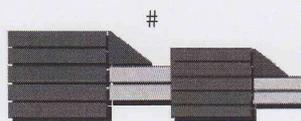


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA CALABRIA**



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE**

**DOTTORATO IN: AMBIENTE, SALUTE E PROCESSI ECO-SOSTENIBILI**

*XXIII Ciclo*

**TESI DI DOTTORATO**

Settore Scientifico Disciplinare: Farmaceutico (CHIM/08)

---

***NUOVI 1,4-DIMETIL CARBAZOLI: SINTESI, REATTIVITÀ E  
VALUTAZIONE BIOLOGICA***



***Supervisore***

*Prof.ssa M. S. SINICROPI*

*[Handwritten signature]*  
***per Coordinatore***  
*[Handwritten signature]*

***Candidata***

Antonella PANNO

*[Handwritten signature]*

---

***Anno Accademico  
2009/2010***

*Alla mia famiglia*

## INDICE

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>II</b>
<b>CAPITOLO I–PRINCIPALI BERSAGLI DEGLI ANTITUMORALI .....</b>	<b>2</b>
1.1 INTRODUZIONE .....	2
1.2 IL DNA: “TARGET” PRINCIPALE.....	3
1.3 GLI ENZIMI CHE INTERAGISCONO CON IL DNA .....	8
1.3.1 <i>Le Nucleasi e Le Ligasi</i> .....	9
1.3.2 <i>Le Polimerasi</i> .....	10
1.3.3 <i>Le Elicasi</i> .....	10
1.3.4 <i>Le DNA-Topoisomerasi</i> .....	11
<b>CAPITOLO II–INIBITORI DELLE DNA-TOPOISOMERASI .....</b>	<b>19</b>
2.1 CARATTERISTICHE GENERALI E MECCANISMI D’AZIONE .....	19
2.1.1 <i>Agenti intercalanti quali inibitori delle Topoisomerasi</i> .....	23
2.2 VELENI O INIBITORI DELLE TOPOISOMERASI I.....	25
2.2.1 <i>La Camptotecina e i derivati camptotecina-simili</i> .....	25
2.2.2 <i>Derivati indolocarbazolici</i> .....	29
2.2.3 <i>Derivati naftochinonici</i> .....	31
2.2.4 <i>Nuovi inibitori delle Topoisomerasi I</i> .....	32
2.3 VELENI O INIBITORI DELLE TOPOISOMERASI II .....	33
2.3.1 <i>Le Amsacrine</i> .....	34
2.3.2 <i>Le Actinomicine</i> .....	35
2.3.3 <i>Le Antracicline</i> .....	37
2.3.4 <i>Il Mitoxantrone</i> .....	39
2.3.5 <i>Agenti non-intercalanti quali inibitori delle Topoisomerasi II</i> .....	41

2.3.5.1 Derivati della epipodofillotossina: etoposide e teniposide .....	41
2.3.5.2 Il Genistein .....	43
2.4 SOPPRESSORI O INIBITORI CATALITICI DELLE DNA-TOPOISOMERASI .....	43
<b>CAPITOLO III-PRINCIPALI MECCANISMI D'AZIONE DEI DERIVATI CARBAZOLICI .....</b>	<b>47</b>
3.1 INTRODUZIONE .....	47
3.2 EVOLUZIONE STORICA E PROPRIETA' GENERALI DEI DERIVATI CARBAZOLICI.....	48
3.3 AZIONE CITOTOSSICA DEI DERIVATI 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLI.....	50
3.3.1 Intercalazione nel DNA ed Inibizione dell'enzima Topoisomerasi II.....	51
3.3.2 Meccanismi alla base del processo apoptotico .....	53
3.3.3 Attivita' antitubulinica e antimitotica .....	58
3.3.4 Inibizioni delle mieloperossidasi.....	63
<b>CAPITOLO IV-NUOVE PROPRIETA' TERAPEUTICHE DEL NUCLEO CARBAZOLICO.....</b>	<b>67</b>
4.1 COMPOSTI CARBAZOLICI ANTAGONISTI NPY5 USATI PER IL TRATTAMENTO DELL'OBESITA'.....	67
4.2 CARBAZOLI COMPLESSATI CON AMMIDI MACROCICLICHE A POTENZIALE ATTIVITA' ANTIMICROBICA .....	69
4.3 ATTIVITA' ANTIMICOTICA DI NUOVE MOLECOLE A NUCLEO CARBAZOLICO.....	71
4.4 CARBAZOLI A POTENZIALE ATTIVITA' ANTIMALARICA .....	72
4.5 EPED3: NUOVO ANTINEOPLASTICO CARBAZOLICO USATO NEL TRATTAMENTO DEL MIELOMA MULTIPLO .....	74
<b>CAPITOLO V-SCOPO DELLA RICERCA.....</b>	<b>77</b>
5.1 SINTESI DEGLI 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI.....	81
5.2 SINTESI DEI NITRO CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI .....	82

5.3	SINTESI DEGLI AMMINO CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI .....	82
5.4	SINTESI DEGLI 1,4-DIMETIL-BENZOIL-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI.....	85
5.5	SINTESI DI: <i>N</i> -(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)-3,4,5-TRIMETOSSIBENZAMMIDI DIVERSAMENTE SOSTITUITE; SINTESI DI: <i>N</i> -(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)- <i>N'</i> -(2,3,4-TRIMETOSSIFENIL)UREE DIVERSAMENTE SOSTITUITE.....	87
5.5.1	<i>Sintesi di N</i> -(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammidi diversamente sostituite .....	89
5.5.2	<i>Sintesi di N</i> -(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)- <i>N'</i> -(2,3,4-trimetossifenil)uree diversamente sostituite .....	89
5.6	SINTESI DI DERIVATI OPPORTUNAMENTE IDROSSILATI .....	91
5.7	SINTESI DI NUOVI DERIVATI CARBONILICI A NUCLEO 1,4-DIMETIL-CARBAZOLICO .....	93
5.8	SINTESI DEI 4-(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)BUT-3-EN-2-ONI DIVERSAMENTE SOSTITUITI.....	103
5.9	SINTESI DI NUOVI DERIVATI TRIMETOSSIFENIL-ENAMMINICI; <i>N</i> -[(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)METIL]- <i>N</i> -(3,4,5-TRIMETOSSIFENIL)ACETAMMIDE(31).....	103
5.10	SINTESI DI NUOVI DERIVATI 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il-1-FENILPROP-2-EN-1-ONI DIVERSAMENTE SOSTITUITI. ....	105
5.11	SINTESI DEI 3-[3-(4-CLOROFENIL)-4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-5-il]-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI. ....	107
5.12	SINTESI DELLE 4-(4-CLOROFENIL)-6-(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLO-3-il)PIRIMIDIN-2-(5H)-IMMINE DIVERSAMENTE SOSTITUITE . ....	108
5.13	SINTESI DEI 3-[3-(4-CLOROFENIL)-4,5-DIIDROISOSSAZOL-5-il]-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI .....	108
5.14	SINTESI DEGLI 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-CARBALDEIDE IDRAZONI.....	109
5.15	SINTESI DI ANALOGHI STRUTTURALI DELL'ELLIPTICINA.....	110
5.15.1	<i>Sintesi di: etil 3-[(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)ammino]2-metil-2-butenato(38); 9-cloro-2,3,5,11-tetrametil-6H-pirido[3,2-b]carbazol-4-olo(39).....</i>	110
5.15.2	<i>Sintesi di N-[(8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metilene]-2,2-dimetossietanammina(40); 7-etil-5,11-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazolo(41).....</i>	112

5.16	SINTESI	DI:	2-[(6-CLORO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLO-3- il)METILINDENE]IDRAZINO(IMMINO)METANAMMINO NITRATO(42).....	112
5.17	RISULTATI E TEST BIOLOGICI .....			114
5.17.1	<i>Test metabolici</i> .....			126
<b>CAPITOLO VI-PARTE SPERIMENTALE .....</b>				<b>128</b>
6.1	PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(2a-i).....			129
6.1.1	<i>Sintesi di: 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2a)</i> .....			130
6.1.2	<i>Sintesi di: 6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2b)</i> .....			130
6.1.3	<i>Sintesi di: 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2c)</i> .....			130
6.1.4	<i>Sintesi di: 6-iodio-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2d)</i> .....			131
6.1.5	<i>Sintesi di: 1,4-dimetil-9H-carbazolo(2e)</i> .....			131
6.1.6	<i>Sintesi di: 1,4,6-trimetil-9H-carbazolo(2f)</i> .....			131
6.1.7	<i>Sintesi di: 6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2g)</i> .....			132
6.1.8	<i>Sintesi di: 7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2h)</i> .....			132
6.1.9	<i>Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2i)</i> .....			132
6.2	PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 1,4-DIMETIL 3-NITRO, 6-NITRO, E 3,6-DINITRO-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(3a-f) .....			133
6.2.1	<i>Sintesi di: 6-cloro-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3a)</i> .....			134
6.2.2	<i>Sintesi di: 6-fluoro-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3b)</i> .....			134
6.2.3	<i>Sintesi di: 6-bromo-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3c)</i> .....			134
6.2.4	<i>Sintesi di: 1,4-dimetil-3,6-dinitro-9H-carbazolo(3d)</i> .....			135
6.2.5	<i>Sintesi di: 1,4,6-trimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3e)</i> .....			135
6.2.6	<i>Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3f)</i> .....			135
6.2.7	<i>Sintesi di: 6-nitro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(3g)</i> .....			136
6.3	PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 3-AMMINO-1,4-DIMETIL-9H- CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(4a-e).....			137
6.3.1	<i>Sintesi di: 3-ammino-6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4a)</i> .....			138
6.3.2	<i>Sintesi di: 3-ammino-6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4b)</i> .....			138

6.3.3	Sintesi di 3-ammino-6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4c) .....	138
6.3.4	Sintesi di: 3,6-diammino-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4d).....	139
6.3.5	Sintesi di: 3-ammino-1,4-dimetil-8-etil-9H-carbazolo(4e) .....	139
6.4	PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-AMMINO-5,8-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3- OLO(6).....	140
6.5	PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 3-AMMINO-1,4,6-TRIMETIL-9H-CARBAZOLO(7)	141
6.6	PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-AMMINO-5,8-DIMETIL-3-ETOSSICARBONILOSSI- 9H-CARBAZOLO(8).....	142
6.7	PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-CLORO-1,4-DIMETIL-3-IDROSSILAMMINO-9H- CARBAZOLO(9).....	143
6.8	PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 1,4-DIMETIL-9H-BENZOIL CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(10a-d;11a-d;12a-d) .....	144
6.8.1	Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-fenil-metanone(10a) .....	146
6.8.2	Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-4-metossifenil-metanone(10b)....	146
6.8.3	Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(2,6-dimetossifenil)- metanone(10c).....	147
6.8.4	Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)- metanone(10d).....	147
6.8.5	Sintesi di (6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)- metanone(11a).....	148
6.8.6	Sintesi di (6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)- metanone(11b).....	149
6.8.7	Sintesi di (1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone(11c) .....	150
6.8.8	Sintesi di: (6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)- metanone(11d).....	150
6.8.9	Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-fenil-metanone(12a) .....	151
6.8.10	Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-4-metossifenil-metanone(12b).....	151
6.8.11	Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(2,6-dimetossifenil)- metanone(12c).....	152
6.8.12	Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)- metanone(12d).....	152

6.9	PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: <i>N</i> -(1,4-DIMETIL-9 <i>H</i> -CARBAZOL-3-il)-3,4,5-TRIMETOSSIBENZAMMIDI DIVERSAMENTE SOSTITUITE(13a-h) .....	153
6.9.1	<i>Sintesi di: N</i> -(6-cloro-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammide(13a).....	155
6.9.2	<i>Sintesi di: N</i> -(6-fluoro-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammide(13b).....	156
6.9.3	<i>Sintesi di: N</i> -(6-bromo-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammide(13c).....	157
6.9.4	<i>Sintesi di: N</i> -{1,4-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossibenzoil)ammino]-9 <i>H</i> -carbazol-3-il}-3,4,5-trimetossibenzammide(13d) .....	158
6.9.5	<i>Sintesi di: N</i> -(8-etil-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammide(13e).	159
6.9.6	<i>Sintesi di: 5,8-dimetil-6</i> -(3,4,5-trimetossibenzammide)-9 <i>H</i> -carbazol-3-il-3,4,5-trimetossibenzoato(13f).....	160
6.9.7	<i>Sintesi di: 3,4,5-trimetossi-N</i> -(1,4,6-trimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)benzammide(13g) .....	161
6.9.8	<i>Sintesi di: 5,8-dimetili-6</i> -(3,4,5-trimetossibenzammide)-9 <i>H</i> -carbazol-3-il-etilcarbonato(13h).....	162
6.10	PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: <i>N</i> -(1,4-DIMETIL-9 <i>H</i> -CARBAZOL-3-il)- <i>N'</i> -(2,3,4-TRIMETOSSIFENIL)UREE DIVERSAMENTE SOSTITUITE(14a-h) .....	163
6.10.1	<i>Procedura per la sintesi di: azido</i> (3,4,5-trimetossifenil)metanone(16).....	164
6.10.2	<i>Sintesi di: N</i> -(6-cloro-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetossifenil)urea(14a).....	165
6.10.3	<i>Sintesi di: N</i> -(6-fluoro-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetossifenil)urea(14b).....	166
6.10.4	<i>Sintesi di: N</i> -(6-bromo-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetossifenil)urea(14c).....	167
6.10.5	<i>Sintesi di: N</i> -(1,4-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossianilina)carbonil]ammino)-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetossifenil)urea(14d) .....	168
6.10.6	<i>Sintesi di: N</i> -(8-etil-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetossifenil)urea(14e).....	169
6.10.7	<i>Sintesi di: N</i> -(6-idrossi-1,4-dimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetossifenil)urea(14f).....	170
6.10.8	<i>Sintesi di: N</i> -(3,4,5-trimetossifenil)- <i>N'</i> -(1,4,6-trimetil-9 <i>H</i> -carbazol-3-il)urea(14g)..	171

---

6.10.9 Sintesi di: 5,8-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossianilina)carbonil]ammino}-9H-carbazol-3-il-etil-carbonato(14h).....	172
6.11 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: (6-CLORO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-IL)(3-IDROSSI-4,5-DIMETOSSIFENIL)METANONE(17) .....	173
6.12 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: (1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-IL)(3-IDROSSI-4,5-DIMETOSSIFENIL)METANON OSSIME DIVERSAMENTE SOSTITUITE(18a-b)....	174
6.12.1 Sintesi di: (E)-(-6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanon ossima(18a).....	175
6.12.2 Sintesi di: (E)-(-6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanon ossima(18b).....	176
6.13 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: DERIVATI CARBAZOLICI IDROSSISOSTITUITI A LIVELLO DEL C-4'DELL'ANELLO BENZOILICO(19-20) .....	177
6.14 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: (3,4-DIIDROSSI-5-METOSSIFENIL)(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-IL)METANONI DIVERSAMENTE SOSTITUITI (21a-d).....	180
6.14.1 Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3,4-diidrossi-5-metossifenil)metanone(21a) .....	181
6.14.2 Sintesi di: (3,4-diidrossi-5-metossifenil)(6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metanone(21b).....	182
6.14.3 Sintesi di: (6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3,4-diidrossi-5-metossifenil)metanone(21c) .....	183
6.14.4 Sintesi di: (3,4-diidrossi-5-metossifenil)(6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metanone(21d).....	184
6.15 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-CARBALDEIDE(22).....	185
6.16 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3,6-DICARBALDEIDE(23).....	186

