16, 2266-2269.

[36] R. K. Maheshwari, A. K. Singh, J. Gaddipati and R. C. Srimal, *Life Sciences* **2006**, 78, 2081-2087.

[37] J-K. Lin and S-Y. Lin-Shiau, *Proc. Nail. Sci. Conc. ROC (B)* **2001**, 25, 2, 59-66.

[38] R. Rukkumani, K. Aruna, P.S. Varma, N. K. Rajasekaran and Menon, *J. Pharm. Pharm. Sci* **2004**, 7, 2, 274-283.

[39] A. J. Ruby, G. Kuttan, K. D. Babu, N. K. Rajasekaran and R. Kuttan, *Cancer lett*. **1995**, 94(1), 79-83.

[40] A. Mukhopadhyay, C. Bueso-Ramos, D. Chatterjee, P. Pantazis and B. B Aggarwal, *Oncogene* **2001**, 20, 7597-7609.

[41] C. Syng-ai, A. Leela Fumari and A. Khar, *Mol. Cancer Ther.* 2004, 3, 9.

[42] A. Duvoix, F. Morceau, S. Delhalle, M. Schmitz, M. Schnekenburger, M. Galteau, M. Dicato and M. Diederich, *Biochem. Pharm*. **2003**, 66, 1475-1483.

[43] A. Kumar, S. Dhawan, N.J. Hardegen, B.B. Aggarwal, *Biochem. Pharmacol*. **1998**, 55, (6), 775-783.

[44] F. Zsila, Z. Bikàdi and M. Simonyi, *Org. Biomol. Chem*. **2004**, 2, 2902-2910.

[45] Y. Wang, M. Pan, A. Cheng, L. Lin, Y. Ho, C. Hsieh and J. Lin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, 15, 1867-1876.

[46] K. Krishnankutty and V. D. John, *Syn. and Reac. in Inorg. and Metal-Org. Chem*. **2003**, 33, 2, 343-358.

[47] K. H. Thompson, K. Bohmerle, E. Polishchuk, C. Martins, P. Toleikis, J. Tse, V. Yuen, J. H. McNeill and C. Orvig, *J. Inorg. Biochem*. **2004**, 98, 2063-2070.

[48] Y. Sumanont, Y. Murakami, M. Tohda, O. Vajragupta, H. Watanabe and K. Matsumoto, *Life Sciences* **2006**, 78, 1884-1891.

[49] J. Annaraj, S. Srinivasan, K. M. Ponvel and PR. Athappan, *J. Inorg. Biochem*. **2005**, 99, 669-676.

[50] M. J. S. Dewar, *Nature* (London) **1945**, 155, 50-51.

[51] G. D. Lindberg, J. M. Larkin, *J. Nat. Prod*. **1980**, 43, 592-594.

[52] Y. Morita, E. Matsumura, T. Okabe, M. Shibata, M. Sugiura, T. Ohe, H. Tsujibo, N. Ispida and Y. Inamori, *Biol. Pharm. Bull*. **2003**, 26(10), 1487-1490.

[53] Y. Inamori, H. Tsujibo, H. Ohishi, F. Ishii, M. Mizugaki, H. Aso, N. Ishida, *Biol. Pharm. Bull*. **1993**, 16, 521-523.

[54] E. Matsumura, Y. Morita, T. Date, H. Tsujibo, M. Yasuda, T. Okabe, N. Ispida and Y. Inamori, *Biol. Pharm. Bull*. **2001**, 24(3), 299-302.

[55] J. B. Helms, L. Huang, R. Price, B. P. Sullivan and B. A. Sullivan, *Inorg. Chem*. **1995**, 43, 5335-5340.

[56] M. C. Barret, M. F. Mahon, K. C. Molloy, J. W. Steed and P. Wright, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 4384-4388.

[57] G. Steyl, *Acta Cryst*. **2005**, E61, 1860-1862.

[58] J. M. Elliott, J. R. Chipperfield and S. Clark, *Inorg. Chem*. **2002**, 41, 293-299.

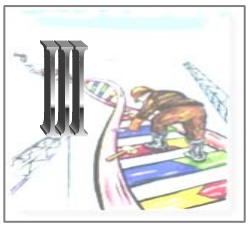
[59] C. V. Yelamaggad, U. S. Hiremath and D. S. Shankar Rao, Liquid Crystals 2001, 28, 3, 351-355.

[60] P. G. Tardi, R. C. Gallagher, S. Johnstone, N. Harasym, M. Webb, M. B. Bally, L. D. Mayer, *Biochim. et Bioph.Acta* **2007**, 1768, 678-687.

[61] P. Vural, M. Canbaz, D. Sekcuki and A. Murat, *Intern. J. Derm*. **1999**, 38, 439-442.

[62] I. Gòmez-Pinto, E. Cubero, S. G. Kalko, V. Monaco, G. van der Marel, J. H. van Boom, M. Orozco and C. Gonzàlez, *J. Biol. Chem* **2004**, 279, 23, 24552-24560.

[63] R. J. Pietras and O. K. Weinberg, *e*CAM **2005**, 2(1), 49-57.



SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COMPLESSI NEUTRI CICLOPALLADATI CONTENENTI LEGANTI O,O CHELANTI

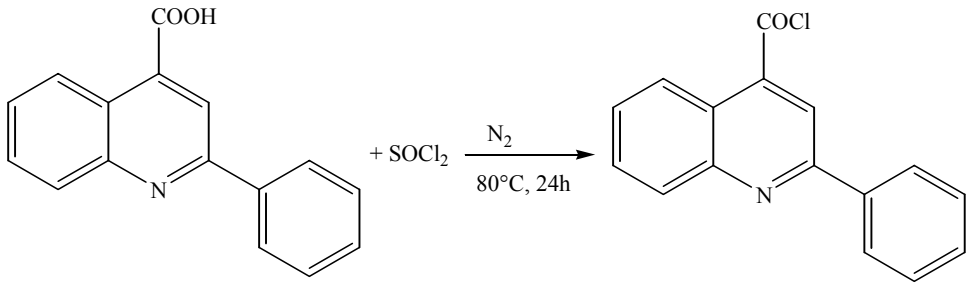
Tutti i complessi sintetizzati sono caratterizzati dalla presenza di leganti biologicamente attivi O,O chelanti, in particolare il legante tropolone ed una serie di leganti della famiglia della curcumina. In particolare, in questa prima parte del lavoro il drug design di nuovi complessi metallici bifunzionali è stato basato sull'ottenimento di complessi di Pd(II) contenenti sia i leganti O,O chelanti che un ulteriore legante con attività potenzialmente intercalante. Volendo ottenere dei complessi neutri si è scelto di selezionare come ulteriore unità a completare la sfera di coordinazione del metallo, un legante ciclometallante C,N con un sistema aromatico triciclico 2+1 non fuso che è stato definito dalla letteratura come "minimal intercalator", un derivato della 2-fenilchinolina [13]. In letteratura sono riportati diversi esempi di complessi ciclometallati di iridio(II) e platino(II) basati sul frammento 2-fenilchinolina [29,30,31], ma non era affatto nota la reattività di questo legante nei confronti del Pd(II). E' stato dunque necessario mettere a punto una strategia di sintesi per ottenere l'opportuno complesso binucleare e poi realizzare la sintesi dei complessi mononucleari eterolettici desiderati.

III.1 Complessi della 2-fenil-4-esadecilcarbossilatochinolina, HL_1

Si è scelto di sintetizzare una prima serie di complessi neutri in cui la 2-fenilchinolina è stata funzionalizzata con una lunga catena alifatica esterea in posizione 4, per aumentare le capacità di veicolazione dei target finali sintetizzati a partire da questo legante, ovvero favorendone l'intercalazione nel DNA

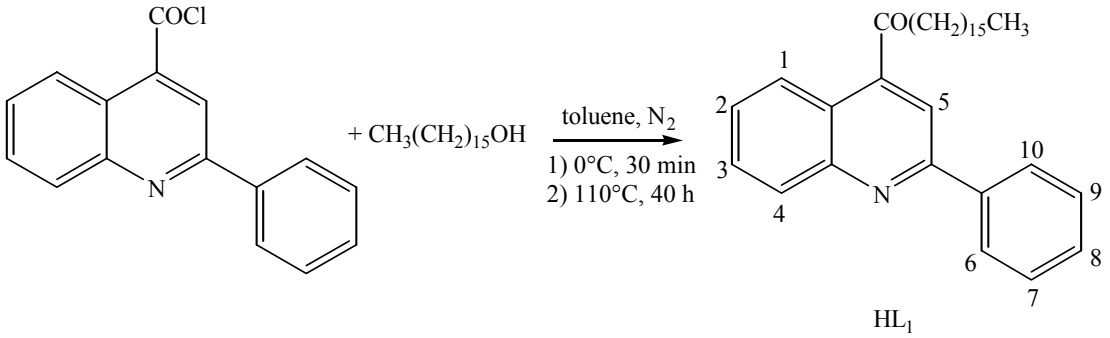
III.1.1 2-fenil-4-esadecilcarbossilatochinolina, HL_1

Il legante 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina, è stato ottenuto attraverso due step di reazioni: l'acido carbossilico della 2-fenilchinolina, prodotto commerciale, è stato fatto reagire con il cloruro di tionile, sotto azoto e mantenendo una temperatura di reazione di 80°C, per 24 h, dando il corrispondente e più reattivo cloruro dell'acido (schema III.1).



Schema III.1

Lo spostamento, rilevabile dall'analisi dello spettro IR, della banda relativa allo stretching (C=O) a frequenze più alte conferma la formazione del cloruro dell'acido della 2-fenilchinolina. Quindi, nel secondo step della reazione il cloruro viene convertito nel corrispondente estere L_1 (schema III.2), portando il cloruro in sospensione con toluene e aggiungendo a tale sospensione, un leggero eccesso di alcol esadecilico.



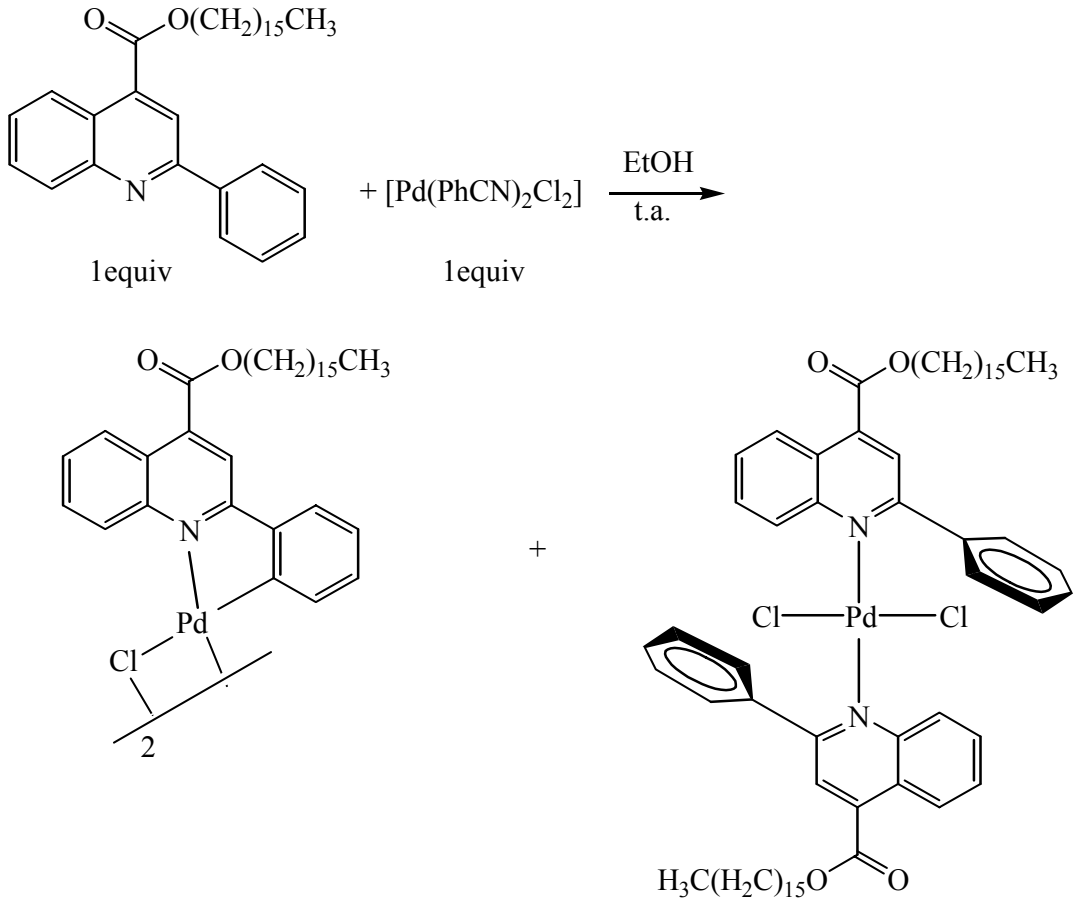
Schema III.2

L'estere, isolato come un solido bianco dalla sospensione, che è stata mantenuta in agitazione prima a 0°C per poco tempo e poi a riflusso per 40 h, sotto N_2, è stato ottenuto con una resa dell'88% e la sua formazione è stata verificata attraverso spettroscopia IR ed ^{1}H NMR.

In particolare, dallo spettro IR si può osservare la comparsa delle bande relative allo stretching (C-H), indice della presenza di una catena alifatica, oltre che lo spostamento della banda relativa allo stretching (C=O) a frequenze più basse rispetto a quelle del cloruro dell'acido. Anche lo spettro ^{1}H NMR, in cui sono presenti i segnali relativi ai protoni della catena alifatica, conferma la formazione dell'estere. Infine, i risultati delle analisi elementari sono in accordo con i valori teorici calcolati per questa nuova molecola organica.

III.1.2 Complesso binucleare a ponte cloro, $[(L_1)Pd(\mu\text{-}Cl)]_2$, 1, e complesso mononucleare *trans*-$[(HL_1)_2PdCl_2]$, 2

Dopo tanti e vari tentativi, la migliore strategia di sintesi per ottenere il complesso binucleare a ponte cloro della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina, è risultata essere quella secondo la quale il palladio(II)dibenzonitrile, $[Pd(PhCN)_2Cl_2]$, è stato fatto reagire con il legante in rapporto equimolare, in etanolo, a temperatura ambiente, dando luogo ad una miscela di complessi metallici. Per l'esattezza, dall'analisi dello spettro ^{1}H NMR si è riscontrata la presenza, in rapporto equimolare, del complesso binucleare $[L_1Pd(\mu\text{-}Cl)]_2$ **1**, e di un secondo complesso, il complesso mononucleare *trans*-$[HL_1PdCl_2]$ **2**, (schema III.3).

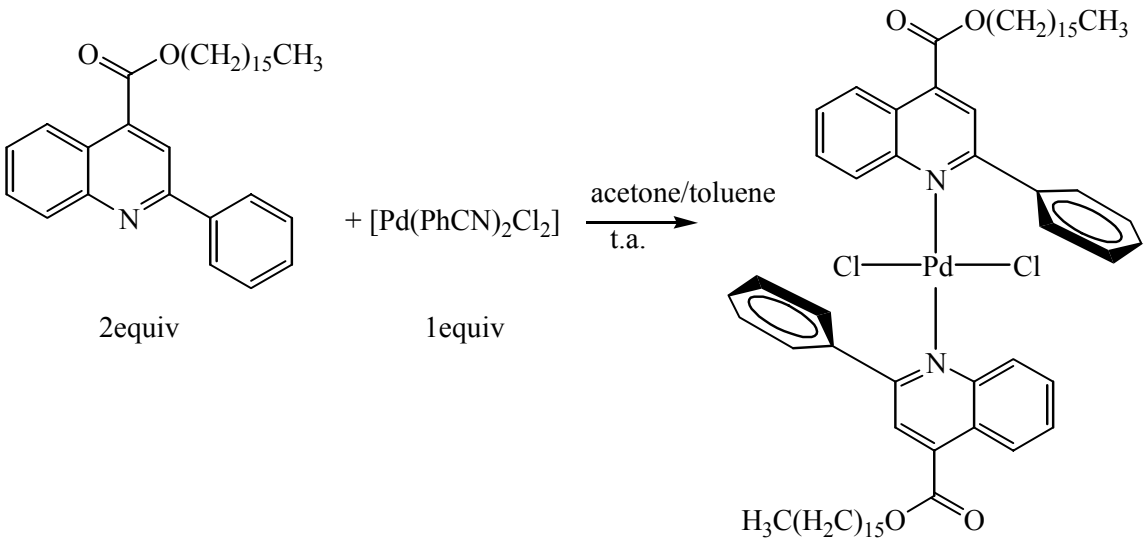


$[L_1Pd(\mu\text{-}Cl)]_2$ **1** *trans*-$[HL_1PdCl_2]$ **2**

Schema III.3

È stato pertanto necessario, per ottenere il complesso binucleare puro, separare la miscela dei prodotti, e per fare ciò si è pensato di sintetizzare il complesso mononucleare non *orto*-palladato, $[L_1PdCl_2]$ **2**, per poterne verificare la solubilità nei diversi solventi organici.

Questo complesso è stato ottenuto mediante una reazione, condotta in acetone/toluene e in cui il legante è stato messo a reagire in rapporto stechiometrico doppio rispetto al palladio(II)dibenzonitrile (schema III.4).



Schema III.4

Secondo questa procedura di sintesi è stato ottenuto, come unico prodotto e con una resa del 70% circa, il complesso mononucleare di cui è stata ottenuta la risoluzione della struttura mediante analisi diffrattometrica a raggi X su cristallo singolo, che ha confermato la non ciclopalladazione del legante (figura III.1).

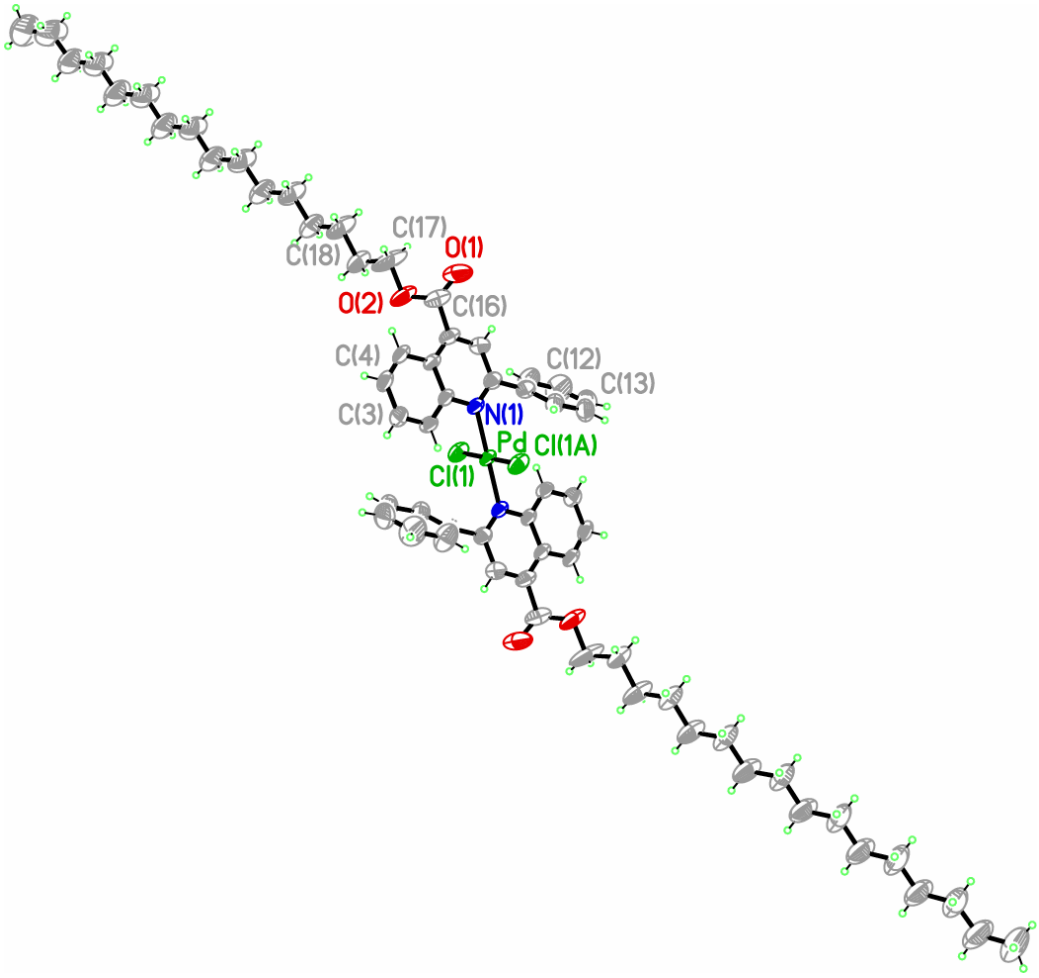


Figura III.1

L'analisi strutturale a raggi X su cristallo singolo ha confermato infatti la stechiometria proposta per questo complesso, la quale prevede la coordinazione di due molecole di 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina e di due atomi di cloro al centro metallico.

Come si vede dalla figura III.1 questo complesso cristallizza senza molecole di solvente nel gruppo spaziale triclino P-1, con una mezza molecola nell'unità asimmetrica.

La geometria di coordinazione attorno al palladio è di tipo planare-quadrata leggermente distorta, come si può osservare dagli angoli di legame riportati nella tabella III.1.

Tabella III.1. Distanze [A] ed angoli di legame [deg] per il complesso 2

Pd-N(1a)	2.035(2)
Pd-N(1)	2.035(2)
Pd-Cl(1)	2.3115(8)
Pd-Cl(1a)	2.3115(8)
N(1a)1-Pd-N(1)	180.00(12)
N(1a)1-Pd-Cl(1)	92.48(7)
N(1)-Pd-Cl(1)	87.52(7)
N(1a)1-Pd-Cl(1a)1	87.52(7)
N(1)-Pd-Cl(1a)1	92.48(7)
Cl(1)-Pd-Cl(1a)1	180.000(1)

(a): -x+1; -y+1; -z+1

Nel crystal packing del complesso **2** il primo elemento importante che si riscontra è l'associazione tra molecole attraverso interazioni di tipo π-π tra gli anelli fenolici dei leganti fenilchinolinici (figura III.2).

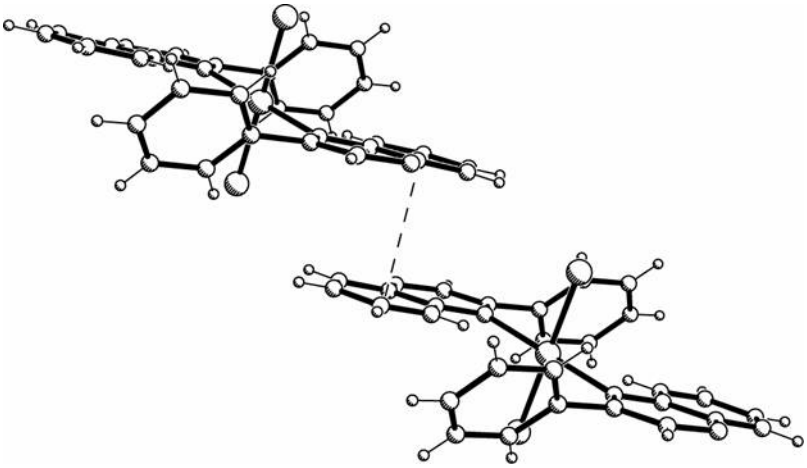


Figura III.2

La ripetizione delle molecole nello spazio 3D porta alla formazione di una struttura a strati costituita da sottostrati paraffinici (con interdigitazione delle catene alifatiche dei sostituenti carbossilici) e da sottostrati "polari" contenenti il core aromatico delle molecole di complesso 2 (figura III.3).

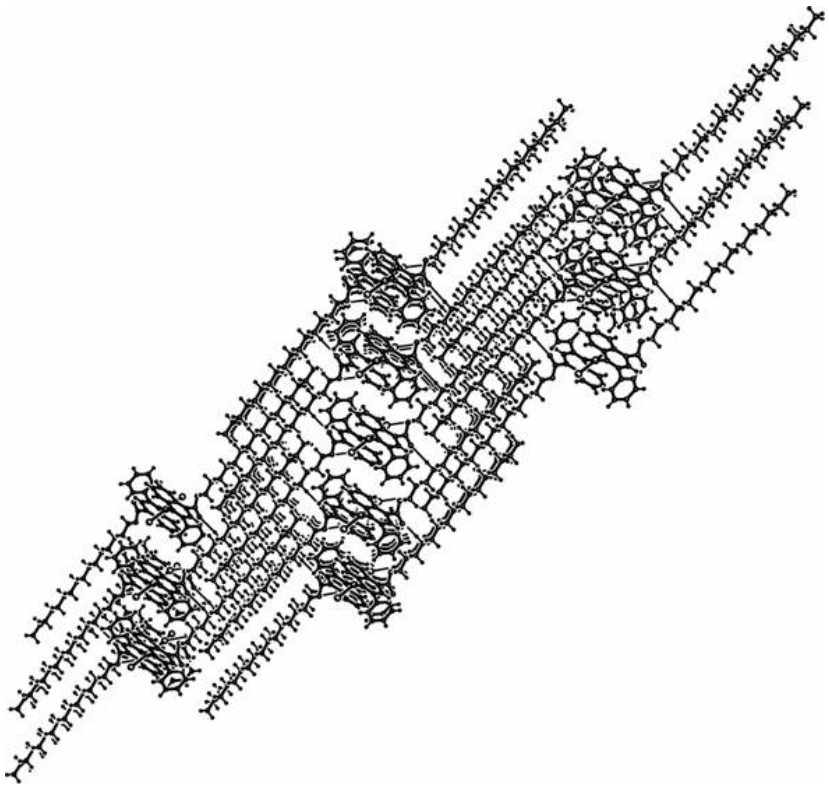


Figura III.3

Sulla base dello studio delle solubilità del complesso mononucleare è stato possibile separare la miscela dei prodotti e ottenere il complesso binucleare puro con una resa finale del 33%. Entrambi i complessi sono stati caratterizzati mediante spettroscopie IR e ^{1}H NMR e analisi elementari, e tutte queste tecniche di analisi hanno confermato le differenze strutturali dei due complessi. In particolare la ciclopalladazione può essere apprezzata soprattutto dall'analisi della parte aromatica dello spettro ^{1}H NMR del complesso **1** messo a confronto con quello del complesso **2** (figura III.4)

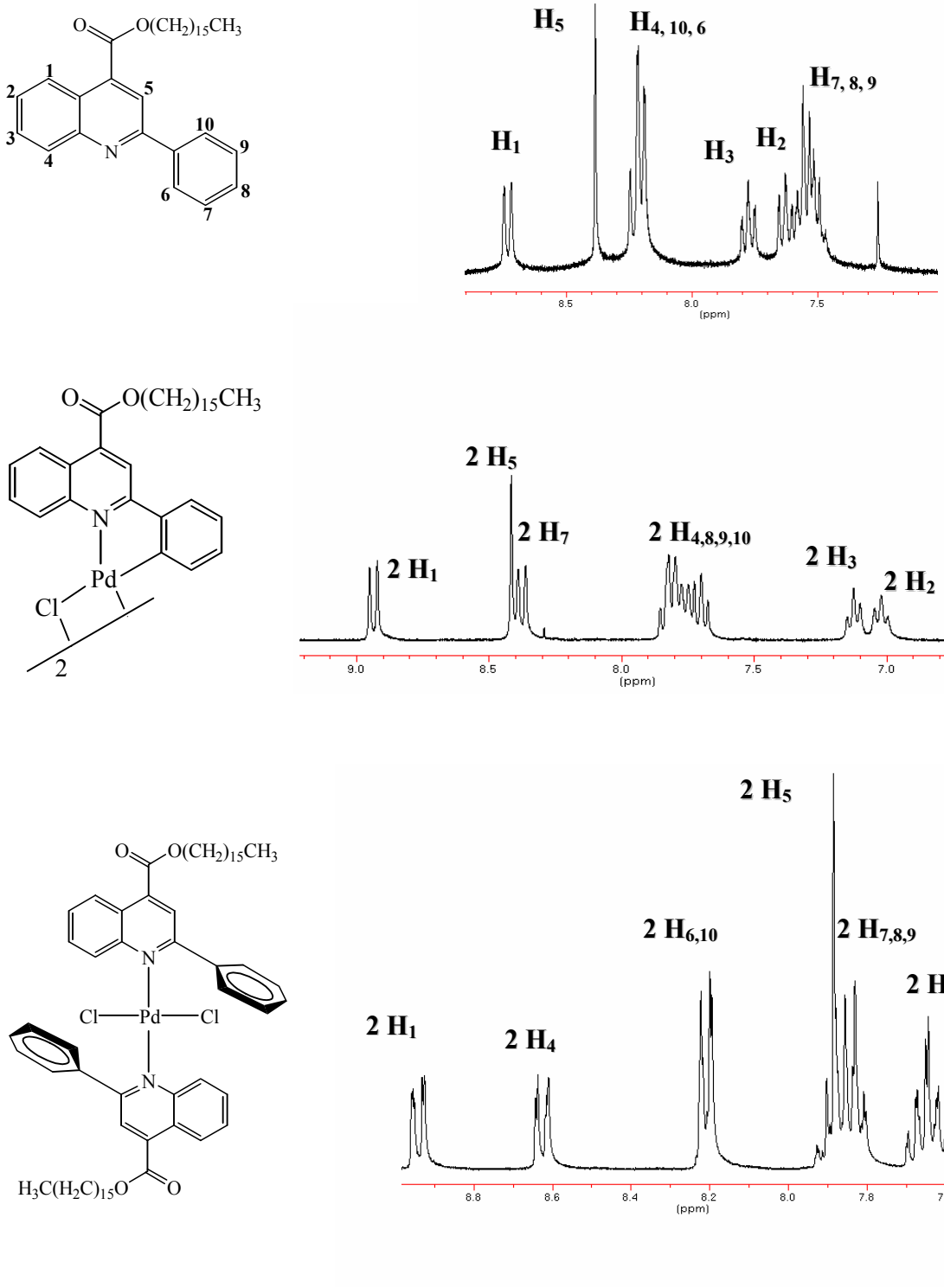
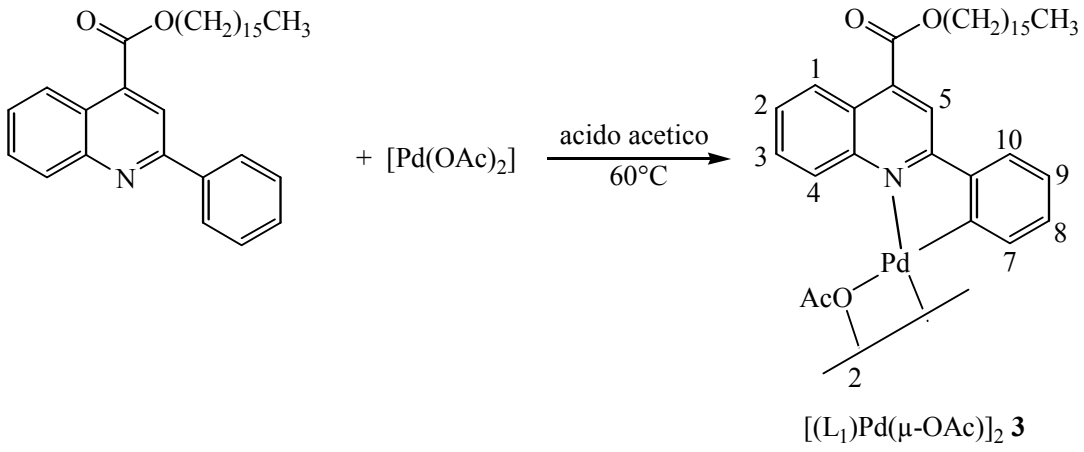

O
O(CH2)15CH3
1
2
3
4
5
10
9
8
6
7
N
H5
H4, 10, 6
H7, 8, 9
H1
H3
H2
8.5
8.0
7.5
(ppm)
Pd
Cl
2
2 H5
2 H7
2 H4,8,9,10
2 H3
2 H2
2 H1
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
(ppm)
Cl
Pd
H3C(H2C)15O
2 H5
2 H6,10
2 H7,8,9
2 H2,3
2 H1
2 H4
8.8
8.6
8.4
8.2
8.0
7.8
7.6
(ppm)

Figura III.4

Come si può osservare, nello spettro del complesso binucleare, il segnale relativo al protone H_6 è assente, indice dell'avvenuta ciclometallazione. Inoltre, a differenza dello spettro del legante e del mononucleare, in quello del binucleare soprattutto i protoni H_1 e H_7 risultano essere più deschermati, ovvero si spostano verso valori più alti di δ, (Δδ= 0.3 ppm) mentre H_2 e H_3 si spostano verso valori più bassi di δ (Δδ= 0.7 ppm). Infine, il differente rapporto del metallo rispetto al legante, nelle due molecole, è stato confermato dai risultati delle analisi elementari che sono in accordo con i valori teorici calcolati per i due complessi.

III.1.3 Complesso binucleare a ponte acetato, $[(L_1)Pd(\mu\text{-}OAc)]_2$, 3

Poiché il complesso ciclopalladato binucleare a ponte cloro **2** è stato ottenuto puro con una resa del 33% e poiché non è sufficientemente reattivo nei confronti dei leganti curcuminoidi che non sono dei buoni nucleofili, è stato opportuno cercare un secondo approccio per ottenere un complesso binucleare con una resa maggiore e con una reattività maggiore nei confronti di leganti come i curcuminoidi. Allora lo stesso legante HL_1, è stato fatto reagire con un precursore metallico più reattivo, il palladio(II)acetato, e la reazione è stata condotta in acido acetico glaciale, a 60°C (schema III.5).



$[(L_1)Pd(\mu\text{-}OAc)]_2$ **3**

Schema III.5

Per raffreddamento a temperatura a ambiente della soluzione rossa formatasi, si è formato un precipitato rosso che costituisce il prodotto della reazione, ottenuto con una resa del 90% circa.

La caratterizzazione del complesso attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari ha confermato la formazione del complesso binucleare a ponte acetato. In particolare nello spettro IR si possono osservare una banda a 1565 cm^{-1} e l'altra a 1411 cm^{-1} attribuibili, rispettivamente ai modi vibrazionali asimmetrico e simmetrico di stretching del C=O del gruppo acetato. Inoltre lo spostamento della banda relativa allo stretching del C=O della 2-fenilchinolina da 1717 cm^{-1} a 1727cm^{-1} conferma l'avvenuta complessazione.

Un ulteriore dato che indica l'avvenuta ciclometallazione proviene dall'analisi dello spettro ^{1}H NMR, in cui l'assoluta assenza del segnale relativo al protone H_6 indica la formazione del complesso ciclometallato come unico prodotto della reazione. Tuttavia lo spettro ^{1}H NMR ha rivelato la presenza di due isomeri. Infatti oltre allo spostamento dei segnali aromatici, indice della complessazione, si possono osservare due set indipendenti di segnali per ogni protone o gruppi di protoni, attribuibili rispettivamente al *trans* e al *cis* isomero. Come confermato da più preparative l'isomero *trans* è presente in soluzione in rapporto molto maggiore rispetto all'isomero *cis* (5:1).

Grazie alla risoluzione della struttura del complesso **3**, attraverso analisi di diffrazione a raggi X su cristallo singolo si può affermare che anche in solido prevale l'isomero *trans* (figura III.5).

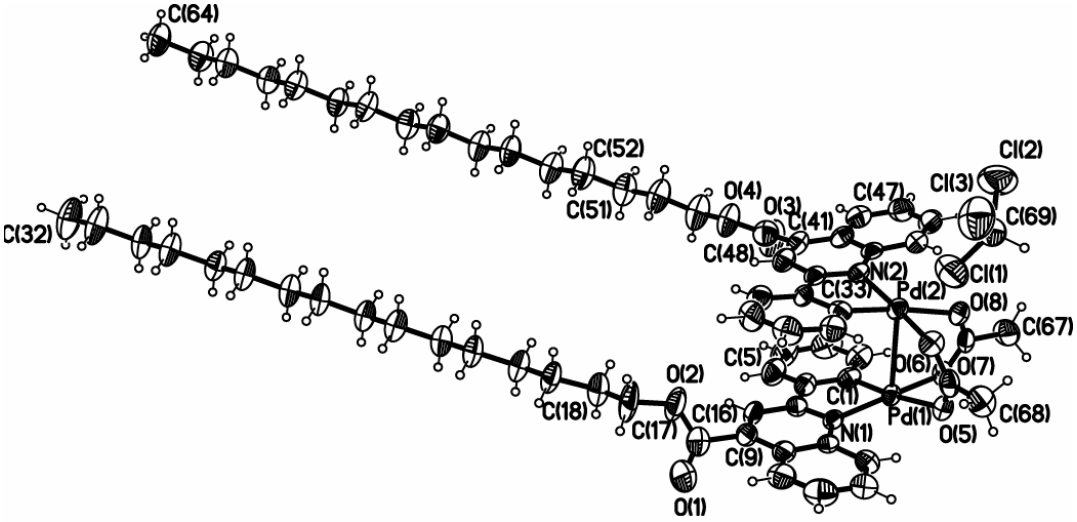


Figura III.5

Infatti l'isomero *trans* del complesso **3** cristallizza con una molecola di cloroformio nell'unità asimmetrica. La tabella III.2 riporta le distanze e gli angoli di legame del suddetto complesso.

Tabella III.2 Distanze [A] ed angoli di legame [deg] per il complesso 3

Pd(1)–C(1)	1.934(6)	Pd(2)–C(33)	1.962(6)
Pd(1)–O(7)	2.041(4)	Pd(2)–O(6)	2.029(4)
Pd(1)–N(1)	2.083(5)	Pd(2)–N(2)	2.060(5)
Pd(1)–O(5)	2.152(4)	Pd(2)–O(8)	2.163(4)
C(1)–Pd(1)–O(7)	92.8(2)	C(33)–Pd(2)–O(6)	91.6(2)
C(1)–Pd(1)–N(1)	80.9(2)	C(33)–Pd(2)–N(2)	81.4(2)
O(7)–Pd(1)–N(1)	172.2(2)	O(6)–Pd(2)–N(2)	172.2(2)
C(1)–Pd(1)–O(5)	173.9(2)	C(33)–Pd(2)–O(8)	174.4(2)
O(7)–Pd(1)–O(5)	83.6(2)	O(6)–Pd(2)–O(8)	86.1(2)
N(1)–Pd(1)–O(5)	103.1(2)	N(2)–Pd(2)–O(8)	101.2(2)
C(1)–Pd(1)–Pd(2)	96.6(2)	C(33)–Pd(2)–Pd(1)	97.0(2)
O(7)–Pd(1)–Pd(2)	84.6(1)	O(6)–Pd(2)–Pd(1)	83.1(1)
N(1)–Pd(1)–Pd(2)	100.7(1)	N(2)–Pd(2)–Pd(1)	101.0(1)
O(5)–Pd(1)–Pd(2)	78.3(1)	O(8)–Pd(2)–Pd(1)	77.7(1)

La struttura cristallina mostra un complesso binucleare in cui ogni Pd(II) è coordinato ad una fenilchinolina ciclometallata e a due gruppi acetati a ponte con una geometria planare-quadrata.

I due leganti fenilchinolinici formano, in una geometria transoide, anelli ciclopalladati a cinque termini, forzati in una disposizione face-to-face, con angolo tra i loro piani di coordinazione di 16.3(1)°. La distanza tra Pd(1)-Pd(2) è 2.872(1) Å.

Il crystal packing del complesso **3**, mostrato in figura III.6, è dominato dalla presenza delle lunghe e lipofiliche catene alcossiliche, interdigitate a formare un substrato paraffinico, dovuto agli elevati effetti di segregazione.

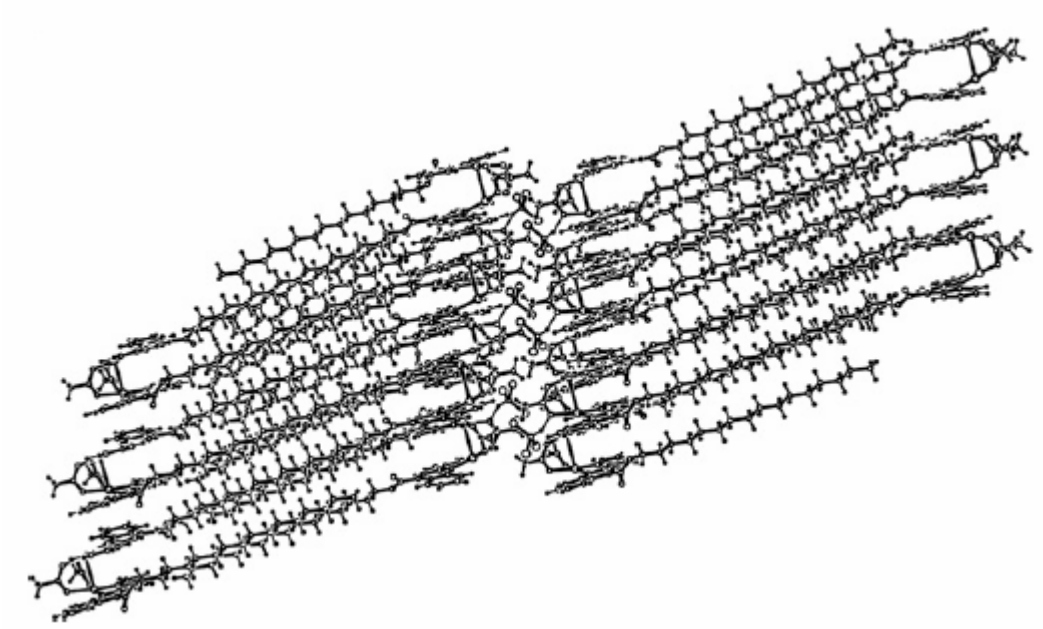
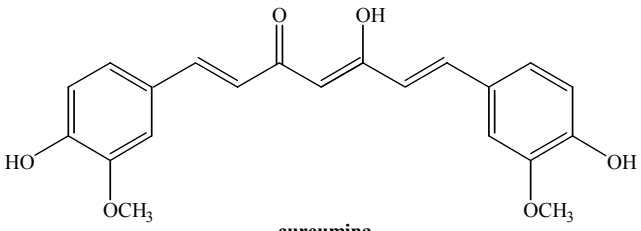


Figura III.6

III.2 Complessi mononucleari contenenti leganti O,O chelanti della famiglia dei curcuminoidi

L'intento di ottenere complessi ciclopalladati mononucleari, ovvero contenenti leganti O,O chelanti biologicamente rilevanti quale la curcumina, oltre al frammento con potenzialità intercalante della 2-fenilchinolina, è nato da una serie di obiettivi. Il primo è stato quello di sfruttare la funzionalità biologica di differenti elementi per ottenere un sinergismo d'azione, in altre parole ottenere sistemi più attivi della curcumina, come nuovi farmacofori. Il secondo è stato quello di bloccare, esplorando la capacità coordinativa di questo β-dichetone nei confronti del Pd(II) attraverso la sintesi dei primi complessi eterolettici della curcumina, il sito vulnerabile alla presenza di ossigeno in soluzione acquosa, aumentando cioè la stabilità della curcumina, e in ultima analisi enfatizzarne le proprietà antitumorali.



curcumina

La complessazione della curcumina è avvenuta utilizzando come precursore il complesso ciclopalladato binucleare a ponte acetato in quanto l'anione acetato ha fornito la giusta driving force, attraverso la rottura del ponte, nel favorire la deprotonazione della curcumina e la sua complessazione.

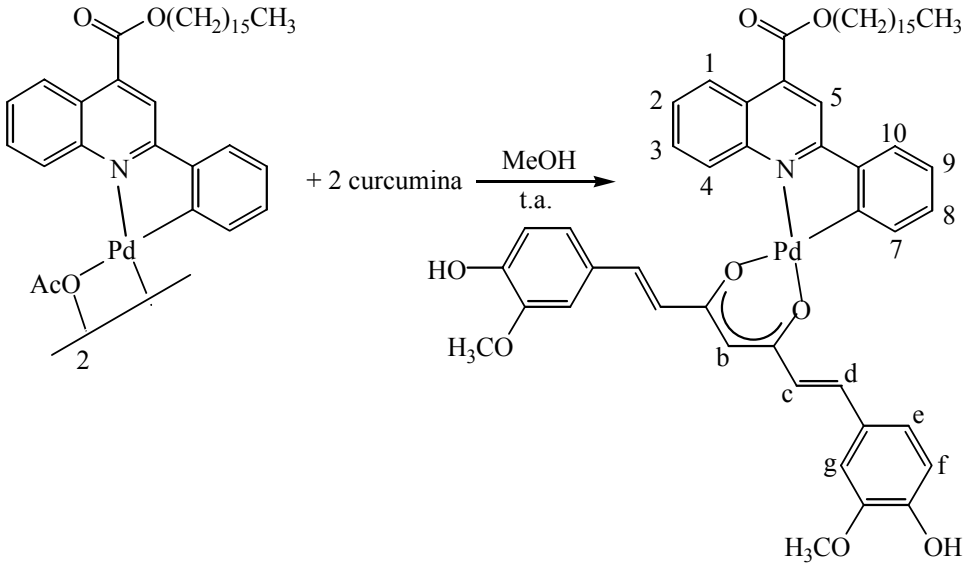
La curcumina è stata utilizzata per la reazione dopo averla purificata dalla miscela di curcuminoidi commerciale (curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina) mediante cromatografia su colonna di silice usando come miscela eluente $CHCl_3$/MeOH in rapporto 9.5/0.5. La curcumina purificata è stata poi funzionalizzata introducendo sui due gruppi idrossilici fenolici, un gruppo alcossilico con una catena alifatica a 22 atomi di carbonio.

Questa funzionalizzazione è stata progettata e ottenuta innanzitutto per indagare sul ruolo biologico giocato dai gruppi OH fenolici, ovvero per capire se sono essenziali per l'attività citotossica. Questo derivato della curcumina è stato complessato per ottenere un complesso analogo a quello della curcumina.

Uno studio poi, delle proprietà citotossiche di questo nuovo curcuminoide e del suo corrispondente complesso metallico, e un confronto con quelle della curcumina e del corrispondente complesso, è stato effettuato con l'intento di delineare un quadro di relazioni struttura-attività dei nuovi farmacofori, al fine di apportare nuovi e interessanti contributi alla ricerca sul farmaco antitumorale da parte della chimica organometallica.

III.2.1 Complesso [(L_1)Pd(curcumina)], 4

Il complesso [(L_1)Pd(μ-OAc)]$_2$, **3**, è stato sospeso in metanolo e per aggiunta della curcumina, si è avuta la formazione del complesso mononucleare, immediatamente osservabile grazie al cambiamento di colore della sospensione che da rossa è diventata gialla (schema III.6).



[(L_1)Pd(μ-OAc)]$_2$ **3** [(L_1)Pd(curcumina)] **4**

Schema III.6

L'avvenuta formazione del complesso, ottenuto con una resa del 71%, è rilevabile già dai dati spettrali provenienti dalla spettroscopia IR, in quanto lo spettro rivela la presenza di una banda a 1625 cm^{-1} e di una banda a 1508 cm^{-1}, attribuibili alle vibrazioni di stretching rispettivamente simmetrico di C=O e asimmetrico di C-C-C dell'anello chelato della curcumina. Inoltre si può osservare lo spostamento della banda relativa alla vibrazione di stretching C=O della 2-fenilchinolina da 1727 cm^{-1} a 1712 cm^{-1}. La formazione dell'anello a sei termini tra il palladio(II) e la curcumina risulta evidente anche dallo spettro ^1H NMR per l'assenza del segnale relativo al protone enolico, come conseguenza della coordinazione della curcumina al metallo. Inoltre si può osservare lo spostamento a valori più alti di δ (Δδ= 1.1 ppm) soprattutto del segnale relativo a H_1 e H_4. Infine i risultati delle analisi elementari concordano con i valori teorici calcolati per la stechiometria di questo complesso.

Si è parlato delle innumerevoli proprietà della curcumina ma è stato detto anche che il principale limite all'uso terapeutico di questo naturale chemioterapico risiede nella sua struttura chimica che ne determina l'instabilità in soluzione acquosa, particolarmente significativa a pH fisiologico.

È anche per superare questo limite che è stata progettata e ottenuta la complessazione della curcumina, per cui prima di valutare le proprietà terapeutiche del complesso **4** è stato valutato il suo comportamento in soluzione acquosa tamponata, ovvero a pH fisiologico e utilizzando come riferimento quello della curcumina nelle stesse condizioni.

La curcumina è stata solubilizzata in etanolo in modo da avere una soluzione con una concentrazione 1 x 10^{-4} M. Questa soluzione è stata diluita con una soluzione acquosa tamponata, D-PBS o tampone fosfato ottenendo una concentrazione finale della curcumina di 1 x 10^{-5} M e in cui la concentrazione dell'etanolo non è maggiore del 5% (v/v).

Analogamente il complesso **4** è stato solubilizzato in etanolo alla concentrazione di 1 x 10^{-4} M e diluito in soluzione acquosa tamponata con una concentrazione finale del complesso di 1 x 10^{-6} M e in cui la concentrazione dell'etanolo è sempre del 5% (v/v).

L'evoluzione del comportamento della curcumina nel tempo, è stata seguita attraverso spettroscopia UV/vis per 48 h (figura III.7a), mentre quella del complesso **4** per 72 h (figura III.7b).

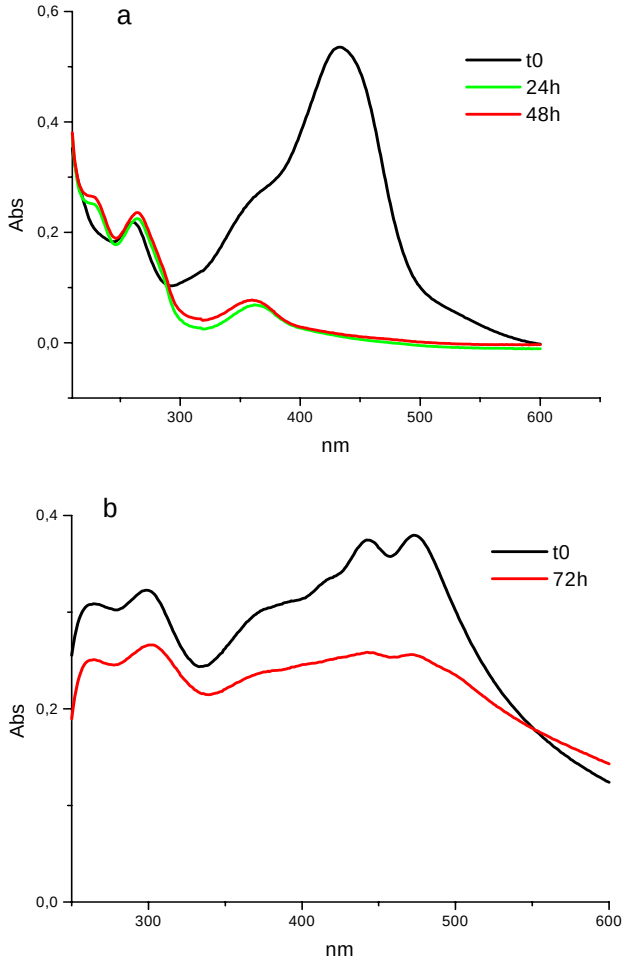


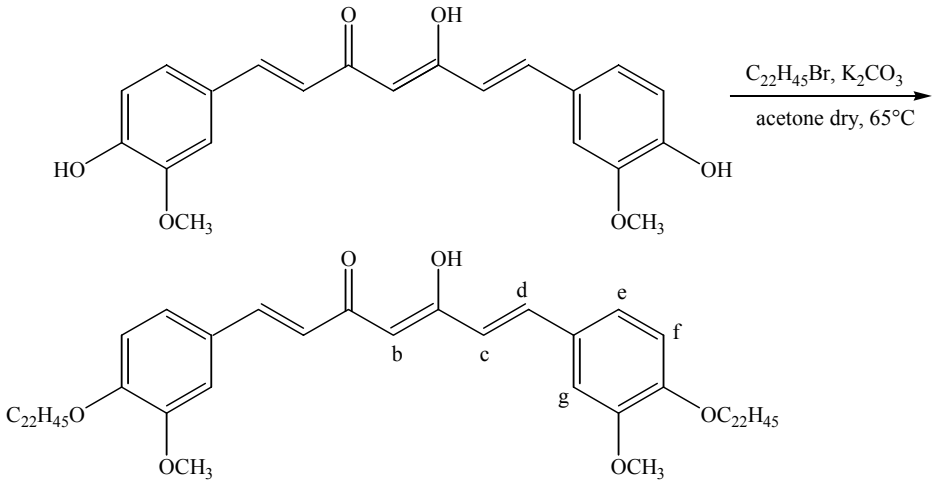
Figura III.7 Spettri UV/vis della curcumina (a) e del complesso 4 (b) a pH 7.2

Come si può osservare dai grafici, mentre per la curcumina si rileva una scomparsa del picco a 427 nm, già dopo 24 h, indice della degradazione, per il complesso **4** si può affermare che anche dopo 72 h il suo comportamento rimane invariato.

Questo dimostra che la complessazione della curcumina impedisce il processo di distruzione della molecola che in soluzione acquosa, a pH neutro, comincia con l'estrazione del protone enolico.

III.2.2 Di-docosanoil curcumina, *curc22*

La sintesi della *curc22* è stata condotta in ambiente anidro e sotto N_2 solubilizzando la curcumina in acetone, aggiunta ad una sospensione di K_2CO_3 in acetone, e quindi fatta reagire con il docosanoil bromuro ottenendo il prodotto con una resa del 78% (schema III.7).



curc22

Schema III.7

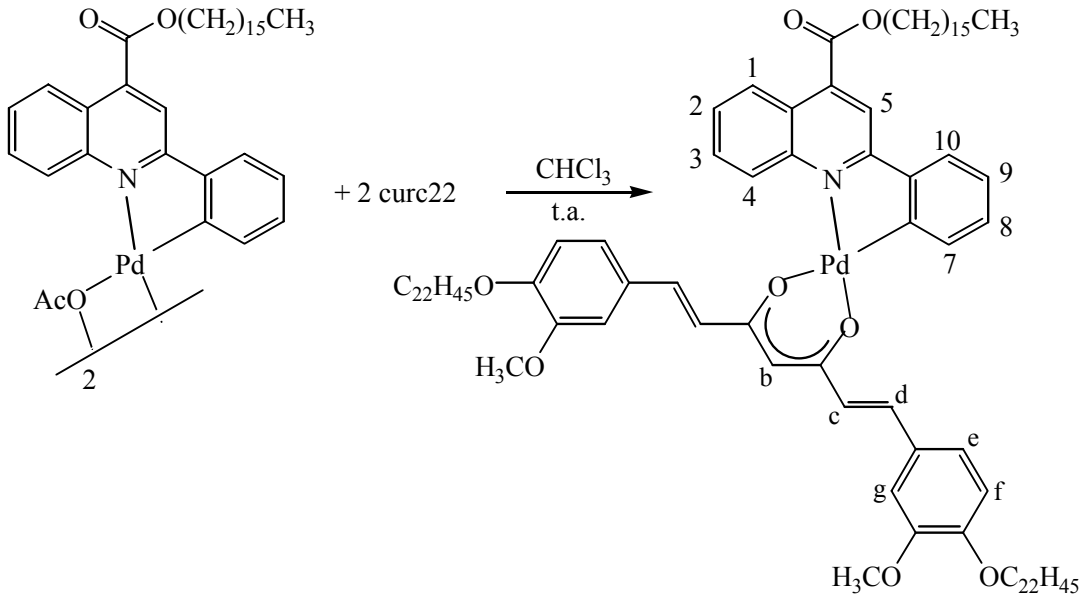
La caratterizzazione attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementare hanno confermato l'avvenuta funzionalizzazione. In particolare, nello spettro IR si possono osservare le bande relative alle vibrazioni di stretching C-H, tra 2918 e 2849 cm^{-1}, indice della presenza delle catene alifatiche. Le catene alifatiche risultano evidenti anche nello spettro ^{1}H NMR, per la presenza di segnali protonici nella zona tra 4.06 e

0.87 ppm. I risultati delle analisi elementari hanno confermato la stechiometria proposta per tale molecola.

III.2.3 Complesso [(L_1)Pd(curc22)], 5

La *curc22* è stata complessata con il frammento ciclopalladato della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina, ottenendo un complesso analogo a quello della curcumina. La procedura sintetica utilizzata è analoga a quella usata per preparare il complesso della curcumina, il complesso **4**, tranne che per il solvente di reazione utilizzato, per ragioni di solubilità.

La reazione infatti è stata condotta in cloroformio, solvente in cui sia il complesso binucleare a ponte acetato che la *curc22* vengono portati in soluzione e il complesso **5** si è formato dopo 4 giorni di agitazione della soluzione a temperatura ambiente (schema III.8).



[(L_1)Pd(curc22)] **5**

Schema III.8

La caratterizzazione del complesso **5,** ottenuto con una resa del 69%, è avvenuta attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari che hanno confermato la formazione del complesso mononucleare della *curc22*. Nello spettro IR la complessazione della *curc22* risulta evidente dalla presenza delle bande relative alle vibrazioni di stretching C=O a 1625 cm^{-1} e C-C-C a 1507 cm^{-1} della *curc22*. Di pochissimo invece si sposta la banda di vibrazione di stretching C=O della 2-fenilchinolina (da 1727 cm^{-1} a 1726cm^{-1}).

Nello spettro ^{1}H NMR il dato più significativo è l'assenza del segnale relativo al protone enolico, indice della chelazione della *curc22*.

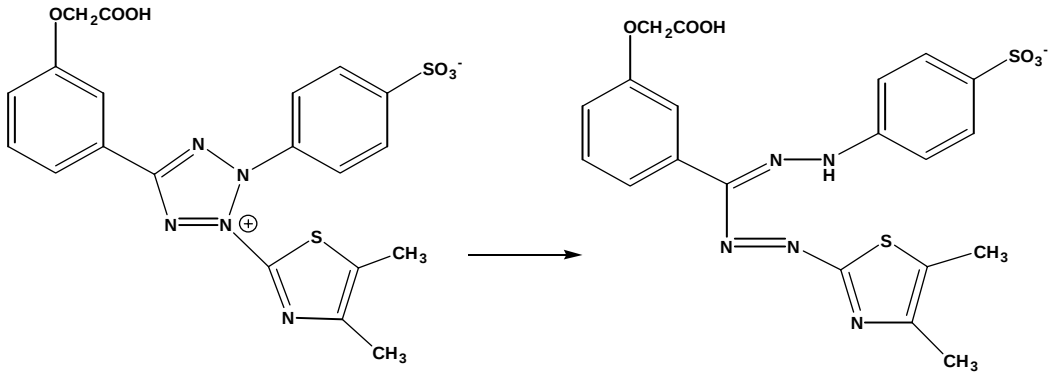
Inoltre si può osservare lo spostamento a valori più alti di δ (Δδ= 1.1 ppm) dei protoni del sistema fenilchinolinico, soprattutto dei protoni H_1 e H_4. Infine i risultati delle analisi elementari concordano con i valori teorici calcolati per la struttura del complesso **5**.

III.2.4 Proprietà citotossiche *in vitro* dei complessi [(L_1)Pd(curcumina)], 4 e [(L_1)Pd(curc22)], 5

Le proprietà citotossiche dei complessi **4** e **5** e dei leganti, ovvero della curcumina purificata e della curcumina funzionalizzata sono state studiate su una linea cellulare tumorale prostatica umana, la DU 145. Questa linea cellulare è stata scelta considerata la capacità da parte della curcumina di inibire la proliferazione di queste cellule e sulla base dell'attività antiandrogenica mostrata da alcuni derivati della curcumina su cellule tumorali prostatiche umane [64].

L'effetto citotossico è stato studiato esponendo le cellule in parallelo ai leganti e ai complessi, per 72 h, dopodiché rilevato mediante saggio colorimetrico dell'MTS.

Il saggio colorimetrico dell'MTS o sale di tetrazolio è un saggio che si basa sulla capacità delle cellule di ridurre il sale di tetrazolio a formazano tramite un enzima mitocondriale, la succinato tetrazolio reduttasi.



MTS FORMAZANO

Tale riduzione avviene solo nelle cellule vive e non in quelle morte o danneggiate, per questo tale saggio è idoneo a rilevare la capacità di un farmaco di uccidere le cellule.

Il formazano assorbe a 490 nm, per cui la bioriduzione del formazano viene quantificata per lettura allo spettrofotometro a 490 nm, valutando così l'entità della sopravvivenza cellulare.

Infatti, la citotossicità dei farmaci viene espressa come percentuale del valore dell'assorbanza dei campioni rispetto ai controlli, ovvero alle cellule non trattate. La concentrazione alla quale si misura una riduzione della vitalità cellulare del 50% rispetto ai controlli viene espresso come IC_{50}, che corrisponde in genere alla media delle deviazioni standard di tre esperimenti. Elaborando i dati si ottengono degli istogrammi in cui l'entità della sopravvivenza cellulare viene rapportata alla concentrazione del farmaco. Sia i complessi che i leganti sono stati utilizzati in concentrazioni scalari comprese tra 0.1 e 100 μM. Come si può osservare dai grafici (figura III.8), la curcumina mostra un effetto citotossico compreso tra 3 e 10 μM, mentre il complesso **4** mostra attività a concentrazioni nettamente inferiori, con un IC_{50} pari a 0.1 μM. A queste concentrazioni la curcumina risulta essere inattiva.

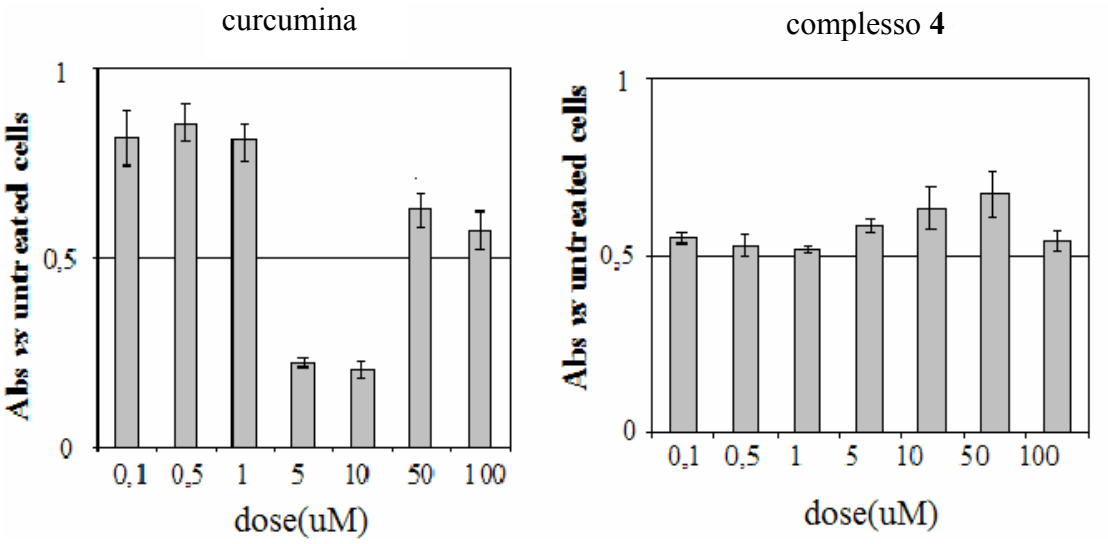


Figura III.8 Istogramma di citotossicità della curcumina e del complesso 4

Considerati i risultati si può affermare che il frammento ciclopalladato agisce in maniera sinergica con la curcumina, oppure che la stabilità del sistema consente alla curcumina di arrivare integra al bersaglio, giustificando la maggiore attività del complesso **4** rispetto alla curcumina libera. Le proprietà chimico-fisiche del sistema contenente il metallo risultano essere pertanto fondamentali per l'attività citotossica *in vitro*, aprendo un interrogativo sul meccanismo d'azione.

Confrontando, poi i grafici che riportano l'attività della *curc22* e della curcumina (figura III.9) si vede che la *curc22* mostra attività citotossica già a concentrazioni di 0.1 μM al contrario della curcumina che ha un range di attività citotossica non inferiore ai 3 μM.

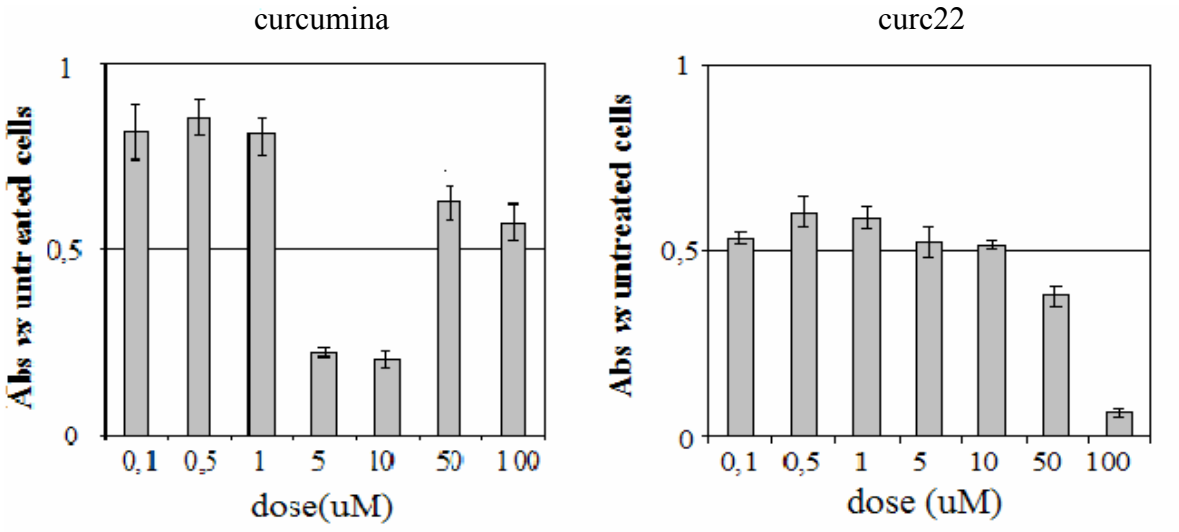


Figura III.9 Istogramma di citotossicità della curcumina e della curc22

Sulla base dei risultati ottenuti, nell'ambito di uno studio di relazione struttura-attività, possiamo dire che la presenza dei gruppi OH fenolici è irrilevante all'attività citotossica, anzi la presenza delle catene alifatiche favorisce l'attività del derivato della curcumina, differentemente da quanto sostenuto finora.

Come emerge dai grafici che riportano i risultati del complesso **5**, messi a confronto con quelli della *curc22* (figura III.10), l'attività citotossica del complesso **5** risulta essere paragonabile a quella del suo legante, con un IC_{50} di 0.1 μM.

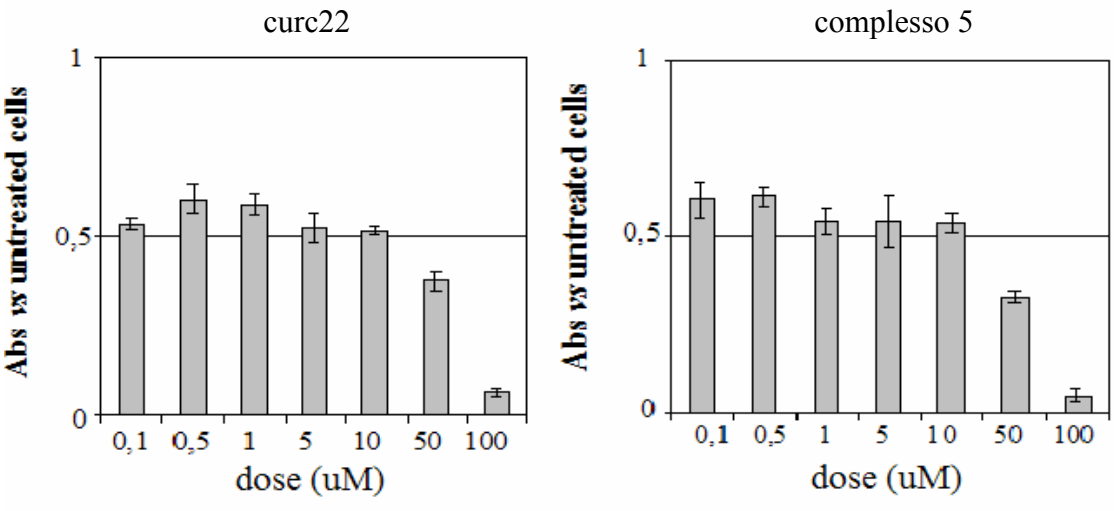


Figura III.10 Istogramma di citotossicità della curc22 e del complesso 5

Dato che l'attività del complesso 5 è paragonabile a quella del suo legante si può dire che l'attività è dominata dalle catene alifatiche.

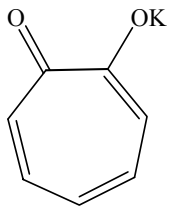
Riassumendo i risultati delle proprietà citotossiche relative alla nuova famiglia di complessi ciclopalladati della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina, si può estrapolare uno studio di relazioni struttura-attività dicendo che sistemi bifunzionali, ovvero sistemi che possiedono attorno al metallo due unità bioattive, producono un sinergismo d'azione, considerando che possiedono un'attività maggiore rispetto ai singoli leganti. Il frammento ciclopalladato, d'altro canto contribuisce all'attività grazie alla stabilità del sistemi risultanti, superando sia i limiti del legante, ovvero della curcumina, che dei complessi di coordinazione di Pd(II) che seguirono alla scoperta del *cis*-platino.

Inoltre è emerso che i gruppi OH fenolici, mentre sono essenziali all'attività antiossidante della curcumina, non lo sono per quanto riguarda l'attività citotossica. Non solo, si è visto che la presenza della lunga catena alifatica è fondamentale all'attività del legante e che la sua attività è paragonabile a quella di entrambi i complessi ciclopalladati, ponendo un importante quesito circa l'influenza delle proprietà chimico-fisiche di questi sistemi sul meccanismo d'azione [68].

III.3 Complessi mononucleari contenenti il legante tropolone

Come è stato descritto, la complessazione della curcumina è avvenuta utilizzando come precursore il complesso ciclopalladato binucleare a ponte acetato in quanto l'anione acetato ha fornito la giusta driving force, attraverso la rottura del ponte, nel favorire la deprotonazione della curcumina e la sua complessazione. Infatti la complessazione della curcumina non avviene quando viene utilizzato come precursore il complesso binucleare a ponte cloro, in quanto questo tipo di legante O,O chelante non è un buon nucleofilo e il legante cloruro uscente dalla rottura del ponte del binucleare non riesce a deprotonare la curcumina.

D'altra parte non è stato possibile aumentare la nucleofilicità della curcumina attraverso la formazione del suo sale per l'elevata instabilità in ambiente basico.
Nel caso del tropolone invece, è stato possibile aumentarne la nucleofilicità utilizzandolo nella forma deprotonata, utilizzandolo cioè come sale.

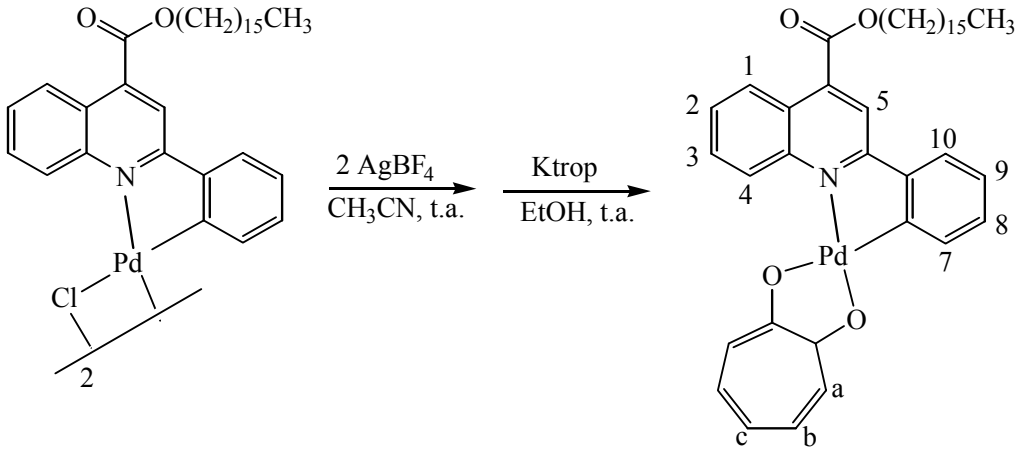


tropolonato di potassio

La capacita di coordinazione del tropolone nei confronti del complesso binucleare ciclopalladato della 2-fenilchinolina è stata testata, infatti, facendo reagire il tropolonato di potassio, precedentemente preparato con il complesso binucleare a ponte cloro.

III.3.1 Complesso [(L_1)Pd(trop)], 6

Il complesso **6** è stato ottenuto mediante una reazione che avviene in due stadi. Infatti in un primo stadio è avvenuta la formazione di un intermedio ionico più reattivo che nel secondo stadio è stato sospeso in etanolo. A questa sospensione è stata aggiunta una soluzione di tropolonato di potassio in etanolo, che è stata agitata a temperatura ambiente. Si è formato un precipitato giallo che è stato purificato e caratterizzato (schema III.9).



[(L_1)Pd(trop)] **6**

Schema III.9

La caratterizzazione del complesso **6,** ottenuto con una resa del 75%, è avvenuta attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari che hanno confermato la chelazione del tropolone. Nello spettro IR del complesso risulta evidente essenzialmente lo spostamento della banda relativa allo stretching C=O della 2-fenilchinolina da 1727 cm^{-1} a 1721 cm^{-1} e le bande di vibrazione di stretching C=O a 1593 cm^{-1} e di C=C a 1545 cm^{-1} che indicano la presenza del sistema aromatico del tropolone.

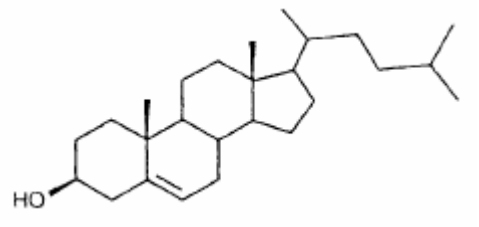
La formazione del complesso **6** è stata confermata dall'analisi dello spettro ^{1}H NMR, in cui si osserva la presenza dei segnali dei protoni aromatici del tropolone e lo spostamento verso valori più alti di δ soprattutto dei protoni H_1 e H_4 dei protoni aromatici della 2-fenilchinolina.

I risultati delle analisi elementari hanno confermato la stechiometria del complesso del tropolone ottenuto.

La scarsa solubilità del complesso **6** non ha consentito però di effettuare le misure di citotossicità al fine di stabilire un'eventuale attività citotossica.

III.4 Complessi della 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina, HL_2

Un ulteriore estere dell'acido carbossilico della 2-fenilchinolina è stato ottenuto e ciclometallato al fine di ottenere una seconda famiglia di complessi ciclopalladati mononucleari. In particolare, sulla 2-fenilchinolina è stata introdotta come parte esterea del legante, un particolare frammento molecolare, il colesterolo.



colesterolo

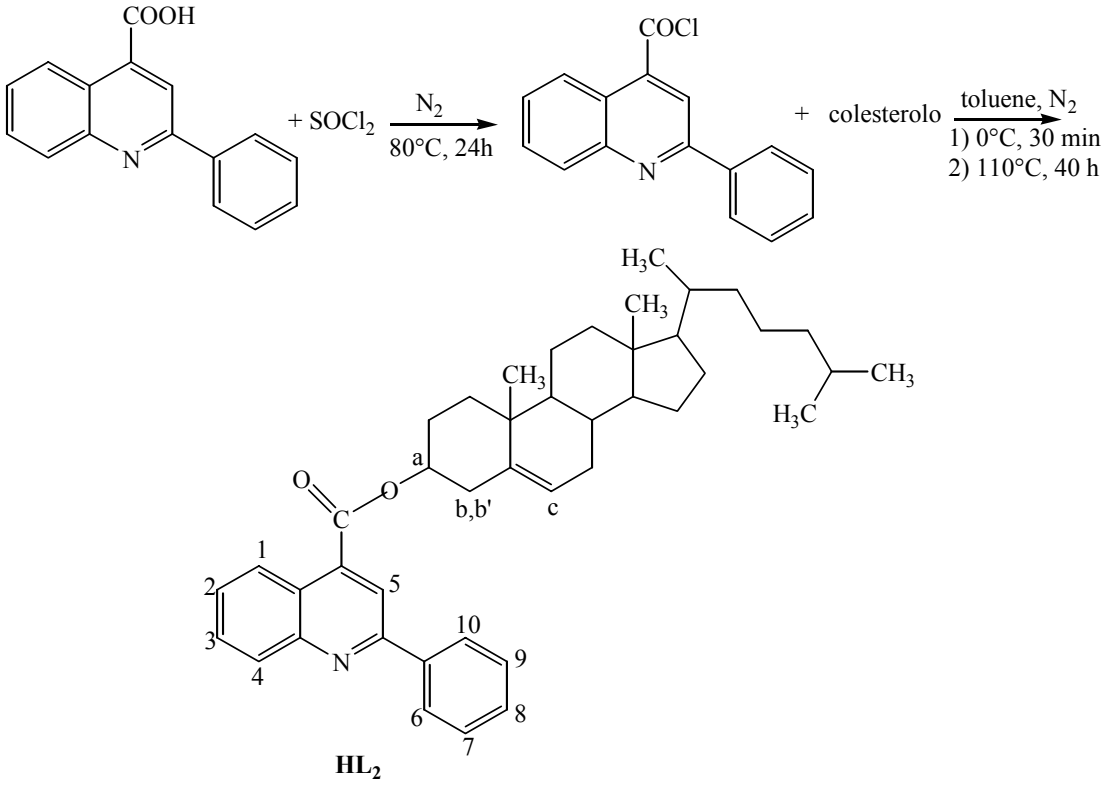
La 2-fenilchinolina è stata funzionalizzata con questa non convenzionale molecola, che costituisce un naturale e importante componente delle membrane cellulari, al fine di introdurre sui target finali con potenziale attività citotossica, un carrier più efficiente. Non a caso il colesterolo rappresenta il maggiore componente delle composizioni liposomiche che vengono adoperate per veicolare il farmaco nei mezzi biologici, e proprio per la loro composizione strutturale presentano bassa tossicità in quanto hanno un'elevata capacità di veicolazione verso il DNA. La capacità di veicolazione del colesterolo nasce, oltre che dalla natura idrofobica della molecola che gli permette di intercalarsi nelle membrane cellulari, dalle proprietà liquido-cristalline che può indurre nelle molecole che lo contengono. In questo senso è stato interessante investigare le proprietà liquido- cristalline dei complessi ciclopalladati mononucleari contenenti il colesterolo, sintetizzati per ottenere materiali biocompatibili.

Sulla base dell'esperienza acquisita riguardo alla ciclopalladazione della 2-fenilchinolina, è stato ritenuto opportuno sintetizzare come precursore dei nuovi complessi mononucleari contenenti leganti O,O chelanti della famiglia dei curcuminoidi e il tropolone, direttamente il complesso binucleare a ponte acetato del legante 2-fenil-

4-colesterilcarbossilato chinolina, essendo un ottimo materiale di partenza per la coniugazione di un legante non sufficientemente nucleofilo come la curcumina.
Dato che il tropolone, sottoforma di sale è sicuramente più nucleofilo della curcumina e considerando che nella sintesi del complesso [(L_1)Pd(trop)], **6**, la chelazione del tropolone è avvenuta utilizzando come precursore il binucleare ponte cloro, si è scelto questa volta di utilizzare come precursore del complesso del troplone il complesso binucleare a ponte acetato.
Quindi sia il legante che i complessi sono stati osservati al microscopio ottico in luce polarizzata fornito di fornetto a temperatura variabile che ha rivelato la presenza di una fase liquido-cristallina solo per i complessi, che è stata meglio studiata attraverso analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC) e tramite diffrattometria a raggi X su polveri, a temperatura variabile.

III.4.1 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina, HL_2

Il legante 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina **HL_2**, è stato ottenuto, analogamente al legante 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina **HL_1**, in una reazione a due step, usando come precursore l'acido carbossilico della 2-fenilchinolina. Pertando, nel primo step è stato ottenuto l'intermedio di reazione più reattivo, il cloruro dell'acido, aggiungendo ad un eccesso di cloruro di tionile l'acido carbossilico della 2-fenilchinolina. Il cloruro dell'acido, nel secondo step di reazione viene fatto reagire con il colesterolo in una soluzione di toluene, ottenendo dopo 40 h di agitazione della soluzione nelle condizioni riportate nello schema III.10, il prodotto desiderato con una resa del 85%.



HL_2

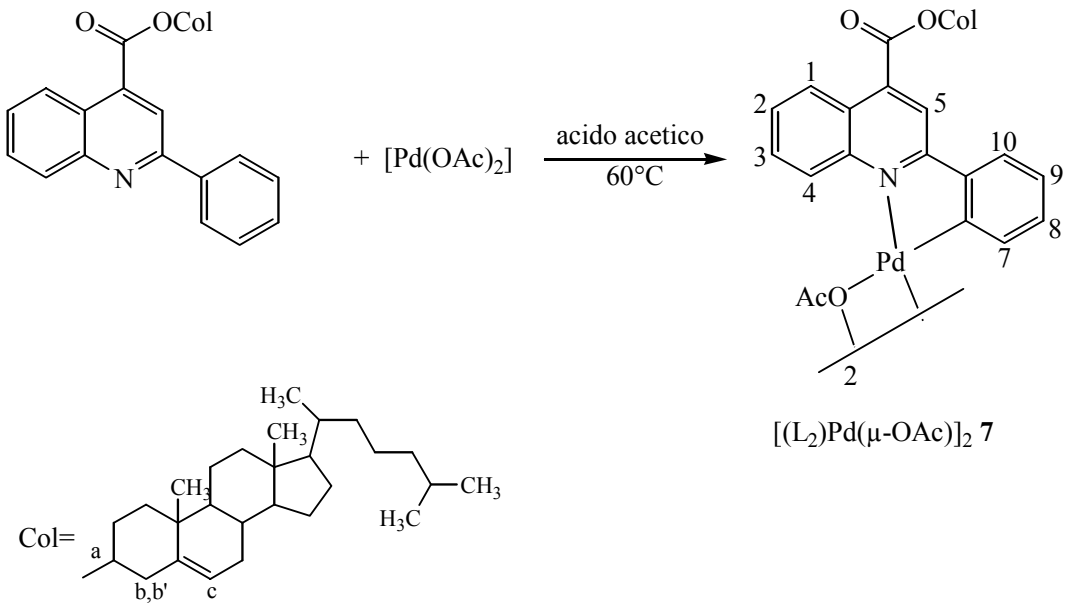
Schema III.10

La formazione di questo nuovo estere è stata verificata attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari. Nello spettro IR si può osservare l'avvenuta esterificazione per la presenza della banda di vibrazione di stretching relativa allo C=O della 2-fenilchinolina a 1713 cm^{-1}. Inoltre la presenza delle bande tra 2941-2866 cm^{-1} relative alle vibrazioni di stretching C-H indicano la presenza del sistema ciclico non aromatico del colesterolo.

Dallo spettro ^{1}H NMR l'esterificazione è rilevabile essenzialmente dallo spostamento del segnale relativo al protone del colesterolo H_a verso valori più alti di δ, (Δδ= 1.5 ppm). Inoltre la presenza di un gruppo di segnali tra 2.58 e 0.7 ppm conferma la presenza del sistema del colesterolo. Infine, i risultati delle analisi elementari hanno confermato la stechiometria di questo nuovo legante.

III.4.2 Complesso binucleare a ponte acetato, $[(L_2)Pd(\mu\text{-}OAc)]_2$, 7

Il complesso binucleare a ponte acetato è stato ottenuto pertanto in maniera analoga a quello della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina, solubilizzando il legante in acido acetico e aggiungendo a questa soluzione una quantità stechiometrica di palladio(II)acetato (schema III.11).



$[(L_2)Pd(\mu\text{-}OAc)]_2$ **7**

Schema III.11

La reazione, condotta a 60 °C ha prodotto subito un precipitato rosso che è stato isolato, ricristallizzato e caratterizzato mediante spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari. L'analisi dello spettro IR del complesso, ottenuto con una resa del 90%, rileva la presenza delle bande a 1570 cm^{-1} e a 1413 cm^{-1}, attribuibili, rispettivamente ai modi vibrazionali asimmetrico e simmetrico di stretching del C=O del gruppo acetato. Inoltre lo spostamento della banda relativa allo stretching del C=O della 2-fenilchinolina da 1713 cm^{-1} a 1727 cm^{-1} conferma l'avvenuta complessazione. Ciò è supportata anche dall'analisi dello spettro ^{1}H NMR in cui la scomparsa del segnale relativo al protone H_6 indica l'avvenuta ciclometallazione.

Tuttavia, come per l'analogo complesso binucleare della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina, la molteplicità di ogni segnale che si ripete indica la presenza di due isomeri, in rapporto di circa 5:1. In analogia al binucleare congenere, si può dire che quello che prevale è l'isomero *trans*. I dati sperimentali delle analisi elementari sono in accordo con quelli teorici calcolati per il binucleare.

La consueta osservazione mediante microscopia ottica in luce polarizzata, utilizzata per la determinazione del punto di fusione, ha rivelato per il complesso **7**, contrariamente al legante 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina, che non è cristallo liquido, la presenza di una fase liquido cristallina caratterizzata da una testura oily streaks coerente con l'esistenza di una fase colesterica.

Un approfondimento del comportamento termico del complesso, effettuando un'analisi delle transizioni di fase attraverso calorimetria differenziale a scansione (DSC), ha rivelato la presenza di una mesofase tra 195.6 °C e 225.5 °C, come riporta la traccia in figura III.11.

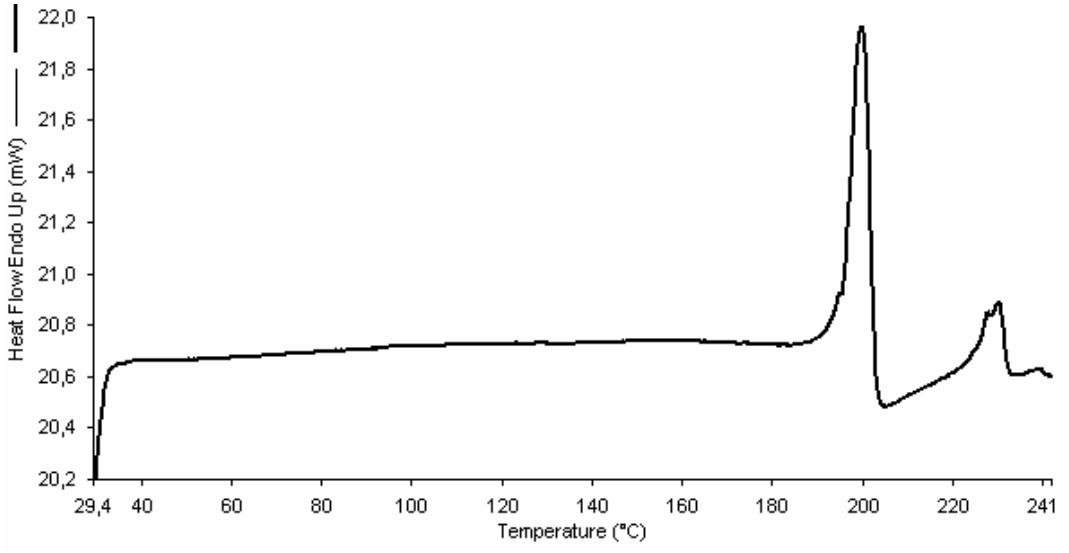


Figura III.11

Per confermare la natura della mesofase è stata effettuata un'indagine strutturale tramite diffrattometria a raggi X su polveri (PXRD), a temperatura variabile.
Mediante quest'analisi è stata attribuita una fase smetica C chirale.
Infatti il pattern di diffrazione registrato nell'intervallo di temperatura della mesofase ha rivelato la presenza di un picco molto largo nella regione a basso angolo centrato a 49.5 Å (figura III.12).

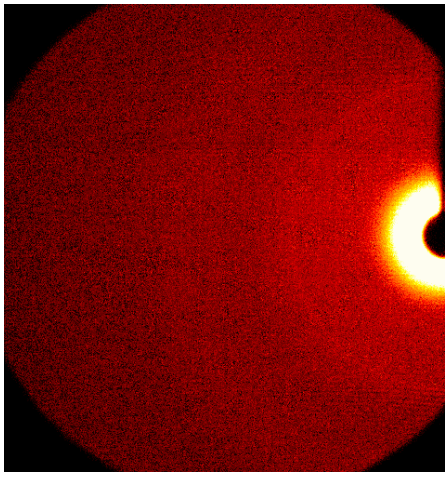
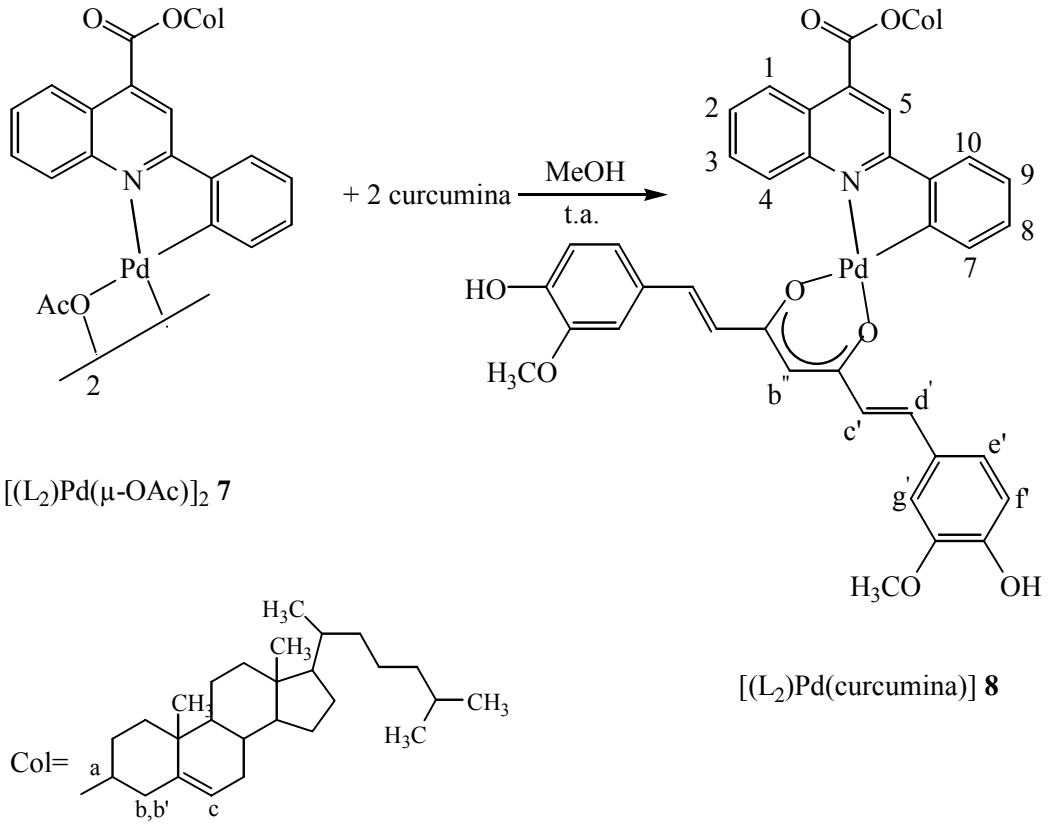


Figura III.12

III.4.3 Complesso mononucleare [(L_2)Pd(curcumina)], 8

La rottura del ponte acetato del complesso binucleare [(L_2)Pd(μ-OAc)]$_2$, **7**, sospeso in metanolo, favorisce la complessazione della curcumina purificata, ottenendo così dopo 48 h di agitazione della sospensione a cui è stata aggiunta, il complesso multifunzionale della curcumina (schema III.12).



Schema III.12

Nello spettro IR, la presenza di una banda a 1626 cm^{-1} e di una banda a 1508 cm^{-1} attribuibili alle vibrazioni di stretching rispettivamente simmetrico di C=O e asimmetrico di C-C-C dell'anello chelato della curcumina, indicano la sua complessazione. Inoltre si può osservare lo spostamento della banda relativa alla vibrazione di stretching C=O della 2-fenilchinolina da 1727 cm^{-1} a 1721 cm^{-1}.

La formazione del complesso mononucleare neutro, attraverso chelazione della curcumina mediante il sistema α,β insaturo dei due gruppi carbonilici, è stata confermata dall'analisi dello spettro ^1H NMR, in cui è evidente la scomparsa del segnale relativo al protone enolico. Inoltre, si può osservare lo spostamento verso valori più alti di δ (Δδ= 1.13 ppm) dei protoni aromatici della 2-fenilchinolina, soprattutto di H_1 e H_4.

I risultati delle analisi elementari, concordi con la stechiometria del complesso **7** forniscono un'ulteriore conferma della formazione del complesso.

Osservando il complesso **8** al microscopio ottico in luce polarizzata, è stata riscontrata la presenza di una fase liquido-cristallina con una testura schlieren, la cui caratterizzazione termica attraverso calorimetria differenziale a scansione (DSC) ha confermato la presenza di una mesofase tra 140°C e 220°C (figura III.13).

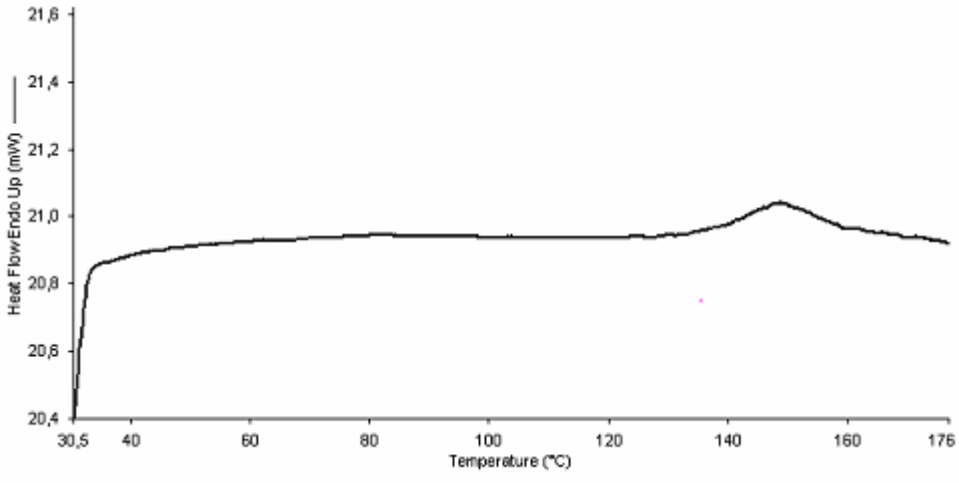


Figura III.13

Il pattern di diffrazione a raggi X su polveri (XRD), registrato a 180°C ha permesso di identificare la presenza di una mesofase colonnare rettangolare caratterizzata da due significativi picchi nella regione a basso angolo (figura III.14).

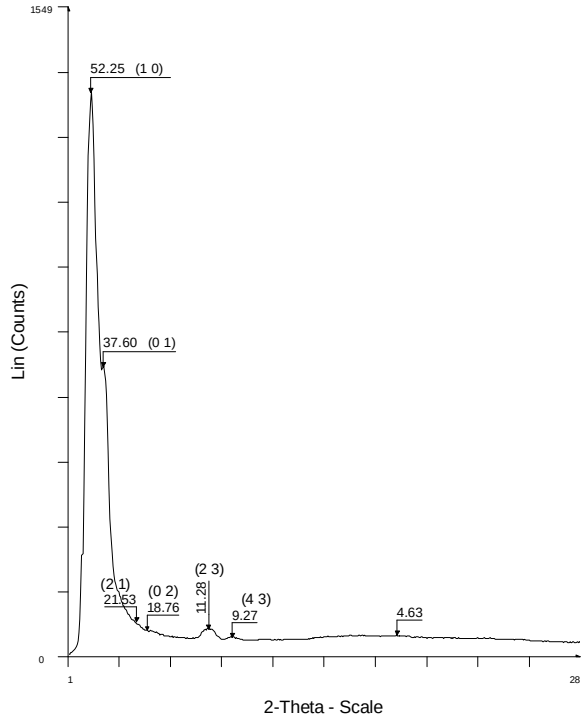


Figura III.14

L'intento di valutare le proprietà citotossiche di questo nuovo complesso multifunzionale della curcumina, ha richiesto come analisi preliminare, oltre alla consueta caratterizzazione chimica, la valutazione della stabilità in ambiente acquoso, a pH neutro del suddetto complesso. È stato importante verificare la stabilità di questo derivato della curcumina per dimostrare, in vista di un ipotetico uso terapeutico, il suo potenziale vantaggio, rispetto alla curcumina, la cui vulnerabilità in ambiente fisiologico è stata ampiamente studiata e in questa sede dimostrata. Tale valutazione, in virtù dei risultati ottenuti già per il complesso analogo della curcumina, il complesso **4**, risulterebbe superfluo considerato che il sistema di complessazione della curcumina è lo stesso. Tuttavia per essere certi della stabilità del complesso **8**, una soluzione del complesso in EtOH con una concentrazione di 1 x 10^{-4} M è stata diluita, analogamente a come è stato fatto per la curcumina e il complesso **4**, con una soluzione acquosa contenente D-PBS o tampone fosfato, ottenendo una concentrazione finale di 1 x 10^{-6} M e in cui la concentrazione dell'etanolo non è maggiore del 5% (v/v).

Mediante gli spettri di assorbimento è stata seguita l'evoluzione nel tempo (72 h), del complesso **8** dimostrando, come si vede dal grafico (figura III.15b), che il complesso in condizioni fisiologiche *in vitro*, è stabile anche dopo 72 h, rispetto invece alla curcumina (figura III.15a) che si degrada già dopo 24 h.

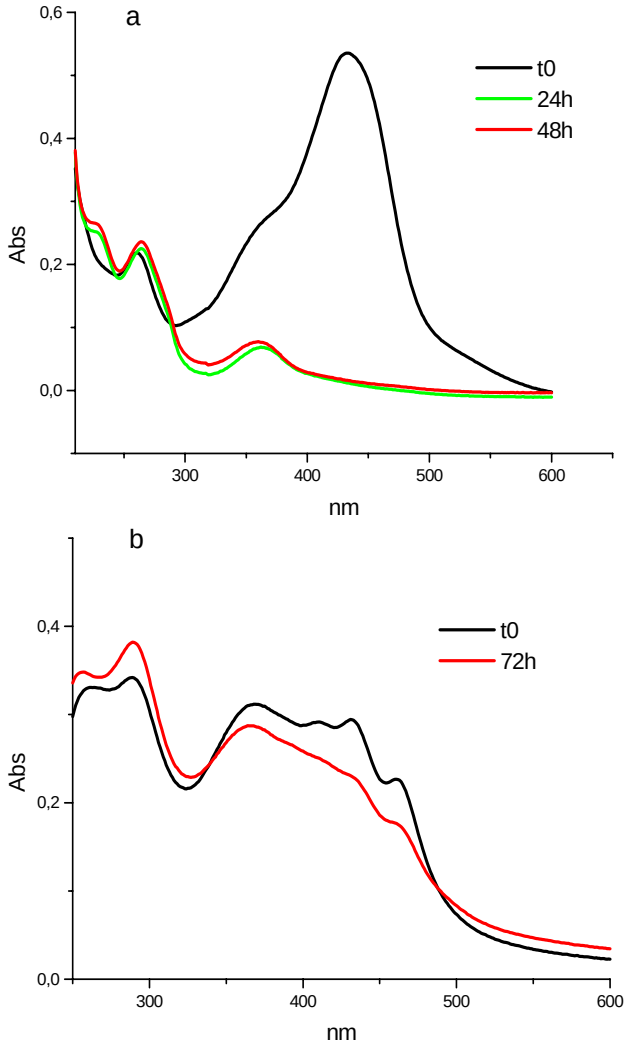


Figura III.15 Spettri UV/vis della curcumina (a) e del complesso 8 (b) a pH 7.2

III.4.4 Proprietà citotossiche *in vitro* del complesso [(L_2)Pd(curcumina)], 8

Lo studio delle proprietà citotossiche del complesso **8** è stato effettuato oltre che sulla linea cellulare prostatica umana, DU 145 su una seconda linea cellulare, LNCaP anch'essa una linea cellulare prostatica umana.

Queste due linee cellulari si distinguono per molte differenze molecolari, tra cui l'espressione della GSTπ che è correlata alla carcinogenesi e alla resistenza delle cellule cancerose verso gli agenti chemioterapici.

In diversi tumori umani i livelli degli enzimi detossificanti sono più elevati e si è visto che le cellule DU 145 esprimono la GSTπ mentre le cellule LNCaP non la esprimono. Esistono farmaci che hanno la peculiarità di mostrare un'attività antitumorale maggiore in celllule con un alto contenuto del sistema di detossificazione GST/ glutatione [65,66]. In questo senso lo studio di citotossicità svolto su entrambe le linee cellulari è stato voluto al fine di fornire un eventuale primo dato nella comprensione del meccanismo d'azione.

Lo studio di citotossicità del complesso **8** è avvenuto sulle due linee in modo parallelo. Le cellule sono state trattate con una soluzione concentrata del complesso in DMSO con concentrazioni finali, ovvero nel terreno di coltura, comprese tra 1.5 e 100 μM.

Dopo 72 h di continua esposizione delle cellule al complesso è stata misurata la sopravvivenza cellulare attraverso saggio colorimetrico dell'MTS.

Dall'elaborazione dei dati è stato ottenuto il grafico in cui viene riportata l'entità della morte cellulare, o sopravvivenza cellulare in parallelo sulle due linee (figura III.16).

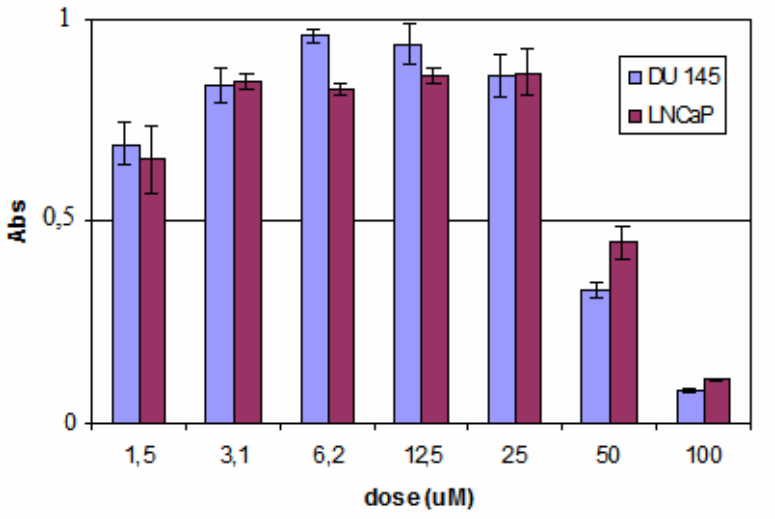


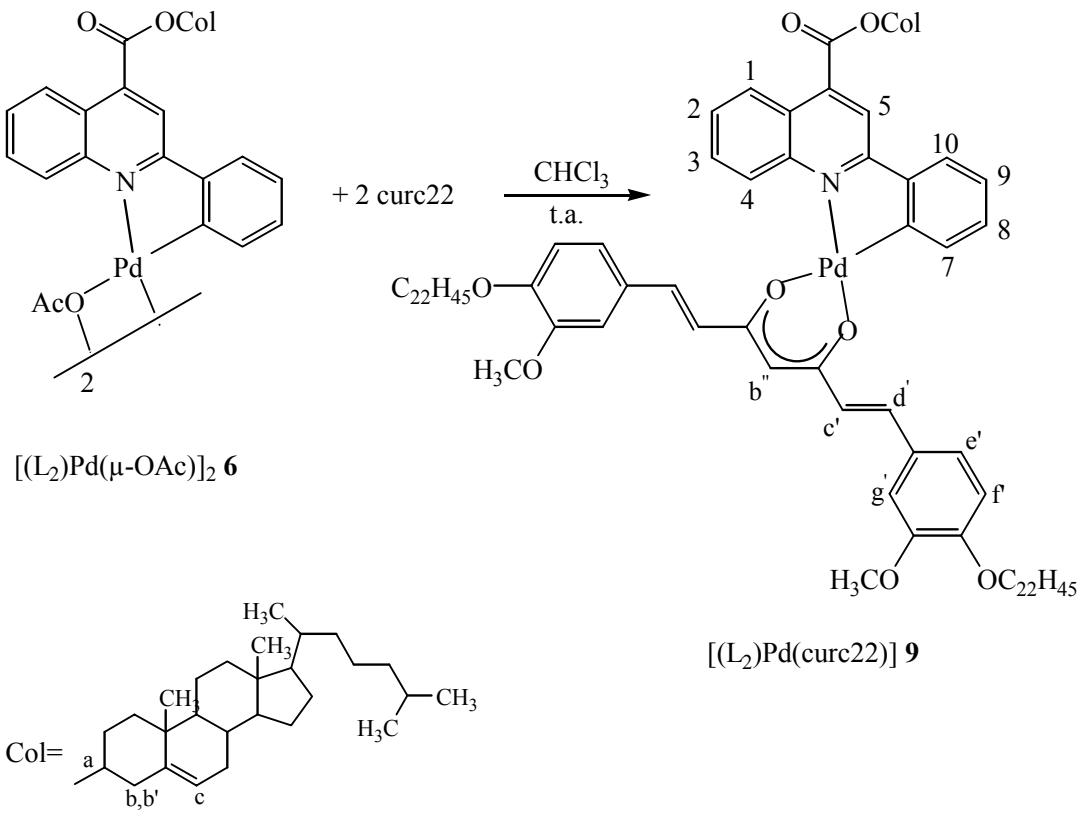
Figura III.16 Istogramma di citotossicità del complesso 8

Come si può osservare dal grafico, il complesso è attivo in un range di concentrazioni compreso tra 25 e 50 μM e l'andamento dell'attività è pressocchè paragonabile nelle due linee cellulari.

Inoltre, il fatto che la concentrazione alla quale il complesso è attivo sia la stessa nelle due linee cellulari può voler significare che il meccanismo d'azione è indipendente dall'enzima GSTπ e da altri fattori molecolari che differenziano le due linee cellulari tumorali.

III.4.5 Complesso mononucleare [(L_2)Pd(curc22)], 9

Per completare il quadro, ovvero per avere un'idea più chiara riguardo alle proprietà sia mesomorfiche che citotossiche di questi nuovi sistemi, è stato sintetizzato un secondo complesso ciclometallato mononucleare multifunzionale, il complesso [(L_2)Pd(curc22)], **9**. Aggiungendo ad una soluzione di cloroformio contenente la *curc22*, il complesso precursore binucleare della 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina, [(L_2)Pd(μ-OAc)]$_2$ **6**, si ottiene una sospensione che viene agitata a temperatura ambiente. Dopo filtrazione e ricristallizzazione si ottiene il complesso [(L_2)Pd(curc22)], **9** con una resa del 75% (schema III.13).