---

6.17 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-METOSI-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-CARBALDEIDE(24).....	187
6.18 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: DERIVATI 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-CARBALDEIDI E 3,6-DICARBALDEIDI DIVERSAMENTE SOSTITUITE(25a-f).....	188
6.18.1 Sintesi di: 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25a).....	189
6.18.2 Sintesi di: 6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25b).....	189
6.18.3 Sintesi di: 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25c).....	190
6.18.4 Sintesi di: 6-iodio-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25d).....	190
6.18.5 Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25e).....	191
6.18.6 Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3,6-dicarbaleide(25f).....	192
6.19 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-CLORO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-9-CARBALDEIDE(26a).....	193
6.20 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-BROMO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-9-CARBALDEIDE(26b).....	194
6.21 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 1-(6-CLORO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)ETANONE(27).....	195
6.22 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 4-(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)BUT-3-EN-2-ONI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(28a-e).....	196
6.22.1 Sintesi di: 4-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28a).....	197
6.22.2 Sintesi di: 4-(6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28b).....	198
6.22.3 Sintesi di: 4-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28c).....	199
6.22.4 Sintesi di: 4-(6-iodio-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28d).....	200
6.22.5 Sintesi di: 4-(8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28e).....	201
6.23 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: N-[(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)METILENE]-3,4,5-TRIMETOSSIFENIL-ENAMMINE DIVERSAMENTE SOSTITUITE(29a-c).....	202
6.23.1 Sintesi di: N-[(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammine(29a).....	203
6.23.2 Sintesi di: N-[(1,4-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossifenil)immino]metil}-9H-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammina(29b).....	204

6.23.3 Sintesi di: 3,4,5-trimetossi-N-[(6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metilene]fenil-enammina(29c).....	205
6.23.4 Procedura per la sintesi di: N-[(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammina(29d) .....	206
6.24 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: N-[(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)METIL]-N-(3,4,5-TRIMETOSSIFENIL)ACETAMMIDE(31) .....	207
6.25 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: DERIVATI 1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il-1-FENILPROP -2-EN-1-ONI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(32a-o) .....	209
6.25.1 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(2,4-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32a) .....	211
6.25.2 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(2,5-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32b) .....	211
6.25.3 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(3,4-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32c).....	212
6.25.4 Sintesi di: 1-(2,5-dimetossifenil)-3-(6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)prop-2-en-1-one(32d) .....	213
6.25.5 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(2,5-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32e) .....	214
6.25.6 Sintesi di: 1-(2,5-dimetossifenil)-3-{6-[3-(2,5-dimetossifenil)-3-oxo-1-propenil]-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il}-2-propen-1-one(32f).....	214
6.25.7 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one(32g) .....	215
6.25.8 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-one(32h) .....	216
6.25.9 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-p-tolilprop-2-en-1-one(32i) ..	217
6.25.10 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one(32l) .....	218
6.25.11 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-one(32m).....	219
6.25.12 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-p-tolilprop-2-en-1-one(32n).....	219

6.25.13 Sintesi di: 1-(4-clorofenil)-3-(8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)prop-2-en-1-one(32o) .....	220
6.26 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 3-[3-(4-CLOROFENIL)-4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-5-il]-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(33a-b) .....	221
6.26.1 Sintesi di: 6-cloro-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidro-1H-pirazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazolo(33a) .....	222
6.26.2 Sintesi di: 6-bromo-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidro-1H-pirazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazolo(33b) .....	223
6.27 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 4-(4-CLOROFENIL)-6-(1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)PIRIMIDIN-2(5H)-IMMINE DIVERSAMENTE SOSTITUITI(34a-b) .....	224
6.27.1 Sintesi di: 4-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-6-(4-clorofenil)pirimidin-2(5H)-immine(34a) .....	225
6.27.2 Sintesi di: 4-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-6-(4-clorofenil)pirimidin-2(5H)-immine(34b) .....	226
6.28 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 3-[3-(4-CLOROFENIL)-4,5-DIIDROISSAZOL-5-il]-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOLI DIVERSAMENTE SOSTITUITI(35a-b) .....	227
6.28.1 Sintesi di: 6-cloro-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidroisossazol-5-il]1,4-dimetil-9H-carbazolo(35a) .....	228
6.28.2 Sintesi di: 6-bromo-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidroisossazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazolo(35b) .....	229
6.29 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 6-CLORO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-CARBALDEIDE IDRAZONE(36a) .....	230
6.30 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-BROMO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-CARBALDEIDE IDRAZONE(36b); 6-BROMO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-CARBALDEIDE-N-[(E)-(6-BROMO-1,4-DIMETIL-9H-CARBAZOL-3-il)METILDENE]IDRAZONE(37) .....	231
6.31 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 9-CLORO-2,3,5,11-TETRAMETIL-6H-PIRIDO[3,2-b]CARBAZOL-4-OLO(39) .....	233

---

6.32 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: <i>N</i> -[8-ETIL-1,4-DIMETIL-9 <i>H</i> -CARBAZOL-3-il)METILENE]-2,2-DIMETOSSIETANAMMINA(40) .....	235
6.33 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 7-ETIL-5,11-DIMETIL-6 <i>H</i> -PIRIDO[4,3-b]CARBAZOLO(41).....	236
6.34 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 2-[(6-CLORO-1,4-DIMETIL-9 <i>H</i> -CARBAZOLO-3-il)METILINDENE]IDRAZINO(IMMINO)METANAMMINO NITRATO(42) .....	237
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>239</b>

# Introduzione

---

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha fatto enormi progressi nella comprensione dei meccanismi responsabili dell'insorgenza di molte malattie e dei siti recettoriali che vi sono coinvolti.

Allo scopo di progettare e sintetizzare nuovi composti chimici farmacologicamente attivi, da utilizzare nel trattamento di patologie per le quali non esistono ancora terapie del tutto efficaci, è comune interesse dei ricercatori comprendere quindi i fenomeni che regolano le interazioni tra le molecole biologiche responsabili dell'attivazione o dell'inibizione dei normali processi vitali, nonché comprendere i meccanismi d'azione dei farmaci già in uso.<sup>1</sup>

I continui miglioramenti conoscitivi e le innovazioni tecnologiche hanno pertanto generato in tal senso un grande ottimismo fra gli scienziati ed i ricercatori che da tempo si dedicano allo studio delle varie patologie come ad esempio i tumori, le malattie genetiche, l'AIDS, ecc..<sup>2</sup>

Tuttavia, nonostante i notevoli progressi scientifici le patologie neoplastiche costituiscono, purtroppo ancora oggi dopo quelle cardiache, la causa principale di morte. Esse rappresentano, quindi un problema di assoluta rilevanza sociale soprattutto nei paesi più sviluppati industrialmente dove negli ultimi decenni si è osservato un continuo incremento del numero di casi diagnosticati legato al prolungamento della vita media, alla diminuzione dell'incidenza di decessi dovuti ad altre cause, e all'aumentata esposizione della popolazione a fattori oncogeni naturali e non.<sup>3</sup>

Dal punto di vista clinico il cancro è sostanzialmente una malattia delle cellule, caratterizzata da una deviazione nei meccanismi di controllo che presiedono alla proliferazione e alla differenziazione cellulare.

Essendo una malattia complessa l'unico modo per combatterla è la comprensione dei meccanismi alla base del funzionamento cellulare.<sup>4</sup>

Le cellule, che rappresentano la struttura fondamentale di tutti gli organi e tessuti dell'organismo, si dividono originando altre due cellule figlie che poi crescono fino a raggiungere le dimensioni della cellula d'origine per poi dividersi di nuovo e così via. Questo processo di divisione cellulare è necessario per rimpiazzare le cellule danneggiate o quelle che sono andate distrutte a causa di traumi o malattie.<sup>5</sup>

---

<sup>1</sup> B.G. Katsung. "Farmacologia generale e clinica", IV Ed. Piccin (2000).

<sup>2</sup> <http://www.alcase.it>.

<sup>3</sup> A. Micheli, E. Mugno, V. Krogh, M. J. Quinn, M. Coleman, T. Hakulinen, G. Gatta, F. Berrino, R. Capocaccia. *Cancer Prevalence in European registry areas Annals of Oncology*, 13, (2002), 840-865.

<sup>4</sup> <http://www.startoncology.net>.

<sup>5</sup> <http://www.fatigue.it/bgdisplay.jhtml>.

L'organismo tiene sotto controllo la divisione cellulare grazie all'esistenza di "geni controllori": in particolare attraverso i cosiddetti geni acceleratori, che spingono le cellule a moltiplicarsi, e i geni inibitori che viceversa arrestano la moltiplicazione cellulare quando non è più necessaria.<sup>6</sup>

Inoltre, durante il processo di replicazione del DNA che precede la divisione cellulare si verificano normalmente modificazioni isolate quali ad esempio le mutazioni puntiformi o gli accoppiamenti illegittimi tra le basi nucleiche o altro.<sup>7</sup>

La stabilità del patrimonio genetico è però garantita, come già detto, da una serie di controlli che provvedono alla riparazione del DNA danneggiato.<sup>8</sup> Questo permette il corretto alternarsi delle varie fasi del ciclo cellulare, e, in caso di emergenza, rallenta la progressione del ciclo stesso fino a quando le anomalie non sono state rimosse. In particolari situazioni, spesso in presenza di concomitanti fattori ambientali mutageni che creano una situazione di stress per la cellula, la frequenza di induzione del danno e la sua gravità risultano maggiori rispetto alla capacità di riparazione della cellula. Si ha, quindi, un danno irreversibile, le cellule cominciano a proliferare in modo sregolato ed incontrollato<sup>9</sup> formando una massa cellulare che viene detta tumore (o neoplasia) (Fig. 1).<sup>10</sup>

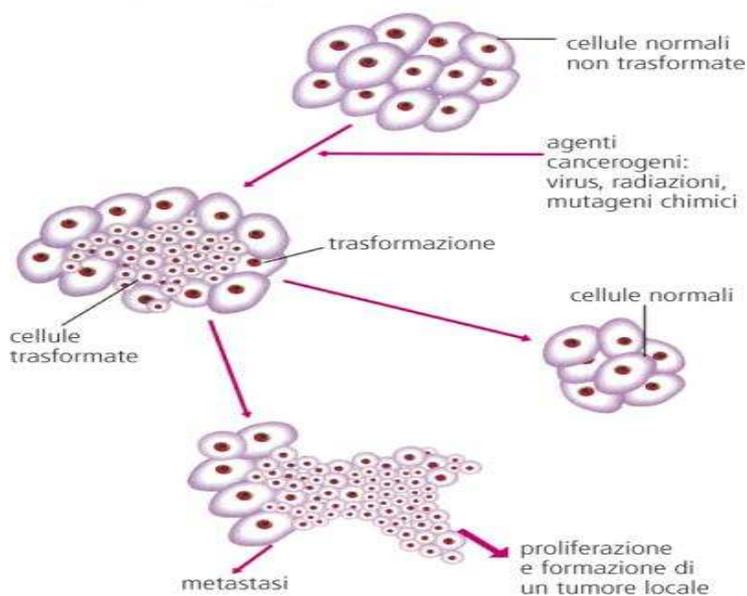


Fig. 1: Trasformazioni delle cellule tumorali

<sup>6</sup> <http://www.effective.it/Novuspharma.htm>.

<sup>7</sup> Robbins. "Le Basi Patologiche Delle Malattie", VI Ed. Italiana, (2000).

<sup>8</sup> S. Gasser, D. Raulet. The DNA damage response, immunity and cancer. *Seminars in Cancer Biology, Natural killer cells in cancer*, 16, (2006), 344-347.

<sup>9</sup> G. Karp. "Biologia cellulare e molecolare", EDISES, (1998).

<sup>10</sup> A. Micheli, E. Mugno, V. Krogh, M. J. Quinn, M. Coleman, T. Hakulinen, G. Gatta, F. Berrino, R. Capocaccia. *Cancer Prevalence in European registry areas Annals of Oncology. op. cit.*

Un tumore può essere classificato come maligno o benigno. Nello specifico si parla di tumore maligno o cancro (tumore primario), quando le cellule in fase di crescita continua ed incontrollata possiedono la capacità di invadere i tessuti circostanti sviluppando un nuovo tumore (tumore secondario o metastasi).<sup>11</sup>

Poiché le cellule di una neoplasia maligna sono dotate di minore adesività rispetto a quelle normali, esse sono infatti in grado di staccarsi dalla massa originaria e di invadere zone distanti del corpo diffondendosi attraverso il circolo linfatico o vascolare. Un tumore benigno, al contrario, non ha queste proprietà pertanto in questo caso le cellule crescendo lentamente restano confinate nel sito di partenza. Hanno generalmente forma regolare, possono essere dotate di capsula reattiva e non producono metastasi (Fig. 2).

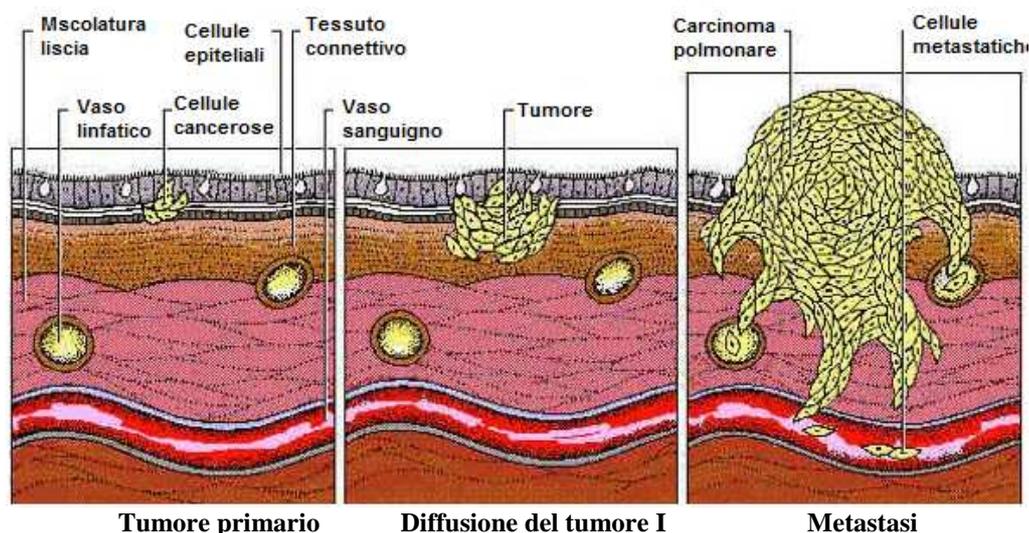


Fig. 2: Rappresentazione schematica dell'evoluzione di una neoplasia

Nella maggior parte dei casi le cellule neoplastiche riducono o aboliscono le funzioni degli organi colpiti in quanto consumano le sostanze nutritive e l'ossigeno destinato al tessuto normale, causandone conseguentemente atrofizzazione e necrosi. Proliferando disordinatamente esse alterano gli equilibri dell'intero organismo finendo infine per respingere o distruggere le cellule normali dell'organo colpito.<sup>12</sup>

Negli ultimi quindici anni si è assistito ad un'amplificazione delle conoscenze che riguardano la biologia dei tumori, con l'identificazione di geni che codificano per proteine

<sup>11</sup> <http://www.startoncology.net>.