Schema III.13

La formazione del complesso **9** è stata accertata con la caratterizzazione attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari. Nello spettro IR la complessazione della *curc22* risulta evidente dalla presenza delle bande relative alle vibrazioni di stretching C=O a 1625 cm^{-1} e C-C-C a 1510 cm^{-1} della *curc22*. Un'ulteriore conferma della formazione del complesso **9**, proveniente dall'analisi dello spettro IR, consiste nello spostamento della banda di vibrazione di stretching C=O della 2-fenilchinolina a frequenze minori.

L'assenza del segnale relativo al protone enolico e lo spostamento verso valori più alti di δ, soprattutto di H_1 e H_4 nello spettro ^{1}H NMR, indica la complessazione della *curc22*.

Infine i risultati delle analisi elementari concordano con i valori teorici calcolati per la struttura del complesso mononucleare neutro della *curc22*.

La scarsa solubilità del complesso **9** in solventi biologicamente compatibili, non ha permesso di effettuare lo studio delle proprietà citotossiche del suddetto complesso.

L'osservazione del complesso **9** mediante microscopia ottica in luce polarizzata ha rivelato la presenza di una fase liquido-cristallina.

L'introduzione di due lunghe catene alcossiliche alifatiche sulla curcumina determina, con la sua complessazione, e quindi con la formazione del complesso analogo al complesso **8**, un cambiamento nell'organizzazione della simmetria delle molecole, passando da una mesofase colonnare rettangolare ad una mesofase colonnare esagonale.

Dall'analisi al microscopio la testura del complesso **9** rivela la presenza di croci maltesi coerente con l'esistenza di un mesomorfismo colonnare.

Come mostra la traccia in figura III.17, relativa all'analisi del comportamento del complesso mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), tale fase esiste tra 65.2°C e 200°C ed è preceduta da una transizione cristallina.

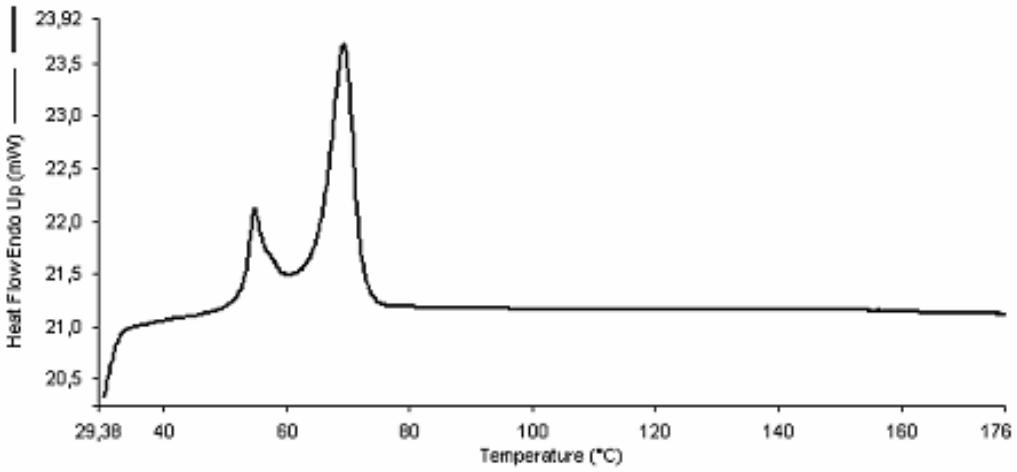
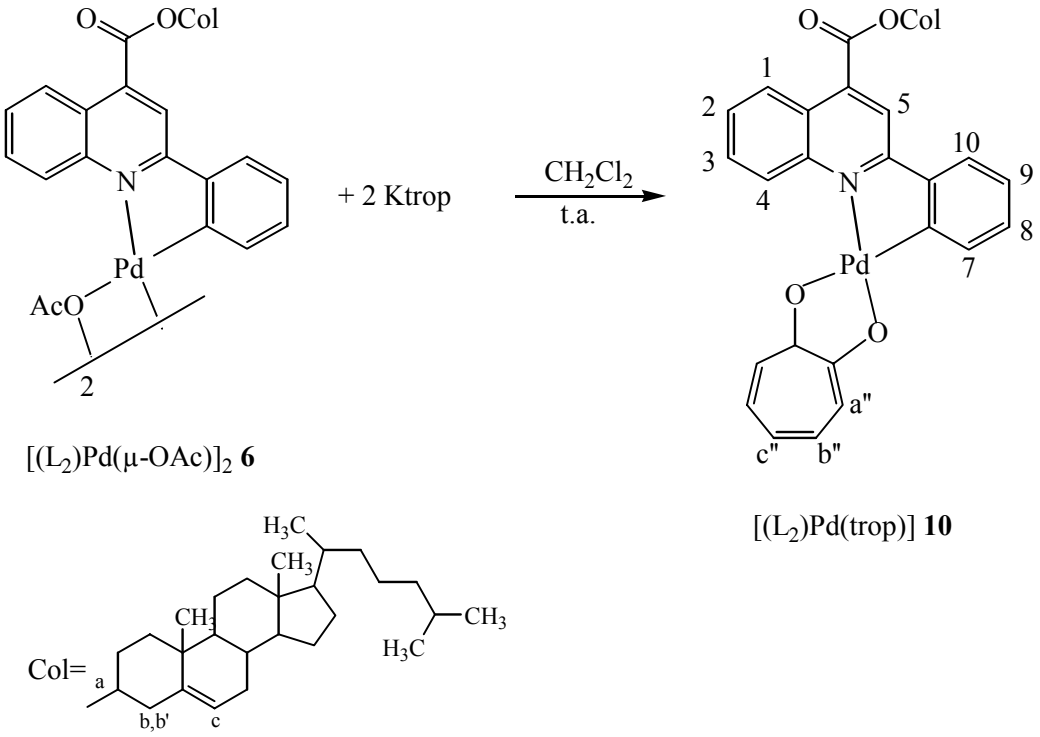


Figura III.17

Il pattern di diffrazione dei raggi X del complesso **9**, con un parametro di cella *a* di 44.7 Å è tipico di un reticolo esagonale bidimensionale. Nella regione ad ampio angolo, un largo halo è centrato a 4.6 Å e corrisponde alle interazioni liquido cristalline delle catene alifatiche.

III.4.6 Complesso mononucleare [(L_2)Pd(trop)], 10

Il tropolonato di potassio è stato aggiunto ad una soluzione del complesso binucleare [(L_2)Pd(μ-OAc)]$_2$ **7** in diclorometano, ottenendo un prodotto giallo, precipitato dalla soluzione che è stata agitata per alcuni giorni a temperatura ambiente (schema III.14).



$[(L_2)Pd(\mu\text{-}OAc)]_2$ **6**

$[(L_2)Pd(trop)]$ **10**

Schema III.14

La caratterizzazione del complesso **10** attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari ha confermato la coordinazione di una molecola di tropolone al frammento ciclopalladato della 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina, quindi la formazione di un complesso ciclopalladato mononucleare.

L'evidenza, nello spettro IR della banda di vibrazione di stretching C=O a 1592 cm^{-1} e di C=C a 1544 cm^{-1} indica la presenza del sistema aromatico del tropolone. Inoltre si osserva lo spostamento della banda di vibrazione di stretching C=O della 2-fenilchinolina da 1727 cm^{-1} a 1721 cm^{-1}. La formazione del complesso **10** risulta evidente anche dall'analisi dello spettro ^{1}H NMR, in cui si osserva la presenza dei segnali dei protoni aromatici del tropolone e lo spostamento verso valori più alti di δ dei protoni aromatici della 2-fenilchinolina.

I risultati delle analisi elementari si sono trovati in accordo con la stechiometria del complesso del tropolone ottenuto.

La scarsa solubilità del complesso **10** non ha consentito di effettuare le misure di citotossicità al fine di stabilire un'eventuale attività antitumorale.

L'introduzione del tropolone al posto della curcumina sul frammento ciclopalladato della 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina ha determinato un cambiamento della forma della molecola che si è tradotto con un arrangiamento molecolare più disordinato, quindi nella perdita dell'ordine lamellare. Una testura "schlieren" è stata osservata al microscopio in luce polarizzata, indice di una mesofase, con l'analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC) è stata confermata stabile tra 135°C e 270°C (figura III.18).

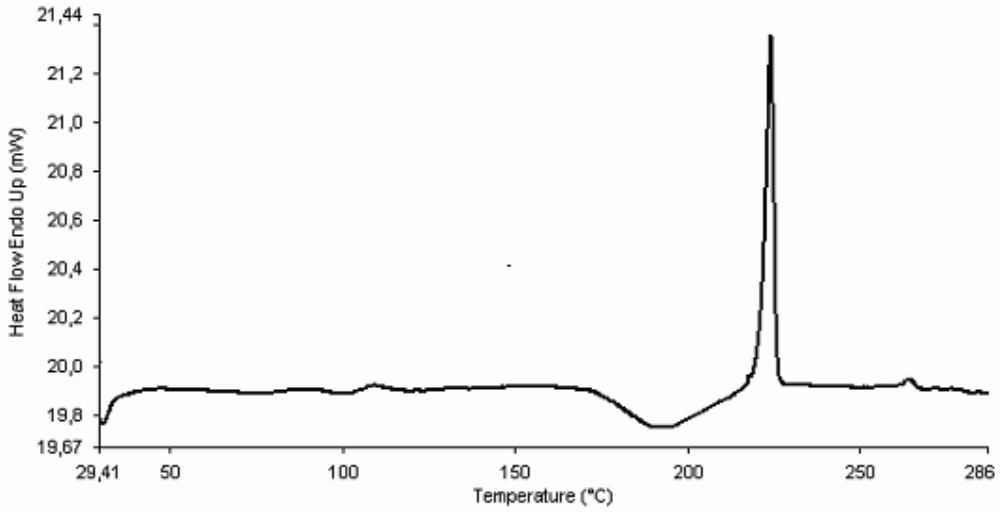


Figura III.18

Tale mesofase è stata identificata dal pattern di diffrazione a raggi X (PXRD) come fase colesterica caratterizzata da un picco largo centrato a $2\theta \approx 20°$ (figura III.19).

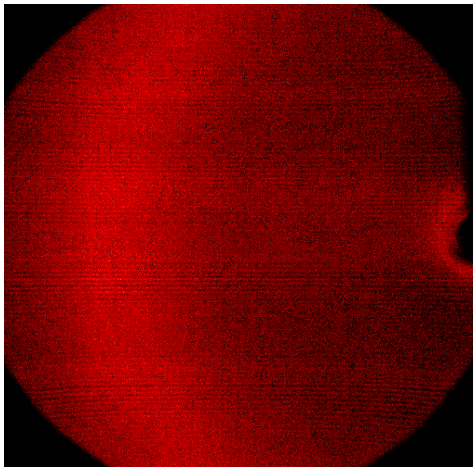
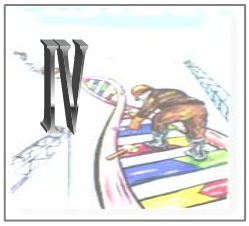


Figura III.19



SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COMPLESSI IONICI DI Pd(II) e Pt(II)

La seconda parte del lavoro riguarda la progettazione e la sintesi di complessi ionici di diversi metalli. Per ottenere complessi ionici il frammento ciclopalladato è stato sostituito con un legante coordinante bidentato azotato, una bipiridina disostituita in posizione 4,4' con catene alifatiche di varia natura, a partire dalla quale sono stati sintetizzati complessi ionici di Pd(II) e Pt(II).

Sulla base dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione biologica dei complessi ciclopalladati mononucleari bifunzionali della curcumina si può affermare, che il principale limite di potenziali farmaci contenenti il metallo stia proprio nella caratterizzazione biologica *in vitro* prima che *in vivo*, ovvero nella difficoltà di portare in soluzione i composti nel mezzo biologico in cui viene testata l'attività. Questo è dovuto alla scarsa solubilità dei composti metallici in ambiente acquoso, che impedisce di lavorare con i composti su una larga scala di cellule.

Pertanto l'obiettivo di ottenere complessi metallici ionici coincide anche con quello di ottenere complessi metallici più solubili, anche perché questi tipi di complessi potrebbero, oltre che aumentare la solubilità, aumentare l'affinità di legame per il DNA, essendo il catione attratto dal polimero carico negativamente.

IV.1 Complessi ionici di Pd(II) contenenti leganti O,O chelanti della famiglia dei curcuminoidi

I complessi di Pd(II) contenenti come leganti O,O chelanti i derivati curcuminoidi contengono come legante che completa la sfera di coordinazione del metallo la 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina, un legante commerciale.

La bipiridina è stata scelta in quanto legante versatile, quindi in grado di coordinare una varietà di ioni metallici, e per la sua struttura chimica da "minimal intercalator" del DNA. In particolare la 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina è stata scelta in quanto solubile in numerosi solventi organici.

La 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina è stata scelta per sintetizzare i complessi ionici contenenti leganti O,O chelanti della famiglia dei curcuminoidi, cioè la curcumina e un derivato della curcumina in cui sono stati funzionalizzati i gruppi idrossilici con l'introduzione di gruppi glicosilici, per aumentare la solubilità del sistema inorganico risultante.

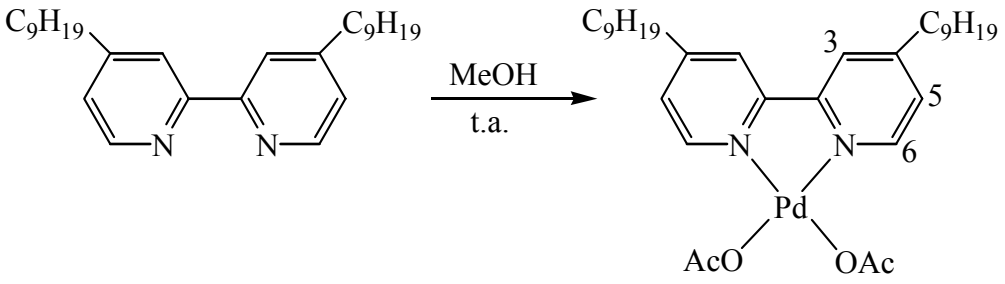
Non è stato semplice mettere a punto la giusta strategia di sintesi per ottenere il complesso ionico della curcumina. Infatti molti sono stati i tentativi di sintesi per ottenere la coordinazione della curcumina al frammento metallico della bipiridina. non essendo questo legante β-dichetonico un ottimo nucleofilo.

D'altra parte, come è stato detto e ribadito, non è semplice aumentare la nucleofilicità della curcumina considerata l'alta suscettibilità alla degradazione della struttura in condizioni neutro-basiche. Allora, utilizzando l'esperienza acquisita sulla sintesi dei precedenti complessi della curcumina, pur considerando la differente reattività dei sistemi precursori, si è pensato di sfruttare anche in questo caso la driving force dell'anione acetato che favorire l'estrazione del protone enolico e la coordinazione della curcumina.

IV.1.1 Complesso $[(L_3)Pd(OAc)_2]$, 10

Il complesso $[(L_3)Pd(OAc)_2]$ **11**, rappresenta infatti il precursore metallico del complesso ionico della curcumina ed è stato ottenuto facilmente per aggiunta del palladio(II)acetato ad una soluzione di 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina in metanolo.

Questa soluzione, dopo 24 h di agitazione a temperatura ambiente, ha fornito il prodotto che è stato purificato e caratterizzato (schema IV.1).



$[(L_3)Pd(OAc)_2]$ **11**

Schema IV.1

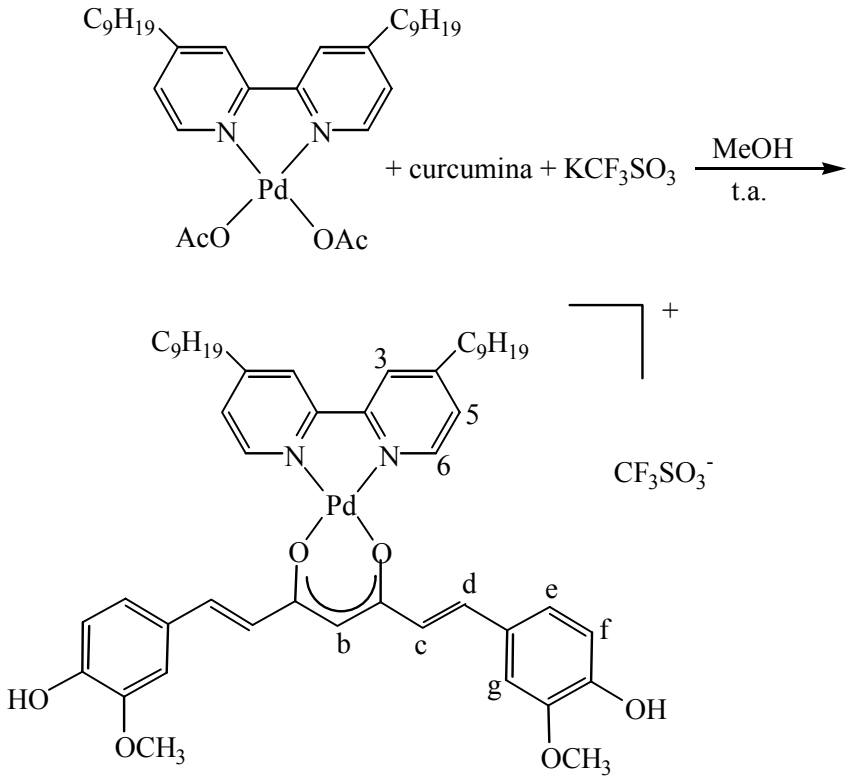
La caratterizzazione attraverso spettroscopia IR e ^{1}H NMR e analisi elementari hanno confermato la formazione del complesso **11**, ottenuto con una resa del 80%. In particolare, nello spettro IR si possono osservare le bande a 1359 cm^{-1} e a 1630 cm^{-1}, relative rispettivamente allo stretching asimmetrico e simmetrico di CO_2 del gruppo acetato.

Anche lo spettro ^{1}H NMR rivela la presenza dei gruppi acetati coordinati, in quanto si può osservare a 2.12 ppm il singoletto dei sei protoni dei gruppi acetati.

I risultati delle analisi elementari sono in accordo con i valori teorici calcolati per la stechiometria di questo complesso.

IV.1.2 Complesso $[(L_3)Pd(curcumina)]CF_3SO_3$, 12

Il complesso $[(L_3)Pd(OAc)_2]$ **11**, è stato solubilizzato in metanolo, e a questa soluzione è stato aggiunto un equivalente di triflato di potassio, quindi la curcumina. Dopo 24 h di agitazione della soluzione a temperatura ambiente il prodotto è stato isolato dal solvente di reazione, è stato solubilizzato in cloroformio e ricristallizzato da etere di petrolio. Il complesso puro è stato ottenuto con una resa del 70%, che è stato poi caratterizzato mediante spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari (schema IV.2).



[(L_3)Pd(curcumina)]CF_3SO_3 **12**

Schema IV.2

I dati ottenuti dalla spettroscopia IR rivelano la presenza di una banda a 1620 cm^{-1} e di una banda a 1509 cm^{-1}, attribuibili alle vibrazioni di stretching rispettivamente simmetrico di C=O e asimmetrico di C-C-C dell'anello chelato della curcumina. Inoltre la presenza della banda di vibrazione di stretching a 1277 cm^{-1} relativa allo ione triflato conferma la natura ionica del complesso.

La complessazione della curcumina risulta evidente anche dallo spettro ^1H NMR per l'assenza del segnale relativo al protone enolico. Inoltre si osserva uno spostamento dei protoni $H_{6,6'}$ e $H_{5,5'}$ verso valori più alti di δ (Δδ= 0.2 ppm) e uno spostamento dei protoni $H_{3,3'}$ verso valori più bassi di δ.

Infine i risultati delle analisi elementari concordano con i valori teorici calcolati per la stechiometria di questo complesso.

Prendendo in considerazione i solventi compatibili con i mezzi biologici, si può affermare, come si sperava, che il complesso **12** oltre che in DMSO, ha una buona solubilità in metanolo e in etanolo. Pertanto, allo scopo di studiare le proprietà citotossiche di questo complesso è stato opportuno verificare preliminarmente la sua stabilità in ambiente acquoso mimando le condizioni fisiologiche.

Il complesso **12** è stato solubilizzato in etanolo ottenendo una concentrazione di 1 x 10^{-4} M e diluito in soluzione acquosa tamponata (pH 7.2) con una concentrazione finale di 1 x 10^{-6} M e in cui la concentrazione dell'etanolo non risulta essere superiore al 5% (v/v). Lo spettro di assorbimento del complesso **12** è stato messo con quello della curcumina registrato nelle stesse condizioni (figura IV.1).

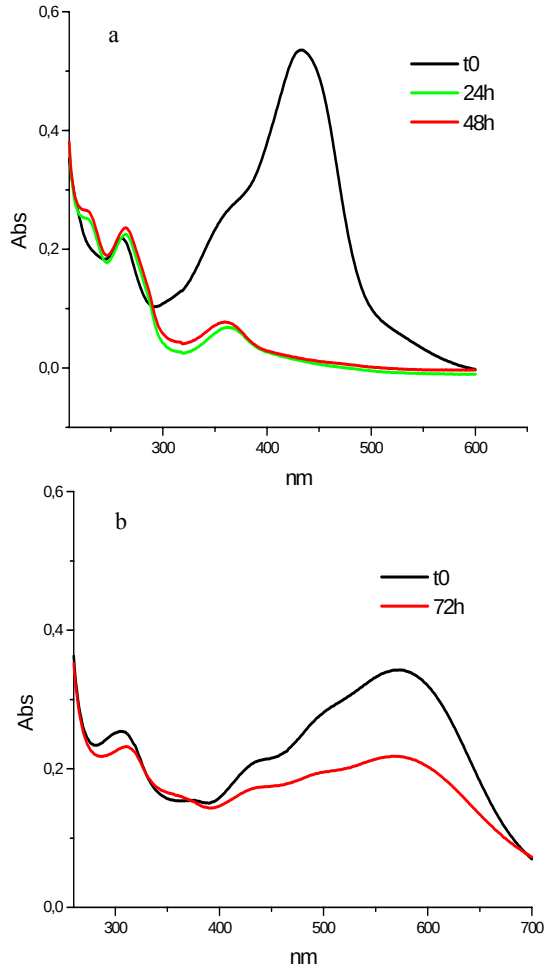


Figura IV.1 Spettri UV/vis della curcumina (a) e del complesso 12 a pH 7.2

Si può osservare che, mentre la curcumina già dopo 24 h decompone, come si può riscontrare dalla scomparsa del picco a 427 nm, il complesso **12** si mantiene stabile anche dopo 72 h.

IV.1.3 Proprietà citotossiche *in vitro* [(L_3)Pd(curcumina)]CF_3SO_3, 12

Lo studio delle proprietà citotossiche del complesso **12** è stato effettuato, come per il complesso [(L_2)Pd(curcumina)], **8** sulle linee cellulari prostatiche umane, DU 145 e LNCaP ed è avvenuto sulle due linee in modo parallelo. Le cellule sono state trattate con una soluzione concentrata del complesso in etanolo con concentrazioni finali, ovvero nel terreno di coltura, comprese tra 1.5 e 100 μM. Nelle stesse condizioni è stato possibile effettuare lo studio di citotossicità del complesso precursore [(L_3)Pd($OAc)_2$] **11**, e della 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina o $\mathbf{L_3}$, in quanto sono anch'essi solubili in etanolo. Dopo 72 h di continua esposizione delle cellule al legante e ai complessi è stata misurata la sopravvivenza cellulare attraverso saggio colorimetrico dell'MTS.
Dall'elaborazione dei dati si ottengono i grafici in cui viene riportata la citotossicità in parallelo sulle due linee cellulari del legante (figura IV.2a), del precursore (figura IV.2b) e del complesso (figura IV.2c)

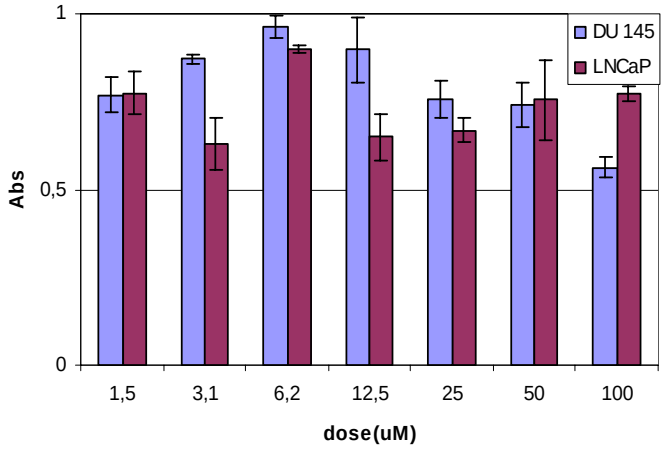


Figura IV.2a Istogramma di citotossicità del legante

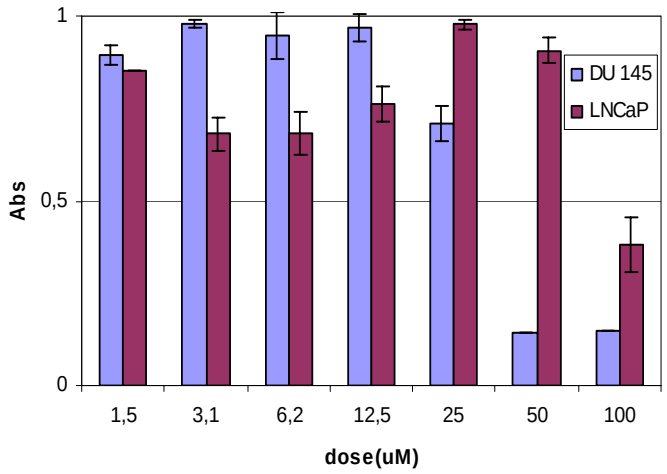


Figura IV.2b Istogramma di citotossicità del complesso 11

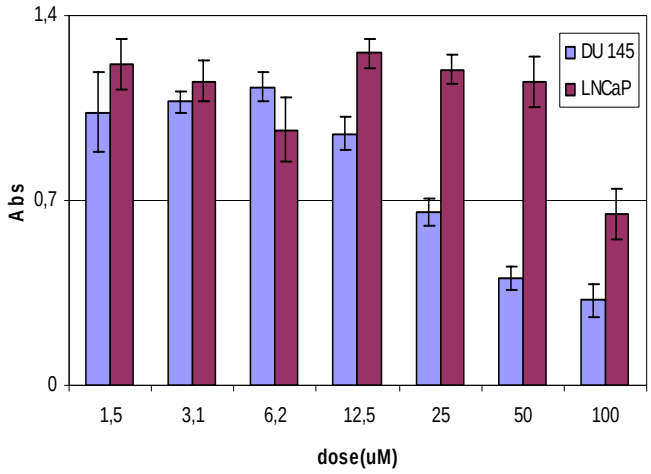


Figura IV.2c Istogramma di citotossicità del complesso 12

Come si può osservare dai grafici, la bipiridina da sola non ha attività se non a 100 µM nelle DU 145, ma a tale concentrazione l'attività è irrilevante.

Passando dal legante al complesso $[(L_3)Pd(OAc)_2]$ **11**, l'attività aumenta ma solo nelle DU 145 con un IC_{50} compreso tra 25 e 50 μM.

Infine si può osservare che passando dal precursore al complesso ionico della curcumina l'attività aumenta ancora, sempre nelle DU 145, con un IC_{50} compreso tra 12.5 e 25 μM.

Facendo uno studio di relazione struttura-attività si può affermare, in virtù di questi risultati, che il sistema bipiridinico da solo non produce attività, mentre la presenza del metallo aumenta l'attività anche se non di molto. Infine, con la presenza della curcumina l'attività aumenta ancora. Questo aumento graduale dell'attività che si riscontra, costruendo a poco a poco il complesso finale, indica che l'unità bipiridinica, il metallo e la curcumina, unitamente alla natura ionica del complesso funzionano come elementi addizionali dell'attività.

D'altra parte è interessante notare che nelle cellule LNCaP l'attività rimane pressocchè invariata, ovvero irrilevante sia quando le cellule vengono trattate con il legante che quando vengono trattate con il complesso precursore **11** e il complesso finale **12**. Questo significa che la presenza della GSTπ, potrebbe risultare vantaggiosa per la selettività d'azione della molecola, essendo espressa solo nella linea cellulare DU 145 e non in quella LNCaP.

IV.1.4 Studio dell'attività apoptotica del complesso $[(L_3)Pd(curcumina)]CF_3SO_3$, 12

Per comprendere allora il meccanismo di citotossicità è stata innanzitutto seguita l'inibizione della crescita nel tempo delle cellule DU 145 trattate con il complesso **12** e la curcumina, in concentrazioni pari al corrispettivo IC_{50} (figura IV.3). Rispetto alle cellule non trattate e alla bipiridina, utilizzate come controllo, il complesso anche dopo 4 giorni mostra un'inibizione del 55% a differenza della curcumina che mantiene una inibizione del 50% fino al terzo giorno, dopodiché la crescita riprende.

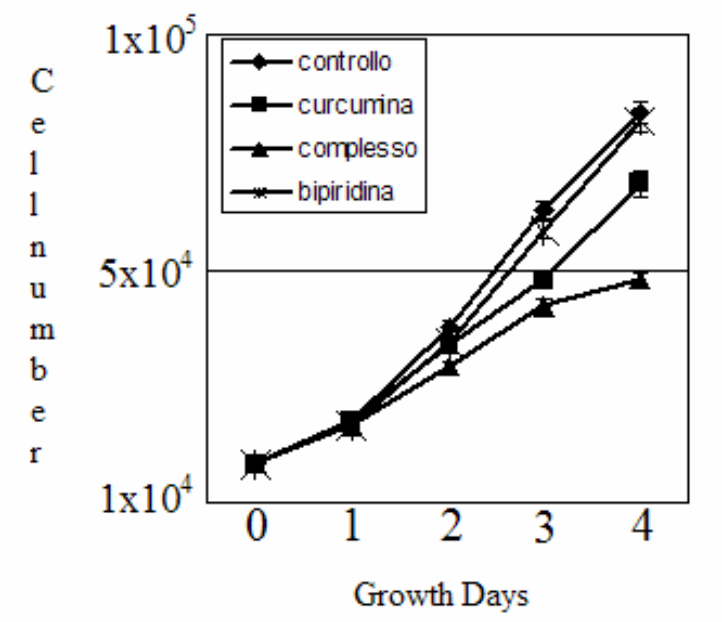


Figura IV.3 Curva di crescita delle cellule DU 145 trattate con il complesso 11 e la curcumina

Per comprendere questa differente attività sulle cellule DU 145 da parte del complesso **11** e della curcumina libera, è stata studiata l'attività ossidante e l'induzione all'apoptosi, quest'ultima rilevata attraverso l'analisi del ciclo cellulare.

Per "ciclo cellulare" si intende la sequenza di eventi che scandiscono il ciclo vitale di una cellula, dalla mitosi della cellula 'madre' che la origina alla sua mitosi. In questo periodo, che nelle linee cellulari stabilizzate è di circa 24 ore, i ricercatori hanno definito quattro fasi principali: la fase G1, dove le cellule sintetizzano fattori indispensabili alla crescita, ma la replicazione del DNA non è ancora iniziata; la fase S o di sintesi dove appunto viene sintetizzato il DNA, la fase G2 , dove la cellula si prepara alla mitosi cellulare e la fase M o mitosi dove da una cellula madre si formano due cellule figlie.

I farmaci antitumorali hanno molteplici attività nelle diverse fasi del ciclo cellulare: la sequenza di eventi all'interno di una fase del ciclo cellulare può venire rallentata, per esempio in fase S, oppure le cellule possono subire un vero e proprio blocco in punti

specifici nelle fasi G1 o G2. Cellule bloccate possono poi "riparare" il danno indotto dal farmaco e rientrare in ciclo oppure possono andare incontro a morte.

Le cellule in coltura sono state incubate parallelamente con il complesso **11** e con la curcumina in corrispondenza del corrispettivo IC_{50}, rilevato attraverso il saggio di citotossicità, e ai tempi prescelti per lo studio (48 e 72 h) le cellule sono state staccate secondo opportune procedure, contate, e fissate in etanolo freddo 80%.

A questo punto le cellule fissate sono state lavate in PBS (tampone fosfato) per rimuovere il fissativo e marcate con Ioduro di Propidio e RNAsi. Lo ioduro di propidio si intercala in modo stechiometrico tra le coppie di basi del DNA in doppia elica. Una volta intercalato, lo Ioduro di Propidio emette fluorescenza rossa, di intensità proporzionale alla quantità di DNA presente. Le cellule sono state tenute a temperatura ambiente per 45 min e successivamente a 4°C fino all' analisi mediante citofluorimetria a flusso.

La citofluorimetria a flusso è una tecnica sviluppatasi in modo importante negli ultimi anni, che permette lo studio e la caratterizzazione di popolazioni cellulari derivanti da materali biologici come il sangue o da colture primarie nonchè, come in questo caso, da linee stabilizzate *in vitro*. Essa consente in particolare, l'analisi quantitativa del contenuto di DNA e la discriminazione di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. La procedura prevede tre diverse fasi: la marcatura del DNA, come è stato descritto, l'analisi citometrica e l'analisi dell'istogramma del DNA.

Nell'analisi citofluorimetrica la sospensione cellulare viene aspirata attraverso un sistema campionatore e le cellule vengono trasportate, mediante un flusso di soluzione fisiologica a regime laminare, e convogliate in una cuvetta in quarzo una alla volta, ben separate ed allineate, ad intercettare un fascio di un laser di eccitazione (laser ad Argon, 488nm). Quando le cellule marcate con Ioduro di Propidio attraversano il fascio laser, emettono un segnale di luce diffusa ed un segnale di fluorescenza rossa che viene raccolta a 90° rispetto al laser incidente che eccita il colorante. Tale radiazione viene separata da una serie di opportuni filtri ottici che selezionano il range di emissione della fluorescenza (590-700nm).

Il segnale di fluorescenza così selezionato viene rilevato da un fotomoltiplicatore. Così il citofluorimetro raccoglie gli impulsi elettrici equivalenti agli impulsi di fluorescenza emessi da una cellula nell'attraversamento (un tempo molto piccolo, 2 ms) del fascio laser in una scala arbitraria di intensità di fluorescenza.

Il citofluorimetro acquisisce in ogni sessione di lavoro di ogni campione un numero elevato di eventi (cellule marcate) dell'ordine delle migliaia; garantendo un'elevata validità statistica del campionamento. Il risultato è una distribuzione statistica del numero di cellule chiamata 'istogramma di DNA'.

L'istogramma di DNA consente una quantificazione della percentuale di cellule in una data fase del ciclo cellulare, sfruttando il diverso contenuto di DNA delle cellule nelle fasi G1, S, G2/M. L'analisi viene effettuata con l'ausilio di un software che permette di dividere l'insieme dei segnali in tre parti fondamentali : due gaussiane, G1 **e** G2 / M, **e** una intermedia, di forma rettangolare o trapezoidale, costituente la fase S, fornendo le percentuali di cellule nelle diverse fasi (%G1 , %S , %G2/M). Inoltre viene rilevata una quarta parte, a sinistra di G1 che fornisce la percentuale delle cellule morte per apoptosi. In questo caso, volendo studiare l'apoptosi è stata calcolata la percentuale della morte apoptotica, come si vede dall'analisi degli istogrammi nella figura IV.4 che si riferiscono rispettivamente allo studio sulle cellule DU 145 trattate con il complesso **11** e con la curcumina in riferimento ai controlli, cioè alle cellule non trattate.

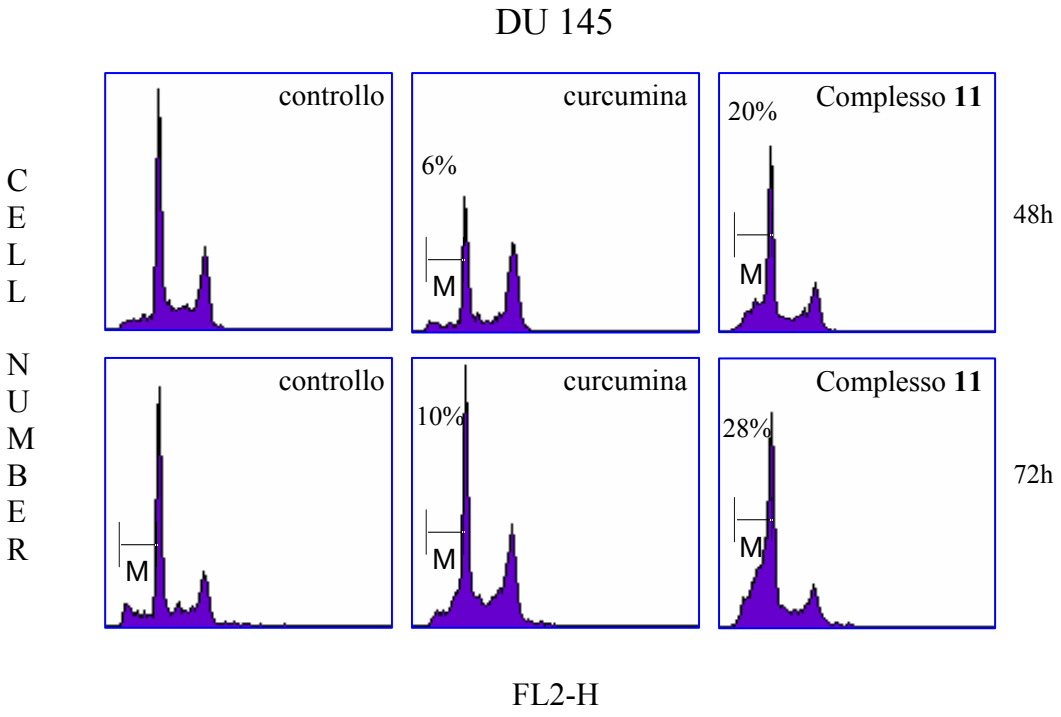


Figura IV.4 Analisi del ciclo cellulare del complesso 11 e della curcumina sulle cellule DU 145

Come si vede dagli istogrammi del DNA, la percentuale di morte apoptotica nelle DU 145 è del 6% per quanto riguarda la curcumina rispetto invece al complesso che è del 20%, dopo 48 h di trattamento. Dopo 72 h d'incubazione si ha un aumento della morte apoptotica, sempre nelle DU 145, fino al 10% per la curcumina e fino al 28 % per il complesso **11**.

Questi numeri indicano che, anche se la curcumina ha un IC_{50} più basso, cioè necessitano concentrazioni più basse per inibire la proliferazione, il complesso **11** induce apoptosi a differenza della curcumina che arresta la crescita cellulare nella fase G2 del ciclo cellulare mentre determina solo un 10% di apoptosi dopo 72 h di trattamento.

Per capire in che modo il complesso induce le cullule all'apoptosi è stata analizzata l'attivazione della caspasi 3 e si è visto, come mostra la figura IV.5, che questo enzima è più attivo nel complesso che nella curcumina.

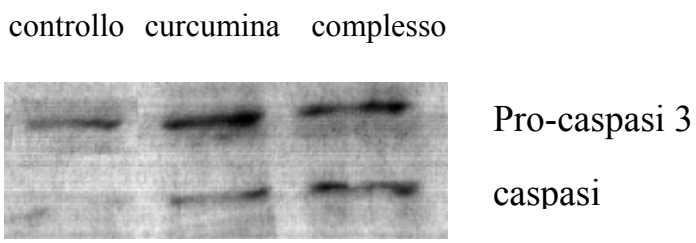


Figura IV.5 Attività dell'enzima caspasi nel complesso 11 e nella curcumina

L'attività dell'enzima caspasi indica l'attivazione del complesso meccanismo dell'apoptosi che avviene da parte del complesso **11** mentre rafforza il dato del semplice rallentamento della crescita da parte della curcumina.

Per stimare l'attività ossidante nelle cellule trattate, al fine di stabilire una correlazione con la tossicità del complesso, è stata investigata la produzione di specie reattive dell'ossigeno o ROS (figura IV.6).

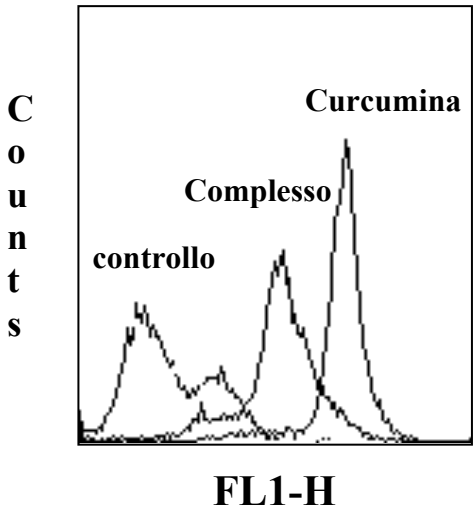


Figura IV.6 Monitoraggio della produzione di ROS da parte del complesso 11 e della curcumina

La misura è stata effettuata, come per l'attività dell'enzima caspasi, trattando le cellule con la curcumina e con il complesso in corrispondenza del proprio IC_{50} e come si vede dalla figura III.24 la curcumina alla concentrazione di 3 μM produce dopo 18 h d'incubazione il doppio di radicali liberi rispetto al complesso presente nelle cellule alla concentrazione di 25 μM.

Attraverso HPLC è stata analizzata la concentrazione di glutatione o GSH nelle cellule DU 145 trattate rispettivamente con il complesso e con la curcumina (figura IV.7).

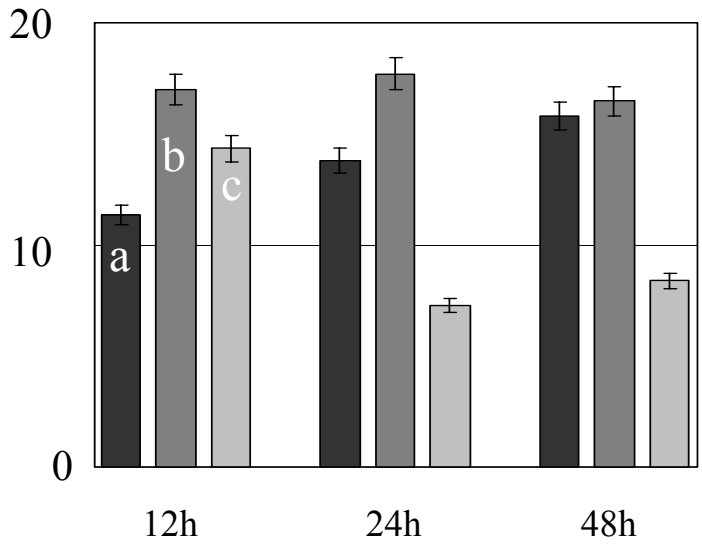


Figura IV.7 Quantità di GSH monitorato nelle cellule trattate con curc (b) e complesso (c) rispetto al controllo (a)

Come si vede dall'istogramma, la quantità di GSH rilevata nelle cellule DU 145 ed espressa come nmolGSH/mg proteine, è il doppio nelle cellule trattate con la curcumina rispetto al complesso già dopo 24 h e si mantiene tale fino a 48 h di trattamento.

In parallelo è stata verificata l'attività dell'enzima glutatione S-transferasi o GSTπ che è l'enzima che viene associato con la resistenza acquisita dai farmaci in quanto catalizza la coniugazione al glutatione dei farmaci come prodotti di detossificazione (figura IV.8).

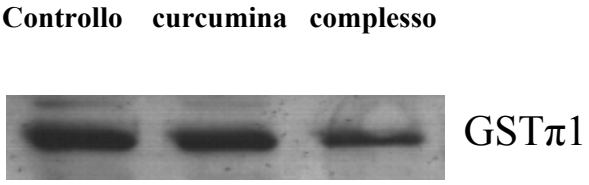


Figura IV.8 Attività dell'enzima GSTπ1 in cellule trattate con curcumina e complesso

Come si può osservare dalla figura, mentre le cellule trattate con la curcumina overesprimono questo enzima, quelle trattate con il complesso mostrano un'inibizione della sua attività.

È stata verificata poi l'attività della una protein chinasi stress-attivata (SAPK), una proteina facente parte di una famiglia di proteine che possono essere attivate in risposta a stimoli pro o antiapoptotici (figura IV.9).

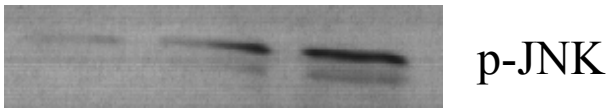


Figura IV.9 Attività della proteina JNK in cellule trattate con curcumina e complesso

Come si vede dalla figura le cellule trattate con il complesso mostrano un'aumentata attività della fosforilazione di c-Jun al *trans*-dominio di attivazione da parte della proteina JNK, confermando che vi è la fosforilazione del fattore di trascrizione inducibile che regola la trascrizione di alcuni geni implicati nell'apoptosi.

D'altra parte evidenze sperimentali confermano che l'enzima GSTπ1 risulta implicato nella regolazione dell'apoptosi attraverso una sua diretta interazione con la proteina JNK. Questo complesso formato da GSTπ1 e JNK determina un'inibizione dell'attività della proteina JNK proteggendo le cellule dall'apoptosi [67].

Questo è in linea con i risultati sperimentali in questione, ovvero nelle cellule trattate con la curcumina vi è un'overespressione dell'enzima GSTπ1 che, interagendo con la JNK inibisce la sua attività proteggendo le cellule dall'apoptosi. Viceversa, anche se nelle cellule trattate con il complesso la produzione di specie reattive dell'ossigeno è minima, riesce comunque a depletare le cellule di glutatione, ad inibire l'attività dell'enzima GSTπ1, permettendo alla proteina JNK di svolgere la sua attività, ovvero d'innescare il meccanismo apoptotico. D'altra parte un'inibizione dell'attività dell'enzima GSTπ1 significa superare il problema della resistenza acquisita, che si verifica come conseguenza dell'overespressione di questo enzima.

L'attività della proteina JNK è correlata anche con le proteine Bcl-2 o Bcl-XL la cui attivazione può innescare oppure no il meccanismo apoptotico. A seconda della prevalenza di fattori apoptotici o antiapoptotici viene regolata l'attività della proteina Bcl-2 che è antiapoptotica e della Bax è proapoptotica. Se viene innescata l'apoptosi queste proteine interagiscono con le membrane nucleari, mitocondriale esterna e del reticolo endoplasmatico determinando l'apertura di un complesso poliproteico chiamato poro di transizione mitocondriale. L'apertura del poro fa cadere la differenza di potenziale, per uscita dei protoni, il mitocondrio si riempie di liquido, la membrana esterna scoppia e si ha rilascio nel citoplasma di citocromo c che è il primo attivatore dell'apoptosi e di altre proteine proapoptotiche.

Così è stata valutata l'espressione di queste proteine implicate in questo meccanismo rilevando che nelle cellule trattate con il complesso la proteina Bcl-2 che è antiapoptotica viene down-regolata mentre la proteina Bax che è proapoptotica viene up-regolata, a differenza della curcumina che non influenza l'attività di queste proteine in nessun modo (figura IV.10).

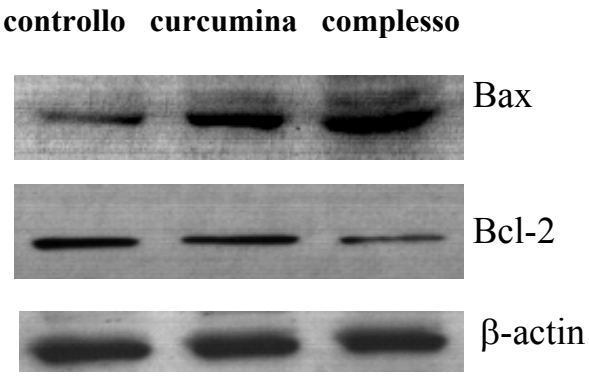


Figura IV.10 Attività delle proteine Bax e Bcl-2 in cellule trattate con curcumina e complesso

Come conseguenza dell'attività di queste proteine, quindi come primo evento dell'induzione del processo apoptotico, si ha la perdita di potenziale della membrana interna mitocondriale che è stata rilevata mediante un test del gradiente elettrochimico. Questo viene valutato mediante uptake nei mitocondri di un colorante fluorescente, carbocianina JC-1 ed avviene nelle cellule normali mostrando fluorescenza, mentre in quelle apoptotiche il colorante rimane nel citosol (figura IV.11).

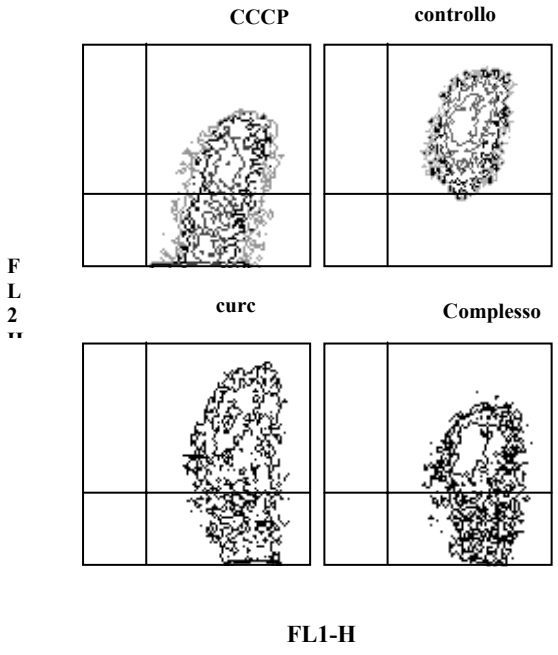


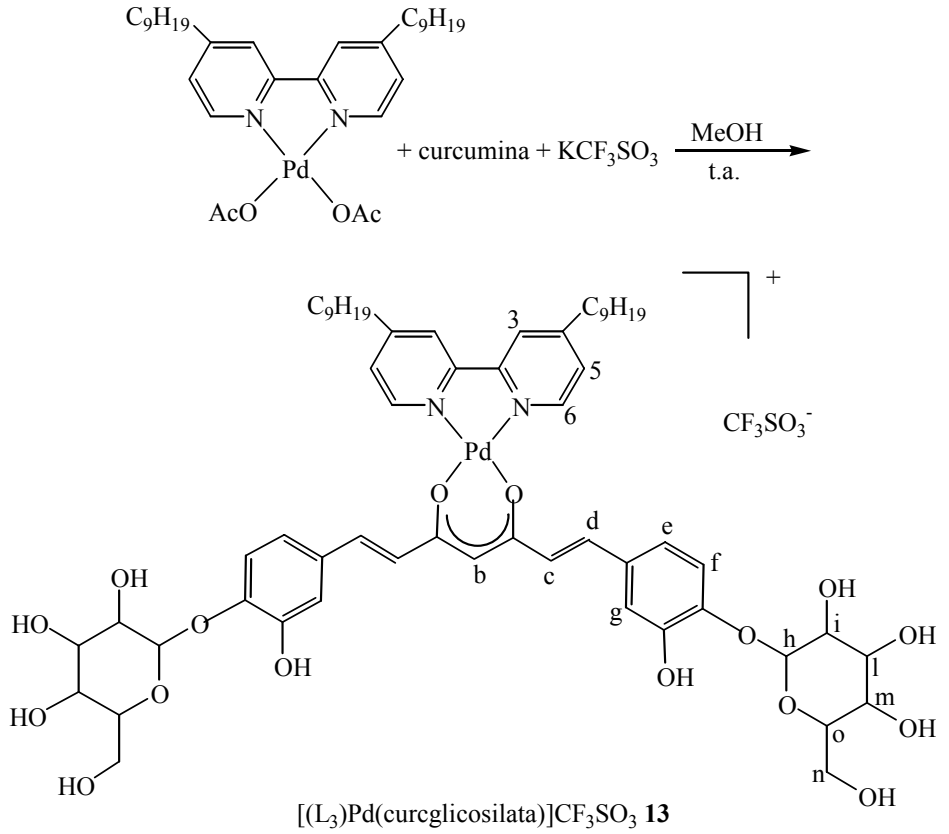
Figura IV.11 Valutazione della depolarizzazione della membrana mitocondriale nelle cellule trattate con la curcumina e con il complesso

Come ci si aspettava, questi risultati sono in linea con i precedenti, ovvero la depolarizzazione della membrana mitocondriale osservata nelle cellule trattate con il complesso è causata all'innescamento del processo apoptotico da parte della proteina Bcl-2 e della proteina Bax.

Riassumendo, tutti questi studi dimostrano che a differenza della curcumina che determina solo un rallentamento della crescita delle cellule DU 145, la citotossicità del complesso avviene in maniera selettiva, ovvero attraverso l'induzione all'apoptosi. Quest'ultima viene innescata sia attivando segnali (JNK) che a loro volta attivano i fattori (c-Jun) che regolano la trascrizione di geni implicati nell'apoptosi, sia modulando l'espressione di segnali di morte cellulare (Bcl-2 e Bax) che inducono depolarizzazione della membrana del mitocondrio che funziona come amplificatore del segnale di morte cellulare.

IV.1.5 Complesso $[(L_3)Pd(\textit{curcglicosilata})]CF_3SO_3$, 13

Utilizzando il complesso $[(L_3)Pd(OAc)_2]$ **11**, è stato sintetizzato un secondo complesso ionico del Pd(II) contenente un derivato della curcumina, la curcumina glicosilata, sintetizzata nel laboratorio di chimica dell'Università di Modena, dal gruppo di ricerca della dott.ssa Ferrari. Il complesso $[(L_3)Pd(OAc)_2]$ **11** è stato solubilizzato in metanolo, e a questa soluzione è stato aggiunto un equivalente di triflato di potassio, quindi la curcumina. Dopo 24 h di agitazione della soluzione a temperatura ambiente il prodotto è stato allontanato dal solvente di reazione, ripreso da cloroformio in cui il prodotto non si è sciolto e lavato e asciugato. Il prodotto puro è stato ottenuto con una resa del 75%, che è stato poi caratterizzato mediante spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari (schema IV.3).



[(L_3)Pd(curcglicosilata)]CF_3SO_3 **13**

Schema IV.3

Nello spettro IR sono rilevabili le bande a 1618 cm^{-1} e a 1508 cm^{-1}, attribuibili alle vibrazioni di stretching rispettivamente simmetrico di C=O e asimmetrico di C-C-C dell'anello chelato della curcumina. Inoltre la presenza della banda di vibrazione di stretching a 1265 cm^{-1} relativa allo ione triflato conferma la natura ionica del complesso.

L'avvenuta complessazione della curcumina è risultata evidente dallo spettro ^1H NMR per l'assenza del segnale relativo al protone enolico. Inoltre si osserva uno spostamento dei protoni $H_{6,6'}$ e $H_{5,5'}$ verso valori più alti di δ (Δδ= 0.4 ppm) e uno spostamento dei protoni $H_{3,3'}$ verso valori più bassi di δ. Infine i risultati delle analisi elementari concordano con i valori teorici calcolati per la stechiometria di questo complesso.

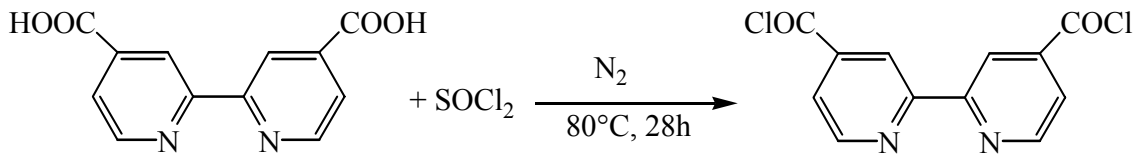
Il complesso testato sulla linea DU 145 mostrato attività ad alte concentrazioni.

IV.2 Complessi ionici di Pd(II) e Pt(II) contenente il legante O,O chelante tropolone

Come è stato descritto, è stato possibile ottenere complessi ionici di Pd(II) contenenti leganti curcuminoidi, seppur è stato difficile mettere a punto la giusta strategia di sintesi, ma non è stato possibile, nonostante i tentativi, ottenere la coordinazione del Pt(II) a questi tipi di leganti.
È stato possibile ottenere invece, attraverso una strategia totalmente differente rispetto a quella utilizzata per i complessi dei curcuminoidi, complessi isostrutturali di Pd(II) e Pt(II) contenenti come legante O,O chelante il tropolone. Questo è stato possibile perché, come è stato detto, la capacità coordinativa del tropolone è stata favorita dalla possibilità di ottenerne la deprotonazione, attraverso la formazione del suo sale.
Si è voluto funzionalizzare anche la bipiridina nel tentativo di migliorare l'attività del frammento bipiridinico. A questo scopo si è ottenuta la diesterificazione del diacido carbossilico della 2,2'-bipiridina con una catena alchilica a sedici atomi di carbonio.

IV.2.1 4,4'-Esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, L_4

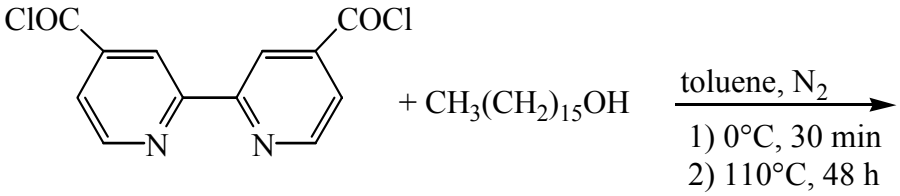
La funzionalizzazione è avvenuta utilizzando il diacido della 2,2'-bipiridina che viene fatto reagire con un eccesso di cloruro di tionile, ottenendo come prodotto intermedio, quindi del primo step della reazione, il più reattivo corrispondente dicloruro (schema IV.4).

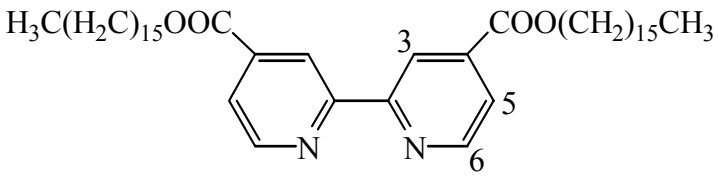


Schema IV.4

La formazione del dicloruro è stata verificata attraverso spettroscopia IR, i cui dati dimostrano uno spostamento della banda relativa allo stretching (C=O) a frequenze più alte.

Il prodotto desiderato ovvero il diestere si ottiene nel secondo step della reazione, in cui il dicloruro viene fatto reagire con un eccesso di alcol esadecilico (schema IV.5). Quindi il prodotto, ottenuto con una resa dell'80% è stato isolato, purificato e caratterizzato.





4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, **L_4**

Schema IV.5

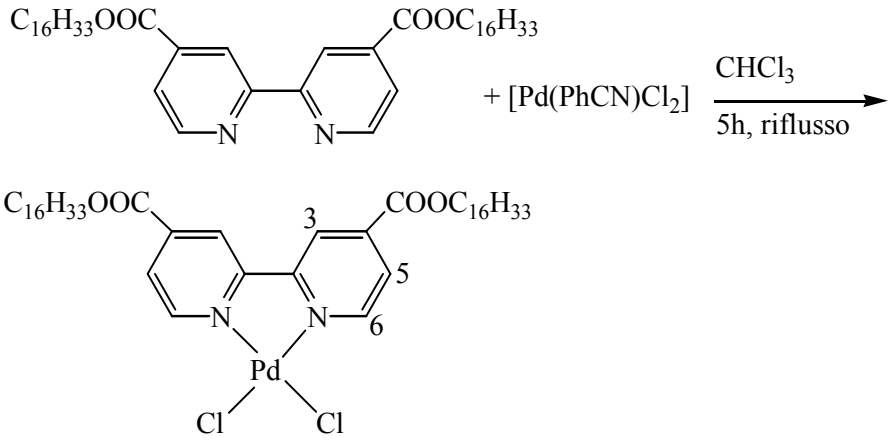
I dati spettrali IR dimostrano la formazione del diestere per la comparsa delle bande tra 2849 cm^{-1} e 2952 cm^{-1} relative allo stretching (C-H), indice della presenza di catene alifatiche, e per lo spostamento della banda relativa allo stretching (C=O) a frequenze più basse rispetto a quelle del cloruro dell'acido.

Anche dai dati spettrali ^1H NMR si evince la formazione della bipiridina funzionalizzata per la presenza dei segnali relativi ai protoni delle catene alifatiche nella zona di bassi valori di δ, che confermano la formazione del diestere.

Infine i risultati delle analisi elementari sono in accordo con i valori teorici calcolati per questa nuovo legante.

IV.2.2 Complesso $[(L_4)Pd(Cl)_2]$, 14

Il nuovo legante 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, $\mathbf{L_4}$, è stato complessato con il Pd(II) allo scopo di ottenere il precursore del complesso finale bifunzionale contenente il tropolone. Per fare ciò è stato sintetizzato un complesso in cui la bipiridina coordina il Pd(II) attraverso il suo sito bidentato N,N e la sfera di coordinazione del metallo è completata da due leganti labili, l'anione cloruro. Questo complesso si è formato aggiungendo ad una soluzione della 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, $\mathbf{L_4}$, in cloroformio, un equivalente di palladio(II)dibenzonitrile. Dopo 5h di agitazione della soluzione risultante a riflusso, il prodotto è stato isolato dall'ambiente di reazione e purificato (schema IV.6).



$[(L_4)Pd(Cl)_2]$, **14**

Schema IV.6

Il complesso **14**, ottenuto con una resa dell'80%, è stato caratterizzato mediante spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari. Dalla spettroscopia IR emerge soprattutto lo spostamento della banda relativa allo stretching (C=O) da 1714 cm^{-1} nel

legante a 1722 cm^{-1} nel complesso e lo spostamento delle bande relative allo stretching (C-C e C-N) della bipiridina tra 1593-1558 cm^{-1} a 1616-1557 cm^{-1}.

L'analisi dello spettro ^1H NMR rivela lo spostamento dei segnali protonici aromatici verso valori più alti di δ, ($\Delta\delta$= 0.62 ppm) in quanto risultano essere più deschermati per effetto della coordinazione della bipiridina al palladio(II).

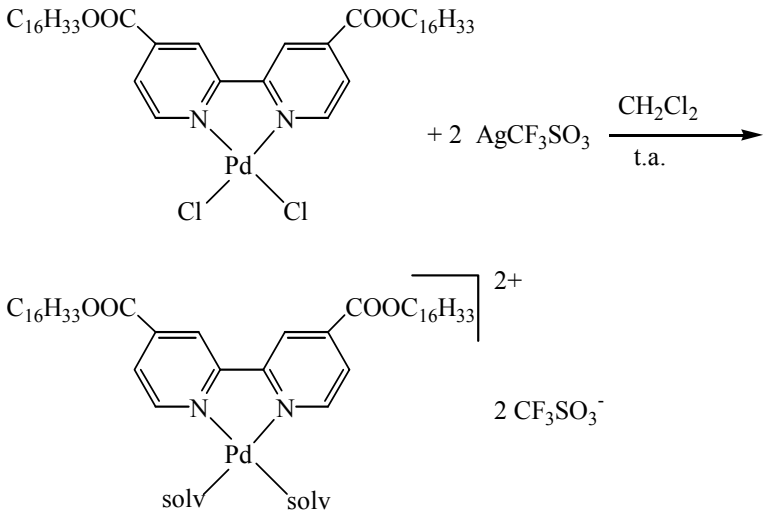
I risultati delle analisi elementari concordano con la stechiometria del complesso **14**.

L'insolubilità del complesso **14** nei solventi compatibili con i mezzi biologici per effettuare la caratterizzazione biologica, non ha consentito di effettuare lo screening di citotossicità su questo complesso.

IV.2.3 Complesso $[(L_4)Pd(trop)]CF_3SO_3$, 15

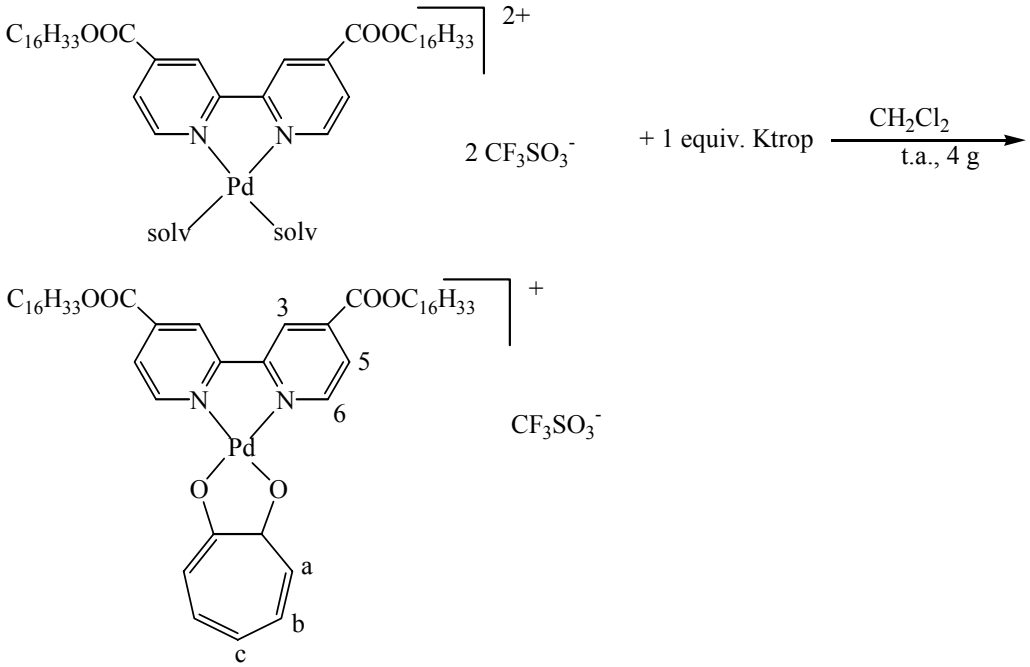
Come è stato accennato, il complesso $[(L_4)Pd(Cl)_2]$ **14**, è stato utilizzato come precursore metallico per la sintesi di un nuovo complesso ionico del tropolone, per studiare le proprietà citotossiche e confrontarle con quelle del complesso analogo dello Zn(II).

La strategia di sintesi per ottenere questo nuovo complesso è compresa di due step, in quanto prima il complesso $[(L_4)Pd(Cl)_2]$ **14** viene convertito in un intermedio più reattivo che si forma facendo reagire una soluzione del precursore in diclorometano con due equivalenti di triflato di argento. In questa soluzione che viene agitata a temperatura ambiente per 24 h al buio, i leganti Cl^- precipitano come cloruro di argento e vengono sostituiti nella sfera di coordinazione del Pd(II) dal solvente, come schematizzato di seguito (schema IV.7).



Schema IV.7

A questo punto l'intermedio dicationico formatosi è stato fatto reagire con un equivalente di tropolonato di potassio in diclorometano (schema IV.8).



[(L_4)Pd(trop)]CF_3SO_3**, 15**

Schema IV.8

La reazione avviene in diclorometano e viene agitata a temperatura ambiente per 4 giorni, quindi il prodotto, ottenuto con una resa del 85%, è stato isolato, purificato e caratterizzato. La caratterizzazione del prodotto della reazione attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari ha dimostrato che il tropolone chela il Pd(II) a formare un complesso ionico.

Infatti nello spettro IR del complesso **15** si può osservare la presenza delle bande a 1590 cm^{-1} e a 1508 cm^{-1} relative alle vibrazioni di stretching C-O e C=C del tropolone che dimostrano la complessazione del tropolone. Inoltre la presenza della banda a 1263 cm^{-1} dello ione triflato dimostra la natura ionica del complesso.

Nello spettro ^{1}H NMR si osserva lo spostamento essenzialmente del segnale relativo ai protoni aromatici $H_{6,6'}$da 9.5 ppm a 8.8 ppm, indice della formazione del complesso. Inoltre la presenza dei segnali aromatici del tropolone confermano la coordinazione del tropolone al Pd(II).

Infine i risultati delle analisi elementari confermano la struttura del complesso, in quanto sono in accordo con i valori teorici calcolati per la stechiometria del complesso **15**.

A differenza del legante, ovvero la 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, $\mathbf{L_4}$, e il complesso precursore $[(L_4)Pd(Cl)_2]$ **14**, il complesso **15** è solubile in DMSO, pertanto è stato possibile studiare le sue proprietà citotossiche.

Allora prima di procedere è stata studiata la sua stabilità in condizioni fisiologiche *in vitro* per poter consentire un suo potenziale utilizzo terapeutico.

Il complesso è stato sciolto in DMSO alla concentrazione di 1 x 10^{-4} M, dopodichè diluito come gli altri complessi in soluzione acquosa tamponata (pH 7.2) con una concentrazione finale dell'ordine di 1 x 10^{-6} M e in cui la concentrazione dell'etanolo non risulta essere superiore al 5% (v/v).

La verifica è avvenuta come al solito utilizzando la spettroscopia UV/vis, per cui qui di seguito vengono mostrate le curve relative al comportamento del complesso **16** al tempo zero e dopo 72 h, che come si può vedere rimane invariato (figura IV.12).

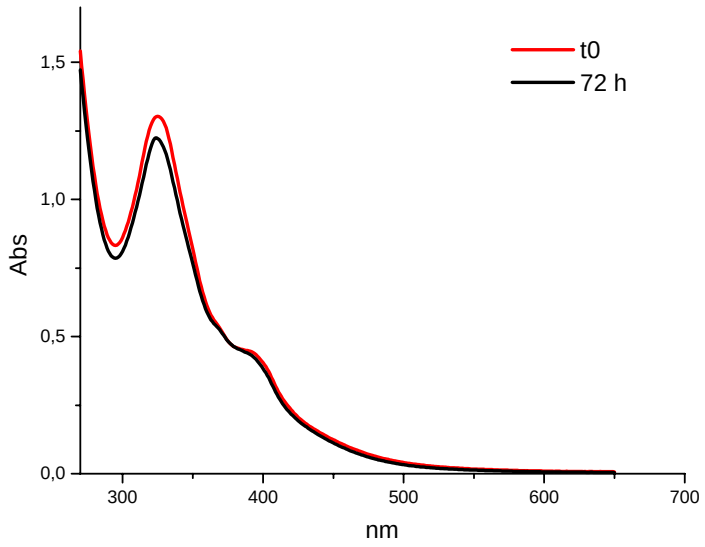
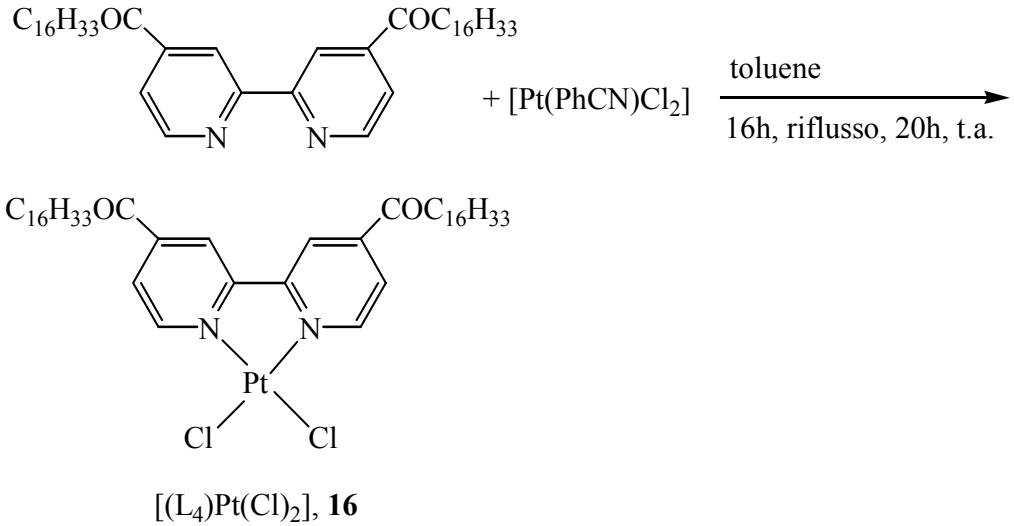


Figura IV.12 Spettro UV/vis del complesso 16 a pH 7.2

IV.2.4 Complesso $[(L_4)Pt(Cl)_2]$, 16

Per ottenere questo complesso è stata utilizzata la stessa strategia sintetica usata per il complesso **15**. E' stato sintetizzato il precursore metallico $[(L_4)Pt(Cl)_2]$ aggiungendo il platino(II)dibenzonitrile ad una soluzione della 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina in toluene. La soluzione risultante è stata agitata prima per 16 h a riflusso e poi per 20 h a temperatura ambiente. Quindi il prodotto della reazione, ottenuto con una resa del 75% è stato isolato e purificato (schema IV.9).



$[(L_4)Pt(Cl)_2]$, **16**

Schema IV.9

La caratterizzazione del prodotto attraverso IR, ^{1}H NMR e analisi elementari ha confermato la formazione di un complesso il cui il Pt(II) è coordinato da una una parte alla 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, mediante il suo sito bidentato azotato, e dall'altra ai due leganti Cl^-.

Infatti nello spettro IR è possibile osservare lo spostamento della banda relativa allo stretching (C=O) da 1714 cm^{-1} nel legante a 1725 cm^{-1} nel complesso e lo spostamento delle bande relative allo stretching (C-C e C-N) a frequenze maggiori.

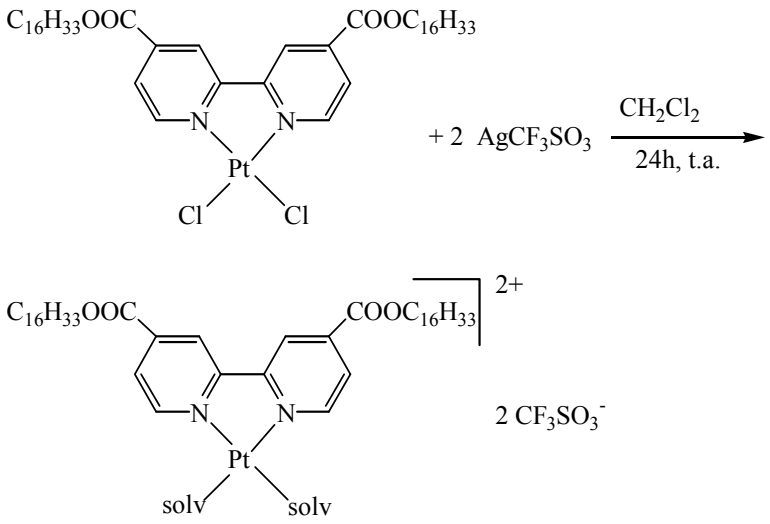
L'analisi dello spettro ^{1}H NMR rivela lo spostamento dei segnali protonici aromatici, soprattutto di $H_{6,6'}$ verso valori più alti di δ, in quanto risultano essere più deschermati per effetto della coordinazione della bipiridina al Pt(II).

Anche i risultati delle analisi elementari hanno confermato la formazione del complesso **16** perchè in accordo con la stechiometria della struttura.

La scarsa solubilità del complesso **16** nei solventi compatibili con i mezzi biologici non ha consentito di effettuare lo screening di citotossicità su questo complesso.

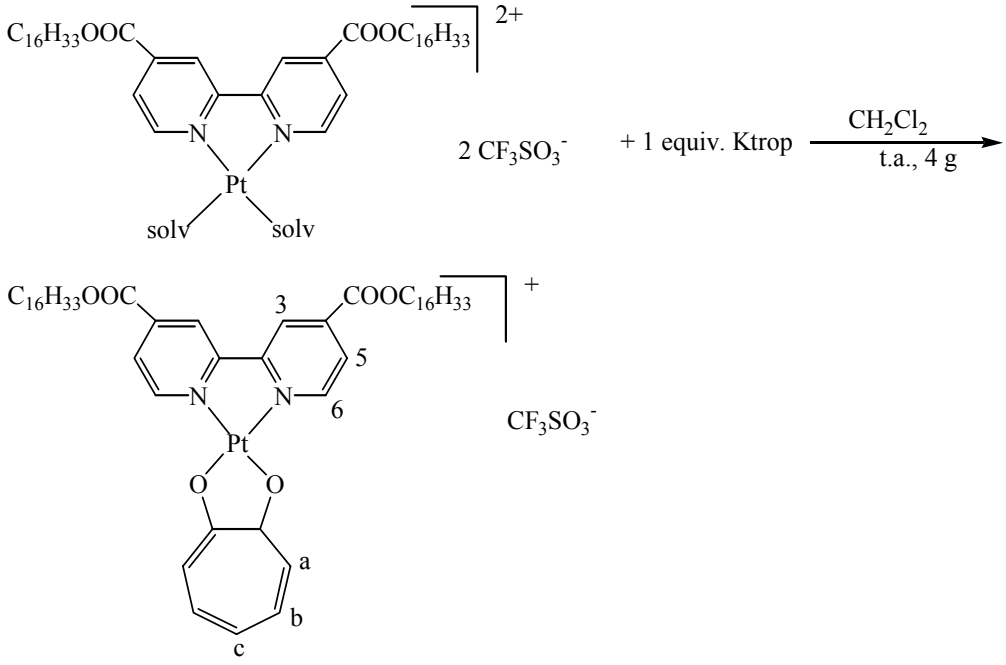
IV.2.5 Complesso $[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3$, 17

Analogamente al complesso di Pd(II) la sintesi di questo complesso avviene mediante una strategia di sintesi che prevede due step, ovvero prima si ottiene la formazione di un complesso intermedio più reattivo, un complesso in cui il metallo perde i leganti Cl^- in seguito a reazione del precursore $[(L_4)Pt(Cl)_2]$, **17** con 2 equivalenti di triflato di argento in una soluzione di diclorometano. Dopo 24 h di agitazione della soluzione al buio si osserva la formazione di un solido bianco, cloruro di argento che viene allontanato mediante filtrazione su celite e il complesso che si ottiene è quello riportato nello schema di reazione qui di seguito (schema IV.10).



Schema IV.10

Questo intermedio dicationico viene fatto reagire nel secondo step della reazione con un equivalente di tropolonato di potassio (schema IV.11).



[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3, **17**

Schema IV.11

Come si vede dallo schema III.27 la reazione avviene in diclorometano e dopo 4 giorni di agitazione a temperatura ambiente il prodotto, ottenuto con una resa del 60% è stato isolato, purificato e caratterizzato.

La caratterizzazione attraverso spettroscopia IR rivela innanzitutto la banda attribuibile allo ione triflato a 1258 cm^{-1}, che conferma la natura ionica del complesso. Inoltre si possono osservare le bande a 1590 cm^{-1} e a 1509 cm^{-1} relative alle vibrazioni di stretching C=O e C=C del tropolone.

Nello spettro ^1H NMR si osserva lo spostamento essenzialmente del segnale relativo ai protoni aromatici $H_{6,6'}$ da 9.82 ppm a 9.12 ppm, indice della formazione del complesso, confermata dalla presenza dei segnali aromatici del tropolone.

I risultati delle analisi elementari hanno confermato la struttura del complesso, in quanto sono in accordo con i valori teorici calcolati per la stechiometria della struttura in esame.

Mediante l'analisi di diffrazione a raggi X su cristallo singolo si è determinata la struttura del complesso **17**, rappresentando la conferma più evidente della formazione del complesso ionico del tropolone (figura IV.13).

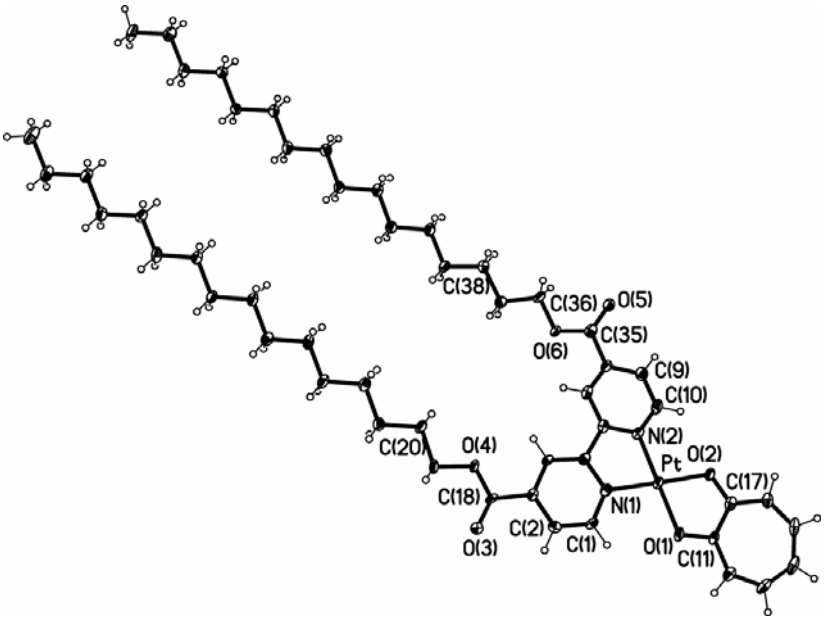


Figura IV.13

Il complesso **17** cocristallizza con una molecola di H_2O nell'unità asimmetrica. Nella tabella IV.1 vengono riportate le distanze e gli angoli di legame relativi al suddetto complesso.

Tabella IV.1 Distanze [Å] e angoli di legame per il complesso 18

Pt-N(1)	1.991(3)	Pt-N(2)	1.973(3)
Pt-O(1)	2.006(3)	Pt-O(2)	2.000(2)
O(1)-C(11)	1.322(4)	O(2)-C(17)	1.295(5)
N(1)-Pt-N(2)	80.2(1)	N(1)-Pt-O(1)	100.0(1)
N(1)-Pt-O(2)	178.2(1)	O(1)-Pt-O(2)	81.1(1)

L'atomo di Pt(II) è legato ai due N dell'unità bipiridinica ed ai 2 O dell'unità tropolonica con una geometria planare quadrata distorta (angoli di "bite" N(1)-Pt-N(2) e O(1)-Pt-O(2) di 80.1(1) e 81.1(1)° rispettivamente). Entrambi i valori si trovano nel range di tipici valori di "bite" di complessi contenenti sia bipiridine che β-dichetoni entrambi come sistemi chelanti. La molecola è essenzialmente planare; i piani passanti per gli anelli a cinque termini formati da N, N e O, O formano un angolo diedro di 2.1(1)°. Gli atomi di ossigeno carbossilico O(3) e O(5) della 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina puntano in direzioni opposte, con angoli di torsione C(4)-C(3)-C(18)-O(3) e C(7)-C(8)-C(35)-O(5) rispettivamente di 179.7(4) e 157.4(4)°. Come si vede dalla struttura del complesso mostrate in figura III.27, le catene dei gruppi carbossilici sono dritte e parallele e in una regolare conformazione *anti* (gli angoli di torsione sono rispettivamente 178.4(4) e 178.2(4).

Il crystal packing del complesso, riportato in figura IV.14, mostra una disposizione supramolecolare tipica di una struttura a strati, con un'alternanza di regioni polari e apolari lungo l'asse *b*. Il substrato paraffinico è mantenuto dalla forte interdigitazione delle lunghe catene carbossiliche del legante bipiridinico.

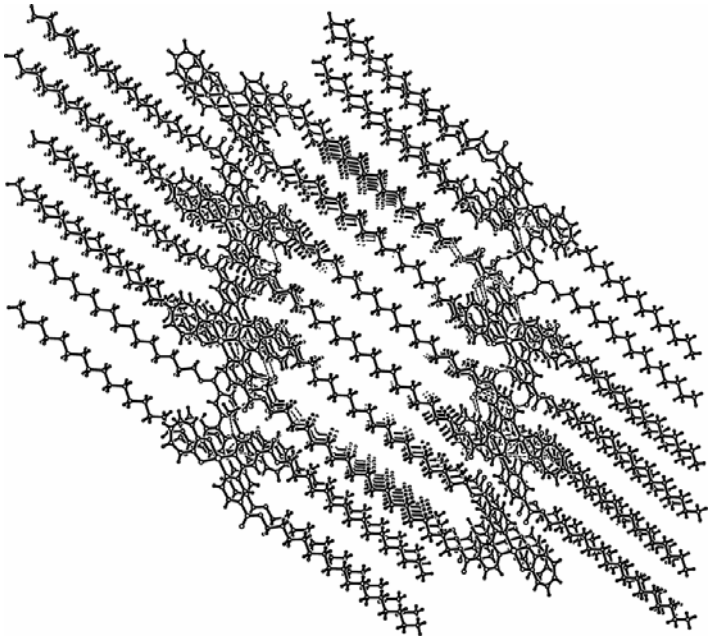


Figura IV.14

Nella regione polare, l'elemento più significativo è la formazione di dimeri di molecole, dovuto alla loro planarità e alla loro abilità di sovrapporsi e di stare vicina l'una all'altra. Infatti l'interazione tra le molecole in dimeri è tale che la distanza tra Pt—Pt sia di 3.4 Å e una forte interazione π-π si origina tra un anello piridinico del legante bipiridinico e l'anello centrosimmetrico aromatico del tropolone (figura IV.15). Questa forte interazione è confermata dai valori della distanza interplanare tra i due piani principali: l'angolo di distorsione e lo slip trasversale hanno valori tipici di interazioni π-π stacking.

Come mostrato nella figura IV.15 ogni molecola del dimero interagisce sia con la molecola di H_2O cocristallizzata che con il controione triflato attraverso i legami a idrogeno OH---O [O(10)---O(5)i 2.937(5) Å, H(10w)---O(5) 2.05(5) Å, O(10)-H(10w)---O(5) 143(3)°, i = x, y, z-1] and C-H---F [C(16)---F(1)ii 3.62(2) Å, H(16a)---F(1) 2.76(1) Å, C(16)-H(16a)---F(1) 155.3(5)°, ii = x, y+1, z+1].

L'esistenza di un forte legame a idrogeno tra la molecola di H_2O e il contro ione triflato [O(10)---O(8)^{iii} 2.909(1) Å, H(11w)---O(8) 1.87(4) Å, O(10)-H(11w)---O(8) 175(3)°, *iii* = x, y+1, z] genera la formazione di un anello con graph-set $R_3^3(18)$.

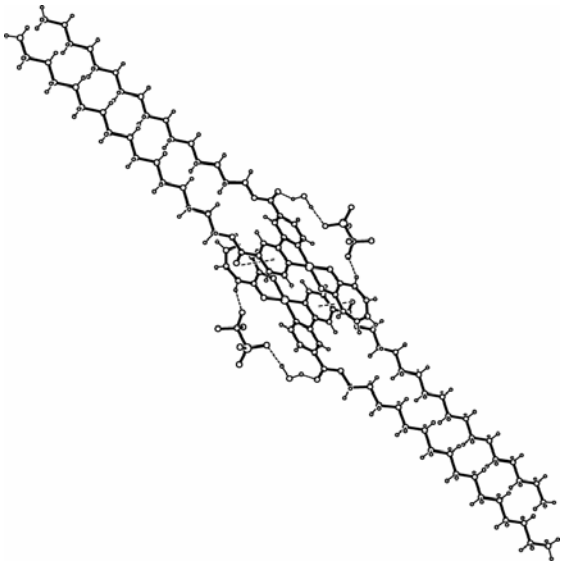


Figura IV.15

Anche il complesso **17**, come il complesso **15** è solubile in DMSO, a differenza del suo precursore metallico $[(L_4)Pt(Cl)_2]$ **16** e del legante 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, $\mathbf{L_4}$. La solubilità del complesso **17** nel DMSO comunque, è bastata per poter effettuare lo screening di citotossicità sulle linee cellulari finora utilizzate. Allora, è stata studiata la sua stabilità in condizioni fisiologiche *in vitro* per poter considerare utili i risultati dei test di citotossicità.

Il complesso è stato solubilizzato in DMSO alla concentrazione dell'ordine di 1×10^{-4}, quindi, allo stesso modo di come è stato fatto per gli altri complessi, è stato diluito in soluzione acquosa tamponata (pH 7.2) con una concentrazione finale dell'ordine di 1×10^{-6} M e in cui la concentrazione dell'etanolo non risulta essere superiore al 5% (v/v).

La registrazione di spettri di assorbimento UV/vis, ha consentito di monitorare il comportamento del complesso **17** nelle condizioni prescelte, che come si può osservare dalle curve in figura IV.16 non sembra essere cambiato.

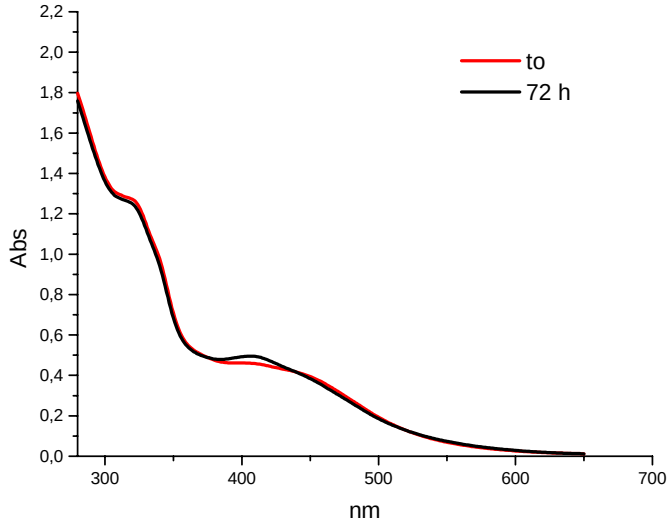


Figura IV.16 Spettro UV/vis del complesso 17 a pH 7.2

IV.2.6 Proprietà citotossiche *in vitro* dei complessi $[(L_4)Pd(trop)]CF_3SO_3$, 15 e $[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3$, 17

Entrambi i complessi sono stati solubilizzati in DMSO e lo screening dell'attività citotossica è avvenuto sulle stesse linee cellulari, ovvero DU 145 e LNCaP e allo stesso modo degli altri complessi.

Il grafico ottenuto per il complesso **15** è quello mostrato in figura IV.17 e può essere messo a confronto solo con quello del tropolone (figura IV.18), dato che non è stato possibile lavorare con il legante 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, $\mathbf{L_4}$, e con il complesso precursore $[(L_4)Pd(Cl)_2]$ **14**.

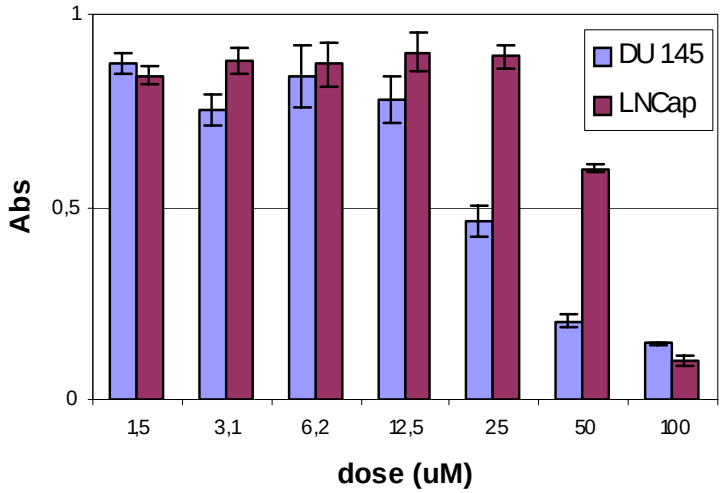


Figura IV.17 Istogramma di citotossicità del complesso 15

Come si può osservare, nella linea cellulare LNCaP l'attività è irrilevante perché a concentrazioni alte, mentre più interessante è l'attività nella linea DU 145 con un IC_{50} compreso tra 12.5 e 25 μM.

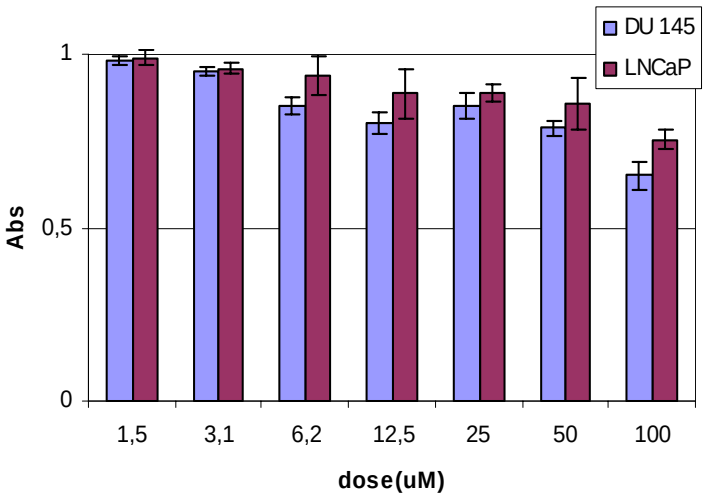


Figura IV.18 Istogramma di citotossicità del tropolone

In figura IV.19 viene riportata invece la citotossicità del complesso **17**.

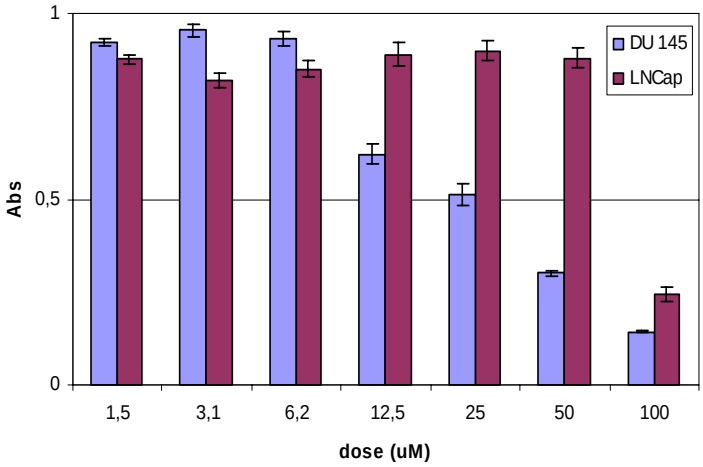


Figura IV.19 Istogramma di citotossicità del complesso 17

Dal confronto con il grafico del complesso analogo del Pd(II) cioè il complesso $[(L_4)Pd(trop)]CF_3SO_3$, **15**, emerge che, mentre nella linea LNCaP l'attività è irrilevante da parte di entrambi i complessi, nella linea DU 145 esiste una sottile differenza di attività, ovvero il complesso del Pt(II) determina il 45% di morte cellulare alla concentrazione di 12 μM. In virtù di questi risultati si può affermare, per quanto riguarda le DU 145, che il

Pt(II) sia un po' più attivo del Pd(II) e che dato che si tratta di complessi isostrutturali si è indotti a pensare che l'elemento determinate sull'attività citotossica sia proprio quest'ultimo.

Questo significa che il metallo non funge solo da elemento che riunisce due funzionalità attive ma c'è un sinergismo nell'attività, considerando anche che il tropolone, come legante libero è praticamente inattivo, se non ad alte concentrazioni come si vede dal grafico in figura IV.18.

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COMPLESSI IONICI E NEUTRI DI Zn(II)

I risultati ottenuti per quanto riguarda l'attività citotossica dei complessi del tropolone di Pd(II) e Pt(II) dimostrano che complessi bifunzionali contenenti questo legante chelante rappresentano una strategia di successo per il drug design di complessi metallici come potenziali farmaci antitumorali.

Per questo motivo è stata progettta e realizzata la sintesi di altri complessi contenenti il tropolone e come metallo lo Zn(II). Lo Zn(II) è un metallo che non è stato ancora molto utilizzato nel campo dei complessi antitumorali, per cui è stato ritenuto interessante progettare complessi potenzialmente attivi in questo senso.

D'altra parte è stato stimolante indagare la capacità di coordinazione di questo metallo non molto elettrofilo nei confronti di leganti O,O chelanti della famiglia dei curcuminoidi e il tropolone. Proprio perché lo Zn(II) non è molto elettrofilo e la curcumina non è un buon nucleofilo, i tentativi sintetici per ottenere la complessazione con questo legante non sono andati a buon fine.

Il tropolone invece è un legante O,O chelante che finora ha dimostrato buone capacità coordinative, grazie anche alla possibilità di aumentarne la nucleofilicità.

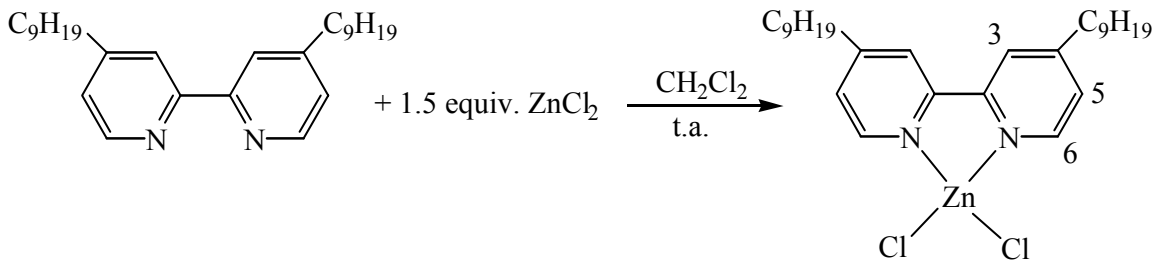
Non solo, si è voluto approfittare di questo e della capacità dello Zn(II) di originare differenti geometrie per indagare sul ruolo della geometria sull'attività citotossica e/o ottenere nuovi e diversi farmacofori sempre più attivi.

Infatti utilizzando il tropolonato di potassio in differente rapporto stechiometrico rispetto al precursore metallico, si ottengono un complesso ionico tetracoordinato e un complesso neutro esacoordinato.

Considerando che la 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina è più solubile della 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, è stata scelta come unità intercalante che va a completare la sfera di coordinazione dello Zn(II) nei complessi.

V.1 Complesso $[(L_3)Zn(Cl)_2]$, 18

Per ottenere la complessazione del tropolone allo Zn(II) è stata messa a punto una strategia di sintesi per ottenere l'opportuno precursore. Questo prevede la coordinazione della bipiridina da un lato e dall'altra di due leganti labili, ovvero ioni cloro ed è stato ottenuto aggiungendo 1,5 equivalenti di $ZnCl_2$ ad una soluzione del legante 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina in diclorometano come mostrato nello schema V.1.



$[(L_3)Zn(Cl)_2]$ **18**

Schema V.1

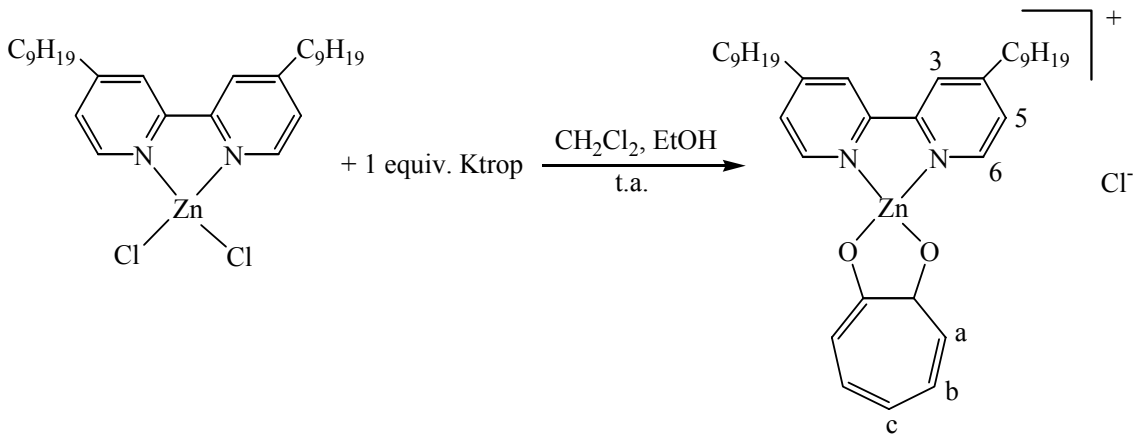
Dalla soluzione risultante, che è stata agitata per 6 giorni a temperatura ambiente, è stato isolato e purificato il prodotto con una resa del 78%.

Il complesso **18** è stato caratterizzato attraverso spettroscopia IR, ^{1}H NMR e analisi elementari. Nello spettro IR si possono osservare le bande a 1617 cm^{-1} e 1556 cm^{-1} relative alle vibrazioni di stretching C=C e C=N del sistema aromatico bipiridinico che indicano la coordinazione al metallo. L'analisi dello spettro ^{1}H NMR rivela lo spostamento dei segnali protonici aromatici verso valori più alti di δ, cioè risultano essere più deschermati per effetto della coordinazione della bipiridina (Δδ= 0.9 ppm) al metallo.

Infine, i risultati delle analisi elementari rappresentano un ulteriore dato che confermano la formazione del complesso **18**.

V.2 Complesso [(L$_3$)Zn(trop)]Cl, 19

Come è stato accennato, il complesso [(L$_3$)Zn(Cl)$_2$] **18**, è il precursore metallico del complesso contenente il legante tropolone, ovvero quando una soluzione del complesso **18** in diclorometano viene aggiunta ad una soluzione di tropolonato di potassio in etanolo, si forma, agitando la soluzione risultante a temperatura ambiente, un complesso in cui una molecola di tropolone è chelato al frammento L_3Zn^{2+}. Il complesso **18** e il tropolone vengono fatti reagire in rapporto stechiometrico 1:1 e il tropolone viene utilizzato in forma deprotonata per aumentare la nucleofilicità del sistema, favorendo la coordinazione ad un metallo non molto elettrofilo come lo Zn(II). La caratterizzazione del prodotto ha rivelato che il complesso che si ottiene, con una resa del 55%, è un complesso ionico, rappresentato nello schema V.2



[(L$_3$)Zn(trop)]Cl 19

Schema V.2

Lo spettro IR del complesso **19** mostra lo spostamento delle bande relative allo stretching C=C e C=N del sistema bipiridinico a frequenze inferiori. Inoltre la presenza delle bande a 1595 cm^{-1} e a 1514 cm^{-1} relative alle vibrazioni di stretching C-O e C=C del tropolone dimostrano la complessazione del tropolone.

Nello spettro ^{1}H NMR si osserva lo spostamento essenzialmente del segnale relativo ai protoni aromatici $H_{6,6'}$ di 0.4 ppm, quindi verso valori più alti di δ, indice della formazione del complesso. Inoltre la presenza e la molteplicità dei segnali aromatici del tropolone indicano che lo Zn(II) coordina una molecola di tropolone.

Infine i risultati delle analisi elementari confermano la natura ionica del complesso, in quanto sono in accordo con i valori teorici calcolati per la stechiometria del complesso **19**.

Avendo progettato e ottenuto questo nuovo complesso al fine di ottenere complessi sempre più attivi in termini di citotossicità, è stato opportuno verificare, prima di effettuare lo screening citotossico, la stabilità in ambiente acquoso mimando le condizioni fisiologiche per poter garantire un potenziale suo utilizzo terapeutico.

Così è stata preparata una soluzione del complesso **19** in DMSO alla concentrazione dell'ordine di 1 x 10^{-4} M e diluito in soluzione acquosa tamponata (pH 7.2) con una concentrazione finale dell'ordine di 1 x 10^{-6} M e in cui la concentrazione dell'etanolo non risulta essere superiore al 5% (v/v).

Entrambe le verifiche sono state effettuate attraverso spettroscopia UV/vis, come mostrato dalle curve di assorbimento del complesso **13** in soluzione acquosa tamponata registrate dopo 24, 48 e 72 h (figura V.1).

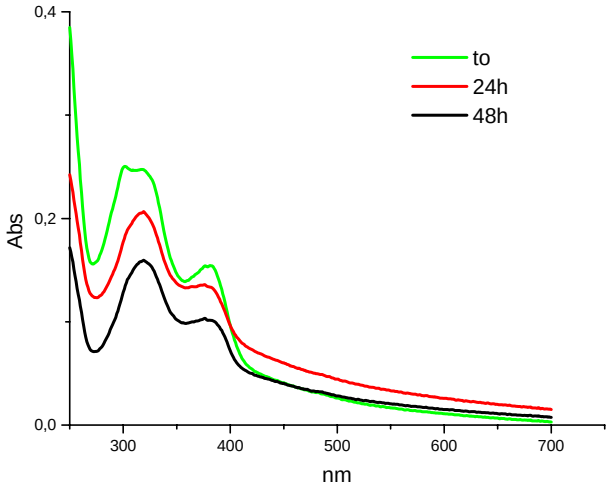
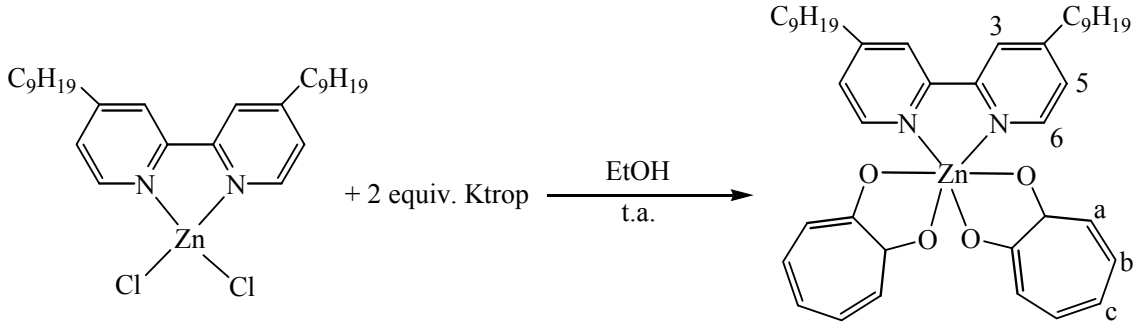


Figura V.1 Spettro UV/vis del complesso 13 a pH 7.2

Come si può osservare le curve risultano essere essenzialmente sovrapponibili, potendo confermare la stabilità del complesso in condizioni fisiologiche anche dopo 72h.

V.3 Complesso $[(L_3)Zn(trop)_2]$ 20

Descrivendo la sintesi del complesso precedente si è voluto specificare che il rapporto stechiometrico tra il complesso precursore $[(L_3)Zn(Cl)_2]$ **18** e il tropolone è di 1:1.
Questo perché, utilizzando un rapporto stechiometrico tra il precursore e il tropolone di 1:2, anche a temperatura ambiente, si forma un secondo complesso, un complesso neutro in cui due molecole di tropolone chelano lo Zn(II).
Tuttavia, per ottenere il complesso puro, con una resa del 75%, la reazione è stata effettuata aggiungendo un equivalente di $[(L_3)Zn(Cl)_2]$ **12** ad una soluzione di etanolo contenente due equivalenti di tropolonato di potassio e agitando la miscela di reazione per 24 h a 80°C (schema V.3).



$[(L_3)Zn(trop)_2]$ 20

Schema V.3

La caratterizzazione di questo nuovo complesso del tropolone attraverso spettroscopia IR, ^1H NMR e analisi elementari ha confermato la coordinazione allo Zn(II) di due molecole di tropolone.