<sup>12</sup> Ibidem.

coinvolte nella riparazione del DNA, nella regolazione del ciclo cellulare, nei processi di differenziamento e morte cellulare.<sup>13</sup>

Queste conoscenze permettono di dire quindi che il cancro è una patologia che si sviluppa attraverso un processo multistadio nel quale gli eventi critici sono sostanzialmente i danni al DNA ed i geni colpiti possono essere: i proto-oncogeni che codificano per proteine che promuovono la crescita cellulare (è sufficiente un solo allele mutato per avere una proliferazione incontrollata), o i geni oncosoppressori che bloccano la crescita cellulare<sup>14</sup> (è richiesta una mutazione su entrambi gli alleli per avere un effetto sulla proliferazione).

Il delicato equilibrio tra attivazione e soppressione di tali geni permette una corretta progressione della cellula nel suo ciclo vitale.<sup>15</sup> Il verificarsi di mutazioni che aumentano l'attività dei proto-oncogeni, che diventano quindi oncogeni (la versione opportunamente mutata dei proto-oncogeni), o che diminuiscono la funzione dei geni oncosoppressori, portano invece ad una proliferazione cellulare sregolata e all'alterazione dei meccanismi di differenziazione con lo sviluppo di una neoplasia.<sup>16</sup> La maggior parte dei tumori contiene alterazioni sia a carico dei geni oncosoppressori che dei proto-oncogeni. L'alterazione di uno solo dei due tipi di geni non è generalmente sufficiente a far sì che la cellula diventi maligna, normalmente ciò avviene quando si verificano contemporaneamente la conversione del proto-oncogene in oncogene e la perdita della funzione oncosoppressiva; in più, in alcune tipologie di tumori sono necessarie ulteriori variazioni dell'informazione genetica per realizzare un fenotipo chiaramente metastatico.<sup>17</sup>

I tumori possono colpire qualsiasi organo del corpo e, a seconda della loro localizzazione, cambiano i nomi e le terapie applicate. Circa l'85% dei tumori sono detti "carcinomi" e si originano nell'epitelio; il 6% sono detti "sarcomi" e hanno origine nel tessuto connettivo di muscoli, ossa e tessuti adiposi. Il 5% è invece costituito da leucemie e linfomi, che si sviluppano nel midollo osseo e nel sistema linfatico. Il restante 4% è costituito da tumori cerebrali e da forme più rare (Tab. 1).<sup>18</sup>

---

<sup>13</sup> Goodman & Gilman. "Le Basi Farmacologiche della Terapia", IX Ed. Italiana, McGraw-Hill, Libri Italia Srl.

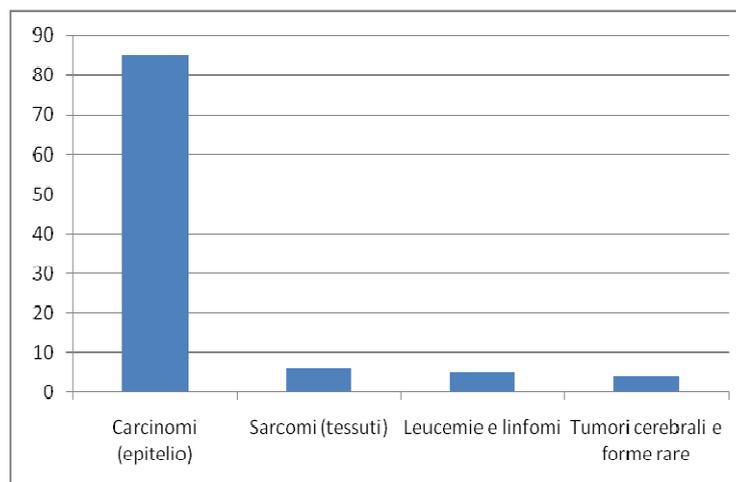
<sup>14</sup> J. M. Bishop, R. A. Weinberg. *Molecular Oncology Scientific American* (1996).

<sup>15</sup> A. Vazquez, E. E. Bond, A. J. Levine, G. L. Bond. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 7, (2008), 979-987.

<sup>16</sup> J. M. Bishop, R. A. Weinberg. *Molecular Oncology Scientific American* (1996), *op. cit.*.

<sup>17</sup> G. Karp. "Biologia cellulare e molecolare", EDISES, (1998), *op. cit.*.

<sup>18</sup> <http://www.startoncology.net>.



Tab. 1

### ❖ Terapie antitumorali.

Quando si parla comunemente di tumore si tende a considerarlo come un'unica tipologia di malattia, in realtà il termine ne contempla numerose che hanno cause molteplici e distinte, che colpiscono organi diversi e che richiedono pertanto protocolli clinici e trattamenti curativi differenti per ogni specifica forma di tumore e per lo stadio di sviluppo in cui si trova.<sup>19</sup>

Attualmente le neoplasie possono essere trattate mediante: terapie loco-regionali e/o terapie sistemiche.

- *Terapie loco-regionali* (chirurgia e radioterapia) che hanno lo svantaggio di poter essere utilizzate esclusivamente per neoplasie in sedi specifiche.

La chirurgia spesso è il primo trattamento al quale vengono sottoposti la maggior parte dei tumori solidi. Nei casi in cui il cancro è diagnosticato ad uno stadio iniziale, la chirurgia può essere sufficiente a curare il soggetto, rimuovendo tutte le cellule cancerogene. Anche le crescite tumorali benigne possono essere rimosse chirurgicamente.<sup>20</sup>

La radioterapia, usata insieme alla chirurgia e/o trattamenti farmacologici ha invece, come obiettivo finale quello di uccidere le cellule cancerogene direttamente,

<sup>19</sup> D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. J. Bast, T. S. Gansler, J. F. Holland, E. Frei. *Cancer Medicine*, 6, (2003).

<sup>20</sup> <http://www.emory.edu>.

danneggiandole con fasci di alta energia (radiazioni). Essa non è tuttavia in grado di fornire una riduzione ottimale del quadro patologico.

- *Terapie sistemiche* (ormonoterapia, immunoterapia, chemioterapia).

L'ormonoterapia prevede l'utilizzo di farmaci (ormoni), come: gli adrenocorticosteroidi, gli estrogeni, gli antiestrogeni, i progesteronici e gli androgeni. Benché il loro meccanismo specifico d'azione non sia chiaro, essi rallentano la crescita di alcuni tumori ormone-dipendenti (tumore della mammella, dell'ovaio, della prostata ecc..) impedendo alle cellule stesse di ricevere i segnali necessari per una continua crescita e divisione.

L'immunoterapia si basa invece sull'utilizzo di vaccini tumorali allo scopo di stimolare le difese dell'organismo contro il cancro. I vaccini generalmente contengono proteine rilevate o prodotte nelle cellule tumorali. Somministrando tali proteine, il trattamento ha infatti lo scopo di incrementare la risposta immunitaria dell'organismo contro le cellule cancerogene.<sup>21</sup>

Sebbene il trattamento chirurgico e radiante può essere efficace nell'estirpazione di tumori localizzati, tuttavia i migliori risultati per il trattamento della patologia, una volta divenuta sistemica e largamente disseminata, si hanno con il trattamento chemioterapico.

In linea generale, la strategia terapeutica contro una neoplasia prevede un iniziale ciclo di chemioterapia per ridurre le dimensioni della massa tumorale, cui segue l'eliminazione, il più completa possibile, della stessa con terapia radiante o per mezzo della chirurgia. Per evitare poi che si formino metastasi, il paziente viene sottoposto ad ulteriori cicli di chemioterapia, spesso in combinazione con terapie radianti.

Dopo la scoperta dei primi chemioterapici nel corso della Seconda Guerra Mondiale quando, in seguito alla diffusione in mare del gas iprite, nei marinai contaminati venne diagnosticata un'aplasia midollare e linfatica associata a distruzione dell'epitelio bronco alveolare la chemioterapia ha avuto un rapido sviluppo con risultati soddisfacenti.

Il termine chemioterapia è stato in realtà coniato da Herlich all'inizio del 1900 per indicare una terapia basata sull'impiego di farmaci ad ampio spettro d'azione e basso indice terapeutico.

Negli anni successivi due studiosi Goodman e Gilman, effettuarono uno studio somministrando un derivato dell'iprite, la mostarda azotata, in sei pazienti affetti da linfoma maligno. In seguito a tale somministrazione essi notarono un miglioramento delle condizioni cliniche ed una riduzione delle lesioni neoplastiche in questi pazienti.

---

<sup>21</sup> Ibidem.

Tale scoperta suscitò grande entusiasmo, seguito però presto da grande delusione per la ricomparsa delle masse neoplastiche.<sup>22</sup>

Nei primi anni i farmaci chemioterapici vennero somministrati quasi sempre in forma di monochemioterapia, seguendo una posologia giornaliera o settimanale. La vera rivoluzione si ebbe nel 1970 quando per la prima volta fu usata con successo la polichemioterapia nel linfoma di Hodgkin.<sup>23</sup>

Oltre che come monochemioterapia (oggi riservata soltanto ai pazienti di età superiore ai 70-75 anni), e polichemioterapia (ciclica, sequenziale o alternante), la chemioterapia può essere di tipo: *palliativo*, *adiuvante o post-chirurgica*, *neoadiuvante o primaria* o *chemio preventiva*, *chemioterapia della malattia avanzata* o *chemioterapia d'induzione* (Fig.3).

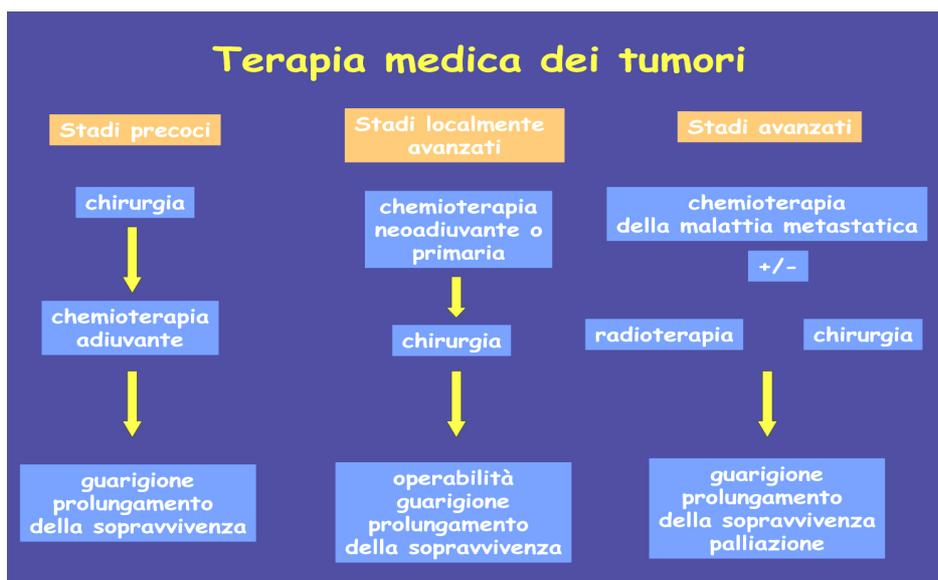


Fig. 3: Terapie antitumorali

La chemioterapia adiuvante o post-chirurgica si effettua dopo che il tumore primitivo è stato controllato per mezzo della chirurgia o radioterapia. Viene, pertanto, eseguita in pazienti senza evidenza clinica di neoplasia, ma a rischio significativo di ricaduta e di disseminazione a distanza.<sup>24</sup>

<sup>22</sup> <http://www.med.unifi.it/didonline/corsi.htm>.

<sup>23</sup> Ibidem.

<sup>24</sup> <http://www.oncologiaitalia.it/chemio.html>.

Il suo scopo è quello di distruggere eventuali micrometastasi presenti dopo un intervento loco-regionale aumentando così la percentuale di guarigione. I farmaci in questo caso devono essere somministrati in uno stadio precoce della neoplasia, in quanto esso rappresenta la fase più chemiosensibile.

Come la terapia adiuvante la chemioterapia detta chemiopreventiva (neoadiuvante o primaria), è rivolta contro le eventuali micrometastasi in presenza di una neoplasia apparentemente localizzata. Questa è un tipo di terapia che viene effettuata prima dell'intervento chirurgico e che ha lo scopo di ridurre le dimensioni della neoplasia, al fine di poter effettuare un successivo intervento loco-regionale il più possibile conservativo.

Tale chemioterapia pre-operatoria ha numerosi vantaggi rispetto a quella post-operatoria. Un trattamento chemioterapico primario consente di somministrare gli agenti antiproliferativi in assenza di fenomeni di sclerosi locale, correlati alla chirurgia e/o alla radioterapia, che possono impedire il raggiungimento di concentrazioni adeguate di farmaco, proteggendo in tal modo eventuali cellule neoplastiche residue.

L'esposizione precoce delle cellule tumorali all'azione dei farmaci antitumorali può prevenire inoltre, l'espansione di fenotipi farmacoresistenti insorti per mutazione spontanea delle cellule neoplastiche.

In questo trattamento esistono anche potenziali svantaggi ritenuti complessivamente di minore importanza rispetto ai potenziali vantaggi: la malattia può progredire durante il trattamento chemioterapico sebbene in meno del 2% dei pazienti; lo stadio patologico della neoplasia può risultare modificato dalla regressione della lesione primitiva e dalla conversione di linfonodi positivi in linfonodi negativi, alterando la valutazione prognostica del paziente.

Abbiamo ancora la cosiddetta chemioterapia d'induzione denominata anche chemioterapia delle neoplasie avanzate o metastatiche per le quali non esiste una valida alternativa terapeutica.

Il beneficio di tale trattamento viene valutato in base al grado di regressione della malattia e il criterio più importante di valutazione della sua efficacia è l'ottenimento di una risposta completa e persistente anche dopo la sospensione del trattamento.

Questa modalità terapeutica da sola è "curativa" nei confronti di vari tumori in fase avanzata quali leucemie linfatiche acute, leucemia mieloide acuta, malattia di Hodgkin, ecc..

Poiché purtroppo i farmaci antitumorali oggi disponibili presentano un basso indice terapeutico a causa della bassa specificità d'azione e, quindi della tossicità marcata per limitare tale tossicità si può ricorrere alla polichemioterapia.

La vera rivoluzione in campo neoplastico, come già detto, si ebbe con l'introduzione della polichemioterapia o chemioterapia di combinazione. E' noto da tempo infatti, che l'associazione di più farmaci antitumorali è più efficace degli agenti singoli i quali, con qualche rara eccezione, non sono in grado di guarire il cancro. La combinazione di diversi farmaci antineoplastici che abbiano differenti proprietà farmacologiche curative, ma anche diversi effetti collaterali consente di ottenere il massimo effetto sul tumore con effetti collaterali minimi grazie proprio al sinergismo terapeutico.