Nello spettro IR si possono osservare le bande a 1592 cm^{-1} e a 1508 cm^{-1} relative alle vibrazioni di stretching C-O e C=C del tropolone che dimostrano la complessazione del tropolone, anche se è soprattutto dall'analisi dello spettro ^1H NMR che si capisce, dalla molteplicità dei segnali aromatici del tropolone che il complesso contiene due molecole di tropolone. Inoltre, mentre nel complesso ionico del tropolone il segnale relativo ai protoni aromatici $H_{6,6'}$si sposta di 0.4 ppm, quindi verso valori più alti di δ, nel complesso neutro si sposta di pochissimo, mentre si spostano a valori più bassi di δ i protoni aromatici $H_{3,3'}$.

Anche i risultati delle analisi elementari hanno confermato la stechiometria di un complesso ottaedrico, ma il dato più palese della formazione di un complesso neutro, ottaedrico dello Zn(II) proviene dall'analisi di diffrazione a raggi X su cristallo singolo, che ha consentito di risolvere la struttura (figura V.2).

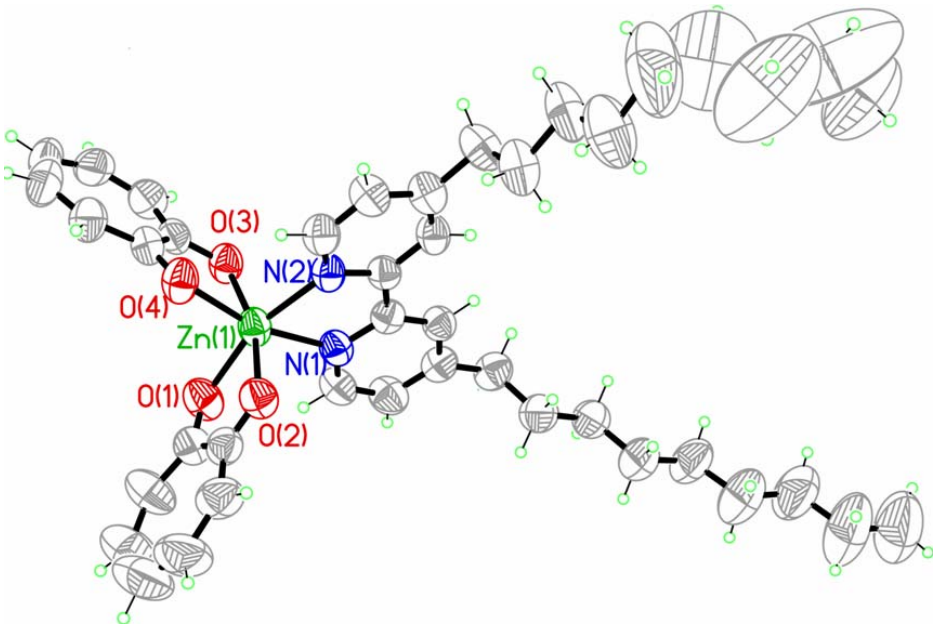


Figura V.2

L'analisi mediante raggi X ha messo in evidenza infatti, la formazione di un complesso ottaedrico, in cui il metallo è legato a due unità tropoloniche e coordinato ad una molecola di bipiridina. Il complesso cristallizza nel gruppo spaziale triclino P^-_1.

Dall'analisi strutturale si evince inoltre che nessuna molecola di solvente è presente nella sfera di coordinazione del metallo. Lo ione zinco ha un numero di coordinazione pari a sei, essendo coordinato ai due atomi di azoto dell'unità aromatica ed ai quattro atomi di ossigeno delle due unità tropoloniche. La geometria di coordinazione attorno al metallo è di tipo ottaedrico distorto, come si può osservare dagli angoli di legame riportati in tabella V.1.

Zn(1)-O(4)	2.063 (3)
Zn(1)-O(1)	2.087 (3)
Zn(1)-O(2)	2.093 (3)
Zn(1)-O(3)	2.100 (3)
Zn(1)-N(2)	2.132 (4)
Zn(1)-N(1)	2.150 (4)
O(4)-Zn(1)-O(1)	97.51 (14)
O(4)-Zn(1)-O(2)	92.34 (13)
O(1)-Zn(1)-O(2)	76.48 (13)
O(4)-Zn(1)-O(3)	77.08 (12)
O(1)-Zn(1)-O(3)	93.91 (13)
O(2)-Zn(1)-O(3)	164.81 (12)
O(4)-Zn(1)-N(2)	95.48 (13)
O(1)-Zn(1)-N(2)	163.25 (14)
O(2)-Zn(1)-N(2)	92.49 (13)
O(3)-Zn(1)-N(2)	99.27 (12)
O(4)-Zn(1)-N(1)	164.38 (13)
O(1)-Zn(1)-N(1)	94.08 (14)
O(2)-Zn(1)-N(1)	100.55 (13)
O(3)-Zn(1)-N(1)	91.75 (13)
N(2)-Zn(1)-N(1)	75.33 (14)

Tabella V.1 Distanze [Å] ed angoli di legame [deg] per il complesso 14

La distorsione della geometria ottaedrica regolare è evidenziata dagli angoli O(2)-Zn-O(3) e O(1)-Zn-N(2) con un valore di 164.81° e 163.25° rispettivamente. Il piano equatoriale è costituito dagli atomi O(1), N(1), N(2) e O(4), mentre le posizioni assiali sono occupate dagli atomi O(3) e O(2).

In figura V.3 è riportata una proiezione del crystal packing del complesso 14 visto nel piano cristallografico *ab* (lungo l'asse *c*).

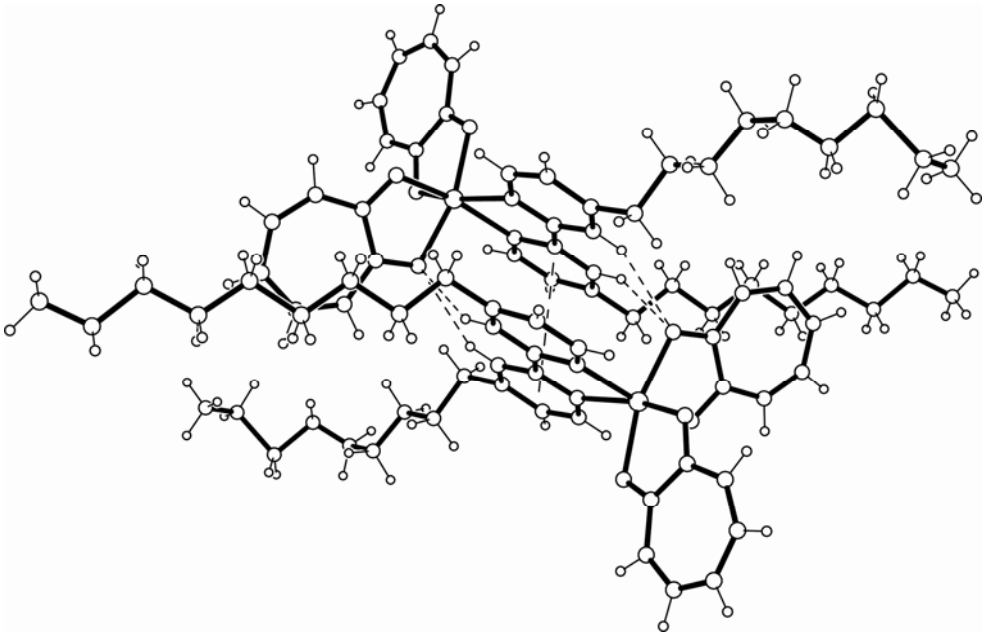


Figura V.3

Osservando attentamente le molecole distinguiamo due tipologie d'interazioni intermolecolecolari. La prima interazione è un legame a ponte di idrogeno che interessa l'atomo di ossigeno dell'unità tropolonica e l'idrogeno in posizione 3 dell'unità bipiridinica della molecola centroasimmetrica, [O (3)-H (4A): 2.52 Å; O (3)-C (4): 3.38 Å; C(4)-H(4A)-O(3): 153.95]. le interazioni intermolecolari dominanti sono, comunque, dovute alla presenza dei tanti anelli aromatici che circondano lo ione metallico: si tratta, pertanto, di interazioni π-π. Come è stato già detto in precedenza, le interazioni π-π, dette anche aromatiche-aromatiche, sono forze intermolecolari non covalenti simili al legame a ponte di idrogeno.

Nel caso del complesso **20** la forte interazione intermolecolare di tipo π-π che si instaura tra gli anelli aromatici è evidenziabile dalla distanza tra i centroidi di due anelli piridinici delle molecole centroasimmetriche pari a 5.34 Å e da una distanza interplanare di 3.47 Å.

A questo punto è stato interessante studiare come varia l'attività citotossica, passando da un complesso ionico contenente un tropolone ad un complesso neutro contenente due tropoloni, ma prima di fare ciò è stato opportuno accertarsi della stabilità del complesso **20** in condizioni fisiologiche *in vitro*.

Il complesso è stato sciolto in DMSO alla concentrazione di 1 x 10^{-4} M, quindi diluito come gli altri complessi in soluzione acquosa tamponata (pH 7.2) con una concentrazione finale dell'ordine di 1 x 10^{-6} M e in cui la concentrazione dell'etanolo non risulta essere superiore al 5% (v/v).

La verifica è avvenuta come al solito seguendo il comportamento dopo 24, 48 e 72 h attraverso la registrazione di spettri UV/vis, per cui qui di seguito vengono riportate le curve di assorbimento del complesso **20** in soluzione acquosa tamponata registrate nei tempi prescelti (figura V.4).

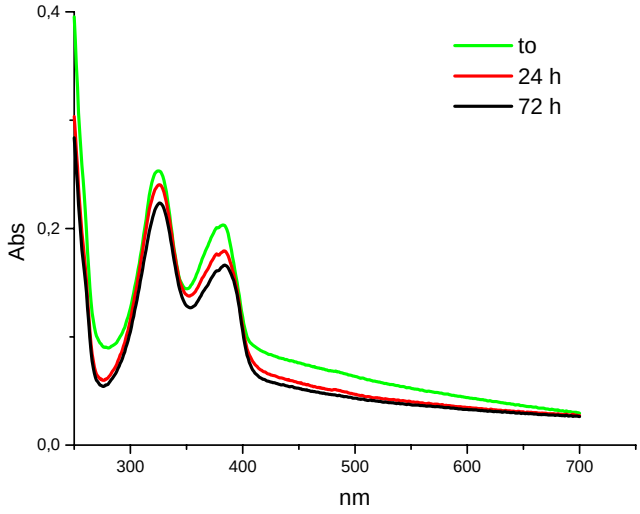


Figura V.4 Spettro UV/vis del complesso 20 a pH 7.2

Come si può osservare dal grafico, la sovrapposizione delle curve indica la stabilità del complesso nelle condizioni prescelte, dimostrando l'idoneità all'uso terapeutico del complesso **20** una volta dimostrato la sua efficacia citotossica.

V.4 Proprietà citotossiche *in vitro* dei complessi [(L_3)Zn(trop)]Cl, 19 e [(L_3)Zn(trop)$_2$] 20

I due complessi dello Zn(II), **19** e **20** sono stati testati in maniera parallela su un pannello di due linee cellulari tumorali prostatiche umane, DU 145 e LNCaP. I complessi sono stati solubilizzati in DMSO e le cellule sono state incubate con queste soluzioni, con concentrazioni finali scalari, ovvero nel terreno di coltura da 1.5 a 100 μM. Allo stesso modo è stato possibile effettuare lo studio di citotossicità del complesso precursore [(L_3)Zn(Cl)$_2$] **18**, solubilizzato in DMSO mentre si è visto che il legante, ovvero la 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina o **L_3**, è risultata inattiva su entrambe le linee cellulari. La citotossicità è stata testata anche sul legante tropolone, come già descritto. Come per i precedenti complessi, dopo 72 h di continua esposizione delle cellule al legante tropolone e ai complessi **19** e **20** è stata misurata la sopravvivenza cellulare attraverso saggio colorimetrico dell'MTS.
Dall'elaborazione dei dati sono stati ottenuti i grafici in cui viene riportata la citotossicità in parallelo sulle due linee cellulari del complesso precursore **18** (figura V.5a), e dei complessi **19 e 20** (figura V.5b e c).

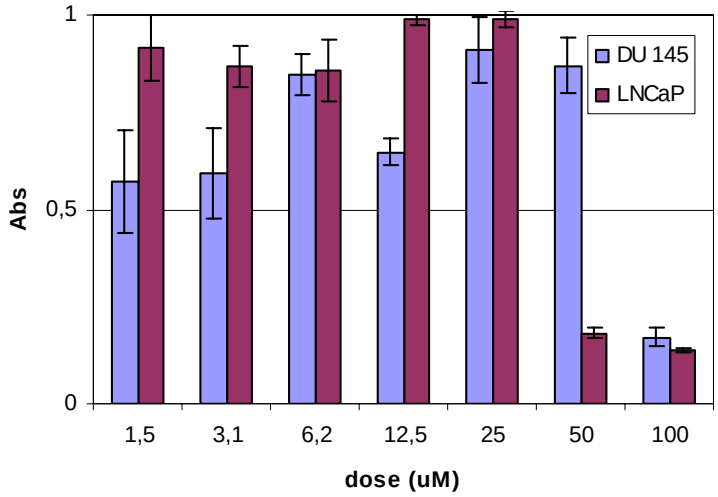


Figura V.5a Istogramma di citotossicità del complesso 18

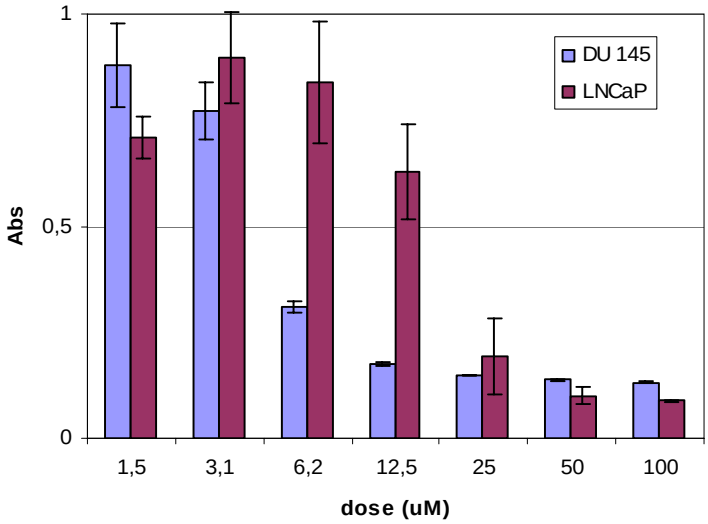


Figura V.5b Istogramma di citotossicità del complesso 19

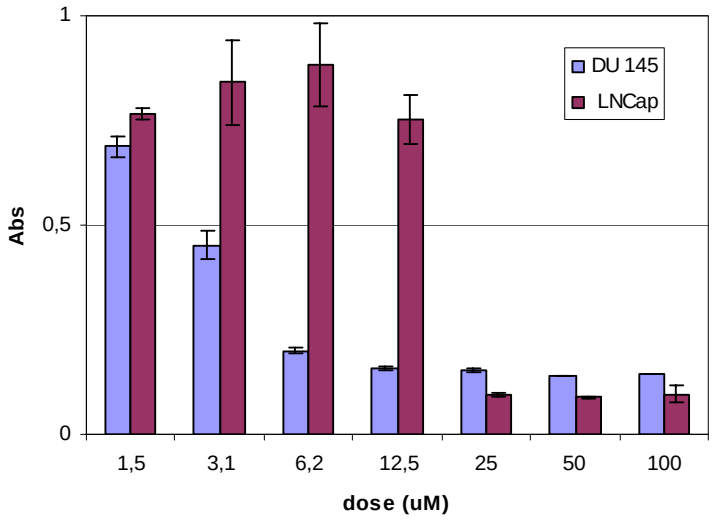


Figura V.5c Istogramma di citotossicità del complesso 20

Come si può osservare dai grafici, l'attività del complesso precursore $[(L_3)Zn(Cl)_2]$ **18**, è irrilevante perché ad alte concentrazioni in entrambe le linee.

L'attività aumenta di molto, essenzialmente nelle DU 145, con il complesso ionico del tropolone $[(L_3)Zn(trop)]Cl$ **19**, mostrando un IC_{50} compreso tra 3.1 e 6.2 μM e con il complesso ottaedrico il ha un IC_{50} compreso tra 1.5 e 3.1 μM.

Quindi il complesso ottaedrico del tropolone, **20**, si è dimostrato il complesso più attivo e questo significa che l'unità tropolonica funziona in modo addizionale all'attività, oppure che le proprietà chimico-fisiche del complesso **20**, che possono generare dalla geometria ottaedrica e/o dalla carica del complesso, fanno di questo sistema il farmacoforo migliore.

Nell'ambito di uno studio di relazione struttura-attività si può affermare che il tropolone e il frammento metallico da soli non bastano a produrre un'attività significativa, mentre il complesso finale possiede le proprietà chimico-fisiche giuste per produrre attività, considerando la sua efficacia anche a piccole concentrazioni.

Inoltre il fatto che il complesso ottaedrico dello Zn(II) sia molto più attivo di quelli ionici del tropolone contenenti il Pd(II) e il Pt(II) indica che il metallo ha un ruolo

importante nell'attività di questi complessi e rappresenta uno dei rari casi in cui lo Zn(II) supera il Pt(II) in questo campo.

Questo dimostra che bisogna utilizzare per forza il Pt(II) per progettare composti citotossici e che la progettazione di sistemi bifunzionali rappresenta la strada giusta per ottenere un sinergismo d'azione dei vari elementi introdotti, rispondendo perfettamente alle aspettative prefissate da questo progetto.

Bibliografia del III capitolo

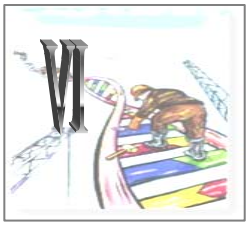
[64] L. Lin, Q. C. Shi, A. K. Nayarko, K. F. Bastow, C.-C. Wu, C.-Y. Su, C. C.-Y. Shih, K.H.J. Lee, *J. Med. Chem*. **2006**, 49, 3963-3972.

[65] Sabatino M.A., Colombo T., Geroni C., Marchini S. and Broggini M., *Clinical Cancer Research* **2003**, 9, 5402-5408.

[66] Lu M., Xia L., Luo D., Waxman S. and Jing Y.,*Oncogene* **2004**, 3945-3952.

[67] R. Kamath, Z. Jiang, G. Sun, J. C. Yalowich and R. Baskaran, *Mol. Pharmacol.* **2007**, 71, 61-72.

[68] D. Pucci, R. Bloise, A. Bellusci, S. Bernardini, M. Ghedini, S. Pirillo, A. Valentini e A. Crispini *J. Inorg. Chem*. **2007**, 101, 1013-1022.



PARTE SPERIMENTALE

Condizioni generali

La caratterizzazione dei prodotti sintetizzati è stata effettuata mediante analisi elementari, spettroscopie IR e ^{1}H-NMR, spettrofotometria UV-VIS, diffrazione a raggi X su cristallo singolo e su polveri.

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 Spectrum One.

Gli spettri ^{1}H-NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker W-M 300, usando TMS come standard interno e vari solventi deuterati.

Gli spettri UV sono stati registrati con uno spettrometro Perkin Elmer LS50B.

Gli studi di diffrazione a raggi X sono stati eseguiti mediante l'utilizzo di un diffrattometro di nuova generazione con area detector X8 APEX della Bruker AXS.

Gli studi di citotossicità sono stati rilevati mediante saggio colorimetrico dell'MTS, ovvero una soluzione commerciale (Promega) contenente il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio e fenazina etosolfato (PES).

VI.1 SINTESI DEI PRECURSORI

VI.1.1 Preparazione del tropolonato di potassio [K-trop]

310 mg (2.54 mmol) di tropolone sono stati solubilizzati in 10 mL di etanolo e a tale soluzione è stato addizionato 1 equivalente di idrossido di potassio (142 mg). La formazione di un precipitato è stata quasi immediata e pertanto dopo un'ora di agitazione magnetica, a temperatura ambiente la sospensione è stata filtrata e il solido giallo risultante è stato lavato, asciugato e caratterizzato. Il sale del tropolone è stato ottenuto con una resa del 75% (305 mg).

Formula molecolare: $C_7H_5O_2K$
Massa molecolare: 160.22 g mol^{-1}

Caratterizzazione

$\Rightarrow$ IR (KBr): ν = 1233 cm^{-1} (C-O).

VI.1.2 Preparazione del palladiodibenzonitrilecloruro [$Pd(PhCN)_2Cl_2$]

Il complesso [$Pd(PhCN)_2Cl_2$] è stato ottenuto sciogliendo 2 g di $PdCl_2$ (0.011 mol) in 40 mL di benzonitrile . La miscela, dopo essere stata mantenuta sotto agitazione magnetica, a 110 °C, per circa 4 h, è stata filtrata ancora calda, raccogliendo il filtrato in un pallone da 500 mL contenente 350 mL di etere di petrolio, tenuto in agitazione.

Il precipitato giallo, formatosi immediatamente, è stato filtrato e lasciato asciugare, prima alla pompa ad H_2O e poi all'aria, fino a quando il peso è rimasto costante. Il prodotto così sintetizzato è stato ottenuto con una resa del 98% (4.2 g).

Formula molecolare: $C_{14}H_{10}N_2PdCl_2$
Massa molecolare: 383.55 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ IR (KBr): ν = 3096-3034 cm^{-1} (C-H), 2289 cm^{-1} (C≡H)

VI.1.3 Preparazione del platinodibenzonitrilecloruro [$Pt(PhCN)_2Cl_2$]

500 mg di $PtCl_2$ (1.88 mmol) sono stati sciolti in 20 mL di benzonitrile. La miscela, mantenuta a 110 °C e sotto agitazione magnetica per circa 4 ore, è stata filtrata ancora calda, raccogliendo il filtrato in un pallone contenente 100 mL di etere di petrolio tenuto in agitazione. Si è formato subito un precipitato giallo che si è stato filtrato e lasciato asciugare prima alla pompa ad H_2O e poi all'aria fino a quando il peso non è risultato costante. Si sono ottenuti 800 mg di prodotto, un solido giallo, con una resa del 90%.

Formula molecolare: $C_{14}H_{10}N_2PtCl_2$
Massa molecolare: 472.23 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ IR (KBr): ν = 3095-3032 cm^{-1} (C-H), 2286 cm^{-1} (C≡H).

VI.1.4 Purificazione della curcumina commerciale

La curcumina o (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) è stata separata, dalla miscela di curcuminoidi (curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina) disponibile commercialmente pura al 95%, mediante cromatografia su colonna di silice, usando come miscela eluente una miscela $CHCl_3$/MeOH in rapporto 9.5/0.5.
Partendo da 900 mg di questa miscela, sono stati ottenuti, con queste condizioni, 590 mg di curcumina [1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3.5-dione], (66%).

Formula molecolare: $C_{21}H_{20}O_6$
Massa molecolare: 368.39 g mol^{-1}

Caratterizzazione

$\Rightarrow$ IR (KBr): ν = 1628 cm^{-1} (C-O), 1510 cm^{-1} (C-C-C), 963 cm^{-1} (CH=CH).

IV.1.5 Preparazione della Di-docosanoil curcumina , ([1,7-bis(4-n-docosanoil-3-metossifenil)-1,6- eptadiene-3,5-dione]), *curc22*

Una sospensione di K_2CO_3 (0.18 g, 1.303 mmol) in 10 mL di acetone dry è stata messa a reagire, sotto N_2, con una soluzione di curcumina pura (0.12 g, 0.325 mmol) in 20 mL di acetone dry. Quindi è stato aggiunto goccia a goccia il docosanoil bromuro (0.254 g, 0.651 mmol), precedentemente solubilizzato sempre in acetone dry (10 mL). La risultante miscela è stata mantenuta sotto agitazione, a riflusso e sotto N_2 per 3 giorni. Dopo filtrazione, la soluzione è stata seccata a pressione ridotta e il residuo estratto con cloroformio. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio anidro, seccata a

pressione ridotta e ricristallizzata da metanolo. Il prodotto, un solido di colore arancio, è stato ottenuto con una resa del 78% (252 mg).

Formula molecolare: $C_{65}H_{108}O_6$
Massa molecolare: 985.41 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 85°C
- ⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 79.23 H= 11.04
  Sperimentale: C= 78.86 H= 10.68
- ⇒ IR (KBr): ν = 963 cm^{-1}(CH=CH), 1511 cm^{-1} (C-C-C), 1630 cm^{-1} (C-O), 2918-2849 cm^{-1} (C-H).

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz $CDCl_3$): δ 16.20 (s, 1H, H_a), 7.59 (d, 2H, *J*(H,H) = 15.64 Hz, $H_{d,d'}$), 7.08 (m, 4H, $H_{e,e',g,g'}$), 6.93 (d, 2H, *J*(H,H) = 8.07 Hz, $H_{f,f'}$), 6.47 (d, 2H, *J*(H,H) = 15.81 Hz, $H_{c,c'}$), 5.82 (s, 1H, H_b), 3.92 (s, 6H, OCH_3), 4.06 (t, 4H, *J*(H,H) = 6.77 Hz, OCH_2), 1.86 (4H, m, $CH_2(CH_2)_{19}CH_3$) 1.44 (76H, m, $(CH_2)_{19}CH_3$) 0.87 (t, 6H, *J*(H,H) = 6.70 Hz, CH_3).

VI.2 SINTESI DI COMPLESSI NEUTRI CICLOPALLADATI

VI.2.1 Preparazione del legante 2-fenil-4-esadecilcarbossilatochinolina, HL_1

Ad un eccesso di $SOCl_2$ (10 mL), sotto N_2, sono stati aggiunti 2 g (8.02 mmol) di 2-fenil-4-carbossilatochinolina [pqc]. La miscela ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione, ad una temperatura di 80 °C per circa 24 h, dopodiché la soluzione risultante viene portata a secco a pressione ridotta, quindi ricristallizzata da diclorometano.
Il cloruro della 2-fenil-4-carbossilatochinolina così ottenuto (2.14 g, 8.02 mmol), di colore giallo, è stato fatto reagire con una soluzione di esadecanolo (2.33 g, 9.6 mmol) in 50 mL di toluene. La sospensione risultante è stata mantenuta sotto agitazione magnetica, prima a 0°C per 30 minuti sotto N_2, poi ad una temperatura di 110°C, sempre sotto N_2 per circa 40 h. La sospensione ottenuta, seccata a pressione ridotta, è stata sciolta in cloroformio, estratta con una soluzione basica di bicarbonato di sodio e ricristallizzata da cloroformio/metanolo. Il precipitato è stato filtrato ottenendo il prodotto, di colore bianco, con una resa dell'88% (3.35 g).

Formula molecolare: $C_{32}H_{43}NO_2$
Massa molecolare: 473.70 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 56°C
- ⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 81.14 H= 9.16 N= 2.96
  Sperimentale: C= 80.88 H= 8.93 N= 3.15

⇒ IR (KBr): ν = 1717 cm^{-1} (C-OOR), 3067-2853 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.77 (d, *J*(H,H) = 8.55 Hz, H_1), 8.41(s, H_5), 8.24 (m, 3H, $H_{6,\ 10,4}$), 7.75 (t, *J*(H,H) = 7.12 Hz, H_3), 7.64 (t, *J*(H,H) = 6.02 Hz, H_2), 7.58 (m, 3H, $H_{7,\ 8,\ 9}$), 4.52 (t, 2H, *J*(H,H) = 6.75 Hz, OCH_2), 1.9 (q, 2H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.5 (m, 26H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.9 (t, 3H, *J*(H,H) = 6.36 Hz, CH_3).

VI.2.2 Preparazione del complesso binucleare a ponte cloro, $[(L_1)Pd(\mu\text{-}Cl)]_2$, 1

Ad 1g (2.1 mmol) di legante L_1, solubilizzato in 30 mL di etanolo, è stato addizionato 1 equivalente di $[Pd(PhCN)_2Cl_2]$ (0.810 g, 2.1 mmol). La sospensione di colore giallo intenso è stata mantenuta sotto costante agitazione magnetica per 3 giorni a temperatura ambiente. Il precipitato giallo, costituito dalla miscela del complesso $[(pqc\text{-}C_{16}H_{33})\text{-}Pd\text{-}(\mu\text{-}Cl)]_2$ e del complesso *trans*-$[(pqc\text{-}C_{16}H_{33})\text{-}PdCl_2]$ è stato filtrato e ricristallizzato da cloroformio da cui è stato ottenuto il complesso binucleare puro con una resa del 33% (425 mg).

Formula molecolare: $C_{64}H_{84}O_4N_2Pd_2Cl_2$
Massa molecolare: 1229.06 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: 155°C

⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 62.54	H= 6.88	N= 2.28
Sperimentale:	C= 62.38	H= 6.66	N= 2.15

⇒ IR (KBr): ν = 1732 cm^{-1} (C-O), 2923-2851 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ= 8.95 (d, *J*(H,H) = 8.97 Hz, 2H, $H_{1,1'}$), 8.43 (s, 2H, $H_{5,5'}$), 8.40 (d, *J*(H,H) = 8.36 Hz, 2H, $H_{7,7'}$), 7.78 (m, 8H, $H_{4,4',8,8',9,9',10,10'}$), 7.14 (t, *J*(H,H) = 6.98 Hz, 2H, $H_{3,3'}$), 7.05 (t, *J*(H,H) = 7.04 Hz, 2H, $H_{2,2'}$), 4.45 (t, 4H, OCH_2), 1.79 (q, 2H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.30 (m, 52H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.82 (t, *J*(H,H) = 6.54 Hz, 6H, CH_3).

VI.2.3 Preparazione del complesso mononucleare *trans*-[$(HL_1)_2PdCl_2$], 2

Una soluzione di [$Pd(PhCN)_2Cl_2$] (162 mg, 0.211 mmol) in 10 mL di toluene viene addizionata ad una soluzione contenente 2 equivalenti di legante L_1(200 mg, 0.423 mmol) in 15 mL di acetone. Dalla risultante soluzione, che è stata agitata a temperatura ambiente per 24 h, si è formato un solido giallo che è stato filtrato e lavato con acetone. Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 72% (343 mg).

Formula molecolare: $C_{64}H_{86}O_4N_2PdCl_2$
Massa molecolare: 1124.72 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: 160°C

⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 68.34	H= 7.70	N= 2.49
Sperimentale:	C= 68.28	H= 7.38	N= 2.77

⇒ IR (KBr): ν = 1727 cm^{-1} (C-O), 2920-2851 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.95 (dd, J_o(H,H) = 9.97 Hz, J_m(H,H) = 1.52 Hz, 2H, $H_{1, 1'}$), 8.63 (dd, J_o(H,H) = 9.97 Hz, J_m(H,H)= 1.52 Hz, 2H, $H_{4, 4'}$), 8.21 (dd, J_o(H,H) = 8.23 Hz, J_m(H,H) = 1.65 Hz, 4H, $H_{6, 6',10, 10'}$), 7.88 (s, 2H, $H_{5, 5'}$), 7.86 (m, 6H, $H_{7, 7',8, 8',9,9'}$) 7.65 (m, 4H, $H_{2, 2',3, 3'}$) 4.42 (t, 4H, J(H,H) = 6.79 OCH_2), 1.79 (q, 2H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.37 (m, 52H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.82 (t, J(H,H) = 6.54 Hz, 6H, CH_3).

VI.2.4 Preparazione del complesso binucleare a ponte acetato, $[(L_1)Pd(\mu\text{-}OAc)]_2$, 3

Ad una soluzione del legante L_1 (0.3 g, 0.63 mmol) in 10 mL di acido acetico, è stato aggiunto 1 equivalente di palladio acetato (0.141g, 0.63 mmol). La soluzione rossa risultante viene mantenuta sotto agitazione magnetica ad una temperatura di 60 °C per un periodo di 20 h e poi riportata lentamente a temperatura ambiente per 3 h. Il precipitato formatosi è stato filtrato e lavato con etanolo. Il prodotto viene ricristallizzato da cloroformio/metanolo. Il complesso, un solido rosso si ottiene con una resa dell'87% (352 mg).

Formula molecolare: $C_{68}H_{90}O_8N_2Pd_2$
Massa molecolare: 1277.472 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: 78°C

⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 63.93 H= 7.09 N= 2.19
Sperimentale: C= 63.89 H= 7.11 N= 2.16

⇒ IR (KBr): ν = 1565 cm^{-1} (C-O acetato), 1727 cm^{-1} (C-O), 2916-2850 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.57 (d, *J*(H,H) = 8.75 Hz, 2H, H_{1trans}), 8.51 (d, *J*(H,H) = 8.40 Hz, 2H, H_{1cis}), 8.29 (d, *J*(H,H) = 8.40 Hz, 2H, H_{7trans}), 8.18 (d, *J*(H,H) = 7.69 Hz, 2H, H_{7cis}), 7.76 (s, 2H, H_{5trans}), 7.63 (s, 2H, H_{5cis}), 7.55 (t, *J*(H,H) = 7.82 Hz, 2H, H_{8trans}), 7.45 (t, *J*(H,H) = 7.64 Hz, 2H, H_{9trans}), 7.21 (t, *J*(H,H) = 8.50 Hz, 2H, H_{8cis}), 7.13 (t, *J*(H,H) = 8.40 Hz, 2H, H_{9cis}), 6.99 (d, *J*(H,H) = 7.35 Hz, 2H, H_{4cis}), 6.87 (d, *J*(H,H) = 7.70 Hz, 2H, H_{4trans}), 6.80 (m, 4H, $H_{3,10cis}$), 6.68 (t, *J*(H,H) = 7.70 Hz, 2H, H_{2cis}), 6.53 (t, *J*(H,H) = 7,35 Hz, 2H, H_{3trans}), 6.44 (d, *J*(H,H) = 7.82 Hz, 2H, $H_{10trans}$), 6.18 (t, *J*(H,H) = 7.52 Hz, 2H, H_{2trans}), 4.56 (t, *J*(H,H) = 6.76 Hz, 4H, OCH_2 trans), 4.48 (t, *J*(H,H) = 6.47 Hz, 4H, OCH_2 cis), 2.40 (s, 3H, OCH_3 acetate cis), 2.26 (s, 3H, OCH_3 acetate trans), 2.19 (s, 3H, OCH_3 acetate cis), 1.95 (q, 8H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$ cis e trans), 0.87 (t, *J*(H,H) = 6.53 Hz, 12H, CH_3 cis and trans).

VI.2.5 Preparazione del complesso mononucleare [(L_1)Pd(curcumina)], 4

Una sospensione del complesso [(pqc-$C_{16}H_{33}$)-Pd-(μ-OAc)]$_2$, (0.15 g, 0.117 mmol) in 5 mL di metanolo è stata fatta reagire con una soluzione della curcumina purificata (0.087 g, 0.23 mmol) in 15 mL di metanolo. La miscela rossa risultante che via via è diventata sempre più gialla è stata mantenuta in agitazione, a temperatura ambiente per 48 h. Quindi il solido giallo, filtrato e ricristallizzato da metanolo, è stato ottenuto con una resa del 71% (154 mg).

Formula molecolare: $C_{53}\ H_{61}O_8NPd$
Massa molecolare: 946.357 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 186 °C
- ⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 67.30 H= 6.49 N= 1.48
  Sperimentale: C= 67.43 H= 6.80 N= 1.61

- ⇒ IR (KBr): ν = 1507 cm^{-1} (C-C-C), 1625 cm^{-1} (C-O curcumina), 1712 cm^{-1} (C-O), 2920-2850 cm^{-1} (C-H).

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 9.69 (d, 1H, *J*(H,H) = 8.77 Hz, H_1), 8.69 (d, 1H, *J*(H,H) = 7.56 Hz, H_4), 8.26 (s, 1H, H_5), 7.85 (m, 2H, $H_{8,9}$), 7.62 (m, 4H, $H_{3,7,d,d'}$), 7.22 (m, 2H, $H_{2,10}$), 7.07 (m, 4H, $H_{e,e',g,g'}$), 6.92 (d, 2H, *J*(H,H) = 7.73 Hz, $H_{f,f'}$), 6.59 (d, 2H, *J*(H,H) = 15.46 Hz, $H_{c,c'}$), 5.79 (s, 2H, OH), 5.71 (s, 1H, H_b), 4.50 (t, 2H, *J*(H,H) = 6.70 Hz, OCH_2), 3.95 (s, 6H, OCH_3), 1.89 (m, 2H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.41 (m, 26H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.87 (t, 3H, *J*(H,H) = 6.70 Hz, CH_3).

VI.2.6 Preparazione del complesso mononucleare [(L_1)Pd(curc22)], 5

Ad una soluzione della di-docosanoil curcumina (0.1 g, 0.102 mmol) in 15 mL di cloroformio, è stato aggiunto il complesso [(pqc-$C_{16}H_{33}$)-Pd-(μ-OAc)]$_2$, (0.065 g, 0.051 mmol). La soluzione arancio scuro è stata agitata per 4 giorni a temperatura ambiente .
Il precipitato giallo che si è formato è stato filtrato e ricristallizzato de etere etilico. Sono stati ottenuti 0.11 g di prodotto puro, quindi con una resa del 69%.

Formula molecolare: $C_{97}H_{149}O_8NPd$
Massa molecolare: 1563.45 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: 107 °C

⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 74.52 H= 9.60 N= 0.89
Sperimentale: C= 74.21 H= 9.55 N= 1.15

⇒ IR (KBr): ν = 959 cm^{-1} (CH=CH), 1512 cm^{-1} (C-C-C), 1626 cm^{-1} (C-O $curc_{C22}$), 1727 cm^{-1} (C-O), 2919-2850 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 9.69 (d, 1H, *J*(H,H) = 9.00 Hz, H_1), 8.71 (d, 1H, *J*(H,H) = 9.00 Hz, H_4), 8.31 (s, 1H, H_5), 7.87 (m, 2H, $H_{8,9}$), 7.67 (m, 4H, $H_{3,7,\ d,d'}$), 7.27 (m, 2H, $H_{2,\ 10}$), 7.11 (m, 4H, $H_{g,g',e,e'}$), 6.79 (d, 2H, *J*(H,H) = 7.70 Hz, $H_{f,\ f'}$), 6.61 (d, 2H, *J*(H,H) = 15.11 Hz, $H_{c,c'}$), 5.76 (s, 1H, H_b), 4.51 (t, 2H, *J*(H,H) = 6.65 Hz, OCH_2), 4.05 (s, 6H, OCH_3), 3.92 (t, 4H, *J*(H,H) = 5.22 Hz, $OCH_2(CH_2)_{20}CH_3$), 0.87 (t, 9H, CH_3).

VI.2.7 Complesso [(L_1)Pd(trop)], 6

La formazione di questo complesso è avvenuta attraverso una reazione in due stadi. Nel primo stadio è stato sintetizzato un intermedio, che si è formato per reazione tra il complesso binucleare a ponte cloro, $[(L_1)Pd(\mu\text{-}Cl)]_2$, **1**, (70 mg, 0.057 mmol) solubilizzato in 10 mL di acetonitrile e 2 equivalenti di tetrafluoroborato di Ag, $AgBF_4$ (22 mg, 0.114 mmol). La soluzione risultante è stata mantenuta sotto agitazione per 20h a temperatura ambiente ed al buio. Quindi è stata filtrata su celite e la soluzione seccata

a pressione ridotta. Il solido giallo ottenuto (155 mg, 0.207 mmol) è stato sospeso in 12 mL di etanolo per farlo reagire nel secondo stadio con una soluzione di tropolonato di potassio (33 mg, 0.207 mmol) in 3 mL di etanolo. La sospensione di colore giallo è stata mantenuta sotto agitazione magnetica, per 3 giorni e a temperatura ambiente. La sospensione è stata filtrata e ricristallizzata da $CHCl_3$/etanolo. Il prodotto, un solido di colore giallo è stato ottenuto con una resa del 75% (113 mg).

Formula molecolare: $C_{39}H_{47}O_4NPd$
Massa molecolare: 700.145 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 121 °C
- ⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 66.90 H= 6.76 N= 2.00
  Sperimentale: C= 67.3 H= 6.76 N= 2.29

- ⇒ IR (KBr): ν = 1593 cm^{-1} (C-O trop), 1721 cm^{-1} (C-O), 2918-2849 cm^{-1} (C-H)

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 9.47 (d, 1H, *J*(H,H) = 8.95 Hz, H_1), 8.65 (dd, 1H, J_o(H,H) = 8.5 Hz, J_o(H,H) = 1.47 Hz, H_4), 8.21 (s, 1H, H_5), 7.72 (m, 4H, $H_{2,3,7,10}$), 7.39 (m, 5H, $H_{a,b,c,d,e}$), 7.21 (m, 2H, $H_{8,9}$), 6.91 (m, 2H, $H_{2,3}$), 4.47 (t, 2H, *J*(H,H) = 6.75 Hz, OCH_2), 1.86 (m, 2H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.45 (m, 26H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.85 (t, 3H, *J*(H,H) = 6.70 Hz, CH_3).

VI.2.8 Preparazione del legante 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina, HL_2

Ad un eccesso di $SOCl_2$ (10 mL), sotto N_2, sono stati aggiunti 2 g (8.02 mmol) di 2-fenil-4-carbossilatochinolina [pqc]. La miscela ottenuta è stata mantenuta sotto

agitazione, ad una temperatura di 80 °C per circa 24 h, dopodiché la soluzione risultante è stata seccata a pressione ridotta, quindi ricristallizzata da diclorometano.
Il cloruro della 2-fenil-4-carbossilatochinolina ottenuto (2.14 g, 8.02 mmol), di colore giallo, si fa reagire con una soluzione di colesterolo (3.71 g, 9.6 mmol) in 50 mL di toluene.
La sospensione risultante è stata mantenuta sotto agitazione magnetica, prima a 0°C per 30 minuti sotto N_2, poi ad una temperatura di 110°C, sempre sotto N_2 per circa 40 h. La sospensione ottenuta, seccata a pressione ridotta, è stata sciolta in cloroformio, estratta con una soluzione basica di bicarbonato di sodio e ricristallizzata da cloroformio/metanolo. Il precipitato è stato filtrato ottenendo il prodotto, di colore bianco, con una resa dell'85% (4.21 g).

Formula molecolare: $C_{43}H_{55}NO_2$
Massa molecolare: 617.913 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 145°C
- ⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 83.58 H= 8.97 N= 2.26
  Sperimentale C= 83.07 H= 9.23 N= 2.66

- ⇒ IR (KBr): ν = 1713 cm^{-1} (C-OOR), 2941-2866 cm^{-1} (C-H).

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.71 (d, *J*(H,H) = 7.59 Hz, H_1), 8.35 (s, H_5), 8.21 (m, 3H, $H_{6,\ 10,4}$), 7.76 (t, *J*(H,H) = 5.47 Hz, H_3), 7.62 (t, *J*(H,H) = 5.57 Hz, H_2), 7.53 (m, 3H, $H_{7,\ 8,\ 9}$), 5.48 (d, *J*(H,H)= 3.9 Hz, H_c), 5.05 (m, 1H, H_a), 2.58 (d, 2H, *J*(H,H) = 7.81 Hz, $H_{b,b'}$), 0.70-2.09 (m, 41H, H_{colest}).

VI.2.9 Preparazione del complesso binucleare a ponte acetato, $[(L_2)Pd(\mu\text{-}OAc)]_2$, 7

Ad una soluzione del legante L_2 (0.5 g, 0.809 mmol) in 15 mL di acido acetico, è stato addizionato 1 equivalente di palladio (II) acetato (0.181 g, 0.809 mmol). La soluzione rossa risultante è diventata subito una sospensione che è stata mantenuta sotto agitazione e a 60 °C per 48 h. Quindi il precipitato è stato filtrato e lavato con etanolo. Il prodotto è stato poi ricristallizzato da cloroformio/metanolo. Il complesso, un solido rosso è stato ottenuto con una resa dell'90% (570 mg).

Formula molecolare: $C_{90}H_{114}O_8N_2Pd_2$
Massa molecolare: 1564.85 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione:
- ⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 69.07	H= 7.34	N= 1.79
Sperimentale	C= 69.12	H= 7.75	N= 2.03

- ⇒ IR (KBr): ν = 1570 cm^{-1} (C-O acetato), 1726 cm^{-1} (C-O), 2934-2865 cm^{-1} (C-H).

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.54 (d, *J*(H,H) = 6.71 Hz, 2H, H_{1trans}), 8.49 (d, 2H, H_{1cis}), 8.24 (d, *J*(H,H) = 7.33 Hz, 2H, H_{7trans}), 8.12 (d, 2H, H_{7cis}), 7.71 (s, 2H, H_{5trans}), 7.50 (m, 2H, H_{8trans}), 7.42 (m, 2H, H_{9trans}), 7.18 (m, 2H, H_{8cis}), 7.08 (m, 2H, H_{9cis}), 6.85 (d, *J*(H,H) = 7.94 Hz, 2H, H_{4cis}), 6.80 (d, 2H, H_{4trans}), 6.70 (m, 4H, $H_{3,10cis}$), 6.62 (t, 2H, H_{2cis}), 6.53 (m, 2H, H_{3trans}) 6.46 (t, *J*(H,H) = 5.49 Hz, 2H, $H_{10trans}$), 6.22 (m, 2H, H_{2trans}), 5.54 (d, J(H,H)= 7.32 Hz, H_c *trans*), 5.49 (d, 2H, H_c *cis*), 5.09 (m, 2H, H_a *trans*), 5.02 (m, 2H, H_a *cis*), 2.66 (d, 2H, *J*(H,H) = 10.6 Hz, $H_{b,b'}$ *trans*), 2.60 (d, 2H, $H_{b,b'}$ *cis*), 0.70-2.39 (m, 41H, H_{colest}).

VI.2.10 Preparazione del complesso mononucleare [(L_2)Pd(curcumina)], 8

Una sospensione del complesso [(pqc-colest)-Pd-(μ-OAc)]$_2$, (0.15 g, 0.095 mmol) in 5 mL di metanolo è stata fatta reagire con una soluzione della curcumina purificata (0.070 g, 0.191 mmol) in 15 mL di metanolo. La miscela rossa risultante che via via è diventata sempre più gialla è stata agitata, a temperatura ambiente per 48 h. Quindi il solido giallo, filtrato e ricristallizzato da metanolo, è stato ottenuto con una resa del 70% (145 mg).

Formula molecolare: C_{64} $H_{74}O_8NPd$
Massa molecolare: 1091.71 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: cristallo liquido, caratterizzazione in corso

⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 68.16 H= 6.97 N= 1.24
Sperimentale: C= 68.61 H= 6.89 N= 1.52

⇒ IR (KBr): ν = 1508 cm^{-1} (C-C-C), 1626 cm^{-1} (C-O curcumina), 1721 cm^{-1} (C-O), 2948 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz $CDCl_3$): δ 9.67 (d, 1H, *J*(H,H) = 8,54 Hz, H_1), 8.65 (d, 1H, *J*(H,H) = 8.55 Hz, H_4), 8.22 (s, 1H, H_5), 7.85 (m, 2H, $H_{8,9}$), 7.60 (m, 4H, $H_{3,7,d',d''}$), 7.25 (m, 2H, $H_{2,10}$), 7.10 (m, 4H, $H_{e',e'',g',g''}$), 6.93 (d, 2H, *J*(H,H) = 8.85 Hz, $H_{f',f''}$), 6.60 (d, 2H, *J*(H,H) = 15.56 Hz, $H_{c',c''}$), 5.79 (s, 2H, OHcurc), 5.72 (s, 1H, $H_{b''}$), 5.49 (d, J(H,H)= 3.9 Hz, H_c), 5.05 (m, 1H, H_a), 3.95 (s, 6H, OCH_3), 2.60 (d, 2H, *J*(H,H) = 7.80 Hz, $H_{b,b'}$), 0.70-2.25 (m, 41H, H_{colest}).

VI.2.11 Preparazione del complesso mononucleare [(L_2)Pd(curc22)], 9

Ad una soluzione della di-docosanoil curcumina (0.063 g, 0.063 mmol) in 15 mL di cloroformio, è stato aggiunto il complesso [(pqc-colest)-Pd-(μ-OAc)]$_2$, (0.050 g, 0.031 mmol). La soluzione arancio scuro è stata agitata per 3 giorni a temperatura ambiente. Il precipitato giallo che si è formato è stato filtrato e ricristallizzato de etere etilico. Sono stati ottenuti 0.082 g di prodotto puro, quindi con una resa del 75 %.

Formula molecolare: $C_{108}H_{161}O_8NPd$
Massa molecolare: 1707.86 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: cristallo liquido, caratterizzazione in corso

⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 73.62	H= 9.55	N= 0.79
Sperimentale:	C= 73.66	H= 9.65	N= 1.35

⇒ IR (KBr): ν = 962 (CH=CH), 1510 cm^{-1} (C-C-C), 1625 cm^{-1} (C-O curc$_{C22}$), 1721 (C-O), 2918-2850 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz $CDCl_3$): δ 9.67 (d, 1H, *J*(H,H) = 9.00 Hz, H_1), 8.66 (d, 1H, *J*(H,H) = 9.00 Hz, H_4), 8.27 (s, 1H, H_5), 7.88 (m, 2H, $H_{8,9}$), 7.64 (m, 4H, $H_{3,7, d,d'}$), 7.25 (m, 2H, $H_{2, 10}$), 7.13 (m, 4H, $H_{g,g',e,e'}$), 6.99 (d, 2H, *J*(H,H) = 7,70 Hz, $H_{f, f'}$), 6.65 (d, 2H, *J*(H,H) = 15.11 Hz, $H_{c,c'}$), 5.75 (s, 1H, H_b), 5.50 (d, J(H,H)= 3.9 Hz, H_c), 5.05 (m, 1H, H_a), 4.05 (d, 4H, $OCH_2(CH_2)_{20}CH_3$), 3.93 (s, 6H, OCH_3curc), 2.59 (d, 2H, *J*(H,H) = 7.80 Hz, $H_{b,b'}$), 0.70-2.01 (m, 41H, H_{colest}).

VI.2.12 Preparazione del complesso monucleare [(L_2)Pd(trop)], 10

Ad una soluzione del complesso [(pqc-colest)-Pd-(μ-OAc)]$_2$, (0.15 g, 0.095 mmol) in 15 mL di diclorometano, è stato aggiunto il tropolonato di potassio (0.030 g, 0.191 mmol). La soluzione, inizialmente rossa è diventata via via gialla ed è stata pertanto lasciata in agitazione, a temperatura ambiente per 4 giorni. Quindi la soluzione viene filtrata su celite, concentrata e precipitata da etanolo. Il complesso, un solido giallo è stato ottenuto con una resa del 85% (137 mg).

Formula molecolare: $C_{50}H_{60}O_4NPd$
Massa molecolare: 845.44 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione:

⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 71.03	H= 7.15	N= 1.65
Sperimentale:	C= 71.25	H= 6.78	N= 1.01

⇒ IR (KBr): ν =1592 cm^{-1} (C-C-C trop), 1721 cm^{-1} (C-O), 2865-2945 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz $CDCl_3$): δ= 9.47 (d, *J*(H,H) = 8.48 Hz, H_1), 8.65 (d, 1H, *J*(H,H) = 7.36 Hz, H_4), 8.17 (s, 1H, H_5), 7.87 (t, 1H, *J*(H,H) = 5.52, H_8), 7.75 (d, 1H, *J*(H,H) = 8.93 Hz, H_{10}) 7.63 (t, 1H, *J*(H,H) = 7.25 Hz H_9), 7.56 (d, 1H, *J*(H,H) = 9.14 Hz, H_7) 7.39 (m, 4H, $H_{a,a',b,b'}$), 7.20 (m, 2H, $H_{2,3}$), 6.93 (m, 1H, H_c), 5.50 (d, J(H,H)= 3.9 Hz, HC=C_{colest}), 5.05 (m, 1H, HCO_{colest}), 2.58 (d, 2H, *J*(H,H) = 7.80 Hz, H_2CC=C), 0.69-2.13 (m, 41H, H_{colest}).

VI.3 COMPLESSI IONICI DI Pd(II) E Pt(II)

VI.3.1 Preparazione del complesso $[(L_3)Pd(OAc)_2]$, 11

Ad una soluzione incolore della 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina (500 mg, 1.22 mmol), prodotto commerciale, in 20 ml di MeOH è stato aggiunto il $Pd(OAc)_2$. Si è osservata immediatamente la formazione di una soluzione gialla che è stata lasciata sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente per 20 h. Quindi la soluzione è stata filtrata su celite per allontanare eventuale residuo metallico, il solvente rimosso tramite pressione ridotta, ed estratta da cloroformio per allontanare eventuali sali. La fase organica è stata poi anidrificata con solfato di sodio anidro, concentrata e precipitata da esano. Il prodotto, solido giallino è stato ottenuto con una resa dell'80 % circa (610 mg).

Formula molecolare: $C_{32}H_{50}O_4N_2Pd$
Massa molecolare: 633.27 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 181°C.
- ⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 60.69	H= 7.95	N= 4.42
Sperimentale	C= 60.84	H= 7.38	N= 4.28

- ⇒ IR (KBr): ν = 1359 cm^{-1} (asimmCO_2), 1630 cm^{-1} (simmCO_2), 2854-2925 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.07 (d, *J* (H,H)= 5.82 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 7.97 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 7.19 (d, *J*(H,H)= 5.6 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 2,77 (t, 4H, *J*(H,H)= 7.2 Hz $CH_2(CH_2)_7CH_3$), 2.12 (s, 6H, $OCOCH_3$), 1.66 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_6CH_3$), 1.30 (m, 24H, $(CH_2)_6CH_3$), 0.88 (t, *J*(H,H)= 6.5 Hz, 6H, CH_3).