La superiorità della polichemioterapia può essere spiegata in vario modo:

- Ogni agente singolo determina la massima distruzione cellulare nell'ambito della dose tollerata dall'organismo;
- La copertura nei confronti delle cellule resistenti è più vasta;
- Lo sviluppo di cloni resistenti da cellule inizialmente sensibili può essere prevenuto o rallentato.

A tale proposito è opportuno scegliere solo farmaci singolarmente attivi che non abbiano tossicità sovrapponibile.

Essi devono essere somministrati in dosi ottimali: la riduzione della dose di un farmaco efficace per compensare la tossicità relativa all'aggiunta di un altro farmaco meno efficace, potrebbe, infatti, comportare una diminuzione significativa dell'efficacia del trattamento, compromettendone il potenziale eradicativo in un tumore chemiosensibile.

In questi casi può essere utile, pertanto, ricorrere all'uso dei fattori di crescita emopoietici per mantenere l'intensità della dose e per evitare di alterare il regime chemioterapico.<sup>25</sup>

Questo tipo di chemioterapia viene suddivisa in fasi o cicli successivi di cura. Ogni fase prevede la somministrazione settimanale di una o più dosi di farmaco, per 2-6 settimane di seguito.

Solitamente, i farmaci vengono iniettati in vena con una siringa o per fleboclisi; in questo secondo caso, (il più frequente), la terapia può durare da pochi minuti a diverse ore a seconda dello schema impiegato, del meccanismo d'azione del farmaco che si vuole sfruttare e della patologia da trattare. In casi rari, durante la flebo, il paziente può provare senso di spossatezza, malessere e a volte nausea.

---

<sup>25</sup>Ibidem.

Alcuni tipi di chemioterapia possono essere somministrati anche per via sottocutanea; direttamente nel tumore (somministrazione intralesionale); o nella cavità dell'organismo (addome, cavo pleurico); per quanto riguarda invece la via orale essa viene utilizzata raramente.<sup>26</sup>

Oltre che somministrare cicli ripetuti della stessa associazione farmacologica, è possibile effettuare una polichemioterapia alternante o una polichemioterapia sequenziale; inoltre, spesso la chemioterapia è utilizzata in combinazione con altre terapie come la radioterapia, la chirurgia, l'ormonoterapia, l'immunoterapia. In tal modo si hanno maggiori possibilità di controllo del tumore e quindi di guarigione.<sup>27</sup>

### ❖ **Principi farmacologici: caratteristiche generali.**

Relativamente ai possibili trattamenti terapeutici e, soprattutto al principio attivo più appropriato da somministrare, uno dei punti chiave nella cura del cancro è la sua diagnosi precoce. Molto spesso infatti, il cancro viene rilevato in stadio avanzato o terminale, quando ha già compromesso le funzioni di uno o più organi vitali e si è diffuso ampiamente attraverso il corpo. I metodi di rilevazione e diagnosi precoce del cancro sono pertanto di estrema importanza e sono un'area di ricerca molto attiva al momento attuale.

Solo dopo questa prima fase di individuazione e rilevazione di una massa cancerogena, si procede quindi ad accurata diagnosi e classificazione dello stadio della malattia, al fine di progettare un corretto piano di trattamenti terapeutici efficaci. A tale scopo bisogna inoltre tener conto che le sostanze farmacologiche usate nella chemioterapia sono molte e hanno meccanismi d'azione analoghi, ma non identici.

Come precedentemente detto, essendo il cancro una malattia delle cellule tra i farmaci antitumorali un posto rilevante spetta ai principi attivi di origine naturale, chimica, o di altro genere, aventi capacità selettiva sulle sole cellule neoplastiche, tramite induzione di apoptosi o pseudo-apoptosi. Tali processi, mediati dall'attivazione di enzimi proteolitici intracellulari, provocano la degradazione (per proteolisi) di sequenze vitali del DNA, causando di conseguenza la morte della cellula.<sup>28</sup>

Questo processo di "morte cellulare programmata" nel quale la cellula morta viene poi fagocitata e degradata, è un meccanismo fisiologico attivo altamente organizzato e

<sup>26</sup> [http://www.istitutotumori.mi.it/INT/informazioniINT/pdf/INT\\_informazioni\\_2003\\_3.pdf](http://www.istitutotumori.mi.it/INT/informazioniINT/pdf/INT_informazioni_2003_3.pdf).

<sup>27</sup> <http://www.oncologiaitalia.it/chemio.html>.

<sup>28</sup> <http://www.mednat.org/Nacci%libro.pdf>.

controllato a livello genetico, in cui la cellula “decide di morire” a differenza della necrosi che è invece un processo passivo in cui un danno alla cellula ne causa il rigonfiamento e la successiva lisi. In questo secondo caso, infatti la cellula è “indotta a morire” per cause non naturali quali: ipossia, temperature estreme, tossine prodotte da batteri, virus litici infettanti. Gli organismi viventi attraverso l’apoptosi eliminano quindi le cellule non correttamente sviluppate, danneggiate oppure invecchiate.<sup>29</sup>

Poiché i farmaci antitumorali (e antiproliferativi) intervengono nel momento preciso in cui le cellule neoplastiche si suddividono impedendone o ritardandone la moltiplicazione<sup>30</sup> mediante l’innescò di un processo apoptotico, la maggior parte di essi vengono detti “citotossici”.

Gli antineoplastici ideali sono pertanto quelli capaci di eliminare soltanto le cellule tumorali senza danneggiare quelle sane intervenendo nel momento preciso in cui le cellule neoplastiche si suddividono.

I farmaci attualmente in uso non consentono però di esercitare un’azione specificatamente diretta contro le cellule tumorali: colpiscono genericamente tutte le popolazioni cellulari in fase di attiva replicazione, quindi anche le cellule sane (seppure in misura minore rispetto a quelle neoplastiche) e in particolare quelle di tessuti ad alto ritmo proliferativo come: il midollo osseo, la mucosa orale e gastrointestinale, gli epitelii dei bulbi piliferi, l’ovaio e il testicolo.<sup>31</sup>

Tali farmaci provocano un danno cellulare interferendo con la sintesi del DNA o interagendo chimicamente con esso, così da alterare il processo di divisione cellulare.

Poiché inoltre a differenza di quanto avviene nelle cellule normali quelle neoplastiche si moltiplicano molto più rapidamente e senza rispettare alcun meccanismo di controllo, tale diversità tra cellule normali e cancerose può essere sfruttata in chemioterapia consentendo in molti casi una terapia più mirata.

A tale proposito vi sono ad esempio dei farmaci che inducono dei danni al DNA che possono essere riparati da una cellula sana in stato di quiescenza, cosa che non è invece possibile in una cellula neoplastica in fase di replicazione. Nei tumori a rapida proliferazione (leucemie, linfomi), in cui il genoma è maggiormente vulnerabile a causa dell’elevata frequenza dei cicli replicativi (poiché il DNA durante le fasi di duplicazione è

<sup>29</sup> W. O. Foye, D. A. Williams, T. L. Lemke. “*Foye’s principi di Chimica Farmaceutica*”, Piccin (2005).

<sup>30</sup> [http://www.istitutotumori.mi.it/INT/informazioniINT/pdf/INT\\_informazioni\\_2003\\_3.pdf](http://www.istitutotumori.mi.it/INT/informazioniINT/pdf/INT_informazioni_2003_3.pdf).

<sup>31</sup> <http://www.iss.it/Rapporti> (ISTISAN 02/16).

maggiormente disavvolto), vengono invece impiegati farmaci che interagiscono direttamente con esso.

Le nuove linee di ricerca farmacologica si sono quindi rivolte all'identificazione di agenti (terapia target) in grado di interferire in maniera selettiva contro bersagli molecolari specifici al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali sistemici. La progettazione di tali farmaci comporta quindi la capacità di prevedere l'idonea struttura molecolare di un composto chimico (target) sulla base di informazioni relative al sito recettoriale o al meccanismo d'azione sul quale deve intervenire.

A tale proposito, poiché nella maggior parte dei casi lo sviluppo di una neoplasia è dovuto ad alterazioni a carico del DNA la presente ricerca si è indirizzata verso la sintesi e la valutazione biologica di farmaci anticancro che abbiano come bersagli principali: il DNA stesso<sup>32</sup> e gli enzimi che interagiscono con esso.<sup>33</sup> Tali argomenti saranno trattati nel prossimo capitolo.

---

<sup>32</sup> M.F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa, A. Ramos. *Curr. Pharm. Des.*, 7, (2001), 1745.

<sup>33</sup> K. R. Hande. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1-3), (1998), 173-184.

Capitolo I:  
Principali bersagli degli antitumorali

# PRINCIPALI BERSAGLI DEGLI ANTITUMORALI

## 1.1 Introduzione.

Le recenti conoscenze sui meccanismi coinvolti nel processo di trasformazione e progressione tumorale ed il riconoscimento delle proteine coinvolte nella regolazione di questi processi, ha aperto una nuova era nella formulazione e nella valutazione clinica di nuovi farmaci dando sempre più importanza a quei farmaci che agiscono con un meccanismo che coinvolge gli acidi nucleici, in particolare il DNA.

Infatti, essendo il trasportatore dell'informazione genetica e svolgendo un ruolo critico nei processi di crescita e divisione cellulare, è bersaglio comune di molti farmaci per la cura di svariate malattie.<sup>1</sup>

Grazie all'ausilio di tecniche sperimentali per la determinazione della selettività di binding al DNA, quali l'NMR, la diffrattometria ai raggi X, il footprinting, è stato inoltre possibile determinare la natura dei processi chimici coinvolti durante l'interazione di questi farmaci con il DNA stesso.

A tale scopo le ricerche condotte finora hanno dimostrato che il primo evento per l'azione di molti farmaci antitumorali è il legame, reversibile o irreversibile, al DNA. Tale legame può essere di tipo intercalativo: la molecola di farmaco s'inserisce tra le coppie di basi della doppia elica, oppure il farmaco può legare un solco maggiore o minore del DNA, oppure ancora, alchilare una o più basi azotate.

Queste conoscenze su "target" selezionati mediante modelli sperimentali sia *in vitro* che *in vivo* hanno permesso la sintesi di molecole ad attività citotossica, nonché di approfondire lo studio del loro meccanismo d'azione al fine di renderle selettive nei confronti delle sole cellule tumorali.<sup>2</sup>

Spesso i farmaci antitumorali non producono un danno alla cellula solo per interazione diretta con il DNA: la loro azione si esplica impedendo o alterando i normali processi biologici mediati da enzimi strettamente connessi con esso. È perciò molto importante approfondire le conoscenze sui meccanismi d'azione di farmaci che agiscono secondo queste modalità, in modo da poter ottenere molecole sempre più selettive nei confronti delle cellule tumorali.

---

<sup>1</sup>M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa, A. Ramos. *Curr. Pharm. Des.*, 7, (2001), 1745. *op. cit.*.

<sup>2</sup><http://it.wikipedia.org/wiki/Chemioterapia>.

Consideriamo pertanto più dettagliatamente i principali bersagli dei farmaci antitumorali (Fig. 4) quali: il DNA stesso e gli enzimi coinvolti nel suo “metabolismo” e nella biosintesi dei suoi precursori.

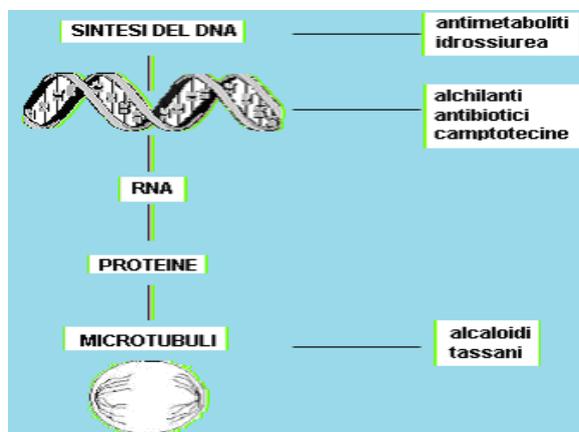


Fig. 4: Principali bersagli dei chemioterapici

## 1.2 Il DNA: “target” principale.

Il DNA (acido desossiribonucleico) è un acido nucleico (presente nel nucleo delle cellule) che contiene tutte le informazioni genetiche necessarie per la biosintesi del RNA e delle proteine, molecole indispensabili per il corretto funzionamento degli organismi viventi.

Dal punto di vista chimico è un polimero organico costituito da monomeri detti nucleotidi.<sup>3</sup> Tutti i nucleotidi sono a loro volta costituiti da tre componenti fondamentali (Fig. 5):

- un gruppo fosfato;
- uno zucchero pentoso: il desossiribosio;
- una base azotata.

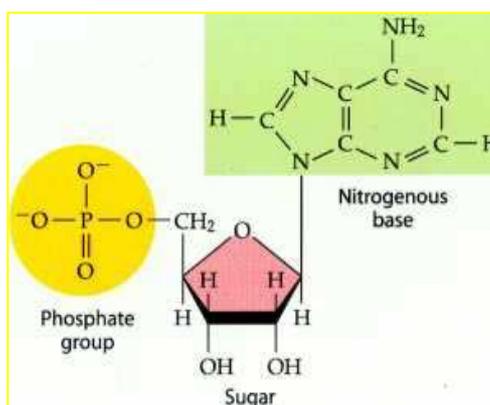


Fig. 5: Struttura base di un nucleotide

<sup>3</sup> J. M. Butler. Forensic DNA Typing. Elsevier, (2001), 14-15. ISBN 978-0-12-147951-0.

La sua struttura di base, secondo il modello (*B*-DNA) stabilito nel 1953 dall'inglese F. Crick e dallo statunitense J. Watson, consiste in una doppia elica (coppia di filamenti saldamente associati tra loro) (Fig. 6) in cui i singoli nucleotidi si legano tra loro grazie a legami fosfodiesterici.<sup>4,5</sup>

Nello specifico la struttura laterale della doppia elica di DNA è composta da unità ripetute ed alternate di gruppi fosfato e di 2-desossiribosio.<sup>6</sup> Quest'ultimo si lega ai fosfati adiacenti attraverso legami fosfodiesterici presso il terzo ed il quinto carbonio.

In pratica, ogni molecola di fosfato forma un ponte molecolare collegando, attraverso legami fosfodiesterici, il carbonio in posizione 3' di una molecola di desossiribosio con quello in posizione 5' dello zucchero successivo.<sup>7</sup>

Conseguenza di questi legami asimmetrici è che ogni filamento di DNA ha un senso, determinato dalla direzione dei legami fosfodiesterici. In una doppia elica, il senso di un filamento è opposto a quello del filamento complementare e per tale motivo i filamenti sono detti antiparalleli. Le estremità asimmetriche di un singolo filamento di DNA sono invece definite *estremità 5'* (*cinque primo*) ed *estremità 3'* (*tre primo*).<sup>8</sup>

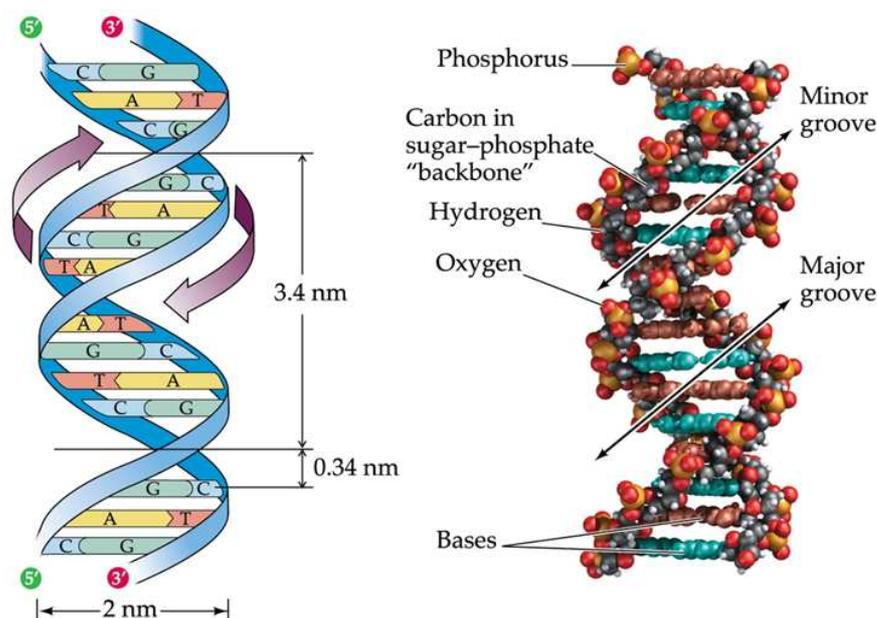


Fig. 6: Rappresentazione dello scheletro della doppia elica del DNA

<sup>4</sup> J. Watson, F. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 (1953), 737-8.

<sup>5</sup> J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry* (2002). W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6.

<sup>6</sup> A. Ghosh, M. Bansal. A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59 (2003), 620-6.

<sup>7</sup> R. L. P. Adams, J. T. Knowler, D. P. Leader. In the biochemistry of the nucleic acids. (1992).

<sup>8</sup> J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry* (2002). W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6. *op. cit.*

Legate al carbonio anomerico del desossiribosio con un legame detto *N*-glicosidico, si trovano le basi azotate (Fig. 7): puriniche Adenina (A) e Guanina (G), e pirimidiniche Timina (T) e Citosina (C).

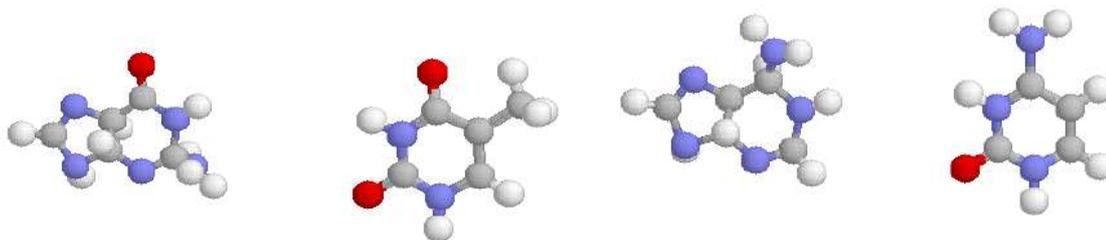


Fig. 7: Le basi azotate del DNA: Adenina, Timina, Guanina, Citosina

La doppia elica del DNA è inoltre stabilizzata<sup>9</sup> da interazioni non covalenti quali (Fig. 8):

1. I ponti ad idrogeno tra le basi azotate di catene opposte e antiparallele. Due ponti ad idrogeno legano l'adenina alla timina (A-T), mentre tre legano la guanina alla citosina (G-C). Per tale motivo la stabilità del legame G-C è decisamente maggiore di quello A-T.<sup>10</sup>
2. Le interazioni idrofobiche di tipo Van der Waals tra le porzioni planari delle basi che si impilano all'interno dello scheletro.

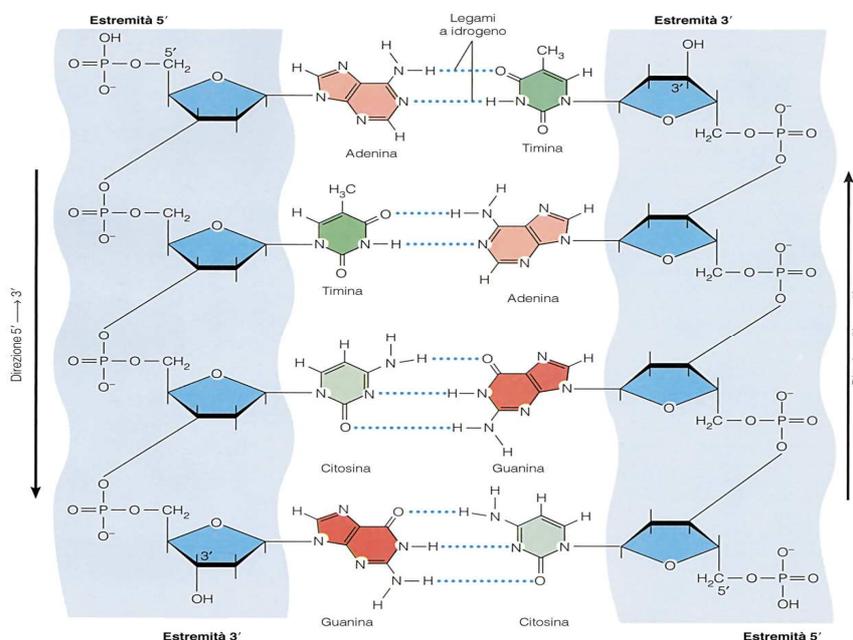


Fig. 8: Appaiamento A-T e G-C

<sup>9</sup> Ibidem.

<sup>10</sup> T. Chalikian, J. Völker, G. Plum, K. Breslauer. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetric and volumetric techniques. 14, (1999), 7853-8.

Sebbene non siano importanti per la conservazione dell'informazione genetica, come lo sono invece i legami idrogeno, le interazioni idrofobiche risultano essere determinanti per la stabilizzazione della struttura tridimensionale del DNA in quanto riducono il contatto delle basi con l'acqua e favoriscono l'impilamento idrofobico delle basi stesse. Queste interazioni fanno sì infatti che i piani contenenti gli anelli eterociclici delle basi azotate, all'interno della doppia elica, risultino quasi paralleli tra loro e perpendicolari al lungo asse della macromolecola.

Tuttavia i legami zucchero-base azotata presenti nella doppia elica non sono direttamente opposti l'uno all'altro tanto da determinare tra lo scheletro zucchero-fosfato e la superficie interna della molecola la formazione di due solchi di larghezza diversa: solco maggiore e solco minore. A livello di tali solchi le basi azotate presentano atomi di *H*, *N* ed *O* che possono costituire siti di legame a idrogeno per il legame con molecole esterne quali ad esempio proteine specifiche per il DNA (enzimi) e farmaci.

Bisogna inoltre dire che il DNA non è una struttura statica ma flessibile e libera di muoversi nello spazio fluido della cellula. Può quindi piegarsi, annodarsi o avvolgersi su se stesso per assumere, a seconda delle necessità, diverse strutture tridimensionali. Inoltre, tutti i processi cellulari che comportano un'interazione di complessi proteici con il DNA ne alterano la struttura, avvolgendolo o disavvolgendolo, creando delle regioni super-avvolte o "linearizzate" del tutto simili a quelle che possono assumere una corda od un elastico.

A tale proposito, in relazione al superavvolgimento, alla posizione relativa assunta dalle basi nei confronti del rispettivo zucchero (*sin* o *anti*), il DNA può esistere in diversi tipi di conformazioni.<sup>11</sup> Esse sono denominate *A*-DNA, *B*-DNA, *C*-DNA, *D*-DNA,<sup>12</sup> *E*-DNA,<sup>13</sup> *H*-DNA,<sup>14</sup> *L*-DNA,<sup>15</sup> *P*-DNA<sup>16</sup> e *Z*-DNA.<sup>17</sup> In ogni caso, solo le conformazioni *A*-DNA, *B*-DNA e *Z*-DNA (Fig. 9) sono state osservate nei sistemi biologici naturali. Di tali

<sup>11</sup> H. Basu, B. Feuerstein, D. Zarling, R. Shafer, L. Marton. Recognition of Z-RNA and Z-DNA determinants by polyamines in solution: experimental and theoretical studies. *J Biomol Struct Dyn*, 6, (2), (1988), 299-309.

<sup>12</sup> G. Hayashi, M. Hagihara, K. Nakatani. Application of L-DNA as a molecular tag. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)* 49, (2005), 261-262.

<sup>13</sup> J. M. Vargason, B. F. Eichman, P. S. Ho. The extended and eccentric E-DNA structure induced by cytosine methylation or bromination. *Nature Structural Biology*, 7, (2000), 758-761.

<sup>14</sup> G. Wang, K. M. Vasquez Non-B DNA structure-induced genetic instability. *Mutat Res*, 598 (1-2), (2006), 103-119.

<sup>15</sup> G. Hayashi, M. Hagihara, K. Nakatani. Application of L-DNA as a molecular tag. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)* 49, (2005), 261-262. *op. cit.*

<sup>16</sup> Allemand, et al. Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases. *PNAS*, 24, (1998), 14152-14157.

<sup>17</sup> E. Palecek. Local supercoil-stabilized DNA structures. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26 (2), (1991), 151-226.

conformazioni, la conformazione *B* è la più frequente nelle condizioni standard delle cellule.<sup>18</sup>

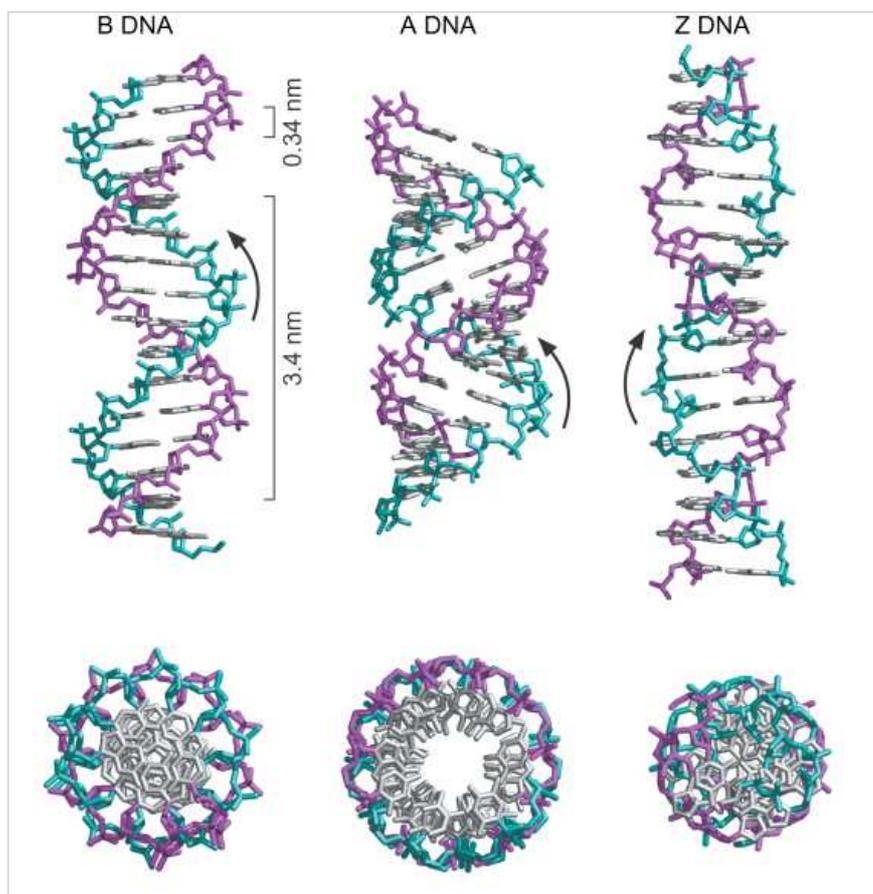


Fig. 9: Le strutture del DNA A, B e Z

La forma *A* è un'ampia spirale destrorsa (il solco minore è largo ma poco profondo, quello maggiore è più stretto e profondo). Tale conformazione è presente in condizioni non fisiologiche, quando il DNA viene disidratato. In condizioni fisiologiche, questa conformazione caratterizza gli *eteroduplex* di DNA e RNA e i complessi formati dalle associazioni DNA-proteina.<sup>19,20</sup>

La forma *B*, o di Watson-Crick, è la forma che prevale nelle normali condizioni fisiologiche di forza ionica ed elevata idratazione. Il DNA si avvolge in modo destrorso le basi sono perpendicolari all'asse di avvolgimento e la loro conformazione nei confronti

<sup>18</sup> A. G. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekaran, R. L. Ratliff. Polymorphism of DNA double helices. *J. Mol. Biol.*, 143 (1), (1980), 49-72.

<sup>19</sup> M. Wahl, M. Sundaralingam. Crystal structures of A-DNA duplexes. *Biopolymers*, 44 (1), (1997), 45-63.

<sup>20</sup> X. J. Lu, Z. Shakked, W. K. Olson. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures. *J. Mol. Biol.*, 300 (4), (2000), 819-40.

dello zucchero è *anti*. In queste condizioni i due solchi maggiore e minore sono molto evidenti.

La conformazione *Z* è tipica invece delle sequenze che presentano modificazioni chimiche come la metilazione, e dei tratti di DNA ricchi di basi C e G. Essa assume un andamento sinistrorso, opposto rispetto alla conformazione *B*.<sup>21</sup> Deve il suo nome all'andamento a zig-zag che la caratterizza in cui le basi puriniche sono, *sin*, mentre le pirimidine *anti* rispetto allo zucchero.

È proprio l'esistenza di diverse forme e la dinamica del passaggio da una all'altra che permette al DNA di conservare e replicare l'informazione genetica. Questo dinamismo, però, lo rende anche molto suscettibile a danni esterni che possono compromettere la sua stabilità.

Per questa ragione, esistono numerosi meccanismi che interagiscono in maniera stretta con il DNA controllandolo, compattandolo, presiedendo alla sua replicazione, riparando i danni fisiologici o innescando meccanismi di morte cellulare quando si rende necessario.

Supervisor e attori di questi processi sono proteine specifiche (enzimi) che interagiscono con esso.

### **1.3 Gli enzimi che interagiscono con il DNA.**

Numerosi enzimi (Fig. 10) concorrono a mantenere la struttura del patrimonio genetico presiedendo al controllo di tutti quei processi dinamici che avvengono a carico del DNA al fine di assicurarne i processi funzionali indispensabili alla vita cellulare.

Tra questi enzimi ricordiamo: le nucleasi, le ligasi, le polimerasi, le elicasi e in maniera più dettagliata le DNA-topoisomerasi, in quanto potenziali target delle molecole oggetto di studio di tale progetto di tesi.

---

<sup>21</sup> S. Rothenburg, F. Koch-Nolte, F. Haag. DNA methylation and Z-DNA formation as mediators of quantitative differences in the expression of alleles. *Immunol Rev.*, 184, 286-98.