VI.3.2 Preparazione del complesso $[(L_3)Pd(curcumina)]CF_3SO_3$, 12

Il complesso precursore [(4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina)$Pd(OAc)_2$] (150 mg, 0.236 mmol) è stato solubilizzato in 15 mL di metanolo e a questa soluzione è stato aggiunto prima il triflato di potassio (44.57 mg, 0.236 mmol) e poi la curcumina (87.25 mg, 0.236 mmol). La soluzione che è diventata subito rossa, è stata mantenuta sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente per 20 h. Quindi il solvente di reazione è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo sciolto in cloroformio. Questa soluzione è stata filtrata su celite per allontanare eventuali tracce metalliche e curcumina non reagita, dopodiché estratta. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio anidro, concentrata e precipitata da etere di petrolio. Il prodotto, un solido marroncino, è stato ottenuto con una resa del 70 % (170 mg).

Formula molecolare: $C_{50}H_{63}O_9N_2F_3SPd$
Massa molecolare: 1031.53 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: 210°C.

⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 58.21	H= 6.15	N= 2.71
Sperimentale	C= 57.92	H= 6.07	N= 2.26

⇒ IR (KBr): ν = 1278 cm^{-1} (CF_3SO_3), 1509 cm^{-1} (asimC-C-C), 1620 cm^{-1} (simC=O), 2855-2927 cm^{-1} (C-H).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.17 (d, *J* (H,H)= 5.8 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 7.71 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 7.29 (d, *J*(H,H)= 5.1 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 7.05 (s, 2H, Hg,g'), 6.94 (m, 4H, $H_{d,d',e,e'}$), 6.78 (d, *J*(H,H)= 8.19 Hz, 2H, $H_{f,f'}$), 6.17 (d, *J*(H,H)= 15.7 Hz, 2H, $H_{c,c'}$), 5.88 (s, 1H, OH), 5.52 (s, 1H, H_b), 3.91 (s, 6H, OCH_3), 2.33 (t, *J*(H,H)= 7.3 Hz, 4H, $CH_2(CH_2)_7CH_3$), 1.58 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_6CH_3$), 1.20 (m, 24H, $(CH_2)_6CH_3$), 0.90 (t, *J*(H,H)= 6.7 Hz, 6H, CH_3).

VI.3.3 Preparazione del complesso [(L_3)Pd(curcglicosilata)]CF_3SO_3, 13

Il complesso precursore [(4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina)$Pd(OAc)_2$] (70 mg, 0.110 mmol) è stato solubilizzato in 10 mL di metanolo e a questa soluzione è stato aggiunto prima il triflato di potassio (44.57 mg, 0.236 mmol) e poi la curcumina glicosilata (73.46 mg, 0.157 mmol). La soluzione rossa è stata mantenuta sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente per 24 h. Quindi il solvente di reazione è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso da cloroformio, filtrato, lavato con H_2O e asciugato. Il prodotto, un solido marroncino, è stato ottenuto con una resa del 75 % (160 mg).

Formula molecolare: $C_{60}H_{79}O_{19}N_2F_3SPd$
Massa molecolare: 1327.76 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: 252°C

⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 54.27 H= 5.99 N= 2.10
Sperimentale C= 54.22 H= 5.59 N= 1.97

⇒ IR (KBr): ν = 1265 cm^{-1} (CF_3SO_3), 1508 cm^{-1} (asimC-C-C), 1618 cm^{-1} (simC=O), 2855-2926 cm^{-1} (C-H)

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, MeOD): δ= 7.98 (d, *J* (H,H)= 5.5 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 7.91 (d, *J* (H,H)= 15.75 Hz, 2H, $H_{d,d'}$), 7.30 (d, *J*(H,H)= 5.0 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 6.96 (m, 6H, $H_{e,f,g}$) 6,66 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 6.08 (d, *J* (H,H)= 15.95 Hz, 2H, $H_{c,c'}$) 5.40 (s, 1H, H_b), 4.85 (s, 2H, $H_{h,h'}$) 3.99 (d, *J* (H,H)= 10.85 Hz, 2H, $H_{n,n'}$) 3.77 (m, 2H, $H_{n'',n'''}$) 3.52 (m, 4H, $H_{i,i',l,l'}$) 3.30 (s, 4H, $H_{m,m',o,o'}$) 1.56 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_6CH_3$), 1.32 (m, 24H, $(CH_2)_6CH_3$), 0.90 (t, *J*(H,H)= 6.6 Hz, 6H, CH_3).

VI.3.4 Preparazione del legante 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, L_4.

Ad 1 g di 4,4'-dicarbossi-2,2'-bipiridina (4.09 mmol) sono stati aggiunti 90 mL di cloruro di toluene e la miscela è stata tenuta a riflusso a 80°C, sotto N2, finchè è stata ottenuta una soluzione di colore giallo chiaro, contenente il cloruro dell'acido. L'eccesso di cloruro di tionile è stato rimosso e il residuo giallo è stato mantenuto sotto vuoto per circa due ore. A questo punto il cloruro dell'acido, ovvero il residuo giallo, è stato sospeso in toluene (40 mL) ed è stato aggiunto un leggero eccesso di alcol esadecilico. La sospensione risultante è stata mantenuta a riflusso , sotto N2, ad una temperatura di 100°C fino a diventare una soluzione incolore, dopodiché il toluene è stato rimosso e il residuo è stato solubilizzato in cloroformio ed estratto con una soluzione satura di $NaHCO_3$. La fase organica è stata ricristallizzata da metanolo.
Il prodotto, un solido di colore bianco, è stato ottenuto con una resa del 91%.

Formula molecolare: $C_{44}H_{72}N_2O_4$
Massa molecolare: 693.07 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 94°C.
- ⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 76.25 H= 10.47 N= 4.04
  Sperimentale C= 76.18 H= 10.65 N= 3.81

- ⇒ IR (KBr): ν = 1714 cm^{-1} (C=O), 1593 cm^{-1}, 1558 cm^{-1} (C=C, C=N).

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.95 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 8.87 (d, *J*(H,H)= 5.0, 2H, $H_{6,6'}$), 7.91 (dd, *J*(H,H)= 5.0, 2H, $H_{5,5'}$), 4.39 (t, *J*(H,H)= 6.77 Hz, 4H, OCH_2), 1.80 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.34 (m, 52H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.88 (t, *J*(H,H) = 6.1 Hz, 6H, CH_3).

VI.3.5 Preparazione del complesso $[(L_4)Pd(Cl)_2]$, 14

Ad una soluzione incolore di 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina (500 mg, 0.721 mmol) in 20 ml di cloroformio sono stati aggiunti 276.70 mg di palladio(II)dibenzonitrile (0.721 mmol). La soluzione risultante è stata agitata per 5 h a riflusso, quindi il solvente è stato rimosso a pressione ridotta e il residuo sciolto in diclorometano, filtrato su celite, concentrato e precipitato da etere etilico. Il solido giallo che è stato filtrato è stato ottenuto con una resa del 80% (500 mg).

Formula molecolare: $C_{44}H_{72}N_2O_4PdCl_2$
Massa molecolare: 870.38 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 59.03 H= 8.58 N= 3.47
Sperimentale C= 60.42 H= 8.51 N= 3.50

⇒ IR (KBr): ν = 1722 cm^{-1} (C=O), 1616 cm^{-1}, 1557 cm^{-1} (C=C, C=N).

⇒ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 9.51 (d, *J*(H,H) = 5.9 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 8.60 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 8.07 (d, *J*(H,H) = 4.16 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 4.44 (t, *J*(H,H) = 6.77 Hz, 4H, OCH_2), 1.83 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.43 (m, 52H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.85 (t, *J*(H,H) = 6.1 Hz, 6H, CH_3).

VI.3.6 Preparazione del complesso $[(L_4)Pd(trop)]CF_3SO_3$, 15

Ad una soluzione di [(4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina)$PdCl_2$] (80 mg, 0.091 mmol) in 10 mL di diclorometano sono stati aggiunti 2 equivalenti di Ag(OTf) (47.3 mg, 0.184 mmol). La sospensione è stata mantenuta sotto agitazione, a temperatura ambiente per 24 h, al buio. A questo punto l'AgCl che si è formato dalla reazione è stato rimosso per filtrazione su celite e al filtrato è stato aggiunto il tropolonato di potassio (14.7 mg, 0.091 mmol). La risultante miscela di reazione è stata agitata per 4 giorni, a temperatura ambiente, dopodiché filtrata su celite, concentrata e precipitata da esano. Il prodotto, un solido arancione, è stato ottenuto con una resa dell'85% circa (83 mg).

Formula molecolare: $C_{52}H_{77}F_3N_2O_9PdS$
Massa molecolare: 1069.67 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: .240 °C.

⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 58.39 H= 7.26 N= 2.62
Sperimentale C= 58.60 H= 7.46 N= 2.36

⇒ IR (KBr): ν = 1732 cm^{-1} (C=O), 1590 cm^{-1} (trop), 1263 cm^{-1} (OTf).

⇒ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.88 (d, *J*(H,H) = 5.8 Hz, 2H; $H_{6,6'}$), 8.69 (d, *J*(H,H) = 1.7 Hz, 2H, $H_{3,3'}$), 8.29 (dd, J_o(H,H) = 5.7 Hz, J_m(H,H) = 1.6 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 7.56 (t, *J*(H,H) = 10.4 Hz, 2H, $H_{8,8'}$), 7.47 (d, *J*(H,H) = 10.7 Hz, 2H, $H_{7,7'}$), 7.30 (t, *J*(H,H) = 9.6 Hz, 1H, H_9), 4.50 (t, *J*(H,H) = 7.0 Hz, 4H, OCH_2), 1.88 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.38 (m, 52H, $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.90 (t, *J*(H,H) = 6.65 Hz, 6H, CH_3).

VI.3.7 Preparazione del complesso $[(L_4)Pt(Cl)_2]$, 16

Ad una soluzione della 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina (600 mg, 0.865 mmol) in 25 mL di toluene, è stato aggiunto il platinodibenzonitrile (408.83 mg, 0.865 mmol). La soluzione risultante è stata mantenuta in agitazione a riflusso per 16 h e a temperatura ambiente per 20 h circa. Quindi il solvente di reazione è stato rimosso a pressione ridotta e il residuo sciolto in diclorometano e precipitato da etere di petrolio. Il solido giallo scuro è stato filtrato e costituisce il prodotto che è stato ottenuto con una resa del 75% (622 mg).

Formula molecolare: $C_{44}H_{72}N_2O_4PtCl_2$
Massa molecolare: 959.046 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 54.82 H= 7.57 N= 3.01
Sperimentale C= 54.80 H= 6.85 N= 3.13

⇒ IR (KBr): ν = 1725 cm^{-1} (C=O), 1618 $cm^{-}1$, 1558 cm^{-1} (C=C, C=N).

⇒ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 9.82 (d, *J*(H,H) = 5.7 Hz, 2H; $H_{6,6'}$), 8.57 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 8.06 (d, *J*(H,H) = 5.9 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 4.44 (t, *J*(H,H) = 6.79 Hz, 4H, OCH_2), 1.84 (m, 4H; $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.43 (m, 52H; $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.85 (t, *J*(H,H) = 6.7 Hz, 6H, CH_3).

VI.3.8 Preparazione del complesso $[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3$, 17

Due equivalenti di Ag(OTf) (43 mg, 0.166 mmol) sono stati aggiunti ad una soluzione di [(4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina)$PdCl_2$] (80 mg, 0.083 mmol) in 10 mL di diclorometano. La risultante soluzione è stata mantenuta sotto costante agitazione per 24 h, a temperatura ambiente e al buio. L'AgCl precipitato è stato rimosso per filtrazione su celite e il filtrato messo a reagire con il tropolonato di potassio (13 mg, 0.083 mmol) per 4 giorni e a temperatura ambiente. La sospensione è stata filtrata su celite, concentrata e precipitata da esano. Il prodotto, un solido arancione è stato ottenuto con una resa del 60% (58 mg).

Formula molecolare: $C_{52}H_{77}F_3N_2O_9PtS$
Massa molecolare: 1158.33 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: .226 °C.

⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 53.92	H= 6.70	N= 2.42
Sperimentale	C= 52.94	H= 6.62	N= 2.47

⇒ IR (KBr): ν = 1732 cm^{-1} (C=O), 1590 cm^{-1} (trop), 1258 cm^{-1} (OTf).

⇒ ^{1}H NMR (300 MHz): δ=9.12 (d, *J*(H,H) = 5.8 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 8.50 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 8.12 (d, *J*(H,H) = 6.11 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 7.67 (t, *J*(H,H) = 9.98 Hz, 2H, $H_{8,8'}$), 7.53 (d, *J*(H,H) = 10.9 Hz, 2H, $H_{7,7'}$), 7.34 (t, *J*(H,H) = 9.5 Hz, 1H, H_9), 1.86 (m, 4H; $CH_2(CH_2)_{13}CH_3$), 1.45 (m, 52H; $(CH_2)_{13}CH_3$), 0.85 (t, *J*(H,H) = 6.6 Hz, 6H, CH_3).

VI.4 COMPLESSI IONICI E NEUTRI DI Zn(II)

VI.4.1 Preparazione del complesso $[(L_3)Zn(Cl)_2]$, 18

1.5 equiv of $ZnCl_2$ (250 mg, 1.83 mmol) è stato aggiunto ad una soluzione di 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina (500 mg, 1.22 mmol) in 20 mL di diclorometano. La risultante soluzione è stata agitata per 6 giorni a temperatura ambiente, dopodiché filtrata su celite. Il solvente di reazione è stato rimosso sotto pressione ridotta e il prodotto è stato sciolto in cloroformio e precipitato da etere etilico. Il complesso, un solido bianco, è stato ottenuto con una resa del 78% (523 mg).

Formula molecolare: $C_{28}H_{44}N_2ZnCl_2$
Massa molecolare: 544.96 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 150°C.
- ⇒ Analisi elementare: Teorico: C= 61.71 H= 8.14 N= 5.14
  Sperimentale C= 61.31 H= 8.31 N= 5.31

- ⇒ IR (KBr): ν = 1617, 1556 cm^{-1} (C=C, C=N).

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.68 (d, *J*(H,H)= 5.3 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 8.01 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 7.51 (d, *J*(H,H)= 5.3 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 2.83 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_7CH_3$), 1.71 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_6CH_3$), 1.27 (m, 24H, $(CH_2)_6CH_3$), 0.88 (t, *J*(H,H)= 6.6 Hz, 6H, CH_3).

VI.4.2 Preparazione del complesso [(L_3)Zn(trop)]Cl, 19

Ad una soluzione di tropolonato di potassio (29.4 mg, 0.183 mmol) in 5 mL di etanolo è stata aggiunta una soluzione del [(4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina)$Zn(Cl)_2$] (100 mg, 0.183 mmol) in 10 mL di diclorometano. La risultante sospensione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente e sotto N_2 per 4 giorni. Quindi è stata filtrata. I solventi di reazione sono stati poi evaporati a pressione ridotta, il residuo sciolto in etanolo, concentrato e precipitato da esano. Il solido è stato lavato con acqua e asciugato con esano. Il complesso, di colore giallo scuro, è stato ottenuto con una resa del 55% (65 mg).

Formula molecolare: $C_{35}H_{49}N_2O_2ZnCl$
Massa molecolare: 630.53 g mol^{-1}

Caratterizzazione

- ⇒ Punto di fusione: 130°C.
- ⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 66.66	H= 7.83	N= 4.44
Sperimentale	C= 67.19	H= 7.19	N= 4.25

- ⇒ IR (KBr): ν = 1609, 1595 cm^{-1} (C=O) 1514 cm^{-1} (C=C).

- ⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 9.04 (d, *J*(H,H)= 3.3 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 7.93 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 7.48 (d, *J*(H,H)= 4.9 Hz, 2H, $H_{5,5'}$), 7.33 (m, 4H, $H_{7,7',8,8'}$), 6.82 (t, *J* (H,H)= 8.5 Hz, 1H, H_9), 2.78 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_7CH_3$), 1.70 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_6CH_3$), 1.23 (m, 24H, $(CH_2)_6CH_3$), 0.88 (t, *J*(H,H)= 6.6 Hz, 6H, CH_3).

VI.4.3 Preparazione del complesso $[(L_3)Zn(trop)_2]$ 20

Due equivalenti di tropolonato di potassio (58.79 mg, 0.366 mmol) sono stati sciolti in 15 mL di etanolo e un equivalente di [(4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina)$Zn(Cl)_2$] (100 mg, 0.183 mmol) è stato aggiunto. La risultante miscela è stata agitata a 80 °C per 24 h. Quindi la miscela di reazione è stata filtrata e il solvente contenente il prodotto è stato evaporato a pressione ridotta. Il prodotto è stato sciolto in cloroformio, filtrato su celite, concentrato e precipitato da esano, ottenendolo con una resa del 75% (98 mg).

Formula molecolare: $C_{42}H_{54}N_2O_4Zn$
Massa molecolare: 716.29 g mol^{-1}

Caratterizzazione

⇒ Punto di fusione: 170°C.

⇒ Analisi elementare:

Teorico:	C= 70.42	H= 7.60	N= 3.91
Sperimentale	C= 70.05	H= 7.49	N= 4.20

⇒ IR (KBr): ν= 1611, 1592 cm^{-1} (C=O) 1560 cm^{-1} (C=C).

⇒ ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 8.71 (d, *J*(H,H)= 5.1 Hz, 2H, $H_{6,6'}$), 7.87 (s, 2H, $H_{3,3'}$), 7.23 (m, 10H, $H_{5,5',7,7',7'',7''',8,8',8'',8'''}$), 6.68 (t, *J*(H,H)= 8.3 Hz, 2H, $H_{9,9'}$), 2.69 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_7CH_3$), 1.68 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_6CH_3$), 1.37 (m, 24H, $(CH_2)_6CH_3$), 0.86 (t, *J*(H,H)= 6.1 Hz, 6H, CH_3).

VI.5 ATTIVITA' BIOLOGICA

VI.5.1 Citotossicità e inibizione della crescita

5 x 10^3 cellule sono state piastrate in ciascun pozzetto di una piastra 96-pozzetti. Dopo il trattamento con i farmaci (72 ore) 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) e fenazina etosolfato (PES). Le piastre sono state incubate a 37°C in 5% CO_2 per 2 h, e la bioriduzione del colorante è stata quantificata per lettura a 490 nm. La citotossicità dei farmaci è stata espressa come percentuale del valore dell'assorbanza dei campioni rispetto ai controlli. Il valore della IC_{50} 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 ± SD di tre esperimenti.
L'inibizione della crescita delle cellule è stata valutata seguendo una curva di crescita utilizzando il test dell'esclusione del trypan blue.

VI.5.2 Analisi dell'apoptosi attraverso citofluorimetro o FACS e potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_{mt}$)

Per l'analisi dell'apoptosi le cellule che sono state incubate con la curcumina purificata e il complesso **11** in concentrazioni pari al loro IC_{50}, dopo 48 h e 72 h sono state fissate in etanolo freddo e lasciate per 1 h a -20°C. Dopo lavaggio le cellule sono state risospese in PBS contenente 50Unità/ml di RNAsi e 50 μg/ml di ioduro di propizio e incubate 1 h al buio a temperatura ambiente. La presenza di un quantificabile picco nella fase sub-G1, corrispondente alla luce rossa fluorescente emessa dal nucleo sub-

diploide delle cellule, ha permesso di calcolare l'evento apoptotico e i risultati vengono espressi come percentuale della morte attraverso apoptosi indotta dal trattamento.
L'analisi è stata effettuata al citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson, CA) usando il software CellQuest e ModFit.
Alterazioni nel ΔΨmt sono state analizzate attraverso citofluorimetro usando il ΔΨmt–sensitive dye JC1 (5,5'6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide; Molecular Probes). Dopo trattamento le cellule sono state raccolte, lavate una volta e risospese in PBS 1x, incubate con 1μM JC1 a 37°C per 10 minuti. Le cellule trattate sono state quindi lavate una volta in PBS 1x e analizzate al citofluorimetro. Il citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA), è stato utilizzato per analizzare un minimo di 10000 cellule per campione. I dati acquisiti sono stati valutati usando CellQuest software package (Becton Dickinson).

VI.5.3 Determinazione del glutatione

Il glutatione intracellulare è stato rilevato mediante formazione di derivati scarboximetilici di tioli liberi per reazione con acido iodoacetico, seguito dalla conversione di gruppi amminici liberi a derivati 2,4-dinitrofenilici attraverso reazione con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. I dati sono espressi come nmoli di GSH/mg proteine.

VI.5.4 Analisi dei ROS e analisi del danno ossidativo al DNA

Per analizzare il contenuto dei ROS, prima è stata verificata attraverso il test del trypan blue la vitalità delle cellule trattate con la curcumina pura e il complesso **11** e poi le cellule sono state incubate con 4mM di diidroetidio (Molecular Probes, Eugene, OR) per 45 minuti a 37°C. Dopo incubazione le cellule sono state analizzate al citofluorimetro. La produzione dei ROS è stata valutata 12, 24 e 48 h dopo il

trattamento con la curcumina pura e il complesso **11**. Come controllo interno dei ROS le cellule DU 145 sono state trattate con 15mM di H_2O_2 per 1 h. Le cellule non trattate e quelle trattate con H_2O_2 sono state analizzate per la produzione di ROS nello stesso modo che è stato descritto.

Un kit Biotrin OxyDNA Assay (Biotrin International Ltd, Ireland) è stato usato per valutare il danno ossidativo al DNA. Usando il kit le cellule possono essere analizzate usando il FACScan o la microscopia fluorescente. Quindi, dopo aver fissato e permeabilizzato le cellule DU 145 è stata aggiunta la proteina marcata FITC e il legame all' 8-oxoguanina dell'8-oxoguanosina nel DNA ossidato risulta. Attraverso questo metodo la presenza del DNA ossidato è indicato da una fluorescenza verde/gialla.

VI.5.5 Western blotting

Le cellule lisate sono state ottenute risospendendole in buffer contenente l'1% di triton, 0,1% di SDS, 2 mM di $CaCl_2$, 100 μg/ml di fenilmetil sulfonil fluoruro. Il contenuto di proteine è stato determinato usando il kit Protein Assay Kit 2 (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA). 30 μg di proteine sono state sottoposte ad elettroforesi in gel SDS-poliacrilamide al 10% ed elettrotrasportate alla membrana di nitrocellulosa (Amersham biosciences, Piscataway, NJ, USA), dove sono state bloccate tutta la notte con 10mM di Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 (TBS-T) contenente il 5% di latte privo di grassi. La membrana è stata poi incubata con 1μg/ml di anticorpi primari in TBS-T [PARP (clone C2-10, BD PharMingen), p-JNK (clone G7, Santa Cruz Biotechnology), GSTp (Calbiochem San Diego, CA USA), Bax (BD PharMingen), Bcl-2 (clone 124, DakoCytomation), Caspase 3 (Alexis, Switzerland), β-actin (clone Ac-15, Abcam)] e con specifici anticorpi secondari perossidasi-coniugati di rafano in TBS-T.

Le bande relative alle proteine sono state visualizzate usando un sistema di rilevazione chemiluminescente (Amersham biosciences, Piscataway, NJ, USA).

VI.6 RACCOLTA DEI DATI DI DIFFRAZIONE

VI.6.1 Selezione e montaggio del cristallo

Prima di iniziare l'analisi diffrattometrica i cristalli vengono analizzati al microscopio per selezionare il cristallo con le caratteristiche dovute, e cioè con le dimensioni adeguate, omogeneità interna e assenza di geminazione. Dopo aver selezionato il cristallo si passa alla fase di montaggio.
Il cristallo viene incollato, con la colla acrilica, su capillare di vetro, di diametro di circa 10 mm più piccolo delle dimensioni del cristallo. Il capillare viene poi inserito in un tubicino di ottone, che contiene, nello spazio vuoto, della cera, e viene immobilizzato mediante l'uso ulteriore di colla. Il tubicino viene inserito nella testina goniometrica e quest'ultima è montata sul goniometro del diffrattometro.

VI.6.2 Il diffrattometro

L'analisi diffrattometrica è stata eseguita mediante l'utilizzo di un diffrattometro di nuova generazione con area detector X8 APEX della Bruker AXS.
Il diffrattometro è costituito da una sorgente di raggi X, un goniometro a geometria kappa (pseudo 4 cerchi), un monocromatore, un collimatore del raggio incidente, un rivelatore area detector bidimensionale ad alta risoluzione.

VI.6.3 Riduzione dei dati

I dati delle intensità raccolte sono corretti per effetto di Lorenz e di polarizzazione e resi leggibili per SHELXTL-NT, utilizzando i file di output, contenenti i valori degli indici

h, k, l, e le relative intensità per svolgere i calcoli di determinazione strutturale. Il numero dei riflessi raccolti viene riportato nelle tabelle.

Il file di output della riduzione dei dati fornisce anche una lista delle assenze sistematiche proprie di ogni struttura. Mediante l'analisi delle assenze si risale al gruppo spaziale in cui ogni composto cristallizza avvalendosi dell'International Tables for X-ray crystallography, che contiene tutte le assenze sistematiche caratteristiche di ogni gruppo spaziale. Il gruppo spaziale può essere determinato anche automaticamente utilizzando il programma XPREP, il quale legge i file di output di XSCANS e richiede semplicemente la formula minima del composto per la creazionedel file di input per SHELXTL-NT. Nelle tabelle vengono riportati tutti i dati cristallografici ed i parametri di raccolta relativi ad ogni composto.

VI.6.4 Risoluzione ed affinamento della struttura

Le coordinate degli atomi pesanti sono state calcolate mediante la subroutine PATT dal programma XS, che fornisce la mappa vettoriale di Patterson.

Una volta nota la posizione dell'atomo pesante ne sono state affinate le coordinate e sono stati calcolati i fattori di struttura F_c. Tutti gli altri atomi presenti sono stati individuati, utilizzando il programma XLS, mediante la mappa di Fourier differenza.

Le coordinate sono state affinate mediante il metodo dei minimi quadrati. Dopo aver inserito tutti gli atomi e averne affinato le coordinate, sono stati rieffettuati tutti i calcoli utilizzandi i file degli h, k,l. Tutti gli atomi del composto analizzato sono stati ulteriormente affinati come anisotropi, con i vari cicli dei minimi quadrati. Gli atomi di idrogeno sono stati aggiunti in posizione calcolata.

A tutti gli atomi di idrogeno è stato assegnato un fattore di temperatura isotropo, calcolato come 1.2 volte quello dell'atomo a cui ciascun atomo di idrogeno è legato. Infine, è stato inserito un fattore di pesatura **w** che ha permesso di calcolare i pesi individuali di ogni riflesso secondo l'equazione:

$$W= 1/\sigma^2 (F_0) + (aP)^2 + bP$$

Dove P è pari a $[2F_c + Max (F_0^2, 0)/3]$

L'affinamento delle coordinate minimizza la seguente espressione:

$$R= \Sigma | \ | Fo | - | Fc | \ | / | Fo|$$

Dove il valore di R è l'indice di accordo tra i fattori di struttura calcolati | **Fc** | e osservati | **Fo** |. I valori di R, Rw ed S ottenuti a convergenza per ogni composto sono riportati nelle tabelle dove Rw e S sono così definiti.

$$Rw = \{\Sigma[w (Fo^2 - Fc^2)^2] / \Sigma [w (Fo)^2]\}^{1/2}$$

$$S = \{\Sigma[w (Fo^2 - Fc^2)^2] / (No/Np)\}^{1/2}$$

La risoluzione e l'affinamento della struttura è stata effettuata con il programma SHELXTL-NT che ha permesso di ottenere direttamente i dati finali di ogni struttura: coordinate atomiche, angoli e distanze di legame, nonchè disegni costruiti utilizzando il programma XP medante la visualizzazione sul terminale grafico a colori delle molecole e la riproduzione da stampante laser.

Tabella IV.1 Parametri di raccolta e dati cristallografici del complesso 2

Empirical formula	C64 H86 Cl2 N2 O4 Pd
Formula weight	1124.65
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71073 A
Crystal system, space group	Triclinic, P-1
Unit cell dimensions	a = 8.0938(8) A alpha = 85.300(4) deg. b = 9.3585(9) A beta = 82.949(4) deg. c = 21.3501(19) A gamma = 71.520(4) deg.
Volume	1520.6(2) A^3
Z, Calculated density	1, 1.228 Mg/m^3
Absorption coefficient	0.439 mm^-1
F(000)	596
Crystal size	? x ? x ? mm
Theta range for data collection	1.92 to 26.37 deg.
Limiting indices	-10<=h<=10, -11<=k<=11, -26<=l<=26
Reflections collected / unique	29084 / 6194 [R(int) = 0.0495]

Completeness to theta = 26.37	99.6 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	6194 / 0 / 331
Goodness-of-fit on F^2	1.071
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0466, wR2 = 0.1124
R indices (all data)	R1 = 0.0725, wR2 = 0.1299
Largest diff. peak and hole	0.431 and -0.422 e.A^-3

Tabella IV.2 Coordinate atomiche (Å x 10^4) e fattore termico isotropo equivalente (Å^2 x 10^3) per il complesso 2.

	x	y	z	U(eq)
Pd	5000	5000	5000	39(1)
N(1)	4885(3)	6881(3)	5441(1)	40(1)
O(2)	7076(4)	10007(3)	6703(1)	84(1)
O(1)	4175(5)	10976(4)	6926(2)	108(1)
Cl(1)	6766(1)	3613(1)	5751(1)	58(1)
C(1)	6015(4)	7678(3)	5221(1)	40(1)
C(2)	6973(4)	7391(3)	4623(2)	46(1)
C(3)	8088(5)	8169(4)	4394(2)	56(1)
C(4)	8292(5)	9291(4)	4745(2)	54(1)
C(5)	7405(4)	9607(4)	5319(2)	50(1)
C(6)	6250(4)	8795(3)	5589(2)	42(1)
C(7)	5288(5)	9043(4)	6185(2)	52(1)
C(8)	4119(5)	8279(4)	6376(2)	55(1)
C(9)	3911(4)	7201(3)	5999(2)	45(1)
C(10)	2589(5)	6418(4)	6214(2)	53(1)
C(11)	2616(6)	5677(5)	6796(2)	85(1)
C(12)	1339(8)	4976(6)	7003(2)	102(2)
C(13)	41(6)	5069(6)	6639(3)	87(1)
C(14)	0(5)	5793(5)	6067(2)	73(1)
C(15)	1262(5)	6480(4)	5842(2)	59(1)
C(16)	5444(7)	10130(5)	6643(2)	71(1)
C(17)	7345(8)	11008(5)	7138(3)	124(2)
C(18)	8999(6)	10400(6)	7375(2)	90(1)
C(19)	9474(7)	11341(6)	7809(2)	99(2)
C(20)	11082(7)	10798(7)	8091(3)	112(2)

C(21)	11652(7)	11737(6)	8479(2)	94(2)
C(22)	13285(7)	11261(7)	8742(3)	137(3)
C(23)	13900(7)	12173(6)	9108(2)	101(2)
C(24)	15526(8)	11715(8)	9369(4)	147(3)
C(25)	16132(7)	12612(6)	9742(2)	103(2)
C(26)	17741(8)	12172(8)	10016(4)	145(3)
C(27)	18352(7)	13049(6)	10387(3)	113(2)
C(28)	19940(8)	12630(7)	10669(3)	140(3)
C(29)	20567(8)	13477(7)	11034(3)	121(2)
C(30)	22140(8)	13055(7)	11333(3)	135(2)
C(31)	22800(9)	13929(8)	11662(4)	160(3)
C(32)	24345(9)	13486(10)	11970(4)	182(4)

Il fattore termico isotropo equivalente U (eq) è definito come 1/3 del tensore ortogonalizzato U_{ij}.

Tabella IV.3 Distanze [Å] ed angoli di legame [deg] per il complesso 2

Pd-N(1)#1	2.035(2)
Pd-N(1)	2.035(2)
Pd-Cl(1)	2.3115(8)
Pd-Cl(1)#1	2.3115(8)
N(1)-C(9)	1.344(4)
N(1)-C(1)	1.372(4)
O(2)-C(16)	1.310(5)
O(2)-C(17)	1.453(5)
O(1)-C(16)	1.208(5)
C(1)-C(2)	1.410(4)
C(1)-C(6)	1.428(4)
C(2)-C(3)	1.354(5)
C(3)-C(4)	1.401(5)
C(4)-C(5)	1.346(5)
C(5)-C(6)	1.424(4)
C(6)-C(7)	1.404(5)
C(7)-C(8)	1.363(5)
C(7)-C(16)	1.509(5)
C(8)-C(9)	1.403(4)
C(9)-C(10)	1.488(5)
C(10)-C(11)	1.371(5)
C(10)-C(15)	1.396(5)
C(11)-C(12)	1.402(6)
C(12)-C(13)	1.359(6)
C(13)-C(14)	1.346(6)
C(14)-C(15)	1.391(5)
C(17)-C(18)	1.417(6)
C(18)-C(19)	1.490(5)
C(19)-C(20)	1.427(6)
C(20)-C(21)	1.464(6)

C(21)-C(22)	1.423(6)
C(22)-C(23)	1.437(6)
C(23)-C(24)	1.418(7)
C(24)-C(25)	1.431(6)
C(25)-C(26)	1.420(7)
C(26)-C(27)	1.418(6)
C(27)-C(28)	1.414(6)
C(28)-C(29)	1.394(6)
C(29)-C(30)	1.423(7)
C(30)-C(31)	1.383(7)
C(31)-C(32)	1.414(7)
N(1)#1-Pd-N(1)	180.00(12)
N(1)#1-Pd-Cl(1)	92.48(7)
N(1)-Pd-Cl(1)	87.52(7)
N(1)#1-Pd-Cl(1)#1	87.52(7)
N(1)-Pd-Cl(1)#1	92.48(7)
Cl(1)-Pd-Cl(1)#1	180.000(1)
C(9)-N(1)-C(1)	119.8(2)
C(9)-N(1)-Pd	119.9(2)
C(1)-N(1)-Pd	119.5(2)
C(16)-O(2)-C(17)	116.2(4)
N(1)-C(1)-C(2)	119.6(3)
N(1)-C(1)-C(6)	121.3(3)
C(2)-C(1)-C(6)	119.0(3)
C(3)-C(2)-C(1)	120.8(3)
C(2)-C(3)-C(4)	120.4(3)
C(5)-C(4)-C(3)	121.0(3)
C(4)-C(5)-C(6)	120.9(3)
C(7)-C(6)-C(5)	124.5(3)
C(7)-C(6)-C(1)	117.6(3)
C(5)-C(6)-C(1)	117.9(3)
C(8)-C(7)-C(6)	119.4(3)

C(8)-C(7)-C(16)	116.4(3)
C(6)-C(7)-C(16)	124.2(3)
C(7)-C(8)-C(9)	121.3(3)
N(1)-C(9)-C(8)	120.5(3)
N(1)-C(9)-C(10)	119.7(3)
C(8)-C(9)-C(10)	119.8(3)
C(11)-C(10)-C(15)	119.0(4)
C(11)-C(10)-C(9)	120.1(3)
C(15)-C(10)-C(9)	120.8(3)
C(10)-C(11)-C(12)	119.8(4)
C(13)-C(12)-C(11)	120.3(4)
C(14)-C(13)-C(12)	120.4(4)
C(13)-C(14)-C(15)	120.8(4)
C(14)-C(15)-C(10)	119.6(4)
O(1)-C(16)-O(2)	125.4(4)
O(1)-C(16)-C(7)	122.0(4)
O(2)-C(16)-C(7)	112.6(4)
C(18)-C(17)-O(2)	111.3(4)
C(17)-C(18)-C(19)	116.9(4)
C(20)-C(19)-C(18)	121.0(5)
C(19)-C(20)-C(21)	122.3(5)
C(22)-C(21)-C(20)	123.9(5)
C(21)-C(22)-C(23)	125.0(5)
C(24)-C(23)-C(22)	125.6(5)
C(23)-C(24)-C(25)	125.8(6)
C(26)-C(25)-C(24)	126.8(5)
C(27)-C(26)-C(25)	127.3(6)
C(28)-C(27)-C(26)	128.2(6)
C(29)-C(28)-C(27)	129.1(6)
C(28)-C(29)-C(30)	129.6(6)
C(31)-C(30)-C(29)	129.1(6)
C(30)-C(31)-C(32)	128.5(7)

Tabella IV.4 Fattori termici anisotropi (Å^2 x 10^3) per il complesso 2

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Pd	43(1)	29(1)	51(1)	-3(1)	-15(1)	-17(1)
N(1)	43(2)	31(1)	51(2)	-3(1)	-14(1)	-16(1)
O(2)	105(2)	72(2)	95(2)	-20(2)	-52(2)	-36(2)
O(1)	126(3)	103(3)	103(2)	-59(2)	-15(2)	-31(2)
Cl(1)	67(1)	45(1)	71(1)	3(1)	-34(1)	-19(1)
C(1)	37(2)	29(2)	58(2)	-2(1)	-17(2)	-12(1)
C(2)	52(2)	36(2)	58(2)	-8(1)	-9(2)	-20(2)
C(3)	54(2)	52(2)	68(2)	-5(2)	-4(2)	-26(2)
C(4)	45(2)	45(2)	83(3)	1(2)	-15(2)	-26(2)
C(5)	48(2)	38(2)	73(2)	-4(2)	-25(2)	-20(2)
C(6)	44(2)	32(2)	55(2)	-3(1)	-21(2)	-13(1)
C(7)	64(2)	36(2)	61(2)	-7(2)	-23(2)	-16(2)
C(8)	65(2)	50(2)	50(2)	-9(2)	-5(2)	-19(2)
C(9)	50(2)	38(2)	51(2)	0(1)	-12(2)	-15(2)
C(10)	56(2)	44(2)	61(2)	-7(2)	-4(2)	-19(2)
C(11)	101(4)	108(4)	68(3)	19(3)	-18(2)	-65(3)
C(12)	126(5)	120(4)	77(3)	20(3)	0(3)	-73(4)
C(13)	72(3)	93(3)	104(4)	-9(3)	14(3)	-45(3)
C(14)	48(2)	63(3)	110(4)	-9(2)	-8(2)	-17(2)
C(15)	49(2)	45(2)	83(3)	-2(2)	-11(2)	-14(2)
C(16)	106(4)	53(2)	64(2)	-13(2)	-26(3)	-29(2)
C(17)	184(6)	75(3)	135(4)	-24(3)	-109(4)	-34(4)
C(18)	95(4)	105(4)	94(3)	-31(3)	-24(3)	-52(3)
C(19)	139(5)	94(3)	90(3)	-10(3)	-63(3)	-52(3)
C(20)	93(4)	130(5)	137(4)	-53(4)	-37(3)	-48(3)
C(21)	122(4)	96(3)	85(3)	-11(3)	-52(3)	-46(3)
C(22)	99(4)	150(6)	189(6)	-79(5)	-51(4)	-45(4)

C(23)	124(5)	99(4)	95(3)	-16(3)	-56(3)	-37(3)
C(24)	97(4)	157(6)	212(7)	-88(5)	-57(5)	-38(4)
C(25)	119(4)	105(4)	99(4)	-24(3)	-55(3)	-31(3)
C(26)	98(4)	152(6)	208(7)	-75(5)	-60(5)	-40(4)
C(27)	121(5)	107(4)	123(4)	-28(3)	-67(4)	-25(3)
C(28)	103(5)	135(5)	202(7)	-56(5)	-70(5)	-36(4)
C(29)	122(5)	117(4)	134(5)	-39(4)	-73(4)	-19(4)
C(30)	99(4)	132(5)	192(7)	-57(5)	-60(4)	-31(4)
C(31)	144(6)	163(6)	185(7)	-69(5)	-93(5)	-22(5)
C(32)	131(6)	224(9)	212(8)	-67(7)	-85(6)	-46(6)

I fattori termici anisotropi hanno la forma:

-2 pi^2 [h^2 a*^2 U11 + ... + 2 h k a* b* U12]

Tabella IV.5 Coordinate atomiche (Å x 10^4) e fattori termici isotropi degli atomi di idrogeno (Å^2 x 10^3) per il complesso 2.

	x	y	z	U(eq)
H(2A)	6838	6658	4382	55
H(3A)	8722	7957	4000	67
H(4A)	9051	9826	4580	65
H(5A)	7548	10365	5542	59
H(8A)	3447	8476	6763	65
H(11A)	3480	5640	7052	103
H(12A)	1381	4444	7392	122
H(13A)	-824	4630	6786	104
H(14A)	-883	5834	5819	88
H(15A)	1223	6978	5447	71
H(17A)	7269	11977	6923	148
H(17B)	6429	11169	7488	148
H(18A)	9891	10192	7018	108
H(18B)	9041	9443	7595	108
H(19A)	9461	12281	7579	119
H(19B)	8538	11588	8151	119
H(20A)	12005	10464	7750	135
H(20B)	11045	9905	8350	135
H(21A)	11617	12656	8227	113
H(21B)	10753	12024	8831	113
H(22A)	14177	10937	8390	165
H(22B)	13298	10361	9004	165
H(23A)	13877	13076	8846	121
H(23B)	13009	12492	9460	121
H(24A)	16418	11413	9016	177
H(24B)	15558	10802	9624	177
H(25A)	16114	13517	9482	124

H(25B)	15226	12928	10089	124
H(26A)	17760	11264	10273	174
H(26B)	18646	11859	9667	174
H(27A)	18340	13952	10127	136
H(27B)	17437	13372	0732	136
H(28A)	19946	11729	10929	168
H(28B)	20851	12302	10324	168
H(29A)	19637	13834	11370	146
H(29B)	20595	14362	10767	146
H(30A)	22071	12219	11624	162
H(30B)	23065	12627	11003	162
H(31A)	21865	14382	11983	192
H(31B)	22907	14748	11367	192
H(32A)	24465	14344	12155	273
H(32B)	25339	13084	11670	273
H(32C)	24280	12729	12296	273

Tabella IV.6 Angoli di torsione [deg] per il complesso 2

N(1)#1-Pd-N(1)-C(9)	61(100)
Cl(1)-Pd-N(1)-C(9)	-73.8(2)
Cl(1)#1-Pd-N(1)-C(9)	106.2(2)
N(1)#1-Pd-N(1)-C(1)	-129(100)
Cl(1)-Pd-N(1)-C(1)	95.7(2)
Cl(1)#1-Pd-N(1)-C(1)	-84.3(2)
C(9)-N(1)-C(1)-C(2)	-177.0(3)
Pd-N(1)-C(1)-C(2)	13.6(4)
C(9)-N(1)-C(1)-C(6)	3.3(4)
Pd-N(1)-C(1)-C(6)	-166.2(2)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	179.5(3)
C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	-0.7(5)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.8(5)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	0.8(5)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	0.8(5)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	179.4(3)
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	-2.3(5)
N(1)-C(1)-C(6)-C(7)	0.4(4)
C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	-179.4(3)
N(1)-C(1)-C(6)-C(5)	-178.0(3)
C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	2.2(4)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	175.0(3)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	-3.3(5)
C(5)-C(6)-C(7)-C(16)	-4.5(5)
C(1)-C(6)-C(7)-C(16)	177.2(3)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	2.8(5)
C(16)-C(7)-C(8)-C(9)	-177.7(3)
C(1)-N(1)-C(9)-C(8)	-3.9(4)
Pd-N(1)-C(9)-C(8)	165.5(2)
C(1)-N(1)-C(9)-C(10)	175.4(3)

Pd-N(1)-C(9)-C(10)	-15.2(4)
C(7)-C(8)-C(9)-N(1)	0.9(5)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-178.4(3)
N(1)-C(9)-C(10)-C(11)	126.2(4)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-54.5(5)
N(1)-C(9)-C(10)-C(15)	-56.7(4)
C(8)-C(9)-C(10)-C(15)	122.6(4)
C(15)-C(10)-C(11)-C(12)	1.1(7)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	178.3(4)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-2.2(8)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	2.2(8)
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-1.1(7)
C(13)-C(14)-C(15)-C(10)	0.0(6)
C(11)-C(10)-C(15)-C(14)	-0.1(5)
C(9)-C(10)-C(15)-C(14)	-177.2(3)
C(17)-O(2)-C(16)-O(1)	-1.5(7)
C(17)-O(2)-C(16)-C(7)	-179.6(4)
C(8)-C(7)-C(16)-O(1)	-43.7(6)
C(6)-C(7)-C(16)-O(1)	135.8(4)
C(8)-C(7)-C(16)-O(2)	134.5(4)
C(6)-C(7)-C(16)-O(2)	-46.0(5)
C(16)-O(2)-C(17)-C(18)	154.9(5)
O(2)-C(17)-C(18)-C(19)	177.8(5)
C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	177.5(6)
C(18)-C(19)-C(20)-C(21)	175.0(5)
C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	-176.8(7)
C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	178.0(6)
C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	-179.7(7)
C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-179.0(7)
C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	179.0(8)
C(24)-C(25)-C(26)-C(27)	-179.8(8)
C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	179.4(8)

C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	179.7(8)
C(27)-C(28)-C(29)-C(30)	178.2(8)
C(28)-C(29)-C(30)-C(31)	175.7(9)
C(29)-C(30)-C(31)-C(32)	178.3(9)

Tabella IV.7 Parametri di raccolta e dati cristallografici del complesso 3

Empirical formula	$C_{69}H_{91}Cl_3N_2O_8Pd_2$
Formula weight	1395.59
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71073 A
Crystal system, space group	Triclinic, P-1
Unit cell dimensions	a = 8.6063(9) A alpha = 83.831(4) deg. b = 10.3547(11) A beta = 85.987(4) deg. c = 38.458(4) A gamma = 86.200(4) deg.
Volume	3393.1(6) A^3
Z, Calculated density	2, 1.366 Mg/m^3
Absorption coefficient	0.702 mm^-1
F(000)	1452
Crystal size	0.28 x 0.12 x 0.022 mm
Theta range for data collection	1.60 to 25.37 deg.
Limiting indices	-10<=h<=8, -8<=k<=12, -46<=l<=41
Reflections collected / unique	34250 / 12163 [R(int) = 0.0648]

Completeness to theta = 25.37	97.4 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	12163 / 0 / 752
Goodness-of-fit on F^2	1.008
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0597, wR2 = 0.1191
R indices (all data)	R1 = 0.1339, wR2 = 0.1428
Largest diff. peak and hole	0.628 and -0.804 e.A^-3

Tabella IV.8 Coordinate atomiche (Å x 10^4) e fattore termico isotropo equivalente (Å^2 x 10^3) per il complesso 3

	x	y	z	U(eq)
Pd(1)	6731(1)	11510(1)	3802(1)	42(1)
Pd(2)	3983(1)	10142(1)	4028(1)	44(1)
N(1)	8006(6)	10131(5)	3524(1)	43(1)
N(2)	2639(6)	10629(5)	3605(1)	47(1)
O(1)	10950(8)	6704(8)	2822(2)	148(3)
O(2)	8482(7)	6854(5)	2690(1)	89(2)
O(3)	923(8)	12848(5)	2451(1)	93(2)
O(4)	887(6)	10727(5)	2397(1)	77(2)
O(5)	7165(5)	10852(4)	4338(1)	49(1)
O(6)	5284(5)	9409(4)	4432(1)	54(1)
O(7)	5548(5)	13038(4)	4016(1)	54(1)
O(8)	3614(5)	11877(4)	4298(1)	48(1)
C(1)	6110(7)	12115(6)	3336(2)	48(2)
C(2)	5107(8)	13220(7)	3246(2)	64(2)
C(3)	4673(9)	13494(8)	2905(2)	74(2)
C(4)	5231(10)	12710(8)	2644(2)	80(2)
C(5)	6185(9)	11631(8)	2733(2)	66(2)
C(6)	6611(8)	11331(6)	3075(2)	51(2)
C(7)	7620(7)	10200(6)	3189(2)	46(2)
C(8)	8161(8)	9204(7)	2975(2)	57(2)
C(9)	9109(8)	8200(7)	3098(2)	56(2)
C(10)	9590(8)	8114(6)	3444(2)	53(2)
C(12)	9520(7)	9121(6)	3988(2)	53(2)
C(11)	9010(7)	9134(6)	3649(2)	46(2)
C(13)	10489(8)	8124(7)	4122(2)	64(2)
C(14)	10984(9)	7101(7)	3928(2)	75(2)
C(15)	10566(8)	7087(7)	3599(2)	67(2)

C(16)	9648(11)	7167(9)	2858(2)	83(3)
C(17)	8714(11)	5745(8)	2481(2)	97(3)
C(18)	8315(10)	6137(7)	2126(2)	74(2)
C(19)	8246(9)	4957(7)	1917(2)	71(2)
C(20)	7858(9)	5301(7)	1542(2)	70(2)
C(21)	7685(9)	4112(6)	1345(2)	66(2)
C(22)	7333(9)	4441(7)	967(2)	67(2)
C(23)	7148(9)	3257(7)	776(2)	70(2)
C(24)	6808(9)	3564(7)	395(2)	67(2)
C(25)	6574(9)	2385(7)	206(2)	69(2)
C(26)	6251(10)	2666(7)	-177(2)	71(2)
C(27)	6022(10)	1476(7)	-362(2)	74(2)
C(28)	5725(9)	1747(7)	-743(2)	70(2)
C(29)	5490(10)	558(7)	-926(2)	80(2)
C(30)	5206(10)	810(7)	-1313(2)	76(2)
C(31)	4972(12)	-387(8)	-1486(2)	96(3)
C(32)	4698(13)	-124(10)	-1872(2)	129(4)
C(33)	4532(7)	8606(6)	3778(2)	47(2)
C(34)	5391(8)	7491(6)	3902(2)	59(2)
C(35)	5774(9)	6529(7)	3683(2)	73(2)
C(36)	5314(9)	6661(7)	3346(2)	73(2)
C(37)	4440(8)	7757(7)	3217(2)	62(2)
C(38)	4024(7)	8733(6)	3438(2)	48(2)
C(39)	3021(7)	9873(6)	3346(2)	45(2)
C(40)	2418(8)	10215(6)	3011(2)	57(2)
C(41)	1490(8)	11315(6)	2945(2)	52(2)
C(42)	990(8)	12079(6)	3223(2)	51(2)
C(43)	1562(7)	11683(6)	3553(2)	46(2)
C(44)	1001(7)	12345(6)	3841(2)	55(2)
C(45)	-53(8)	13394(7)	3796(2)	63(2)
C(46)	-592(8)	13817(7)	3471(2)	65(2)
C(47)	-89(8)	13165(7)	3190(2)	60(2)

C(48)	1055(9)	11723(8)	2578(2)	67(2)
C(49)	530(11)	11079(8)	2040(2)	89(3)
C(50)	305(10)	9867(8)	1876(2)	80(2)
C(51)	12(10)	10169(7)	1489(2)	77(2)
C(52)	-224(10)	8994(7)	1298(2)	79(2)
C(53)	-495(10)	9314(7)	914(2)	76(2)
C(54)	-753(10)	8139(7)	728(2)	72(2)
C(55)	-1021(10)	8445(7)	341(2)	73(2)
C(56)	-1296(9)	7267(7)	158(2)	70(2)
C(57)	-1553(10)	7579(7)	-234(2)	76(2)
C(58)	-1837(10)	6392(7)	-415(2)	72(2)
C(59)	-2100(9)	6690(7)	-803(2)	69(2)
C(60)	-2343(10)	5481(7)	-984(2)	70(2)
C(61)	-2662(9)	5771(7)	-1364(2)	68(2)
C(62)	-2919(9)	4590(7)	-1546(2)	69(2)
C(63)	-3297(10)	4860(8)	-1923(2)	82(2)
C(64)	-3510(11)	3661(8)	-2105(2)	96(3)
C(65)	4336(8)	12896(7)	4219(2)	46(2)
C(66)	6480(9)	9940(7)	4514(2)	50(2)
C(67)	3688(8)	14086(7)	4397(2)	73(2)
C(68)	7127(8)	9359(8)	4854(2)	73(2)
Cl(1)	3378(3)	7068(3)	4906(1)	102(1)
Cl(2)	245(3)	7262(3)	5209(1)	114(1)
Cl(3)	2196(3)	4950(2)	5381(1)	115(1)
C(69)	2153(8)	6645(7)	5272(2)	65(2)

Tabella IV.9 Distanze [Å] ed angoli di legame [deg] per il complesso 3

Pd(1)-C(1)	1.934(6)
Pd(1)-O(7)	2.041(4)
Pd(1)-N(1)	2.083(5)
Pd(1)-O(5)	2.152(4)
Pd(1)-Pd(2)	2.8722(7)
Pd(2)-C(33)	1.962(6)
Pd(2)-O(6)	2.029(4)
Pd(2)-N(2)	2.060(5)
Pd(2)-O(8)	2.163(4)
N(1)-C(7)	1.347(7)
N(1)-C(11)	1.370(8)
N(2)-C(39)	1.344(7)
N(2)-C(43)	1.391(7)
O(1)-C(16)	1.194(9)
O(2)-C(16)	1.307(9)
O(2)-C(17)	1.467(8)
O(3)-C(48)	1.215(8)
O(4)-C(48)	1.328(8)
O(4)-C(49)	1.431(8)
O(5)-C(66)	1.256(8)
O(6)-C(66)	1.273(8)
O(7)-C(65)	1.265(7)
O(8)-C(65)	1.258(8)
C(1)-C(6)	1.386(9)
C(1)-C(2)	1.413(9)
C(2)-C(3)	1.386(9)
C(3)-C(4)	1.397(10)
C(4)-C(5)	1.370(10)
C(5)-C(6)	1.388(9)
C(6)-C(7)	1.457(9)