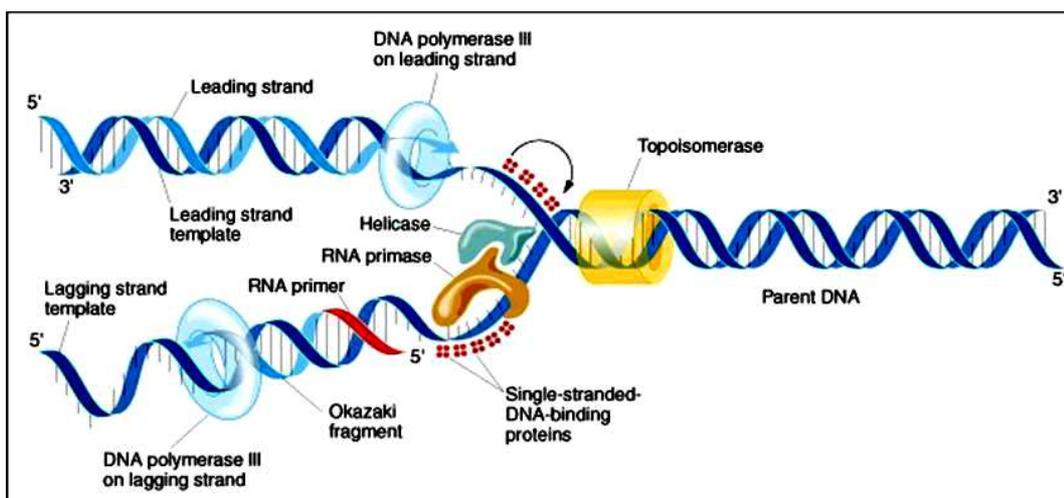


Fig. 10: Enzimi e meccanismi che intervengono nella replicazione del DNA

### 1.3.1 Le Nucleasi e Le Ligasi.

Le nucleasi sono enzimi in grado di tagliare filamenti di DNA, dal momento che catalizzano l'idrolisi del legame fosfodiesterico. Si distinguono esonucleasi che idrolizzano il DNA partendo dai nucleotidi situati alle estremità dei filamenti, ed endonucleasi che effettuano tagli direttamente all'interno del filamento.

Le nucleasi più utilizzate in biologia molecolare sono dette enzimi di restrizione e tagliano il DNA in corrispondenza di specifiche sequenze. Generalmente, tali nucleasi di restrizione riconoscono particolari sequenze nucleotidiche palindrome, note come siti di restrizione, nelle quali la stessa sequenza si ripete in direzioni opposte sulle due eliche complementari, e quindi producono dei tagli su entrambi i filamenti.

Le DNA ligasi sono enzimi in grado di riunire filamenti di DNA precedentemente tagliati o spezzati, utilizzando energia chimica proveniente da molecole di ATP o di NAD.<sup>22</sup> Le ligasi sono particolarmente importanti nella replicazione del filamento lento, dal momento che esse riuniscono i frammenti di Okazaki in un filamento unico. Esse

<sup>22</sup> A. Doherty, S. Suh. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. *Nucleic Acids Res*, 28 (21), (2000), 4051-8.

rivestono un ruolo importante anche nella riparazione del DNA e nella ricombinazione genetica.<sup>23</sup>

### 1.3.2 Le Polimerasi.

Le polimerasi sono enzimi che sintetizzano catene polinucleotidiche a partire dal nucleoside trifosfato. Esse funzionano aggiungendo nucleotidi al 3'-OH del precedente nucleotide presente sul filamento. Come conseguenza di ciò, tutte le polimerasi lavorano in direzione 5'-3'.<sup>24</sup> Nel sito attivo di questi enzimi, il nucleoside trifosfato si appaia ad un nucleotide presente su un filamento usato come stampo: ciò permette alle polimerasi di sintetizzare in modo accurato filamenti fedelmente complementari agli stampi.

Sulla base del tipo di stampo che utilizzano possiamo classificare le polimerasi in:

- DNA polimerasi DNA-dipendente, fondamentali per la replicazione del DNA poiché sono in grado di realizzare una perfetta copia di una sequenza di DNA. Tali enzimi sono inoltre in grado di rilevare un errore di appaiamento tra le basi azotate ed attivare l'azione di un'esonucleasi per rimuovere la base non corretta.<sup>25</sup>
- DNA polimerasi RNA-dipendenti, enzimi specializzati nella sintesi di una copia di DNA, usando come stampo un frammento di RNA. Tra di essi figurano la trascrittasi inversa, un enzima virale coinvolto nell'infezione dei retrovirus, e la telomerasi, necessaria per la replicazione dei telomeri.<sup>26,27</sup>
- RNA polimerasi DNA-dipendenti, fondamentali per la trascrizione. Tali enzimi legano il DNA presso il promotore di un gene e separano i due filamenti. Successivamente, l'enzima genera una molecola di mRNA fino al raggiungimento del terminatore, dove si interrompe la trascrizione e l'enzima si distacca dal DNA.

### 1.3.3 Le Elicasi.

Le elicasi sono proteine in grado di utilizzare l'energia chimica presente nei nucleosidi trifosfato, soprattutto ATP, per rompere i legami idrogeno che si instaurano tra

---

<sup>23</sup> Ibidem.

<sup>24</sup> C. Joyce, T. Steitz. Polymerase structures and function: variations on a theme?. *J. Bacteriol*, 177 (22), (1995), 6321-9.

<sup>25</sup> U. Hubscher, G. Maga, S. Spadari. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev. Biochem*, 71, (2002), 133-63.

<sup>26</sup> L. Tarrago-Litvak, M. Andréola, G. Nevinsky, L. Sarih-Cottin, S. Litvak. The reverse transcriptase of HIV-1: from enzymology to therapeutic intervention. *FASEB J.*, 8 (8), (1994), 497-503.

<sup>27</sup> C. Greider, E. Blackburn. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.*, 43, (1985), 405-13.

le basi azotate, permettendo l'apertura della doppia elica di DNA in singoli filamenti.<sup>28</sup> Questi enzimi sono essenziali per la maggior parte dei processi biologici che coinvolgono enzimi che richiedono un diretto contatto con le basi del DNA.

### 1.3.4 Le DNA-Topoisomerasi.

Le DNA-topoisomerasi sono enzimi ubiquitari che presentano sia un'attività nucleasica che ligasica. Queste proteine sono infatti essenziali per i principali processi cellulari, quali la replicazione, la trascrizione, la duplicazione del DNA, l'assemblaggio della cromatina, la segregazione dei cromosomi, e sono inoltre in grado di modificare le proprietà topologiche del DNA regolando ad esempio il livello di superavvolgimento della doppia elica.

La struttura tridimensionale del DNA nello spazio viene infatti controllata e regolata durante i processi di avvolgimento, linearizzazione e superavvolgimento dalle DNA-topoisomerasi. Alcune di esse svolgono tale funzione tagliando l'elica di DNA e permettendole di ruotare, riducendo il suo grado di superavvolgimento, per poi procedere alla ligazione delle due estremità.<sup>29</sup> Altre topoisomerasi sono invece in grado di tagliare l'elica e far passare attraverso il sito di rottura una seconda elica, prima di ligare il filamento spezzato.<sup>30</sup>

La rottura del DNA avviene tramite un attacco nucleofilo di una tirosina catalitica su un legame fosfodiesterico del filamento che porta alla formazione di un legame covalente tra il gruppo idrossilico della tirosina e il gruppo fosfato di una delle due estremità del filamento tagliato.

In questo modo si forma un varco per il passaggio di un altro segmento di DNA a singolo o a doppio filamento che determina l'effettivo cambiamento topologico della doppia elica di DNA che può consistere, per esempio, nel rilassamento di superavvolgimenti negativi o positivi (Fig. 11, a), oppure nella decatenazione/concatenazione di due anelli di DNA (Fig. 11, b).

---

<sup>28</sup> N. Tuteja, R. Tuteja. Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *Eur. J. Biochem.*, 271 (10), (2004), 1849-63.

<sup>29</sup> J. Champoux. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, (2001), 369-413.

<sup>30</sup> A. Schoeffler, J. Berger. Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem. Soc. Trans.*, 33, (2005), 1465-70.

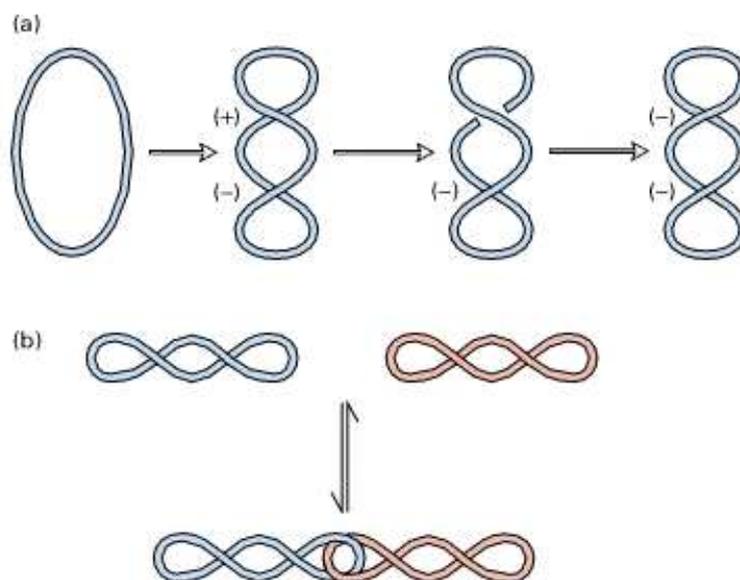


Fig. 11 (a, b): Alterazione della topologia della doppia elica

Dopo che la prima DNA-topoisomerasi fu purificata nel 1971 da *Escherichia coli*<sup>31</sup> (Fig. 12) da allora questi enzimi sono stati individuati in tutte le cellule eucariotiche e procariotiche e in alcuni virus e batteriofagi.<sup>32</sup>

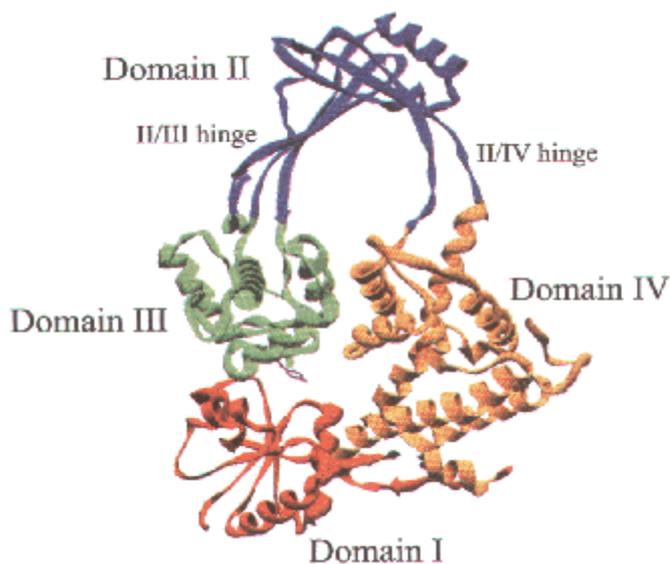


Fig. 12: DNA-topoisomerasi I di *E. Coli*

<sup>31</sup> C. Thrash, K. Voelkel, S. DiNardo, R. Sternglanz. *J. Biol.Chem.*, 259, (1984), 1375-1377.

<sup>32</sup> L. Stewart, G. C. Ireton, J. Champoux. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J. Mol. Biol.*, 269, (1997), 355-372.

Le topoisomerasi note sono state raggruppate in base al loro meccanismo d'azione ed alle proprietà chimico/fisiche<sup>33</sup> essenzialmente in due classi: enzimi di classe I ed enzimi di classe II. All'interno di queste classi si distinguono ulteriori sottofamiglie definite in base a considerazioni strutturali.

Gli enzimi di classe I sono costituiti generalmente da un monomero e sono capaci di dare una rottura su un singolo filamento della doppia elica del DNA, rilassando il DNA di un giro alla volta (Fig. 13). Tale reazione è catalizzata dall'enzima, mediante una transesterificazione con una tirosina e non richiede un apporto di energia sotto forma di ATP ma usa l'energia torsionale dell'acido nucleico superavvolto.

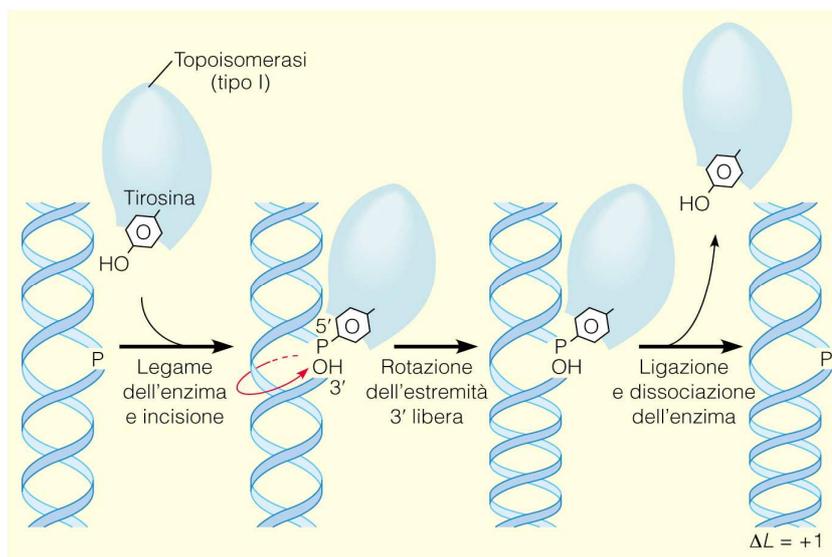


Fig. 13: Topoisomerasi I

La funzione della topoisomerasi I è di fondamentale importanza durante la replicazione del genoma: in sua assenza, il movimento della forcella replicativa (punto in cui il tratto di DNA che viene copiato assume una forma a Y) risulterebbe bloccato dall'accumulo di tensione torsionale nel filamento che funge da stampo. Il suo intervento è pure fondamentale nei processi di trascrizione, ricombinazione e durante la mitosi.<sup>34</sup>

Gli enzimi di classe II, costituiti da due o più subunità sono capaci di introdurre tagli su entrambi i filamenti della doppia elica del DNA per srotolarlo. Il taglio dei due filamenti avviene per transesterificazione tra una coppia di tirosine e due legami

<sup>33</sup> J. M. Berger. Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400, (1998), 3-18.

<sup>34</sup> J. C. Wang. DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, (1996), 635-692.

fosfodiesteri affacciati tra loro; queste due reazioni avvengono in maniera concertata. I residui tirosinici risultano legati covalentemente alle estremità 5' dei filamenti scissi, lasciando liberi gli ossidrili delle posizioni 3'. Successivamente, i cambiamenti conformazionali dell'enzima provocano l'allontanamento delle estremità 5' (legate) da quelle 3' (libere), aprendo così un cancello nella doppia elica tagliata. A questo punto l'enzima trasporta un doppio filamento intatto attraverso l'apertura creata nella doppia elica, la quale poi viene richiusa.