C(7)-C(8)	1.421(9)
C(8)-C(9)	1.344(9)
C(9)-C(10)	1.412(9)
C(9)-C(16)	1.515(10)
C(10)-C(15)	1.418(10)
C(10)-C(11)	1.428(8)
C(12)-C(13)	1.363(9)
C(12)-C(11)	1.405(8)
C(13)-C(14)	1.386(10)
C(14)-C(15)	1.341(10)
C(17)-C(18)	1.442(10)
C(18)-C(19)	1.539(9)
C(19)-C(20)	1.503(9)
C(20)-C(21)	1.533(9)
C(21)-C(22)	1.505(9)
C(22)-C(23)	1.518(9)
(23)-C(24)	1.509(9)
C(24)-C(25)	1.518(8)
C(25)-C(26)	1.512(9)
C(26)-C(27)	1.518(9)
C(27)-C(28)	1.498(9)
C(28)-C(29)	1.515(9)
C(29)-C(30)	1.514(10)
C(30)-C(31)	1.501(10)
C(31)-C(32)	1.510(11)
C(33)-C(34)	1.388(8)
C(33)-C(38)	1.395(8)
C(34)-C(35)	1.381(9)
C(35)-C(36)	1.371(10)
C(36)-C(37)	1.385(10)
C(37)-C(38)	1.402(8)
C(38)-C(39)	1.444(9)

C(39)-C(40)	1.421(9)
C(40)-C(41)	1.359(9)
C(41)-C(42)	1.424(9)
C(41)-C(48)	1.494(10)
C(42)-C(43)	1.405(8)
C(42)-C(47)	1.411(9)
C(43)-C(44)	1.403(8)
C(44)-C(45)	1.373(9)
C(45)-C(46)	1.382(9)
C(46)-C(47)	1.365(9)
C(49)-C(50)	1.493(10)
C(50)-C(51)	1.521(9)
C(51)-C(52)	1.519(9)
C(52)-C(53)	1.511(9)
C(53)-C(54)	1.512(9)
C(54)-C(55)	1.517(9)
C(55)-C(56)	1.513(9)
C(56)-C(57)	1.533(9)
C(57)-C(58)	1.519(9)
C(58)-C(59)	1.519(9)
C(59)-C(60)	1.531(9)
C(60)-C(61)	1.500(9)
C(61)-C(62)	1.507(9)
C(62)-C(63)	1.502(9)
C(63)-C(64)	1.516(10)
C(65)-C(67)	1.528(8)
C(66)-C(68)	1.507(8)
Cl(1)-C(69)	1.733(7)
Cl(2)-C(69)	1.745(7)
Cl(3)-C(69)	1.758(7)
C(1)-Pd(1)-O(7)	92.8(2)
C(1)-Pd(1)-N(1)	80.9(2)

O(7)-Pd(1)-N(1)	172.19(19)
C(1)-Pd(1)-O(5)	173.9(2)
O(7)-Pd(1)-O(5)	83.59(16)
N(1)-Pd(1)-O(5)	103.07(18)
C(1)-Pd(1)-Pd(2)	96.60(19)
O(7)-Pd(1)-Pd(2)	84.55(13)
N(1)-Pd(1)-Pd(2)	100.69(13)
O(5)-Pd(1)-Pd(2)	78.27(12)
C(33)-Pd(2)-O(6)	91.6(2)
C(33)-Pd(2)-N(2)	81.4(2)
O(6)-Pd(2)-N(2)	172.22(18)
C(33)-Pd(2)-O(8)	174.4(2)
O(6)-Pd(2)-O(8)	86.09(16)
N(2)-Pd(2)-O(8)	101.21(18)
C(33)-Pd(2)-Pd(1)	97.00(18)
O(6)-Pd(2)-Pd(1)	83.09(13)
N(2)-Pd(2)-Pd(1)	100.98(14)
O(8)-Pd(2)-Pd(1)	77.71(12)
C(7)-N(1)-C(11)	119.0(5)
C(7)-N(1)-Pd(1)	112.2(4)
C(11)-N(1)-Pd(1)	128.3(4)
C(39)-N(2)-C(43)	119.7(5)
C(39)-N(2)-Pd(2)	112.2(4)
C(43)-N(2)-Pd(2)	127.7(4)
C(16)-O(2)-C(17)	118.6(7)
C(48)-O(4)-C(49)	114.8(6)
C(66)-O(5)-Pd(1)	123.6(4)
C(66)-O(6)-Pd(2)	123.3(4)
C(65)-O(7)-Pd(1)	122.2(4)
C(65)-O(8)-Pd(2)	124.6(4)
C(6)-C(1)-C(2)	118.1(6)
C(6)-C(1)-Pd(1)	116.1(5)

C(2)-C(1)-Pd(1)	125.7(5)
C(3)-C(2)-C(1)	119.7(7)
C(2)-C(3)-C(4)	121.3(7)
C(5)-C(4)-C(3)	118.8(7)
C(4)-C(5)-C(6)	120.7(8)
C(1)-C(6)-C(5)	121.5(7)
C(1)-C(6)-C(7)	114.7(6)
C(5)-C(6)-C(7)	123.8(7)
N(1)-C(7)-C(8)	120.4(6)
N(1)-C(7)-C(6)	115.0(6)
C(8)-C(7)-C(6)	124.6(6)
C(9)-C(8)-C(7)	121.0(6)
C(8)-C(9)-C(10)	120.5(6)
C(8)-C(9)-C(16)	118.7(7)
C(10)-C(9)-C(16)	120.8(7)
C(9)-C(10)-C(15)	124.8(7)
C(9)-C(10)-C(11)	116.5(6)
C(15)-C(10)-C(11)	118.7(7)
C(13)-C(12)-C(11)	120.3(7)
N(1)-C(11)-C(12)	119.1(6)
N(1)-C(11)-C(10)	122.5(6)
C(12)-C(11)-C(10)	118.4(6)
C(12)-C(13)-C(14)	121.1(7)
C(15)-C(14)-C(13)	120.9(7)
C(14)-C(15)-C(10)	120.5(7)
O(1)-C(16)-O(2)	124.1(8)
O(1)-C(16)-C(9)	125.6(8)
O(2)-C(16)-C(9)	110.3(7)
C(18)-C(17)-O(2)	110.2(7)
C(17)-C(18)-C(19)	111.7(6)
C(20)-C(19)-C(18)	114.3(6)
C(19)-C(20)-C(21)	113.5(6)

C(22)-C(21)-C(20)	114.1(6)
C(21)-C(22)-C(23)	113.7(6)
C(24)-C(23)-C(22)	114.5(6)
C(23)-C(24)-C(25)	114.7(6)
C(26)-C(25)-C(24)	115.7(6)
C(25)-C(26)-C(27)	115.0(6)
C(28)-C(27)-C(26)	115.2(6)
C(27)-C(28)-C(29)	115.1(6)
C(28)-C(29)-C(30)	115.9(7)
C(31)-C(30)-C(29)	114.6(7)
C(30)-C(31)-C(32)	114.1(8)
C(34)-C(33)-C(38)	120.1(6)
C(34)-C(33)-Pd(2)	126.4(5)
C(38)-C(33)-Pd(2)	113.4(5)
C(35)-C(34)-C(33)	119.3(7)
C(36)-C(35)-C(34)	120.9(7)
C(35)-C(36)-C(37)	120.9(7)
C(36)-C(37)-C(38)	118.7(7)
C(33)-C(38)-C(37)	120.0(6)
C(33)-C(38)-C(39)	115.7(6)
C(37)-C(38)-C(39)	124.2(7)
N(2)-C(39)-C(40)	119.8(6)
N(2)-C(39)-C(38)	115.2(6)
C(40)-C(39)-C(38)	125.0(6)
C(41)-C(40)-C(39)	121.3(6)
C(40)-C(41)-C(42)	119.5(6)
C(40)-C(41)-C(48)	119.2(7)
C(42)-C(41)-C(48)	121.2(6)
C(43)-C(42)-C(47)	118.5(6)
C(43)-C(42)-C(41)	117.4(6)
C(47)-C(42)-C(41)	124.0(6)
N(2)-C(43)-C(44)	119.0(6)

N(2)-C(43)-C(42)	121.7(6)
C(44)-C(43)-C(42)	119.2(6)
C(45)-C(44)-C(43)	120.2(6)
C(44)-C(45)-C(46)	121.2(7)
C(47)-C(46)-C(45)	119.4(7)
C(46)-C(47)-C(42)	121.4(7)
O(3)-C(48)-O(4)	122.6(7)
O(3)-C(48)-C(41)	124.1(7)
O(4)-C(48)-C(41)	113.2(7)
O(4)-C(49)-C(50)	108.5(7)
C(49)-C(50)-C(51)	111.2(7)
C(52)-C(51)-C(50)	115.2(7)
C(53)-C(52)-C(51)	114.3(6)
C(52)-C(53)-C(54)	113.9(6)
C(53)-C(54)-C(55)	114.4(6)
C(56)-C(55)-C(54)	114.1(6)
C(55)-C(56)-C(57)	113.9(6)
C(58)-C(57)-C(56)	113.6(6)
C(59)-C(58)-C(57)	114.1(6)
C(58)-C(59)-C(60)	113.5(6)
C(61)-C(60)-C(59)	113.9(6)
C(60)-C(61)-C(62)	114.5(6)
C(63)-C(62)-C(61)	115.5(6)
C(62)-C(63)-C(64)	114.9(7)
O(8)-C(65)-O(7)	127.5(6)
O(8)-C(65)-C(67)	115.8(6)
O(7)-C(65)-C(67)	116.6(6)
O(5)-C(66)-O(6)	126.7(6)
O(5)-C(66)-C(68)	118.7(7)
O(6)-C(66)-C(68)	114.6(7)
Cl(1)-C(69)-Cl(2)	110.9(4)
Cl(1)-C(69)-Cl(3)	111.8(4)

Cl(2)-C(69)-Cl(3)	110.3(4)

Tabella IV.10 Fattori termici anisotropi (Å^2 x 10^3) per il complesso 3

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Pd(1)	47(1)	39(1)	41(1)	-10(1)	-4(1)	-6(1)
Pd(2)	46(1)	38(1)	50(1)	-9(1)	-6(1)	-6(1)
N(1)	39(3)	49(3)	43(3)	-4(3)	-5(3)	-13(3)
N(2)	46(3)	43(3)	55(4)	-14(3)	-4(3)	-18(3)
O(1)	84(5)	193(8)	187(8)	-141(7)	1(5)	20(5)
O(2)	104(4)	88(4)	86(4)	-60(3)	-29(4)	12(3)
O(3)	155(6)	60(4)	67(4)	-3(3)	-21(4)	-15(4)
O(4)	121(5)	62(3)	52(3)	-9(3)	-21(3)	-12(3)
O(5)	57(3)	47(3)	46(3)	-8(2)	-10(2)	-4(2)
O(6)	60(3)	51(3)	51(3)	0(2)	-8(2)	-7(2)
O(7)	60(3)	41(2)	60(3)	-9(2)	6(3)	-7(2)
O(8)	53(3)	47(3)	47(3)	-14(2)	-6(2)	-6(2)
C(1)	51(4)	41(4)	53(4)	-2(3)	-8(3)	-13(3)
C(2)	75(5)	48(4)	70(5)	1(4)	-16(4)	-11(4)
C(3)	77(6)	65(5)	78(6)	19(5)	-25(5)	-5(4)
C(4)	104(7)	80(6)	59(6)	4(5)	-20(5)	-25(5)
C(5)	76(5)	76(5)	49(5)	-3(4)	-10(4)	-16(4)
C(6)	58(5)	56(4)	41(4)	-6(3)	-4(4)	-19(4)
C(7)	43(4)	46(4)	49(4)	-4(3)	-1(3)	-14(3)
C(8)	53(5)	79(5)	45(4)	-26(4)	-4(4)	-19(4)
C(9)	48(4)	55(4)	70(5)	-31(4)	9(4)	-18(4)
C(10)	46(4)	52(4)	64(5)	-17(4)	3(4)	-10(3)
C(12)	46(4)	55(4)	57(5)	-9(4)	0(4)	5(3)
C(11)	40(4)	46(4)	53(4)	-14(3)	4(3)	-14(3)
C(13)	54(5)	68(5)	69(5)	-1(4)	0(4)	-7(4)
C(14)	62(5)	58(5)	102(7)	0(5)	-10(5)	10(4)
C(15)	54(5)	55(5)	97(7)	-26(5)	-2(5)	-10(4)
C(16)	79(7)	95(7)	84(7)	-47(5)	-1(5)	-4(5)

C(17)	141(8)	65(5)	93(7)	-50(5)	-38(6)	21(5)
C(18)	94(6)	66(5)	65(5)	-21(4)	-14(5)	5(4)
C(19)	95(6)	55(4)	71(5)	-31(4)	-19(5)	-6(4)
C(20)	94(6)	63(5)	57(5)	-19(4)	-19(4)	-1(4)
C(21)	97(6)	50(4)	57(5)	-23(4)	-10(4)	-9(4)
C(22)	95(6)	62(5)	48(5)	-17(4)	-9(4)	-5(4)
C(23)	97(6)	61(5)	56(5)	-13(4)	-18(4)	-10(4)
C(24)	94(6)	64(5)	46(5)	-18(4)	-12(4)	-4(4)
C(25)	97(6)	55(4)	58(5)	-23(4)	-9(4)	-4(4)
C(26)	104(6)	64(5)	47(5)	-13(4)	-15(4)	-4(4)
C(27)	106(7)	62(5)	61(5)	-25(4)	-17(5)	-10(4)
C(28)	91(6)	57(5)	68(5)	-20(4)	-25(4)	-1(4)
C(29)	116(7)	65(5)	65(5)	-25(4)	-15(5)	-16(5)
C(30)	107(7)	67(5)	59(5)	-25(4)	-17(5)	-2(5)
C(31)	144(9)	79(6)	74(6)	-33(5)	-25(6)	-12(6)
C(32)	191(11)	137(9)	76(7)	-58(7)	-31(7)	-24(8)
C(33)	41(4)	42(4)	58(5)	-2(3)	2(3)	-10(3)
C(34)	67(5)	38(4)	74(5)	-8(4)	-7(4)	-3(3)
C(35)	70(5)	44(4)	104(7)	-11(5)	-2(5)	7(4)
C(36)	83(6)	40(4)	98(7)	-25(5)	15(5)	-14(4)
C(37)	74(5)	51(4)	61(5)	-13(4)	2(4)	-11(4)
C(38)	50(4)	37(4)	59(5)	-17(3)	4(4)	-17(3)
C(39)	44(4)	44(4)	52(4)	-14(3)	-2(3)	-17(3)
C(40)	61(5)	51(4)	64(5)	-19(4)	-4(4)	-13(4)
C(41)	63(5)	50(4)	46(4)	-3(3)	-9(4)	-17(4)
C(42)	51(4)	42(4)	61(5)	-10(4)	-7(4)	-10(3)
C(43)	36(4)	39(4)	65(5)	-11(3)	-6(3)	-10(3)
C(44)	53(4)	59(4)	52(5)	-11(4)	-5(4)	2(4)
C(45)	52(5)	65(5)	78(6)	-30(4)	-9(4)	-1(4)
C(46)	56(5)	56(5)	87(6)	-18(5)	-5(5)	1(4)
C(47)	56(5)	61(5)	63(5)	0(4)	-12(4)	-9(4)
C(48)	68(5)	63(5)	71(6)	-7(5)	-2(4)	-17(4)

C(49)	137(8)	76(6)	59(6)	-12(5)	-21(5)	-9(5)
C(50)	114(7)	73(6)	58(5)	-9(4)	-25(5)	-11(5)
C(51)	108(7)	64(5)	62(5)	-11(4)	-19(5)	-5(5)
C(52)	115(7)	62(5)	65(6)	-11(4)	-20(5)	-7(5)
C(53)	108(7)	59(5)	65(5)	-9(4)	-23(5)	-13(5)
C(54)	105(6)	67(5)	46(5)	-9(4)	-15(4)	-4(5)
C(55)	105(6)	61(5)	56(5)	-14(4)	-13(5)	-7(4)
C(56)	96(6)	61(5)	55(5)	-9(4)	-15(4)	-4(4)
C(57)	95(6)	62(5)	72(6)	-15(4)	-13(5)	-1(4)
C(58)	101(6)	51(4)	69(6)	-11(4)	-23(5)	-11(4)
C(59)	93(6)	52(4)	64(5)	-11(4)	-9(4)	-6(4)
C(60)	103(6)	50(4)	61(5)	-10(4)	-17(4)	-6(4)
C(61)	86(6)	56(5)	65(5)	-5(4)	-16(4)	0(4)
C(62)	89(6)	61(5)	60(5)	-5(4)	-15(4)	-1(4)
C(63)	106(7)	87(6)	53(5)	0(4)	-9(5)	-14(5)
C(64)	135(8)	95(7)	66(6)	-23(5)	-20(6)	-16(6)
C(65)	51(5)	52(4)	37(4)	-12(3)	-15(4)	4(4)
C(66)	61(5)	52(4)	36(4)	-13(3)	-7(4)	15(4)
C(67)	65(5)	59(5)	99(6)	-34(4)	4(5)	8(4)
C(68)	76(5)	92(6)	46(5)	8(4)	-10(4)	13(4)
Cl(1)	85(2)	133(2)	87(2)	-15(2)	15(1)	-6(2)
Cl(2)	62(1)	167(3)	110(2)	-1(2)	-21(1)	5(2)
Cl(3)	149(2)	75(2)	124(2)	-24(2)	-7(2)	-12(2)

I fattori termici anisotropi hanno la forma:

-2 pi^2 [h^2 a*^2 U11 + ... + 2 h k a* b* U12]

Tabella IV.11 Coordinate atomiche (Å x 10^4) e fattori termici isotropi degli atomi di idrogeno (Å^2 x 10^3) per il complesso 3.

	x	y	z	U(eq)
H(2A)	4741	13761	3416	77
H(3A)	3997	14212	2848	89
H(4A)	4959	12918	2414	96
H(5A)	6551	11095	2562	80
H(8A)	7854	9248	2747	68
H(12A)	9195	9796	4122	64
H(13A)	10824	8130	4346	77
H(14A)	11614	6415	4028	90
H(15A)	10918	6398	3473	81
H(17A)	9795	5414	2482	116
H(17B)	8065	5054	2583	116
H(18A)	9085	6709	2011	88
H(18B)	7309	6619	2128	88
H(19A)	9247	4470	1921	86
H(19B)	7469	4394	2033	86
H(20A)	8674	5812	1421	84
H(20B)	6892	5839	1536	84
H(21A)	8643	3565	1356	80
H(21B)	6853	3612	1464	80
H(22A)	8169	4932	847	81
H(22B)	6379	4994	955	81
H(23A)	8098	2700	790	84
H(23B)	6307	2770	895	84
H(24A)	7665	4027	274	80
H(24B)	5876	4143	380	80
H(25A)	7501	1802	224	82
H(25B)	5710	1929	326	82

H(26A)	7114	3121	-298	85
H(26B)	5322	3246	-196	85
H(27A)	6946	890	-339	89
H(27B)	5150	1028	-243	89
H(28A)	6600	2191	-862	84
H(28B)	4805	2336	-766	84
H(29A)	4609	121	-807	96
H(29B)	6405	-35	-900	96
H(30A)	4290	1401	-1340	91
H(30B)	6088	1242	-1433	91
H(31A)	4087	-817	-1367	116
H(31B)	5886	-980	-1459	116
H(32A)	4538	-928	-1964	194
H(32B)	5589	264	-1994	194
H(32C)	3791	458	-1903	194
H(34A)	5706	7392	4130	71
H(35A)	6352	5781	3765	87
H(36A)	5593	6006	3202	88
H(37A)	4134	7845	2988	74
H(40A)	2663	9674	2835	69
H(44A)	1344	12072	4062	66
H(45A)	-410	13829	3988	76
H(46A)	-1291	14539	3443	79
H(47A)	-465	13442	2972	72
H(49A)	1377	11541	1914	107
H(49B)	-412	11647	2030	107
H(50A)	-574	9434	1997	96
H(50B)	1227	9282	1901	96
H(51A)	-906	10761	1468	93
H(51B)	890	10617	1373	93
H(52A)	688	8396	1321	95
H(52B)	-1111	8551	1412	95

H(53A)	400	9743	799	91
H(53B)	-1398	9921	891	91
H(54A)	-1649	7712	843	86
H(54B)	148	7530	752	86
H(55A)	-1916	9061	316	87
H(55B)	-120	8862	225	87
H(56A)	-2203	6855	272	84
H(56B)	-405	6649	184	84
H(57A)	-2441	8201	-260	91
H(57B)	-644	7987	-348	91
H(58A)	-946	5772	-389	87
H(58B)	-2742	5982	-299	87
H(59A)	-1206	7118	-918	83
H(59B)	-3007	7291	-829	83
H(60A)	-1419	4895	-965	84
H(60B)	-3212	5035	-863	84
H(61A)	-1789	6211	-1486	82
H(61B)	-3579	6365	-1383	82
H(62A)	-1986	4012	-1533	83
H(62B)	-3765	4133	-1418	83
H(63A)	-2464	5336	-2050	98
H(63B)	-4246	5417	-1936	98
H(64A)	-3739	3918	-2344	145
H(64B)	-4358	3197	-1987	145
H(64C)	-2570	3108	-2099	145
H(67A)	2777	13867	4544	110
H(67B)	3416	14780	4221	110
H(67C)	4464	14358	4536	110
H(68A)	8026	9808	4896	110
H(68B)	7421	8455	4840	110
H(68C)	6347	9445	5042	110
H(69A)	2520	7036	5470	77

Tabella IV.12 Angoli di torsione [deg] per il complesso 3

C(1)-Pd(1)-Pd(2)-C(33)	77.3(3)
O(7)-Pd(1)-Pd(2)-C(33)	169.4(2)
N(1)-Pd(1)-Pd(2)-C(33)	-4.7(2)
O(5)-Pd(1)-Pd(2)-C(33)	-106.0(2)
C(1)-Pd(1)-Pd(2)-O(6)	168.0(2)
O(7)-Pd(1)-Pd(2)-O(6)	-99.80(17)
N(1)-Pd(1)-Pd(2)-O(6)	86.06(18)
O(5)-Pd(1)-Pd(2)-O(6)	-15.23(16)
C(1)-Pd(1)-Pd(2)-N(2)	-5.3(2)
O(7)-Pd(1)-Pd(2)-N(2)	86.90(19)
N(1)-Pd(1)-Pd(2)-N(2)	-87.2(2)
O(5)-Pd(1)-Pd(2)-N(2)	171.47(18)
C(1)-Pd(1)-Pd(2)-O(8)	-104.5(2)
O(7)-Pd(1)-Pd(2)-O(8)	-12.32(16)
N(1)-Pd(1)-Pd(2)-O(8)	173.54(18)
O(5)-Pd(1)-Pd(2)-O(8)	72.25(15)
C(1)-Pd(1)-N(1)-C(7)	-9.1(4)
O(7)-Pd(1)-N(1)-C(7)	-45.6(15)
O(5)-Pd(1)-N(1)-C(7)	166.3(4)
Pd(2)-Pd(1)-N(1)-C(7)	86.0(4)
C(1)-Pd(1)-N(1)-C(11)	178.2(5)
O(7)-Pd(1)-N(1)-C(11)	141.6(12)
O(5)-Pd(1)-N(1)-C(11)	-6.4(5)
Pd(2)-Pd(1)-N(1)-C(11)	-86.7(5)
C(33)-Pd(2)-N(2)-C(39)	-13.1(4)
O(6)-Pd(2)-N(2)-C(39)	-38.6(16)
O(8)-Pd(2)-N(2)-C(39)	161.9(4)
Pd(1)-Pd(2)-N(2)-C(39)	82.4(4)
C(33)-Pd(2)-N(2)-C(43)	173.9(5)
O(6)-Pd(2)-N(2)-C(43)	148.4(12)

O(8)-Pd(2)-N(2)-C(43)	-11.1(5)
Pd(1)-Pd(2)-N(2)-C(43)	-90.6(5)
C(1)-Pd(1)-O(5)-C(66)	52(2)
O(7)-Pd(1)-O(5)-C(66)	104.8(5)
N(1)-Pd(1)-O(5)-C(66)	-79.3(5)
Pd(2)-Pd(1)-O(5)-C(66)	19.1(4)
C(33)-Pd(2)-O(6)-C(66)	116.0(5)
N(2)-Pd(2)-O(6)-C(66)	141.3(13)
O(8)-Pd(2)-O(6)-C(66)	-58.9(5)
Pd(1)-Pd(2)-O(6)-C(66)	19.2(5)
C(1)-Pd(1)-O(7)-C(65)	110.5(5)
N(1)-Pd(1)-O(7)-C(65)	146.6(12)
O(5)-Pd(1)-O(7)-C(65)	-64.6(5)
Pd(2)-Pd(1)-O(7)-C(65)	14.2(4)
C(33)-Pd(2)-O(8)-C(65)	35(2)
O(6)-Pd(2)-O(8)-C(65)	100.6(5)
N(2)-Pd(2)-O(8)-C(65)	-82.1(5)
Pd(1)-Pd(2)-O(8)-C(65)	16.8(4)
O(7)-Pd(1)-C(1)-C(6)	-177.9(5)
N(1)-Pd(1)-C(1)-C(6)	6.8(5)
O(5)-Pd(1)-C(1)-C(6)	-125.0(19)
Pd(2)-Pd(1)-C(1)-C(6)	-93.0(5)
O(7)-Pd(1)-C(1)-C(2)	-2.9(6)
N(1)-Pd(1)-C(1)-C(2)	-178.2(6)
O(5)-Pd(1)-C(1)-C(2)	50(2)
Pd(2)-Pd(1)-C(1)-C(2)	82.0(6)
C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	-0.7(10)
Pd(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-175.6(5)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-1.2(11)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	2.1(12)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-1.0(12)
C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	1.8(10)

Pd(1)-C(1)-C(6)-C(5)	177.2(5)
C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	-179.0(6)
Pd(1)-C(1)-C(6)-C(7)	-3.6(7)
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	-1.0(11)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	179.9(7)
C(11)-N(1)-C(7)-C(8)	4.4(9)
Pd(1)-N(1)-C(7)-C(8)	-169.1(5)
C(11)-N(1)-C(7)-C(6)	-176.9(5)
Pd(1)-N(1)-C(7)-C(6)	9.6(7)
C(1)-C(6)-C(7)-N(1)	-4.4(8)
C(5)-C(6)-C(7)-N(1)	174.7(6)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	174.3(6)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-6.6(10)
N(1)-C(7)-C(8)-C(9)	-2.4(10)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	179.0(6)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	0.0(10)
C(7)-C(8)-C(9)-C(16)	180.0(6)
C(8)-C(9)-C(10)-C(15)	179.0(7)
C(16)-C(9)-C(10)-C(15)	-1.1(11)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	0.3(10)
C(16)-C(9)-C(10)-C(11)	-179.7(6)
C(7)-N(1)-C(11)-C(12)	174.6(6)
Pd(1)-N(1)-C(11)-C(12)	-13.1(8)
C(7)-N(1)-C(11)-C(10)	-4.1(9)
Pd(1)-N(1)-C(11)-C(10)	168.2(4)
C(13)-C(12)-C(11)-N(1)	178.4(6)
C(13)-C(12)-C(11)-C(10)	-2.9(10)
C(9)-C(10)-C(11)-N(1)	1.8(9)
C(15)-C(10)-C(11)-N(1)	-177.0(6)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	-176.9(6)
C(15)-C(10)-C(11)-C(12)	4.3(9)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-0.4(11)

C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	2.3(12)
C(13)-C(14)-C(15)-C(10)	-0.8(12)
C(9)-C(10)-C(15)-C(14)	178.8(7)
C(11)-C(10)-C(15)-C(14)	-2.6(11)
C(17)-O(2)-C(16)-O(1)	8.9(15)
C(17)-O(2)-C(16)-C(9)	-171.8(7)
C(8)-C(9)-C(16)-O(1)	135.4(11)
C(10)-C(9)-C(16)-O(1)	-44.5(14)
C(8)-C(9)-C(16)-O(2)	-43.8(10)
C(10)-C(9)-C(16)-O(2)	136.2(7)
C(16)-O(2)-C(17)-C(18)	-125.2(9)
O(2)-C(17)-C(18)-C(19)	-169.3(7)
C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	-179.1(7)
C(18)-C(19)-C(20)-C(21)	-176.0(7)
C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	-178.7(7)
C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	-179.4(7)
C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	-179.5(7)
C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-178.2(7)
C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	-179.3(7)
C(24)-C(25)-C(26)-C(27)	179.9(7)
C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	-179.2(7)
C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	-179.7(7)
C(27)-C(28)-C(29)-C(30)	-179.3(7)
C(28)-C(29)-C(30)-C(31)	-179.8(8)
C(29)-C(30)-C(31)-C(32)	-179.7(8)
O(6)-Pd(2)-C(33)-C(34)	5.2(6)
N(2)-Pd(2)-C(33)-C(34)	-171.5(6)
O(8)-Pd(2)-C(33)-C(34)	71(2)
Pd(1)-Pd(2)-C(33)-C(34)	88.4(6)
O(6)-Pd(2)-C(33)-C(38)	-172.2(5)
N(2)-Pd(2)-C(33)-C(38)	11.1(4)
O(8)-Pd(2)-C(33)-C(38)	-107(2)

Pd(1)-Pd(2)-C(33)-C(38)	-89.0(4)
C(38)-C(33)-C(34)-C(35)	1.8(10)
Pd(2)-C(33)-C(34)-C(35)	-175.4(5)
C(33)-C(34)-C(35)-C(36)	-0.1(11)
C(34)-C(35)-C(36)-C(37)	-0.6(12)
C(35)-C(36)-C(37)-C(38)	-0.3(11)
C(34)-C(33)-C(38)-C(37)	-2.7(10)
Pd(2)-C(33)-C(38)-C(37)	174.8(5)
C(34)-C(33)-C(38)-C(39)	174.5(6)
Pd(2)-C(33)-C(38)-C(39)	-7.9(7)
C(36)-C(37)-C(38)-C(33)	1.9(10)
C(36)-C(37)-C(38)-C(39)	-175.1(6)
C(43)-N(2)-C(39)-C(40)	5.0(9)
Pd(2)-N(2)-C(39)-C(40)	-168.7(5)
C(43)-N(2)-C(39)-C(38)	-174.0(5)
Pd(2)-N(2)-C(39)-C(38)	12.4(7)
C(33)-C(38)-C(39)-N(2)	-3.4(8)
C(37)-C(38)-C(39)-N(2)	173.7(6)
C(33)-C(38)-C(39)-C(40)	177.7(6)
C(37)-C(38)-C(39)-C(40)	-5.1(10)
N(2)-C(39)-C(40)-C(41)	1.8(10)
C(38)-C(39)-C(40)-C(41)	-179.4(6)
C(39)-C(40)-C(41)-C(42)	-6.0(10)
C(39)-C(40)-C(41)-C(48)	172.1(6)
C(40)-C(41)-C(42)-C(43)	3.4(9)
C(48)-C(41)-C(42)-C(43)	-174.6(6)
C(40)-C(41)-C(42)-C(47)	-173.8(6)
C(48)-C(41)-C(42)-C(47)	8.2(10)
C(39)-N(2)-C(43)-C(44)	170.7(6)
Pd(2)-N(2)-C(43)-C(44)	-16.8(8)
C(39)-N(2)-C(43)-C(42)	-7.6(9)
Pd(2)-N(2)-C(43)-C(42)	165.0(4)

C(47)-C(42)-C(43)-N(2)	-179.3(6)
C(41)-C(42)-C(43)-N(2)	3.4(9)
C(47)-C(42)-C(43)-C(44)	2.4(9)
C(41)-C(42)-C(43)-C(44)	-174.9(6)
N(2)-C(43)-C(44)-C(45)	179.5(6)
C(42)-C(43)-C(44)-C(45)	-2.2(10)
C(43)-C(44)-C(45)-C(46)	0.4(11)
C(44)-C(45)-C(46)-C(47)	1.2(11)
C(45)-C(46)-C(47)-C(42)	-1.0(11)
C(43)-C(42)-C(47)-C(46)	-0.8(10)
C(41)-C(42)-C(47)-C(46)	176.3(6)
C(49)-O(4)-C(48)-O(3)	-0.3(11)
C(49)-O(4)-C(48)-C(41)	-177.7(6)
C(40)-C(41)-C(48)-O(3)	-143.4(8)
C(42)-C(41)-C(48)-O(3)	34.6(11)
C(40)-C(41)-C(48)-O(4)	33.9(9)
C(42)-C(41)-C(48)-O(4)	-148.0(6)
C(48)-O(4)-C(49)-C(50)	-177.4(7)
O(4)-C(49)-C(50)-C(51)	-176.8(7)
C(49)-C(50)-C(51)-C(52)	179.7(8)
C(50)-C(51)-C(52)-C(53)	-179.3(7)
C(51)-C(52)-C(53)-C(54)	-179.1(7)
C(52)-C(53)-C(54)-C(55)	-179.8(7)
C(53)-C(54)-C(55)-C(56)	-179.4(7)
C(54)-C(55)-C(56)-C(57)	-179.5(7)
C(55)-C(56)-C(57)-C(58)	-179.7(7)
C(56)-C(57)-C(58)-C(59)	179.7(7)
C(57)-C(58)-C(59)-C(60)	178.5(7)
C(58)-C(59)-C(60)-C(61)	177.9(7)
C(59)-C(60)-C(61)-C(62)	-179.5(7)
C(60)-C(61)-C(62)-C(63)	177.9(7)
C(61)-C(62)-C(63)-C(64)	178.5(7)

Pd(2)-O(8)-C(65)-O(7)	-12.7(9)
Pd(2)-O(8)-C(65)-C(67)	169.0(4)
Pd(1)-O(7)-C(65)-O(8)	-5.9(9)
Pd(1)-O(7)-C(65)-C(67)	172.4(4)
Pd(1)-O(5)-C(66)-O(6)	-12.0(9)
Pd(1)-O(5)-C(66)-C(68)	166.0(4)
Pd(2)-O(6)-C(66)-O(5)	-10.9(9)
Pd(2)-O(6)-C(66)-C(68)	171.0(4)

Tabella IV.13 Parametri di raccolta e dati cristallografici del complesso 17

Empirical formula	C52 H79 F3 N2 O10 Pt S
Formula weight	1176.32
Temperature	373(2) K
Wavelength	0.71073 A
Crystal system, space group	triclinic, P-1
Unit cell dimensions	a = 8.4536(10) A alpha = 90.443(4) deg. b = 11.7638(15) A beta = 97.657(4) deg. c = 27.970(3) A gamma = 105.588(4) deg.
Volume	2652.6(5) A^3
Z, Calculated density	2, 1.473 Mg/m^3
Absorption coefficient	2.752 mm^-1
F(000)	1212
Crystal size	0.12 x 0.22 x 0.14 mm
Theta range for data collection	1.47 to 26.37 deg.
Limiting indices	-10<=h<=10, -14<=k<=14, -34<=l<=34
Reflections collected / unique	35297 / 10839 [R(int) = 0.0692]

Completeness to theta = 26.37	99.8 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	10839 / 3 / 685
Goodness-of-fit on F^2	0.994
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0389, wR2 = 0.0660
R indices (all data)	R1 = 0.0588, wR2 = 0.0724
Largest diff. peak and hole	1.381 and -0.881 e.A^-3

Tabella IV.14 Coordinate atomiche (Å x 10^4) e fattore termico isotropo equivalente (Å^2 x 10^3) per il complesso 17

	x	y	z	U(eq)
Pt	6130(1)	14204(1)	10312(1)	17(1)
S	850(5)	-154(7)	1185(3)	27(1)
O(7)	2043(16)	-879(13)	1382(5)	62(4)
O(8)	832(7)	87(6)	688(2)	63(2)
O(9)	-755(5)	-466(4)	1342(2)	29(1)
C(52)	1861(11)	1286(7)	1479(3)	34(2)
F(1)	990(20)	2038(14)	1355(6)	74(5)
F(2)	2144(16)	1261(9)	1973(4)	69(3)
F(3)	3361(5)	1720(3)	1349(2)	51(1)
SA	1403(13)	-95(17)	1225(6)	31(3)
O(7A)	2608(18)	671(13)	935(5)	69(4)
O(8A)	-210(20)	-471(13)	954(5)	65(4)
O(9A)	1880(30)	-870(30)	1443(7)	16(4)
C(52A)	1340(30)	950(20)	1668(9)	45(6)
F(1A)	101(18)	454(11)	1931(4)	86(4)
F(2A)	940(50)	1930(30)	1529(13)	55(8)
F(3A)	2490(50)	1150(40)	1916(13)	151(17)
O(1)	7077(3)	15794(2)	10656(1)	19(1)
O(2)	4805(3)	13955(2)	10862(1)	21(1)
O(3)	11048(4)	15512(3)	8472(1)	35(1)
O(4)	9725(3)	13595(2)	8312(1)	20(1)
O(5)	2405(4)	8472(3)	9356(1)	25(1)
O(6)	3667(3)	9341(2)	8742(1)	21(1)
O(10)	59(5)	7967(4)	63(2)	65(1)
N(1)	7467(4)	14405(3)	9769(1)	18(1)
N(2)	5196(4)	12639(3)	9976(1)	17(1)
C(1)	8530(5)	15432(4)	9680(1)	18(1)

C(2)	9416(5)	15507(4)	9295(1)	18(1)
C(3)	9208(5)	14499(4)	9003(1)	16(1)
C(4)	8137(5)	13437(4)	9097(1)	16(1)
C(5)	7238(5)	13418(4)	9479(1)	17(1)
C(6)	5938(5)	12401(4)	9601(1)	17(1)
C(7)	5358(5)	11323(4)	9339(1)	19(1)
C(8)	3967(5)	10489(4)	9456(1)	18(1)
C(9)	3234(5)	10748(4)	9846(1)	24(1)
C(10)	3868(5)	11814(4)	10099(1)	24(1)
C(11)	6333(5)	15934(4)	11030(1)	17(1)
C(12)	6770(5)	17056(4)	11255(1)	21(1)
C(13)	6146(5)	17478(4)	11634(1)	26(1)
C(14)	4996(6)	16860(4)	11917(2)	30(1)
C(15)	4206(6)	15654(4)	11882(1)	28(1)
C(16)	4233(5)	14799(4)	11548(1)	23(1)
C(17)	5097(5)	14884(4)	11147(1)	20(1)
C(18)	10116(5)	14611(4)	8569(1)	17(1)
C(19)	10448(5)	13613(4)	7865(1)	20(1)
C(20)	10043(5)	12352(4)	7675(1)	22(1)
C(21)	10728(5)	12260(4)	7200(1)	21(1)
C(22)	10515(5)	10994(4)	7024(1)	21(1)
C(23)	10974(5)	10901(4)	6518(1)	22(1)
C(24)	10789(5)	9641(4)	6338(1)	20(1)
C(25)	11183(5)	9549(4)	5825(1)	21(1)
C(26)	11002(5)	8288(4)	5645(1)	19(1)
C(27)	11391(5)	8201(4)	5128(1)	20(1)
C(28)	11215(5)	6942(4)	4949(1)	19(1)
C(29)	11590(5)	6853(4)	4433(1)	23(1)
C(30)	11409(5)	5597(4)	4246(1)	22(1)
C(31)	11784(5)	5524(4)	3730(1)	22(1)
C(32)	11593(6)	4278(4)	3541(1)	24(1)
C(33)	11980(6)	4204(4)	3028(1)	29(1)

C(34)	11758(6)	2964(4)	2829(2)	39(1)
C(35)	3263(5)	9332(4)	9186(1)	21(1)
C(36)	3063(5)	8211(4)	8470(1)	21(1)
C(37)	3372(5)	8372(4)	7954(1)	21(1)
C(38)	3060(5)	7170(4)	7702(1)	23(1)
C(39)	3390(6)	7165(4)	7180(1)	22(1)
C(40)	3145(5)	5918(4)	6977(1)	22(1)
C(41)	3465(5)	5820(4)	6457(1)	22(1)
C(42)	3246(5)	4554(4)	6273(1)	22(1)
C(43)	3595(5)	4446(4)	5757(1)	21(1)
C(44)	3392(5)	3181(4)	5580(1)	21(1)
C(45)	3779(5)	3079(4)	5066(1)	23(1)
C(46)	3590(5)	1815(4)	4886(1)	19(1)
C(47)	3979(5)	1728(4)	4372(1)	19(1)
C(48)	3805(5)	471(4)	4191(1)	21(1)
C(49)	4225(5)	390(4)	3680(1)	23(1)
C(50)	4057(6)	-863(4)	3496(1)	27(1)
C(51)	4510(6)	-941(4)	2990(2)	35(1)

Tabella IV.15 Distanze [Å] ed angoli di legame [deg] per il complesso 17

Pt-N(2)	1.973(3)
Pt-N(1)	1.991(3)
Pt-O(2)	2.000(2)
Pt-O(1)	2.006(3)
S-O(8)	1.418(9)
S-O(9)	1.437(7)
S-O(7)	1.540(16)
S-C(52)	1.814(11)
C(52)-F(1)	1.314(18)
C(52)-F(3)	1.334(10)
C(52)-F(2)	1.371(15)
SA-O(9A)	1.22(3)
SA-O(8A)	1.422(17)
SA-O(7A)	1.50(2)
SA-C(52A)	1.75(3)
C(52A)-F(3A)	1.09(5)
C(52A)-F(2A)	1.33(4)
C(52A)-F(1A)	1.36(2)
O(1)-C(11)	1.322(4)
O(2)-C(17)	1.295(5)
O(3)-C(18)	1.196(5)
O(4)-C(18)	1.328(4)
O(4)-C(19)	1.462(4)
O(5)-C(35)	1.216(5)
O(6)-C(35)	1.330(4)
O(6)-C(36)	1.457(5)
N(1)-C(1)	1.346(5)
N(1)-C(5)	1.365(5)
N(2)-C(6)	1.356(5)
N(2)-C(10)	1.357(5)

C(1)-C(2)	1.382(5)
C(2)-C(3)	1.392(5)
C(3)-C(4)	1.383(5)
C(3)-C(18)	1.508(5)
C(4)-C(5)	1.388(5)
C(5)-C(6)	1.467(6)
C(6)-C(7)	1.393(6)
C(7)-C(8)	1.393(6)
C(8)-C(9)	1.393(5)
C(8)-C(35)	1.485(6)
C(9)-C(10)	1.374(6)
C(11)-C(12)	1.392(6)
C(11)-C(17)	1.459(6)
C(12)-C(13)	1.390(5)
C(13)-C(14)	1.392(6)
C(14)-C(15)	1.393(6)
C(15)-C(16)	1.374(6)
C(16)-C(17)	1.407(5)
C(19)-C(20)	1.505(5)
C(20)-C(21)	1.533(5)
C(21)-C(22)	1.522(5)
C(22)-C(23)	1.525(5)
C(23)-C(24)	1.522(5)
C(24)-C(25)	1.527(5)
C(25)-C(26)	1.524(5)
C(26)-C(27)	1.534(5)
C(27)-C(28)	1.522(5)
C(28)-C(29)	1.526(5)
C(29)-C(30)	1.524(5)
C(30)-C(31)	1.526(5)
C(31)-C(32)	1.512(5)
C(32)-C(33)	1.522(5)

C(33)-C(34)	1.512(6)
C(36)-C(37)	1.505(5)
C(37)-C(38)	1.517(5)
C(38)-C(39)	1.523(5)
C(39)-C(40)	1.520(5)
C(40)-C(41)	1.524(5)
C(41)-C(42)	1.527(5)
C(42)-C(43)	1.523(5)
C(43)-C(44)	1.522(5)
C(44)-C(45)	1.527(5)
C(45)-C(46)	1.527(5)
C(46)-C(47)	1.524(5)
C(47)-C(48)	1.522(5)
C(48)-C(49)	1.526(5)
C(49)-C(50)	1.521(6)
C(50)-C(51)	1.522(5)
N(2)-Pt-N(1)	80.14(13)
N(2)-Pt-O(2)	98.75(13)
N(1)-Pt-O(2)	178.24(14)
N(2)-Pt-O(1)	179.83(13)
N(1)-Pt-O(1)	100.02(13)
O(2)-Pt-O(1)	81.09(11)
O(8)-S-O(9)	114.6(4)
O(8)-S-O(7)	115.1(7)
O(9)-S-O(7)	116.3(7)
O(8)-S-C(52)	102.6(6)
O(9)-S-C(52)	103.8(5)
O(7)-S-C(52)	101.7(6)
F(1)-C(52)-F(3)	107.4(9)
F(1)-C(52)-F(2)	109.8(10)
F(3)-C(52)-F(2)	104.8(8)
F(1)-C(52)-S	110.5(9)

F(3)-C(52)-S	110.7(6)
F(2)-C(52)-S	113.4(8)
O(9A)-SA-O(8A)	115.3(19)
O(9A)-SA-O(7A)	116.0(16)
O(8A)-SA-O(7A)	111.1(14)
O(9A)-SA-C(52A)	105.8(17)
O(8A)-SA-C(52A)	107.0(14)
O(7A)-SA-C(52A)	99.9(14)
F(3A)-C(52A)-F(2A)	112(3)
F(3A)-C(52A)-F(1A)	107(3)
F(2A)-C(52A)-F(1A)	101(2)
F(3A)-C(52A)-SA	108(2)
F(2A)-C(52A)-SA	119(2)
F(1A)-C(52A)-SA	108.8(17)
C(11)-O(1)-Pt	113.2(2)
C(17)-O(2)-Pt	113.6(3)
C(18)-O(4)-C(19)	116.4(3)
C(35)-O(6)-C(36)	114.9(3)
C(1)-N(1)-C(5)	120.7(3)
C(1)-N(1)-Pt	123.8(3)
C(5)-N(1)-Pt	115.5(3)
C(6)-N(2)-C(10)	119.6(4)
C(6)-N(2)-Pt	116.8(3)
C(10)-N(2)-Pt	123.6(3)
N(1)-C(1)-C(2)	120.6(4)
C(1)-C(2)-C(3)	119.0(4)
C(4)-C(3)-C(2)	120.6(3)
C(4)-C(3)-C(18)	121.1(4)
C(2)-C(3)-C(18)	118.3(4)
C(3)-C(4)-C(5)	118.1(4)
N(1)-C(5)-C(4)	120.9(4)
N(1)-C(5)-C(6)	113.8(3)

C(4)-C(5)-C(6)	125.2(4)
N(2)-C(6)-C(7)	121.0(4)
N(2)-C(6)-C(5)	113.2(4)
C(7)-C(6)-C(5)	125.5(3)
C(6)-C(7)-C(8)	119.4(4)
C(9)-C(8)-C(7)	118.5(4)
C(9)-C(8)-C(35)	119.2(4)
C(7)-C(8)-C(35)	122.3(3)
C(10)-C(9)-C(8)	119.9(4)
N(2)-C(10)-C(9)	121.4(4)
O(1)-C(11)-C(12)	117.1(4)
O(1)-C(11)-C(17)	115.1(4)
C(12)-C(11)-C(17)	127.8(4)
C(13)-C(12)-C(11)	130.0(4)
C(12)-C(13)-C(14)	129.0(4)
C(13)-C(14)-C(15)	127.0(4)
C(16)-C(15)-C(14)	130.4(4)
C(15)-C(16)-C(17)	130.1(4)
O(2)-C(17)-C(16)	118.0(4)
O(2)-C(17)-C(11)	116.8(3)
C(16)-C(17)-C(11)	125.2(4)
O(3)-C(18)-O(4)	125.3(4)
O(3)-C(18)-C(3)	123.3(4)
O(4)-C(18)-C(3)	111.3(3)
O(4)-C(19)-C(20)	107.0(3)
C(19)-C(20)-C(21)	111.7(3)
C(22)-C(21)-C(20)	113.5(3)
C(21)-C(22)-C(23)	113.2(3)
C(24)-C(23)-C(22)	114.0(3)
C(23)-C(24)-C(25)	113.8(3)
C(26)-C(25)-C(24)	113.7(3)
C(25)-C(26)-C(27)	113.4(3)

C(28)-C(27)-C(26)	113.5(3)
C(27)-C(28)-C(29)	113.6(3)
C(30)-C(29)-C(28)	114.4(3)
C(29)-C(30)-C(31)	113.7(3)
C(32)-C(31)-C(30)	113.8(3)
C(31)-C(32)-C(33)	113.9(3)
C(34)-C(33)-C(32)	114.7(4)
O(5)-C(35)-O(6)	124.0(4)
O(5)-C(35)-C(8)	123.1(4)
O(6)-C(35)-C(8)	112.9(4)
O(6)-C(36)-C(37)	109.9(3)
C(36)-C(37)-C(38)	109.3(3)
C(37)-C(38)-C(39)	116.5(3)
C(40)-C(39)-C(38)	111.6(3)
C(39)-C(40)-C(41)	115.6(3)
C(40)-C(41)-C(42)	113.7(3)
C(43)-C(42)-C(41)	114.2(3)
C(44)-C(43)-C(42)	113.8(3)
C(43)-C(44)-C(45)	113.6(3)
C(46)-C(45)-C(44)	114.1(3)
C(47)-C(46)-C(45)	113.5(3)
C(48)-C(47)-C(46)	113.8(3)
C(47)-C(48)-C(49)	113.6(3)
C(50)-C(49)-C(48)	13.9(3)
C(49)-C(50)-C(51)	113.9(4)

Tabella IV.16 Fattori termici anisotropi (Å^2 x 10^3) per il complesso 17

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Pt	16(1)	20(1)	14(1)	-4(1)	3(1)	6(1)
S	24(2)	23(1)	29(2)	-13(1)	5(2)	0(2)
O(7)	53(6)	29(4)	124(8)	-6(4)	53(5)	24(4)
O(8)	39(4)	124(6)	15(3)	-4(3)	6(2)	5(4)
O(9)	16(3)	22(3)	47(3)	5(2)	15(2)	-1(2)
C(52)	26(5)	26(5)	51(5)	1(4)	-8(4)	15(4)
F(1)	37(5)	22(4)	155(14)	-6(7)	-11(7)	8(3)
F(2)	78(7)	92(6)	44(4)	-49(4)	4(4)	41(5)
F(3)	13(2)	25(2)	105(4)	12(2)	-3(2)	-3(2)
SA	42(7)	31(4)	18(3)	0(3)	1(6)	7(7)
O(7A)	65(11)	77(11)	83(10)	37(9)	43(9)	35(9)
F(1A)	122(12)	87(10)	88(9)	35(8)	68(9)	70(9)
F(2A)	45(10)	42(13)	97(17)	-1(10)	22(11)	41(9)
F(3A)	130(20)	240(30)	120(30)	-133(19)	-64(17)	160(20)
O(1)	18(2)	27(2)	14(1)	-5(1)	5(1)	6(1)
O(2)	23(2)	22(2)	15(1)	-5(1)	6(1)	2(1)
O(3)	53(2)	19(2)	31(2)	-3(2)	22(2)	-2(2)
O(4)	24(2)	20(2)	16(1)	-6(1)	10(1)	3(1)
O(5)	29(2)	22(2)	23(2)	-4(1)	9(1)	0(2)
O(6)	27(2)	18(2)	18(2)	-5(1)	7(1)	3(1)
O(10)	69(3)	53(3)	72(3)	8(2)	31(2)	6(2)
N(1)	16(2)	21(2)	18(2)	-3(2)	1(2)	8(2)
N(2)	13(2)	20(2)	19(2)	-6(2)	0(2)	5(2)
C(1)	16(2)	16(2)	19(2)	-7(2)	-1(2)	3(2)
C(2)	15(2)	18(2)	20(2)	2(2)	0(2)	4(2)
C(3)	17(2)	19(2)	13(2)	-1(2)	0(2)	9(2)
C(4)	18(2)	13(2)	18(2)	-3(2)	2(2)	7(2)
C(5)	18(2)	18(2)	15(2)	-2(2)	-2(2)	6(2)

C(6)	11(2)	25(3)	15(2)	-1(2)	-1(2)	8(2)
C(7)	19(2)	25(3)	15(2)	-2(2)	1(2)	11(2)
C(8)	23(3)	18(2)	15(2)	-3(2)	1(2)	9(2)
C(9)	20(3)	26(3)	25(2)	-2(2)	8(2)	1(2)
C(10)	21(3)	33(3)	20(2)	-6(2)	7(2)	8(2)
C(11)	16(2)	25(3)	9(2)	-4(2)	-5(2)	6(2)
C(12)	24(3)	23(3)	17(2)	-3(2)	-3(2)	13(2)
C(13)	29(3)	27(3)	22(2)	-12(2)	-7(2)	15(2)
C(14)	32(3)	45(3)	18(2)	-11(2)	2(2)	21(3)
C(15)	29(3)	49(3)	11(2)	0(2)	3(2)	19(3)
C(16)	23(3)	31(3)	17(2)	1(2)	6(2)	12(2)
C(17)	18(2)	27(3)	17(2)	-2(2)	2(2)	14(2)
C(18)	23(3)	12(2)	18(2)	-5(2)	1(2)	8(2)
C(19)	25(3)	24(3)	15(2)	1(2)	10(2)	10(2)
C(20)	25(3)	23(3)	20(2)	-6(2)	6(2)	7(2)
C(21)	25(3)	22(3)	17(2)	2(2)	5(2)	8(2)
C(22)	20(2)	26(3)	17(2)	-3(2)	1(2)	6(2)
C(23)	28(3)	25(3)	17(2)	-1(2)	4(2)	15(2)
C(24)	24(3)	28(3)	11(2)	-1(2)	0(2)	11(2)
C(25)	23(3)	24(3)	16(2)	-2(2)	-1(2)	9(2)
C(26)	21(2)	22(3)	18(2)	0(2)	5(2)	9(2)
C(27)	23(3)	21(3)	17(2)	-2(2)	5(2)	9(2)
C(28)	21(2)	23(3)	17(2)	-1(2)	4(2)	9(2)
C(29)	22(3)	32(3)	15(2)	-3(2)	4(2)	7(2)
C(30)	27(3)	21(3)	22(2)	-3(2)	6(2)	10(2)
C(31)	25(3)	28(3)	19(2)	3(2)	6(2)	13(2)
C(32)	29(3)	24(3)	21(2)	-3(2)	4(2)	12(2)
C(33)	35(3)	36(3)	19(2)	-5(2)	3(2)	16(2)
C(34)	48(4)	44(3)	30(3)	-15(2)	4(2)	20(3)
C(35)	19(3)	23(3)	24(2)	-1(2)	3(2)	12(2)
C(36)	24(3)	18(2)	21(2)	-7(2)	4(2)	7(2)
C(37)	21(3)	19(2)	19(2)	-4(2)	1(2)	1(2)