Infine si riformano i legami fosfodiesteri grazie ad un'ulteriore transesterificazione. Il risultato è una variazione di due unità del numero di legame del DNA (Fig. 14).

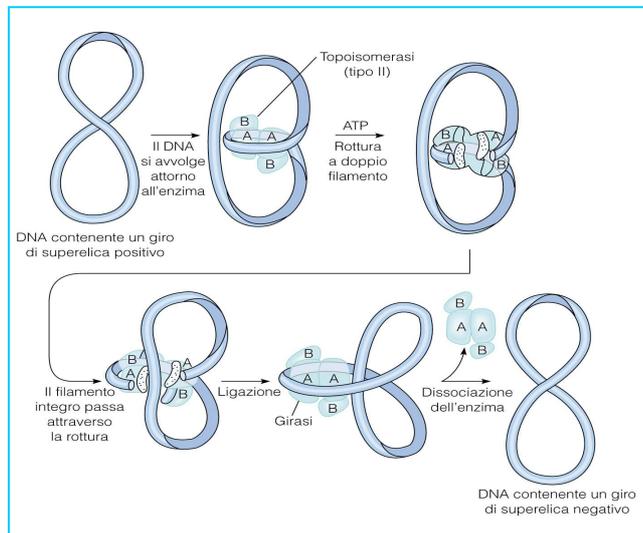


Fig. 14: Topoisomerasi II

In questo caso la reazione di transesterificazione procede solo in presenza di ATP poichè l'energia per la suddetta reazione viene fornita dalla scissione di un legame fosfodiesterico di una molecola di ATP che si lega come un cofattore alla forma inattiva della proteina (Fig. 15-16).

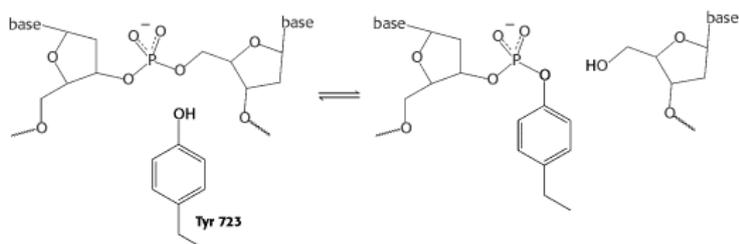


Fig. 15: Reazione catalizzata dalla topoisomerasi II

Riassumendo possiamo dire che l'azione delle topoisomerasi II si esplica essenzialmente in cinque passaggi (Fig. 16):

1. Riconoscimento da parte dell'enzima di specifiche zone del DNA. Il ciclo catalitico è infatti iniziato dal legame dell'enzima a due segmenti di DNA a doppio filamento: il segmento G (in blu) e il segmento T (in azzurro);
2. Legame di due molecole di ATP e successiva formazione di un legame covalente tra un residuo tirosinico dell'enzima e un'estremità 5'-fosfato del DNA (in presenza di ioni  $Mg^{2+}$ );
3. Passaggio attraverso l'apertura di un secondo filamento del DNA: il segmento G viene scisso e il segmento T è trasportato attraverso la rottura nel segmento G (Fig. 16, fase 3-3a), a cui si accompagna l'idrolisi di una molecola di ATP;
4. Rinsaldamento del filamento interrotto. Il segmento G viene quindi religato e la molecola di ATP rimanente viene idrolizzata;
5. Ripristino della forma attiva dell'enzima.

Nelle fasi conclusive del ciclo catalitico della topoisomerasi II si ha quindi: la dissociazione delle due molecole di ADP; il trasporto del segmento T attraverso l'apertura nella parte C-terminale dell'enzima, seguito dalla chiusura di questa porta. Infine, l'apertura dei domini ATPasi N-terminale fanno sì che l'enzima si dissocia dal DNA.<sup>35</sup>

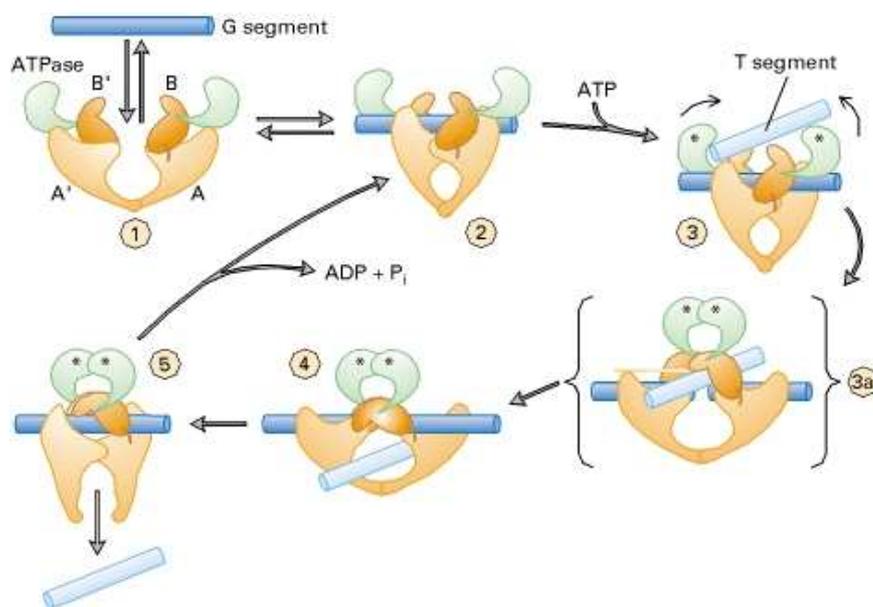


Fig. 16: Reazione catalizzata dalla topoisomerasi II

<sup>35</sup> J. C. Wang. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (6), (2002), 430-40.

Sia nei processi catalizzati dalle topoisomerasi I che in quelli catalizzati dalle topoisomerasi II il successivo riarrangiamento di questi enzimi, permette il disavvolgimento/riavvolgimento della doppia elica mediante il passaggio di uno (topoisomerasi I) o due (topoisomerasi II) filamenti attraverso il taglio. Il ripristino del legame fosfoestereo rotto, riunisce infine i due tronconi del DNA, lasciando una sezione di DNA rilassato pronto per il processamento.

Indipendentemente dal meccanismo di azione è possibile individuare alcune caratteristiche comuni a tutte le DNA-topoisomerasi quali :

- Capacità di interagire e legare una molecola di DNA;
- Capacità di controllare il taglio e la riligazione dello scheletro fosfodiesterico del DNA, mediante due reazioni di transesterificazione successive;
- Formazione di un legame covalente tra l'enzima e il DNA (complex cleavable) durante la fase di taglio.<sup>36</sup> Tale complesso deriva da un attacco nucleofilo dell'OH di una *tirosina* ad un fosfato del DNA. Si ha così una transesterificazione: si rompe un legame fosfodiesterico con uno zucchero del DNA e se ne forma uno fosfotirosinico.

Grazie alle loro importanti funzioni fisiologiche, le DNA-topoisomerasi hanno assunto un'importanza primaria nella ricerca oncologica, in quanto sono il target specifico di molti farmaci antitumorali, che agiscono da loro inibitori, come l'ellipticina (intercalante quadriciclico strutturalmente correlato alle molecole oggetto di studio di tale progetto di ricerca).

Tali farmaci costituiscono un gruppo di composti strutturalmente non correlati ma che tuttavia mostrano una proprietà comune, quale la capacità di indurre un significativo aumento nel numero di complessi covalenti enzima-DNA (complessi "cleavable"). È proprio questo cosiddetto "cleavable complex" (complesso scindibile) che negli ultimi anni ha attratto numerose ricerche in campo neoplastico.

Infatti stabilizzare questo complesso significa impedire al DNA di assumere nuovamente la sua struttura secondaria perchè non si riforma il legame fosfato zucchero che era stato oggetto della precedente transesterificazione. La mancata ricostituzione della struttura tridimensionale del DNA intatto provoca l'innescarsi di processi di controllo che, qualora il danno non fosse riparato, inducono l'apoptosi (Fig. 17).<sup>37</sup>

---

<sup>36</sup> J. C. Wang. DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, (1996), 635-692. *op. cit.*.

<sup>37</sup> S. H. Kaufmann. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 195-211.

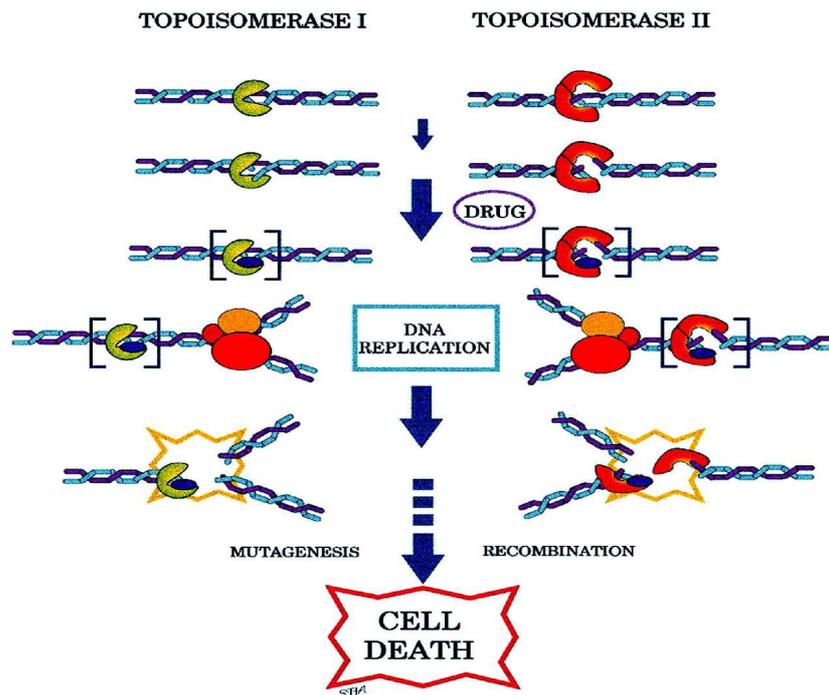


Fig. 17: Meccanismo di citotossicità

Questo rappresenta un'interessante prospettiva terapeutica quando si voglia ottenere un effetto citotossico tenendo conto soprattutto del fatto che le cellule di alcuni tumori si replicano più velocemente di altre.

Inoltre, se si tiene conto del fatto che in tessuti tumorali le cui cellule sono in attiva proliferazione e presentano una maggior concentrazione di enzimi implicati nel controllo della topologia del DNA, e che alcuni di questi enzimi si trovano maggiormente espressi in particolari forme tumorali, si può ottenere una maggiore diversificazione tra cellule anomale e sane e ciò potrebbe costituire un utile strumento terapeutico.

Capitolo II:  
Inibitori delle DNA-Topoisomerasi

## INIBITORI DELLE DNA-TOPOISOMERASI

### 2.1 Caratteristiche generali e meccanismi d'azione.

Negli ultimi anni l'interesse rivolto alle DNA-topoisomerasi deriva, non solo dal loro ruolo cruciale nel mantenimento dello stato topologico del DNA<sup>1</sup> che consiste principalmente nel favorire i processi di replicazione e di trascrizione (mediante rilassamento dei superavvolgimenti delle catene di tale acido nucleico) ma, soprattutto dal fatto che esse rappresentano il bersaglio di numerosi principi attivi. Tali principi attivi aventi diversa origine e differenti meccanismi d'azione interagiscono con esse causando lesioni cellulari citotossiche.

La possibilità di sfruttare a scopo terapeutico queste caratteristiche ha indotto lo sviluppo di una nuova classe di agenti antitumorali<sup>2</sup> in grado infatti di interferire, o di inibire almeno una delle fasi del ciclo catalitico di questi enzimi mediante due meccanismi<sup>3</sup> principali:

- stabilizzazione del complesso covalente topoisomerasi-DNA ("cleavage complex") con la formazione di un complesso ternario farmaco-topoisomerasi-DNA, e conseguente inibizione della riunificazione della doppia elica del DNA stesso;
- inibizione del ciclo catalitico dell'enzima senza diretto intervento sul complesso covalente topoisomerasi-DNA.

In base al loro meccanismo d'azione tali inibitori vengono pertanto definiti come: farmaci di classe I o *veleni*, e farmaci di classe II o *soppressori*.<sup>4</sup>

Benché entrambi inibiscano l'attività catalitica delle DNA-topoisomerasi, nello specifico i *veleni* sono in grado di portare alla morte cellulare mediante l'intrappolamento del "cleavage complex"; mentre i *soppressori* agiscono impedendo il legame dell'enzima al DNA e quindi la formazione del suddetto complesso.<sup>5</sup>

---

<sup>1</sup> J.L. Nitiss. *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, (1998), 63-81.

<sup>2</sup> Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 83-106.

<sup>3</sup> Z. Topcu. *J. Clin. Pharm. Therap.*, 26, (2001), 405-416.

<sup>4</sup> Y. Pommier. DNA Topoisomerase I Inhibitors. *Humana Press.*, (1997) 153-174.

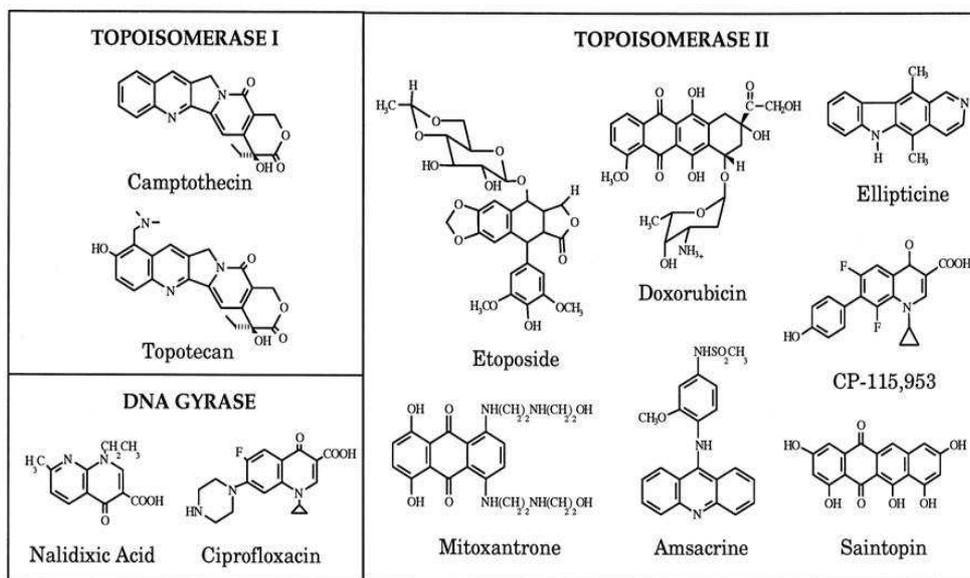
<sup>5</sup> G. Capranico, M. Binaschi. DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 185-94.