C(38)	27(3)	24(3)	18(2)	0(2)	6(2)	7(2)
C(39)	32(3)	20(3)	16(2)	-2(2)	4(2)	10(2)
C(40)	24(3)	24(3)	20(2)	-2(2)	6(2)	7(2)
C(41)	25(3)	22(3)	20(2)	2(2)	5(2)	9(2)
C(42)	22(3)	26(3)	20(2)	-1(2)	5(2)	9(2)
C(43)	26(3)	22(3)	15(2)	3(2)	5(2)	9(2)
C(44)	21(3)	24(3)	21(2)	3(2)	4(2)	9(2)
C(45)	24(3)	27(3)	18(2)	1(2)	5(2)	10(2)
C(46)	19(2)	23(3)	17(2)	1(2)	3(2)	7(2)
C(47)	19(2)	19(2)	18(2)	2(2)	4(2)	6(2)
C(48)	21(3)	20(3)	21(2)	1(2)	4(2)	5(2)
C(49)	22(3)	29(3)	19(2)	-3(2)	3(2)	8(2)
C(50)	27(3)	30(3)	25(2)	-4(2)	1(2)	10(2)
C(51)	33(3)	44(3)	31(3)	-15(2)	11(2)	10(3)

Tabella IV.17 Coordinate atomiche (Å x 10^4) e fattori termici isotropi degli atomi di idrogeno (Å^2 x 10^3) per il complesso 17

	x	y	z	U(eq)
H(10W)	540(60)	8360(40)	-234(11)	50
H(11W)	280(60)	8730(30)	272(13)	50
H(1A)	8670	16098	9879	21
H(2A)	10140	16220	9231	22
H(4A)	8023	12755	8911	19
H(7A)	5896	11162	9088	23
H(9A)	2316	10199	9934	29
H(10A)	3376	11975	10360	29
H(12A)	7610	17609	11132	25
H(13A)	6552	18284	11708	31
H(14A)	4726	17300	12156	36
H(15A)	3557	15384	12123	34
H(16A)	3577	14046	11594	27
H(19A)	11640	13951	7927	24
H(19B)	9983	14083	7632	24
H(20A)	8849	12020	7623	27
H(20B)	10509	11894	7913	27
H(21A)	10169	12649	6954	25
H(21B)	11898	12677	7243	25
H(22A)	9369	10547	7024	25
H(22B)	11203	10640	7247	25
H(23A)	10277	11249	6295	26
H(23B)	12115	11358	6518	26
H(24A)	9660	9175	6351	24
H(24B)	11520	9304	6554	24
H(25A)	10449	9884	5608	25
H(25B)	12311	10017	5812	25

H(26A)	9876	7818	5659	23
H(26B)	11741	7954	5860	23
H(27A)	10651	8534	4913	24
H(27B)	12517	8671	5114	24
H(28A)	10092	6470	4965	23
H(28B)	11961	6611	5162	23
H(29A)	10849	7190	4221	28
H(29B)	12715	7323	4418	28
H(30A)	10285	5125	4261	27
H(30B)	12153	5259	4457	27
H(31A)	11046	5868	3519	27
H(31B)	12911	5991	3716	27
H(32A)	10463	3812	3553	28
H(32B)	12323	3931	3753	28
H(33A)	11268	4571	2818	34
H(33B)	13118	4658	3019	34
H(34A)	12025	2995	2505	59
H(34B)	10628	2511	2827	59
H(34C)	12481	2599	3028	59
H(36A)	1884	7893	8480	25
H(36B)	3627	7654	8615	25
H(37A)	4509	8828	7945	25
H(37B)	2640	8799	7790	25
H(38A)	1912	6739	7710	28
H(38B)	3746	6739	7886	28
H(39A)	2645	7534	6985	26
H(39B)	4518	7627	7162	26
H(40A)	2014	5467	6997	27
H(40B)	3875	5553	7180	27
H(41A)	4587	6282	6432	26
H(41B)	2712	6159	6250	26
H(42A)	3982	4210	6485	26

H(42B)	2118	4097	6293	26
H(43A)	2850	4780	5544	25
H(43B)	4720	4908	5736	25
H(44A)	2260	2722	5594	26
H(44B)	4119	2841	5796	26
H(45A)	3047	3416	4850	27
H(45B)	4908	3543	5052	27
H(46A)	4324	1477	5101	23
H(46B)	2461	1349	4899	23
H(47A)	3241	2062	4157	22
H(47B)	5105	2199	4359	22
H(48A)	2673	2	4198	25
H(48B)	4528	131	4408	25
H(49A)	3499	729	3462	28
H(49B)	5355	861	3672	28
H(50A)	2921	-1330	3497	32
H(50B)	4765	-1208	3717	32
H(51A)	4375	-1752	2897	53
H(51B)	5643	-499	2987	53
H(51C)	3797	-620	2767	53

Tabella IV.18 Angoli di torsione [deg] per il complesso 17

O(8)-S-C(52)-F(1)	61.2(10)
O(9)-S-C(52)-F(1)	-58.4(10)
O(7)-S-C(52)-F(1)	-179.5(10)
O(8)-S-C(52)-F(3)	-57.6(7)
O(9)-S-C(52)-F(3)	-177.2(6)
O(7)-S-C(52)-F(3)	61.7(8)
O(8)-S-C(52)-F(2)	-175.1(8)
O(9)-S-C(52)-F(2)	65.3(9)
O(7)-S-C(52)-F(2)	-55.8(10)
O(9A)-SA-C(52A)-F(3A)	48(3)
O(8A)-SA-C(52A)-F(3A)	171(3)
O(7A)-SA-C(52A)-F(3A)	-73(3)
O(9A)-SA-C(52A)-F(2A)	177(3)
O(8A)-SA-C(52A)-F(2A)	-60(3)
O(7A)-SA-C(52A)-F(2A)	56(3)
O(9A)-SA-C(52A)-F(1A)	-68(2)
O(8A)-SA-C(52A)-F(1A)	55(2)
O(7A)-SA-C(52A)-F(1A)	171.2(16)
N(2)-Pt-O(1)-C(11)	-18(85)
N(1)-Pt-O(1)-C(11)	176.6(3)
O(2)-Pt-O(1)-C(11)	-4.8(3)
N(2)-Pt-O(2)-C(17)	-177.0(3)
N(1)-Pt-O(2)-C(17)	132(4)
O(1)-Pt-O(2)-C(17)	3.0(3)
N(2)-Pt-N(1)-C(1)	173.8(3)
O(2)-Pt-N(1)-C(1)	-135(4)
O(1)-Pt-N(1)-C(1)	-6.2(3)
N(2)-Pt-N(1)-C(5)	-5.9(3)
O(2)-Pt-N(1)-C(5)	45(5)
O(1)-Pt-N(1)-C(5)	174.1(3)

N(1)-Pt-N(2)-C(6)	6.3(3)
O(2)-Pt-N(2)-C(6)	-172.3(3)
O(1)-Pt-N(2)-C(6)	-159(100)
N(1)-Pt-N(2)-C(10)	-173.2(4)
O(2)-Pt-N(2)-C(10)	8.2(4)
O(1)-Pt-N(2)-C(10)	22(86)
C(5)-N(1)-C(1)-C(2)	-0.2(6)
Pt-N(1)-C(1)-C(2)	-179.9(3)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-0.8(6)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.3(6)
C(1)-C(2)-C(3)-C(18)	176.9(4)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	2.3(6)
C(18)-C(3)-C(4)-C(5)	-174.8(4)
C(1)-N(1)-C(5)-C(4)	2.3(6)
Pt-N(1)-C(5)-C(4)	-178.0(3)
C(1)-N(1)-C(5)-C(6)	-175.1(4)
Pt-N(1)-C(5)-C(6)	4.6(5)
C(3)-C(4)-C(5)-N(1)	-3.3(6)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	173.8(4)
C(10)-N(2)-C(6)-C(7)	0.0(6)
Pt-N(2)-C(6)-C(7)	-179.5(3)
C(10)-N(2)-C(6)-C(5)	173.9(4)
Pt-N(2)-C(6)-C(5)	-5.6(5)
N(1)-C(5)-C(6)-N(2)	0.5(5)
C(4)-C(5)-C(6)-N(2)	-176.7(4)
N(1)-C(5)-C(6)-C(7)	174.2(4)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	-3.1(7)
N(2)-C(6)-C(7)-C(8)	1.8(6)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-171.4(4)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-2.3(6)
C(6)-C(7)-C(8)-C(35)	178.8(4)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	1.1(6)

C(35)-C(8)-C(9)-C(10)	-179.9(4)
C(6)-N(2)-C(10)-C(9)	-1.2(6)
Pt-N(2)-C(10)-C(9)	178.2(3)
C(8)-C(9)-C(10)-N(2)	0.6(7)
Pt-O(1)-C(11)-C(12)	-172.4(3)
Pt-O(1)-C(11)-C(17)	5.6(4)
O(1)-C(11)-C(12)-C(13)	176.3(4)
C(17)-C(11)-C(12)-C(13)	-1.5(8)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	5.7(8)
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	0.2(8)
C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	-6.0(8)
C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	1.5(9)
Pt-O(2)-C(17)-C(16)	-179.7(3)
Pt-O(2)-C(17)-C(11)	-0.9(5)
C(15)-C(16)-C(17)-O(2)	-174.5(4)
C(15)-C(16)-C(17)-C(11)	6.9(8)
O(1)-C(11)-C(17)-O(2)	-3.2(6)
C(12)-C(11)-C(17)-O(2)	174.6(4)
O(1)-C(11)-C(17)-C(16)	175.4(4)
C(12)-C(11)-C(17)-C(16)	-6.8(7)
C(19)-O(4)-C(18)-O(3)	-2.8(6)
C(19)-O(4)-C(18)-C(3)	176.2(3)
C(4)-C(3)-C(18)-O(3)	179.7(4)
C(2)-C(3)-C(18)-O(3)	2.5(6)
C(4)-C(3)-C(18)-O(4)	0.7(6)
C(2)-C(3)-C(18)-O(4)	-176.5(4)
C(18)-O(4)-C(19)-C(20)	172.0(4)
O(4)-C(19)-C(20)-C(21)	179.4(3)
C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	173.6(4)
C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	171.9(4)
C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	179.3(4)
C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	177.7(4)

C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	179.8(4)
C(24)-C(25)-C(26)-C(27)	179.7(4)
C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	179.9(4)
C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	179.6(4)
C(27)-C(28)-C(29)-C(30)	-179.7(4)
C(28)-C(29)-C(30)-C(31)	179.8(4)
C(29)-C(30)-C(31)-C(32)	-179.5(4)
C(30)-C(31)-C(32)-C(33)	-179.5(4)
C(31)-C(32)-C(33)-C(34)	-178.7(4)
C(36)-O(6)-C(35)-O(5)	-2.6(6)
C(36)-O(6)-C(35)-C(8)	177.5(3)
C(9)-C(8)-C(35)-O(5)	-21.5(7)
C(7)-C(8)-C(35)-O(5)	157.4(4)
C(9)-C(8)-C(35)-O(6)	158.4(4)
C(7)-C(8)-C(35)-O(6)	-22.7(6)
C(35)-O(6)-C(36)-C(37)	171.5(3)
O(6)-C(36)-C(37)-C(38)	168.8(3)
C(36)-C(37)-C(38)-C(39)	-177.4(4)
C(37)-C(38)-C(39)-C(40)	176.2(4)
C(38)-C(39)-C(40)-C(41)	-179.3(4)
C(39)-C(40)-C(41)-C(42)	178.5(4)
C(40)-C(41)-C(42)-C(43)	-178.9(4)
C(41)-C(42)-C(43)-C(44)	179.4(4)
C(42)-C(43)-C(44)-C(45)	-178.8(4)
C(43)-C(44)-C(45)-C(46)	179.6(4)
C(44)-C(45)-C(46)-C(47)	180.0(4)
C(45)-C(46)-C(47)-C(48)	179.6(4)
C(46)-C(47)-C(48)-C(49)	-179.0(4)
C(47)-C(48)-C(49)-C(50)	179.9(4)
C(48)-C(49)-C(50)-C(51)	-178.8(4)

Table 1. Crystal data and structure refinement for ss42ac.

Identification code	ss42ac
Empirical formula	C42 H54 N2 O4 Zn
Formula weight	716.24
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71073 A
Crystal system, space group	Triclinic, P-1
Unit cell dimensions	a = 10.8621(16) A alpha = 77.235(5) deg. b = 13.4763(18) A beta = 86.019(6) deg. c = 14.342(2) A gamma = 75.809(5) deg.
Volume	1984.8(5) A^3
Z, Calculated density	2, 1.198 Mg/m^3
Absorption coefficient	0.660 mm^-1
F(000)	764
Crystal size	0.18 x 0.16 x 0.06 mm
Theta range for data collection	1.46 to 26.37 deg.
Limiting indices	-13<=h<=13, -16<=k<=16, -17<=l<=17

Reflections collected / unique 37375 / 8090 [R(int) = 0.0788]

Completeness to theta = 26.37 99.7 %

Refinement method Full-matrix least-squares on F^2

Data / restraints / parameters 8090 / 0 / 437

Goodness-of-fit on F^2 0.972

Final R indices [I>2sigma(I)] R1 = 0.0622, wR2 = 0.1676

R indices (all data) R1 = 0.1442, wR2 = 0.2163

Largest diff. peak and hole 1.136 and -0.415 e.A^-3

Table 2. Atomic coordinates (x 10^4) and equivalent isotropic displacement parameters (A^2 x 10^3) for ss42ac.
U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor.

	x	y	z	U(eq)
Zn(1)	6855(1)	6398(1)	6158(1)	62(1)
O(1)	6370(3)	7168(3)	7291(2)	79(1)
O(2)	8391(3)	5743(2)	7081(2)	71(1)
O(3)	5417(3)	7426(2)	5273(2)	66(1)
O(4)	7794(3)	7443(2)	5320(2)	74(1)
N(1)	5670(3)	5319(3)	6664(2)	60(1)
N(2)	7445(3)	5220(3)	5335(2)	57(1)
C(1)	4803(4)	5386(4)	7365(3)	71(1)
C(2)	4033(5)	4694(4)	7639(4)	79(1)
C(3)	4113(4)	3905(4)	7163(3)	66(1)
C(4)	5017(4)	3839(3)	6421(3)	61(1)
C(5)	5781(4)	4535(3)	6197(3)	56(1)
C(6)	6773(4)	4491(3)	5433(3)	54(1)
C(7)	7019(4)	3757(3)	4864(3)	63(1)
C(8)	7993(4)	3745(4)	4183(3)	69(1)
C(9)	8708(4)	4470(4)	4127(3)	70(1)
C(10)	8408(4)	5189(4)	4692(3)	65(1)
C(11)	3291(4)	3136(4)	7411(3)	76(1)
C(12)	3923(5)	2120(4)	8060(4)	83(1)
C(13)	3068(5)	1352(4)	8303(4)	84(2)
C(14)	3665(6)	322(4)	8920(4)	100(2)
C(15)	2826(6)	-463(5)	9106(4)	115(2)

C(16)	3458(7)	-1514(6)	9645(6)	145(3)
C(17)	2820(10)	-2365(6)	9716(6)	173(4)
C(18)	3601(11)	-3437(7)	10245(9)	218(5)
C(19)	3059(11)	-4258(8)	10334(9)	223(5)
C(20)	8273(5)	2974(4)	3530(4)	85(2)
C(21)	9444(5)	2111(4)	3789(4)	94(2)
C(22)	9860(6)	1474(5)	3013(5)	106(2)
C(23)	10940(8)	590(6)	3273(6)	166(3)
C(24)	11429(14)	26(9)	2434(10)	260(7)
C(25)	10880(30)	-670(20)	2363(18)	398(14)
C(26)	11715(14)	-1689(15)	2756(14)	348(12)
C(27)	10769(19)	-2320(30)	2418(17)	520(30)
C(28)	10323(11)	-2922(10)	2980(10)	237(6)
C(29)	7233(5)	6985(4)	7897(3)	74(1)
C(30)	8374(4)	6160(4)	7784(3)	66(1)
C(31)	9426(5)	5820(5)	8408(4)	92(2)
C(32)	9685(7)	6166(7)	9193(5)	127(2)
C(33)	9007(10)	6920(8)	9616(6)	151(3)
C(34)	7845(9)	7558(7)	9350(5)	140(3)
C(35)	7067(6)	7582(5)	8604(4)	109(2)
C(36)	7080(4)	8262(3)	4818(3)	61(1)
C(37)	7601(5)	9104(4)	4351(4)	76(1)
C(38)	7091(6)	10055(4)	3791(4)	89(2)
C(39)	5889(6)	10496(4)	3486(4)	88(2)
C(40)	4865(6)	10019(4)	3694(3)	84(2)
C(41)	4804(5)	9064(4)	4243(3)	76(1)
C(42)	5742(4)	8247(3)	4788(3)	61(1)

Table 3. Bond lengths [A] and angles [deg] for ss42ac.

Zn(1)-O(4)	2.063(3)
Zn(1)-O(1)	2.087(3)
Zn(1)-O(2)	2.093(3)
Zn(1)-O(3)	2.100(3)
Zn(1)-N(2)	2.133(3)
Zn(1)-N(1)	2.150(3)
O(1)-C(29)	1.264(5)
O(2)-C(30)	1.255(5)
O(3)-C(42)	1.285(5)
O(4)-C(36)	1.282(5)
N(1)-C(1)	1.332(5)
N(1)-C(5)	1.348(5)
N(2)-C(6)	1.341(5)
N(2)-C(10)	1.345(5)
C(1)-C(2)	1.377(6)
C(2)-C(3)	1.369(6)
C(3)-C(4)	1.399(6)
C(3)-C(11)	1.497(6)
C(4)-C(5)	1.373(6)
C(5)-C(6)	1.483(6)
C(6)-C(7)	1.382(6)
C(7)-C(8)	1.389(6)
C(8)-C(9)	1.376(6)
C(8)-C(20)	1.511(6)
C(9)-C(10)	1.362(6)
C(11)-C(12)	1.509(6)
C(12)-C(13)	1.523(7)
C(13)-C(14)	1.492(7)
C(14)-C(15)	1.528(8)

C(15)-C(16)	1.479(9)
C(16)-C(17)	1.461(10)
C(17)-C(18)	1.545(11)
C(18)-C(19)	1.353(11)
C(20)-C(21)	1.503(7)
C(21)-C(22)	1.529(7)
C(22)-C(23)	1.454(9)
C(23)-C(24)	1.557(12)
C(24)-C(25)	1.26(2)
C(25)-C(26)	1.46(3)
C(26)-C(27)	1.64(4)
C(27)-C(28)	1.18(2)
C(29)-C(35)	1.404(7)
C(29)-C(30)	1.474(7)
C(30)-C(31)	1.422(6)
C(31)-C(32)	1.380(8)
C(32)-C(33)	1.337(10)
C(33)-C(34)	1.367(10)
C(34)-C(35)	1.399(9)
C(36)-C(37)	1.408(6)
C(36)-C(42)	1.462(6)
C(37)-C(38)	1.362(7)
C(38)-C(39)	1.354(7)
C(39)-C(40)	1.399(7)
C(40)-C(41)	1.368(7)
C(41)-C(42)	1.429(6)

O(4)-Zn(1)-O(1)	97.50(13)
O(4)-Zn(1)-O(2)	92.35(12)
O(1)-Zn(1)-O(2)	76.48(12)
O(4)-Zn(1)-O(3)	77.08(12)
O(1)-Zn(1)-O(3)	93.92(12)

O(2)-Zn(1)-O(3)	164.83(12)
O(4)-Zn(1)-N(2)	95.50(13)
O(1)-Zn(1)-N(2)	163.24(13)
O(2)-Zn(1)-N(2)	92.48(12)
O(3)-Zn(1)-N(2)	99.27(12)
O(4)-Zn(1)-N(1)	164.37(12)
O(1)-Zn(1)-N(1)	94.10(13)
O(2)-Zn(1)-N(1)	100.54(12)
O(3)-Zn(1)-N(1)	91.75(12)
N(2)-Zn(1)-N(1)	75.31(13)
C(29)-O(1)-Zn(1)	115.0(3)
C(30)-O(2)-Zn(1)	115.3(3)
C(42)-O(3)-Zn(1)	113.6(3)
C(36)-O(4)-Zn(1)	115.4(3)
C(1)-N(1)-C(5)	117.6(4)
C(1)-N(1)-Zn(1)	125.7(3)
C(5)-N(1)-Zn(1)	116.6(3)
C(6)-N(2)-C(10)	117.8(4)
C(6)-N(2)-Zn(1)	117.7(3)
C(10)-N(2)-Zn(1)	124.4(3)
N(1)-C(1)-C(2)	123.5(4)
C(3)-C(2)-C(1)	119.9(4)
C(2)-C(3)-C(4)	116.7(4)
C(2)-C(3)-C(11)	122.8(4)
C(4)-C(3)-C(11)	120.6(4)
C(5)-C(4)-C(3)	120.8(4)
N(1)-C(5)-C(4)	121.5(4)
N(1)-C(5)-C(6)	115.2(4)
C(4)-C(5)-C(6)	123.3(4)
N(2)-C(6)-C(7)	121.4(4)
N(2)-C(6)-C(5)	114.6(4)
C(7)-C(6)-C(5)	124.0(4)

C(6)-C(7)-C(8)	120.6(4)
C(9)-C(8)-C(7)	116.9(4)
C(9)-C(8)-C(20)	120.8(4)
C(7)-C(8)-C(20)	122.3(4)
C(10)-C(9)-C(8)	120.1(4)
N(2)-C(10)-C(9)	123.2(4)
C(3)-C(11)-C(12)	113.5(4)
C(11)-C(12)-C(13)	112.5(4)
C(14)-C(13)-C(12)	114.5(5)
C(13)-C(14)-C(15)	113.9(5)
C(16)-C(15)-C(14)	113.9(6)
C(17)-C(16)-C(15)	118.0(7)
C(16)-C(17)-C(18)	113.5(8)
C(19)-C(18)-C(17)	116.3(10)
C(21)-C(20)-C(8)	113.8(4)
C(20)-C(21)-C(22)	112.8(5)
C(23)-C(22)-C(21)	114.0(6)
C(22)-C(23)-C(24)	112.8(9)
C(25)-C(24)-C(23)	114.9(16)
C(24)-C(25)-C(26)	108(2)
C(25)-C(26)-C(27)	91.9(16)
C(28)-C(27)-C(26)	121(3)
O(1)-C(29)-C(35)	119.1(5)
O(1)-C(29)-C(30)	116.3(4)
C(35)-C(29)-C(30)	124.7(5)
O(2)-C(30)-C(31)	119.2(5)
O(2)-C(30)-C(29)	116.2(4)
C(31)-C(30)-C(29)	124.6(5)
C(32)-C(31)-C(30)	131.5(6)
C(33)-C(32)-C(31)	130.8(7)
C(32)-C(33)-C(34)	126.9(7)
C(33)-C(34)-C(35)	129.9(7)

C(34)-C(35)-C(29)	131.5(7)
O(4)-C(36)-C(37)	119.8(4)
O(4)-C(36)-C(42)	115.8(4)
C(37)-C(36)-C(42)	124.5(4)
C(38)-C(37)-C(36)	132.9(5)
C(39)-C(38)-C(37)	130.8(5)
C(38)-C(39)-C(40)	125.2(5)
C(41)-C(40)-C(39)	130.3(5)
C(40)-C(41)-C(42)	131.7(5)
O(3)-C(42)-C(41)	119.0(4)
O(3)-C(42)-C(36)	116.5(4)
C(41)-C(42)-C(36)	124.4(4)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters (A^2 x 10^3) for ss42ac.

The anisotropic displacement factor exponent takes the form:

-2 pi^2 [h^2 a*^2 U11 + ... + 2 h k a* b* U12]

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Zn(1)	58(1)	56(1)	77(1)	-17(1)	-10(1)	-14(1)
O(1)	68(2)	79(2)	93(2)	-32(2)	-14(2)	-8(2)
O(2)	67(2)	67(2)	80(2)	-20(2)	-12(2)	-10(2)
O(3)	58(2)	61(2)	83(2)	-12(2)	-12(2)	-20(2)
O(4)	58(2)	65(2)	100(2)	-12(2)	-11(2)	-20(2)
N(1)	57(2)	59(2)	67(2)	-18(2)	-6(2)	-13(2)
N(2)	48(2)	55(2)	69(2)	-13(2)	-4(2)	-15(2)
C(1)	68(3)	79(3)	74(3)	-31(3)	2(3)	-18(3)
C(2)	76(3)	93(4)	76(3)	-30(3)	14(3)	-27(3)
C(3)	56(3)	72(3)	69(3)	-6(2)	-4(2)	-20(2)
C(4)	59(3)	62(3)	65(3)	-15(2)	-3(2)	-20(2)
C(5)	47(2)	56(3)	62(3)	-8(2)	-9(2)	-9(2)
C(6)	48(2)	55(3)	59(2)	-12(2)	-9(2)	-11(2)
C(7)	53(3)	59(3)	81(3)	-16(2)	-7(2)	-18(2)
C(8)	53(3)	73(3)	85(3)	-26(3)	-1(2)	-15(2)
C(9)	56(3)	81(3)	79(3)	-28(3)	7(2)	-20(2)
C(10)	53(3)	68(3)	78(3)	-16(2)	-2(2)	-19(2)
C(11)	67(3)	83(4)	79(3)	-7(3)	1(2)	-27(3)
C(12)	87(4)	89(4)	79(3)	-13(3)	-2(3)	-37(3)
C(13)	94(4)	85(4)	78(3)	-15(3)	4(3)	-35(3)
C(14)	111(5)	90(4)	95(4)	-5(3)	3(3)	-32(4)
C(15)	133(5)	97(5)	107(5)	13(4)	1(4)	-43(4)
C(16)	145(7)	111(6)	162(7)	19(5)	3(5)	-46(5)
C(17)	233(10)	121(7)	167(7)	24(6)	-30(7)	-87(7)
C(18)	222(11)	115(7)	302(14)	22(9)	-31(10)	-63(8)

C(19)	229(12)	132(8)	313(15)	-12(9)	-68(10)	-66(8)
C(20)	71(3)	100(4)	100(4)	-49(3)	6(3)	-27(3)
C(21)	76(4)	80(4)	136(5)	-42(3)	3(3)	-20(3)
C(22)	98(4)	97(4)	150(5)	-70(4)	36(4)	-45(4)
C(23)	167(7)	117(6)	218(9)	-96(6)	22(7)	9(6)
C(24)	302(16)	163(10)	349(17)	-140(12)	157(14)	-83(11)
C(26)	140(11)	350(20)	440(30)	100(18)	-92(14)	23(13)
C(27)	168(16)	810(70)	370(30)	200(30)	70(17)	-30(30)
C(28)	134(9)	202(11)	303(18)	55(11)	-4(9)	-2(8)
C(29)	81(3)	74(3)	71(3)	-17(3)	-2(3)	-25(3)
C(30)	66(3)	65(3)	68(3)	-7(2)	-4(2)	-22(2)
C(31)	82(4)	105(4)	86(4)	0(3)	-23(3)	-28(3)
C(32)	124(6)	163(7)	99(5)	-19(5)	-45(4)	-41(5)
C(33)	178(9)	188(9)	108(6)	-53(6)	-45(6)	-48(8)
C(34)	170(8)	170(8)	104(5)	-76(5)	5(5)	-44(7)
C(35)	115(5)	134(5)	97(4)	-69(4)	9(4)	-25(4)
C(36)	59(3)	56(3)	71(3)	-20(2)	1(2)	-17(2)
C(37)	66(3)	74(4)	91(3)	-18(3)	6(3)	-23(3)
C(38)	101(4)	64(4)	101(4)	-9(3)	15(3)	-28(3)
C(39)	121(5)	54(3)	87(4)	-12(3)	16(4)	-23(3)
C(40)	106(4)	60(3)	72(3)	-9(3)	-13(3)	9(3)
C(41)	72(3)	73(3)	82(3)	-20(3)	-11(3)	-8(3)
C(42)	68(3)	56(3)	65(3)	-21(2)	-2(2)	-15(2)

–

Table 5. Hydrogen coordinates (x 10^4) and isotropic displacement parameters (A^2 x 10^3) for ss42ac.

	x	y	z	U(eq)
H(1A)	4712	5929	7687	85
H(2A)	3461	4763	8147	95
H(4A)	5101	3316	6076	73
H(7A)	6527	3268	4937	75
H(9A)	9396	4470	3704	84
H(10A)	8892	5682	4629	78
H(11A)	3055	2987	6826	91
H(11B)	2518	3453	7721	91
H(12A)	4158	2266	8647	99
H(12B)	4695	1799	7752	99
H(13A)	2308	1671	8625	101
H(13B)	2810	1231	7712	101
H(14A)	3874	437	9528	120
H(14B)	4453	20	8618	120
H(15A)	2072	-189	9460	139
H(15B)	2554	-530	8498	139
H(16A)	4289	-1718	9353	173
H(16B)	3595	-1453	10289	173
H(17A)	2645	-2417	9077	208
H(17B)	2013	-2196	10049	208
H(18A)	4409	-3596	9910	262
H(18B)	3778	-3375	10880	262
H(19A)	3612	-4879	10683	335
H(19B)	2919	-4356	9711	335

H(19C)	2262	-4120	10672	335
H(20A)	7551	2666	3546	102
H(20B)	8372	3350	2880	102
H(21A)	9281	1645	4380	112
H(21B)	10131	2412	3901	112
H(22A)	9150	1217	2871	127
H(22B)	10075	1933	2436	127
H(23A)	10698	92	3808	200
H(23B)	11625	834	3477	200
H(24A)	11329	546	1840	313
H(24B)	12330	-288	2515	313
H(25A)	10706	-628	1698	478
H(25B)	10076	-589	2715	478
H(26A)	11798	-1824	3444	418
H(26B)	12544	-1800	2444	418
H(27A)	10069	-1797	2085	625
H(27B)	11236	-2696	1950	625
H(28A)	9810	-3223	2656	356
H(28B)	9804	-2567	3433	356
H(28C)	10990	-3467	3311	356
H(31A)	10051	5265	8261	111
H(32A)	10462	5816	9475	152
H(33A)	9364	7021	10149	182
H(34A)	7522	8051	9721	169
H(35A)	6302	8084	8570	131
H(37A)	8468	8986	4444	92
H(38A)	7664	10472	3584	107
H(39A)	5731	11169	3109	106
H(40A)	4104	10416	3413	101
H(41A)	4006	8919	4266	91

Table 6. Torsion angles [deg] for ss42ac.

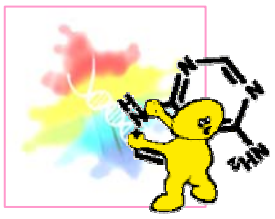
O(4)-Zn(1)-O(1)-C(29)	-82.9(3)
O(2)-Zn(1)-O(1)-C(29)	7.7(3)
O(3)-Zn(1)-O(1)-C(29)	-160.4(3)
N(2)-Zn(1)-O(1)-C(29)	57.7(6)
N(1)-Zn(1)-O(1)-C(29)	107.6(3)
O(4)-Zn(1)-O(2)-C(30)	90.5(3)
O(1)-Zn(1)-O(2)-C(30)	-6.6(3)
O(3)-Zn(1)-O(2)-C(30)	45.2(6)
N(2)-Zn(1)-O(2)-C(30)	-173.9(3)
N(1)-Zn(1)-O(2)-C(30)	-98.4(3)
O(4)-Zn(1)-O(3)-C(42)	-10.4(3)
O(1)-Zn(1)-O(3)-C(42)	86.4(3)
O(2)-Zn(1)-O(3)-C(42)	36.3(6)
N(2)-Zn(1)-O(3)-C(42)	-104.0(3)
N(1)-Zn(1)-O(3)-C(42)	-179.4(3)
O(1)-Zn(1)-O(4)-C(36)	-81.2(3)
O(2)-Zn(1)-O(4)-C(36)	-157.9(3)
O(3)-Zn(1)-O(4)-C(36)	11.1(3)
N(2)-Zn(1)-O(4)-C(36)	109.4(3)
N(1)-Zn(1)-O(4)-C(36)	56.3(6)
O(4)-Zn(1)-N(1)-C(1)	-127.0(5)
O(1)-Zn(1)-N(1)-C(1)	10.9(4)
O(2)-Zn(1)-N(1)-C(1)	87.9(4)
O(3)-Zn(1)-N(1)-C(1)	-83.1(4)
N(2)-Zn(1)-N(1)-C(1)	177.8(4)
O(4)-Zn(1)-N(1)-C(5)	49.9(6)
O(1)-Zn(1)-N(1)-C(5)	-172.2(3)
O(2)-Zn(1)-N(1)-C(5)	-95.2(3)

O(3)-Zn(1)-N(1)-C(5)	93.8(3)
N(2)-Zn(1)-N(1)-C(5)	-5.4(3)
O(4)-Zn(1)-N(2)-C(6)	-160.5(3)
O(1)-Zn(1)-N(2)-C(6)	58.7(5)
O(2)-Zn(1)-N(2)-C(6)	106.9(3)
O(3)-Zn(1)-N(2)-C(6)	-82.8(3)
N(1)-Zn(1)-N(2)-C(6)	6.6(3)
O(4)-Zn(1)-N(2)-C(10)	16.1(3)
O(1)-Zn(1)-N(2)-C(10)	-124.6(5)
O(2)-Zn(1)-N(2)-C(10)	-76.5(3)
O(3)-Zn(1)-N(2)-C(10)	93.9(3)
N(1)-Zn(1)-N(2)-C(10)	-176.7(3)
C(5)-N(1)-C(1)-C(2)	0.7(7)
Zn(1)-N(1)-C(1)-C(2)	177.5(3)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-2.0(7)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	1.4(7)
C(1)-C(2)-C(3)-C(11)	-179.0(4)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	0.3(6)
C(11)-C(3)-C(4)-C(5)	-179.3(4)
C(1)-N(1)-C(5)-C(4)	1.2(6)
Zn(1)-N(1)-C(5)-C(4)	-176.0(3)
C(1)-N(1)-C(5)-C(6)	-179.2(3)
Zn(1)-N(1)-C(5)-C(6)	3.6(4)
C(3)-C(4)-C(5)-N(1)	-1.7(6)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	178.8(4)
C(10)-N(2)-C(6)-C(7)	-2.8(6)
Zn(1)-N(2)-C(6)-C(7)	174.1(3)
C(10)-N(2)-C(6)-C(5)	176.3(3)
Zn(1)-N(2)-C(6)-C(5)	-6.8(4)
N(1)-C(5)-C(6)-N(2)	2.0(5)
C(4)-C(5)-C(6)-N(2)	-178.4(4)
N(1)-C(5)-C(6)-C(7)	-178.9(4)

C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	0.7(6)
N(2)-C(6)-C(7)-C(8)	1.2(6)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-177.8(4)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	1.7(6)
C(6)-C(7)-C(8)-C(20)	-178.4(4)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-3.1(7)
C(20)-C(8)-C(9)-C(10)	177.1(5)
C(6)-N(2)-C(10)-C(9)	1.4(6)
Zn(1)-N(2)-C(10)-C(9)	-175.2(3)
C(8)-C(9)-C(10)-N(2)	1.6(7)
C(2)-C(3)-C(11)-C(12)	-96.7(6)
C(4)-C(3)-C(11)-C(12)	82.9(5)
C(3)-C(11)-C(12)-C(13)	179.9(4)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	178.2(4)
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-176.4(5)
C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	174.9(6)
C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	-169.6(7)
C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	176.8(8)
C(16)-C(17)-C(18)-C(19)	180.0(11)
C(9)-C(8)-C(20)-C(21)	74.1(6)
C(7)-C(8)-C(20)-C(21)	-105.7(5)
C(8)-C(20)-C(21)-C(22)	-168.3(4)
C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	-176.1(6)
C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	-174.1(7)
C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-87(2)
C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	-102(2)
C(24)-C(25)-C(26)-C(27)	-174(2)
C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	-121(3)
Zn(1)-O(1)-C(29)-C(35)	170.7(4)
Zn(1)-O(1)-C(29)-C(30)	-7.8(5)
Zn(1)-O(2)-C(30)-C(31)	-175.2(3)
Zn(1)-O(2)-C(30)-C(29)	4.8(5)

O(1)-C(29)-C(30)-O(2)	2.1(6)
C(35)-C(29)-C(30)-O(2)	-176.3(5)
O(1)-C(29)-C(30)-C(31)	-177.9(4)
C(35)-C(29)-C(30)-C(31)	3.7(8)
O(2)-C(30)-C(31)-C(32)	176.5(6)
C(29)-C(30)-C(31)-C(32)	-3.5(9)
C(30)-C(31)-C(32)-C(33)	1.4(13)
C(31)-C(32)-C(33)-C(34)	-0.5(17)
C(32)-C(33)-C(34)-C(35)	1.4(17)
C(33)-C(34)-C(35)-C(29)	-1.1(15)
O(1)-C(29)-C(35)-C(34)	-179.8(7)
C(30)-C(29)-C(35)-C(34)	-1.5(11)
Zn(1)-O(4)-C(36)-C(37)	169.1(3)
Zn(1)-O(4)-C(36)-C(42)	-10.1(5)
O(4)-C(36)-C(37)-C(38)	-179.2(5)
C(42)-C(36)-C(37)-C(38)	0.0(8)
C(36)-C(37)-C(38)-C(39)	-1.3(11)
C(37)-C(38)-C(39)-C(40)	-0.8(10)
C(38)-C(39)-C(40)-C(41)	2.0(9)
C(39)-C(40)-C(41)-C(42)	0.7(9)
Zn(1)-O(3)-C(42)-C(41)	-172.9(3)
Zn(1)-O(3)-C(42)-C(36)	8.6(4)
C(40)-C(41)-C(42)-O(3)	177.7(5)
C(40)-C(41)-C(42)-C(36)	-3.9(8)
O(4)-C(36)-C(42)-O(3)	0.8(6)
C(37)-C(36)-C(42)-O(3)	-178.4(4)
O(4)-C(36)-C(42)-C(41)	-177.6(4)
C(37)-C(36)-C(42)-C(41)	3.2(7)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:



CONCLUSIONI

Il drug design basato su complessi contenenti più funzionalità biologiche rappresenta una nuova strategia per ottenere complessi metallici più attivi dal punto di vista citotossico.

In questo progetto di ricerca sono stati sintetizzati complessi metallici bifunzionali contenenti leganti O,O chelanti di notevole importanza biologica come il tropolone e i derivati della famiglia dei curcuminoidi.

La scelta del legante ancillare, come unità potenzialmente intercalante e che completa la sfera di coordinazione del metallo, determina una prima distinzione in due classi di complessi: complessi neutri ciclopalladati contenente un legante 2-fenilchinolinico variamente sostituito e complessi ionici di Pd(II) e Pt(II) contenente leganti bipiridinici. Una terza classe di complessi viene distinta per il metallo, lo Zn(II). Questo metallo merita di essere distinto dal Pt(II) e Pd(II) perché, pur mantenendo come legante ancillare il legante bipiridinico, dà luogo sia a complessi ionici che neutri, dipendentemente dal rapporto stechiometrico del legante O,O chelante. Inoltre, nell'ambito della sintesi di complessi metallici con potenziale attività antitumorale, molto pochi sono gli esempi di complessi dello Zn(II) riportati in letteratura.

Queste tre classi di complessi sono state testate dal punto di vista citotossico, ovvero attraverso uno screening citotossico è stato possibile restringere la rosa dei complessi più attivi ed estrapolare uno studio di relazioni struttura-attività, dato che si tratta di complessi chimicamente distinti.

La prima classe infatti, riguarda i primi complessi ciclopalladati neutri 2-fenilchinolinici. La scelta di sintetizzare complessi ciclopalladati deriva dalla necessità di utilizzare un legante C,N monoanionico per ottenere complessi neutri contenenti leganti O,O chelanti, oltre che dall'interesse di indagare le capacità coordinative della 2-fenilchinolina nei confronti del Pd(II).

Inoltre, l'interesse per i complessi ciclopalladati, come materiali biologicamente attivi, nasce dalla riscontrata stabilità e interessante attività antitumorale di alcuni C,N-cicli del Pd(II) verso diverse forme tumorali [16-19]. Tra questi vi sono due complessi ciclometallati bifunzionali di Pd(II), il complesso [(C,N)Pd(4-O-acridina)], e il complesso [(C,N)Pd(4-O-acridina)], dove C,N è la 2-fenipiridina e la 5-esil-2-(4'-metossi-fenilpirimidina), sintetizzati nel nostro laboratorio e che hanno mostrato un'attività antiproliferativa a concentrazioni minori rispetto al *cis*-DDP, su tre linee cellulari di carcinoma ovario [20].

Sulla base di questi risultati e sulla base dell'esperienza acquisita riguardo alle reazioni di ciclopalladazione, sono stati ottenuti i primi complessi 2-fenilchinolinici di Pd(II). Dipendentemente dalla natura del gruppo funzionale che è stato introdotto in posizione 4 della 2-fenilchinolina, questi complessi possono essere divisi a loro volta in due sottoclassi: complessi della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina e complessi della 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina.

Entrambe le sottoclassi contengono le reazioni dei precursori, i complessi binucleari e i complessi eterolettici del tropolone e dei curcuminoidi.

I curcuminoidi complessati sono la curcumina commerciale purificata e un derivato della curcumina ottenuto dalla funzionalizzazione dei gruppi idrossilici con gruppi alcossilici a lunga catena alifatica, la *curc22*.

La complessazione dei curcuminoidi è stata tentata dapprima utilizzando come precursore il complesso binucleare a ponte cloro. A causa delle difficoltà sintetiche dovute alle reazioni competitive di formazione di semplici addotti di coordinazione dello stesso legante, il complesso binucleare a ponte cloro è stato ottenuto con basse rese. Oltre a ciò si è constatata l'insufficiente reattività dello stesso binucleare a ponte cloro nei confronti della curcumina, che dal canto suo possiede una scarsa capacità coordinativa, non essendo un buon nucleofilo. D'altra parte la nucleofilicità di questo legante non può essere nemmeno migliorata per ragioni d'instabilità chimica in ambiente basico. Allora è stato necessario cercare un secondo approccio per ottenere complessi mononucleari della curcumina o dei curcuminoidi, è stato sintetizzato cioè il

binucleare a ponte acetato. In effetti, conseguentemente alla rottura del ponte, l'anione acetato rappresenta la giusta base che deprotona la curcumina favorendone la coordinazione. Per il tropolone, invece non sussistono queste difficoltà di coordinazione, anche perchè la nucleofilicità può essere migliorata facendolo reagire nella forma deprotonata sotto forma di sale. Infatti i complessi mononucleari del tropolone si formano sia a partire dal complesso binucleare a ponte acetato che dal complesso binucleare a ponte cloro.

Per ragioni di solubilità è stato possibile testare solo le proprietà citotossiche dei derivati curcuminoidi. Dai valori di IC_{50} estrapolati si è potuto stabilire che tra le due sottoclassi di complessi, ovvero tra i complessi della 2-fenil-4-esadecilcarbossilato chinolina, $\mathbf{HL_1}$ e i complessi della 2-fenil-4-colesterilcarbossilato chinolina, $\mathbf{HL_2}$, i primi sono risultati molto più attivi dei secondi.

In particolare, il complesso della curcumina, $[(L_1)Pd(curcumina)]$, **4** e il complesso $[(L_1)Pd(\textit{curc22})]$, **5** hanno mostrato un range di attività simile (IC_{50} = 0.1 μM).

Entrambi i complessi sono molto più attivi della curcumina commerciale purificata (IC_{50} = 3 μM), mentre la *curc22* è attiva, sorprendentemente nello stesso range di concentrazione dei complessi **4** e **5** (IC_{50} = 0.1 μM).

Questi dati indicano che nel complesso della curcumina, ovvero nel complesso **4**, l'attività citotossica è dominata dal frammento ciclopalladato, suggerendo che la bifunzionalità rappresenta la giusta strategia per ottenere composti antitumorali più attivi. Inoltre i dati dimostrano che i gruppi idrossilici non hanno un ruolo significativo sull'attività citotossica, anzi la *curc22* è più attiva della curcumina. Tuttavia la complessazione della *curc22* non sposta il range di concentrazione dell'attività, suggerendo che la citotossicità è dominata in questo caso dalle catene alifatiche.

Queste semplici correlazioni struttura-attività inducono a pensare che il meccanismo d'azione non può essere univoco per tutte le specie in esame e che ulteriori studi potrebbero quindi contribuire a chiarire i dubbi che lo screening citotossico ha posto.

La sostituzione del frammento ciclopalladato della 2-fenilchinolina con un frammento bipiridinico, anch'esso diversamente funzionalizzato in posizione 4,4', con diversi

gruppi funzionali, ha generato una seconda classe di complessi di Pd(II) e Pt(II) che in virtù della carica dei leganti O,O chelanti che ne completano la sfera di coordinazione acquistano un carattere ionico.

La diversa nucleofilicità dei due leganti O,O chelanti è il motivo per cui con il Pd(II) è stato possibile ottenere sia complessi del tropolone che dei derivati curcuminoidi, a differenza del Pt(II), per cui è stato possibile ottenere solo il complesso del tropolone. Tutti i complessi sono stati testati sulle linee cellulari prostatiche umane DU 145 e LNCaP e tutti hanno mostrato attività alla concentrazione di 25μM.

In particolare tra i complessi isostrutturali del tropolone, i complessi $[(L_4)Pd(trop)]CF_3SO_3$, **15** e $[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3$, **17**, dove $\mathbf{L_4}$ è la 4,4'-esadecilcarbossilato-2,2'-bipiridina, quello del Pt(II) si è mostrato un po' più attivo di quello del Pd(II). Entrambi comunque sono molto più attivi dei leganti (il tropolone in entrambe queste linee è attivo a concentrazioni superiori a 50 μM).

I risultati dello screening citotossico relativo al complesso $[(L_3)Pd(curcumina)]CF_3SO_3$, **12**, dove $\mathbf{L_3}$ è il legante commerciale 4,4'-dinonil-2,2'-bipiridina, hanno dimostrato invece, che questo complesso ha attività a concentrazioni maggiori (25 μM) della curcumina pura (3 μM). Tuttavia, la maggiore solubilità del complesso **12** nei solventi biocompatibili, ha permesso di approfondire gli studi sul meccanismo d'azione. Tali studi, effettuati parallelamente sulla curcumina e sul complesso, mediante l'analisi del ciclo cellulare e lo studio apoptotico, hanno dimostrato che l'effetto del complesso, seppur a concentrazioni maggiori, è irreversibile, a differenza di quello prodotto dalla curcumina che è solo di rallentamento della proliferazione cellulare, quindi reversibile.

Alla luce delle difficoltà sintetiche incontrate già con il Pt(II) nell'ottenimento di complessi ionici dei curcuminoidi, è stata indagata la capacità di coordinazione di un terzo metallo, lo Zn(II), che come si è detto, è stato poco esplorato finora sia nelle capacità di coordinazione che nelle proprietà citotossiche.

Considerando che si tratta di un metallo poco elettrofilo, non dovrebbe sorprendere il fatto che non è stato possibile ottenere la coordinazione di un legante poco nucleofilo come la curcumina.

È stato possibile però ottenere complessi del tropolone, che utilizzato in opportuno rapporto stechiometrico, ha dato luogo a due complessi con differente geometria. Sono stati infatti ottenuti un complesso tetracoordinato ionico, il complesso $[(L_3)Zn(trop)]Cl$, **19** e un complesso ottaedrico neutro, il complesso $[(L_3)Zn(trop)_2]$ **20** di cui è stato possibile ottenere la risoluzione della struttura attraverso diffrazione a raggi X su cristallo singolo.

Dallo screening citotossico, effettuato su entrambi i complessi, utilizzando le linee cellulari prostatiche umane DU 145 e LNCaP è emerso che il complesso ottaedrico neutro è attivo alla concentrazione di 2 μM, mentre quello ionico tetracoordinato è attivo alla concentrazione di 4 μM.

Riassumendo, coerentemente con quello che è stato lo scopo di questo lavoro, ovvero sintetizzare complessi metallici aventi aspetti comuni e aspetti specifici per selezionare nuovi composti metallici dotati di attività antitumorale, possiamo fare le appropriate considerazioni.

In generale, tutti i complessi sono risultati più attivi nella linea DU 145. I complessi più attivi in assoluto sono risultati i complessi neutri ciclopalladati dei curcuminoidi, i complessi $[(L_1)Pd(curcumina)]$, **4** e $[(L_1)Pd(\textit{curc22})]$, **5**.

Anche se la scarsa solubilità di questi complessi nei solventi biocompatibili non ha consentito di effettuare uno studio dettagliato per comprenderne il meccanismo d'azione, si possono comunque individuare, in linea generale, le caratteristiche chimiche specifiche di questi complessi. La specificità in questo caso è data dalla ciclopalladazione per cui è probabile che un così forte effetto sia legato o alla stabilità intrinseca dei complessi ciclopalladati, o all'estesa planarità del frammento ciclopalladato, dato che il piano di coordinazione del metallo coincide con quello del legante ciclometallante, o entrambe.

Queste ipotesi potrebbero sostenere il dato citotossico che dimostra la maggiore attività del complesso $[(L_1)Pd(curcumina)]$, **4** rispetto alla curcumina, tuttavia non spiegano la comparabile attività della *curc22* con quella del complesso $[(L_1)Pd(\textit{curc22})]$, **5**.

Bisogna allora ipotizzare che concorrono più meccanismi all'attività di questi complessi, coerentemente con quello che è stato l'intento di questo lavoro, ottenere cioè un effetto sinergico da complessi contenenti più unità funzionali all'attività.

Il sinergismo d'azione potrebbe essere visto anche nel complesso $[(L_3)Pd(curcumina)]CF_3SO_3$, **12**, per il quale si è visto che lo studio degli effetti sui parametri metabolici delle cellule tumorali ha rafforzato un dato citotossico che apparentemente era negativo.

Dopo i complessi ciclopalladati dei curcuminoidi i complessi più attivi sono risultati essere i complessi dello Zn(II) del tropolone, i complessi $[(L_3)Zn(trop)]Cl$, **19** e $[(L_3)Zn(trop)_2]$ **20**. Essendo il complesso $[(L_3)Zn(trop)]Cl$, **19** isostrutturale con i complessi $[(L_4)Pd(trop)]CF_3SO_3$, **15** e $[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3$, **17**, si può affermare, in base ai dati numerici dell'attività citotossica, che

$$Zn(II) >> Pt(II) \geq Pd(II)$$

Sorprendentemente lo Zn(II), che finora non si è distinto in questo ambito, si è dimostrato molto più attivo dei complessi dei metalli più studiati, Pt(II) e Pd(II).

Non sono stati affrontati finora studi più specifici per comprendere il meccanismo d'azione di questi complessi.

Tuttavia molto di recente è stato affrontato uno studio teorico sul meccanismo di idrolisi del complesso $[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3$, **17**, nel caso in cui il meccanismo prevalente e/o secondario ad un'eventuale intercalazione che dirige il complesso verso il target molecolare, sia di tipo covalente.

In particolare, attraverso questo studio che si è voluto capire se questo ipotetico meccanismo sia più vicino a quello del *cis*-DDP o a quello dei complessi del Pt(II) di terza generazione, ovvero di quei complessi in cui entrambi i leganti sono chelanti, quindi cineticamente meno labili. I risultati di questo studio hanno dimostrato che la specie che si forma nello stadio più lento, determinante la velocità della reazione, è la specie monoidrata, a differenza del *cis*-platino che da luogo velocemente alla

formazione della specie diidrata, potendo reagire con diverse molecole nucleofile. Questo indica che il complesso $[(L_4)Pt(trop)]CF_3SO_3$, **17**, qualora reagisse con un legame di tipo covalente, come il *cis*-DDP, mostrerebbe maggiore selettività d'azione e quindi minore tossicità

I complessi dello Zn(II) meritano una discussione a parte in quanto comprendono il complesso ionico tetracoordinato, $[(L_3)Zn(trop)]Cl$, **19,** che per similitudine strutturale è stato confrontato con quelli del Pd(II) e del Pt(II) e il complesso neutro esecoordinato, $[(L_3)Zn(trop)_2]$ **20**. Tra questi due complessi si può affermare, a livello di attività citotossica che

Complesso neutro ottaedrico > complesso ionico tetraedrico

Questi due complessi differiscono per la carica, il numero di unità tropoloniche e la geometria, per cui, la differente attività in questo caso potrebbe essere addebitata ad uno, a due o a tutti e tre gli elementi che differenziano i complessi. Studi più affrofonditi, soprattutto d'interazione con il DNA potranno chiarire l'esatto meccanismo d'azione di questi nuovi complessi ed essere inseriti in un ambito più direttamente applicativo, in virtù anche del minore dispendio economico a carico di un metallo come lo Zn(II).