In generale gli inibitori topoisomerasici che agiscono stabilizzando il complesso covalente topoisomerasi-DNA sono detti “veleni” in quanto trasformano l’enzima in una potente tossina cellulare. Essi sono infatti in grado di aumentare la quantità di enzima legato covalentemente al DNA, di conseguenza l’enzima diventa un vero e proprio veleno cellulare, poiché lascia i filamenti di DNA non saldati.<sup>6</sup>

La formazione del complesso covalente enzima-DNA e la conseguente inibizione delle topoisomerasi comportano drammatiche modificazioni dei meccanismi vitali innescando la cosiddetta morte cellulare programmata o apoptosi

Il complesso enzima-DNA interferisce infatti con il metabolismo degli acidi nucleici e porta a lesioni irreversibili del DNA, che costituiscono un segnale di attivazione per la produzione del gene oncosoppressore p53.<sup>7</sup> Tale gene è normalmente in grado di bloccare la crescita nelle cellule in cui si sono verificati danni al DNA, favorendone la riparazione. Se la riparazione del DNA è effettuata con successo il ciclo può riprendere, altrimenti si avvia il processo di morte programmata.

Un’ulteriore classificazione degli inibitori topoisomerasici viene fatta in base all’enzima bersaglio su cui tali farmaci agiscono, pertanto di norma si parla di inibitori delle topoisomerasi I, inibitori delle topoisomerasi II e inibitori delle Girasi (topoisomerasi batteriche) Tab. 2:



Tab. 2: Alcuni esempi di inibitori delle topoisomerasi

<sup>6</sup> R. Reid, P. Benedetti, M.A. Bjornsti. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 289-300.

<sup>7</sup> C. Gobert, L. Bracco, F. Rossi, M. Olivier, J. Tazi, F. Lavelle, A. K. Larsen, J. F. Riou. Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry*, 35 (18), (1996), 5778-86.

Gli inibitori delle topoisomerasi I<sup>8</sup> agiscono tramite la formazione del complesso ternario farmaco-topoisomerasi I-DNA stabilizzando il sistema dopo che è avvenuto il taglio di una singola catena nucleotidica. L'inibizione di tali enzimi provoca di conseguenza l'interruzione dei processi di replicazione e di trascrizione, normalmente mediati da essi, poiché vengono impedito le fasi di rilassamento e di rilegazione del doppia elica di DNA.

Le modificazioni al livello del DNA e l'intrappolamento del complesso enzima-DNA determinano in ultimo, come precedentemente detto, l'innescarsi del processo apoptotico e quindi la morte della cellula (Fig. 18).

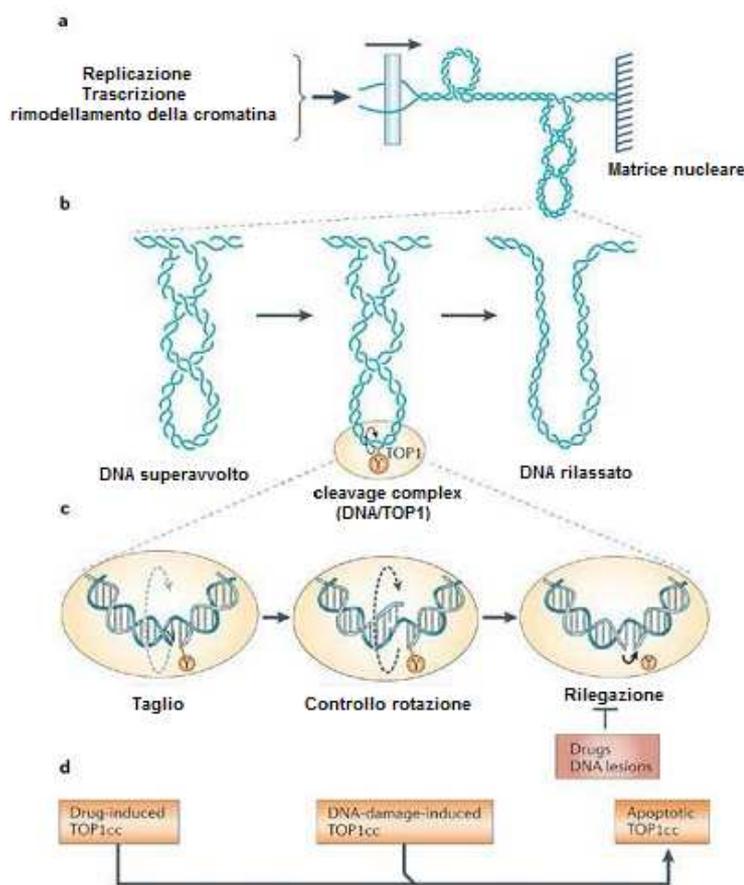


Fig. 18:<sup>9</sup> Rilassamento dei superavvolgimenti del DNA generati da replicazione, trascrizione e rimodellamento della cromatina (a, b) per mezzo dei complessi di taglio mediati da Top1, TOP1cc: cleavage complex (c). Intrappolamento dei TOP1cc da parte di farmaci, modificazioni del DNA e apoptosi (d).

<sup>8</sup> Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 83-106. *op. cit.*

<sup>9</sup> Y. Pommier. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature. Rev./Cancer.*, 6 (2006), 789-802.

Gli inibitori delle topoisomerasi II, come la doxorubicina o il mitoxantrone, e i cosiddetti soppressori, come l'aclarubicina o la novobiocina inibiscono l'azione di tali enzimi interferendo rispettivamente su fasi differenti del loro ciclo catalitico (Fig. 19).<sup>10</sup>

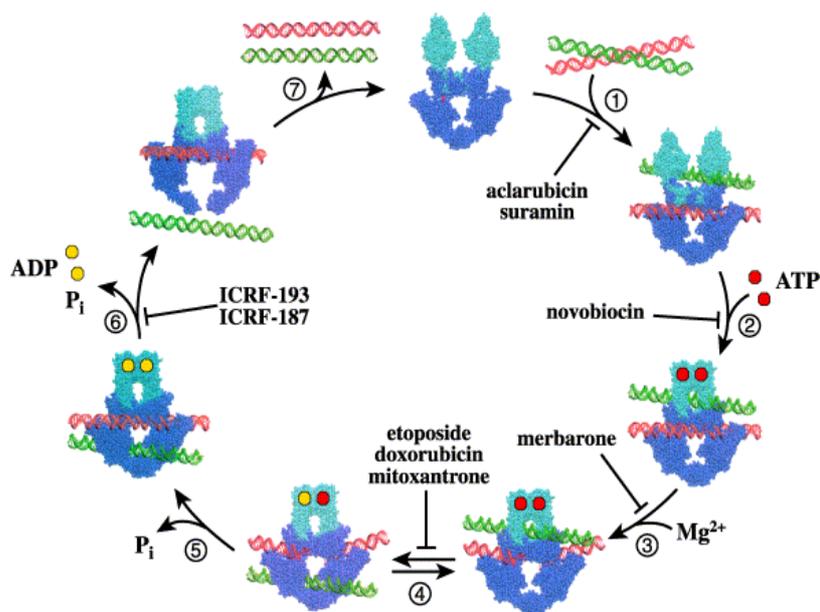


Fig. 19: Ciclo catalitico della DNA-topoisomerasi II

Gli inibitori delle topoisomerasi II comunemente usati nella pratica clinica come l'etoposide o la doxorubicina, agiscono legandosi al complesso DNA-enzima al momento del clivaggio dei filamenti successivo all'azione della topoisomerasi (Fig. 19, step 4). Essi portano pertanto alla formazione del complesso ternario farmaco-topoisomerasi II-DNA, stabilizzando il sistema dopo che è avvenuto il taglio delle due catene nucleotidiche.<sup>11</sup>

Anche in questo caso il farmaco blocca la reazione enzimatica impedendo la rilegazione della doppia elica lasciando quindi il DNA con una rottura permanente a livello dei suoi filamenti. Le rotture multiple tra i filamenti conducono infine a morte cellulare, attraverso l'induzione della apoptosi (Fig. 20).<sup>12</sup>

<sup>10</sup> A. K. Larsen, A. E. Escargueil, A. Skladanowski. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 99 (2), (2003), 167-181.

<sup>11</sup> K. R. Hande. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1-3), (1998), 173-184. *op. cit.*.

<sup>12</sup> [http://www.seminari di ematologia oncologica\\_3\\_2009\\_low.pdf](http://www.seminari di ematologia oncologica_3_2009_low.pdf).

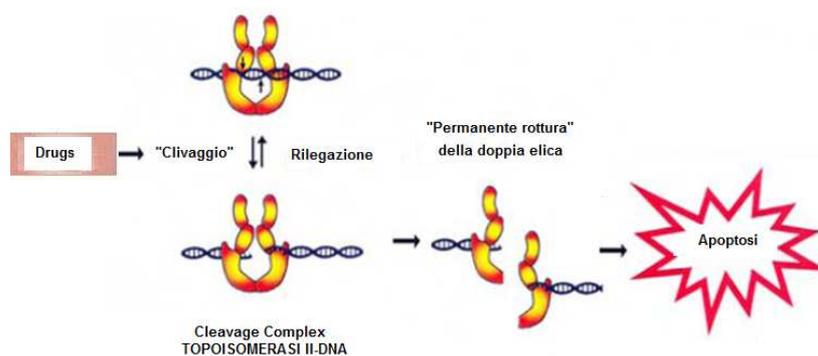


Fig. 20: Inibizione della DNA-topoisomerasi II

### 2.1.1 Agenti intercalanti quali inibitori delle Topoisomerasi.

Gli inibitori topoisomerasici costituiscono inoltre un gruppo di composti strutturalmente non correlati aventi come precedentemente descritto meccanismi d'azione analoghi, ma non identici.<sup>13</sup> Comprendono infatti:

- agenti *intercalanti* come: la camptotecina, le antracicline, (es. doxorubicina, daunorubicina), le amsacrine (es. *m*-amsacrina), le actinomicine (es. actinomicina D), le ellipticine (es. acetato di elliptinio), il mitoxantrone, ecc..
- e agenti *non-intercalanti*, come: le epipodofillotossine (es. etoposide e teniposide), o il genistein.

Tra essi una particolare importanza riveste la classe degli intercalanti: “*piccole molecole organiche o complessi di metalli che si snodano tra le due coppie di basi del DNA*”.<sup>14</sup>

Il termine “intercalazione” venne usato per la prima volta da Leonard Lerman,<sup>15</sup> da allora molecole con proprietà intercalanti sono state oggetto di numerosi studi.<sup>16</sup> Tra i metodi di associazione farmaco-DNA conosciuti, il processo d’intercalazione è infatti quello più diffuso e diverse sostanze sintetiche e naturali, che funzionano mediante questa tipologia d’azione, mostrano un’eccellente attività antitumorale.

<sup>13</sup> B. A. D. Neto, A. A. M. Lapis. Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends. *Molecules*, 14, (2009), 1725-1746.

<sup>14</sup> B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. K. Barton. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chem. Commun.* (2007), 4565-4579.

<sup>15</sup> L.S. Lerman. *J. Mol. Biol.* 3, (1961), 18.

<sup>16</sup> H. Ihmels, D. Otto. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. *Top. Curr. Chem.*, 258, (2005), 161-204.

Purtroppo come più volte affermato dai ricercatori, nonostante l'importanza dei meccanismi di intercalazione a fine terapeutico, ancora oggi non si ha una comprensione dettagliata di come i nuovi farmaci antitumorali si intercalino nella doppia elica del DNA.

In generale, l'intercalazione è definita, come un'interazione covalente o non covalente nella quale una molecola avente struttura planare si inserisce tra le coppie di basi del DNA perpendicolarmente rispetto all'asse della doppia elica provocando una separazione verticale delle coppie di basi complementari con deformazione e allungamento dello scheletro zucchero-fosfato.<sup>17</sup>

Gli agenti intercalanti quindi non rompono i ponti a idrogeno tra le coppie di basi adenina-timina (A-T), citosina-guanina (C-G) ma, determinando la distorsione dello scheletro zucchero-fosfato, distruggono la regolarità della struttura elicoidale del polinucleotide.

Pertanto tali agenti determinano lo svolgimento della doppia elica del DNA e, come diretta conseguenza, interferiscono con l'azione di enzimi che si legano al DNA stesso, come appunto le DNA-topoisomerasi deputate alla regolazione del superavvolgimento della doppia elica.

Gli intercalanti si orientano parallelamente alla coppia di basi del DNA, comunemente a livello del solco maggiore di tale polinucleotide, anche se alcuni legami sembrano verificarsi preferibilmente a livello del solco minore.<sup>18</sup>

Queste interazioni tra le molecole esogene e il DNA possono, come più volte detto, avere come conseguenza una modifica significativa della struttura del DNA stesso,<sup>19</sup> che giunge ad ostacolare o a sopprimere la funzione dell'acido nucleico nei processi fisiologici<sup>20,21,22</sup> impedendo la replicazione delle cellule tumorali e favorendo quindi l'apoptosi. (Fig. 21).

<sup>17</sup> Ibidem.

<sup>18</sup> I. Greguric, J. R. AldrichWright, J. G. Collins. A H-1 NMR study of the binding of Delta-[Ru(phen)(2)DPQ](2+) to the hexanucleotide d(GTCGAC)(2). Evidence for intercalation from the minor groove. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, (1997), 3621-3622.

<sup>19</sup> H. Ihmels, K. Faulhaber, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, G. Viola Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA. Part 2: The annelated quinolizinium ion as a structural motif in DNA intercalators. *Photochem. Photobiol.*, 81, (2005), 1107-1115.

<sup>20</sup> P. B. Dervan, A.T. Poulin-Kerstien, E.J. Fechter, B.S. Edelson. Regulation of gene expression by synthetic DNA-binding ligands. In *DNA Binders and Related Subjects*, Springer: Berlin, Heidelberg, German, 253, (2005), 1-31.

<sup>21</sup> L. H. Hurley. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2, (2002), 188-200.

<sup>22</sup> D. E. Graves, L. M. Velea. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Curr. Org. Chem.*, 4, (2000), 915-929.

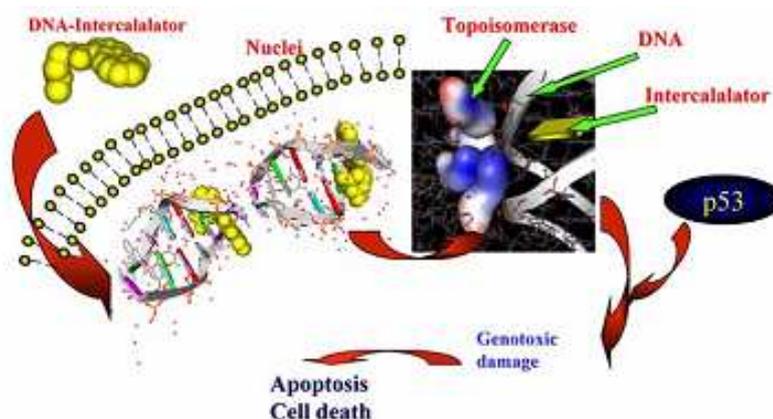


Fig. 21: Rappresentazione schematica del meccanismo di citotossicità degli intercalanti del DNA

Tra gli intercalanti, nonché inibitori delle topoisomerasi II, particolare interesse è stato rivolto ai derivati dell'ellipticina o 5,11-dimetil-6*H*-pirido[4,3-*b*]carbazolo<sup>23</sup> per la notevole somiglianza strutturale con le molecole sintetizzate durante tale progetto di ricerca. Questi derivati saranno trattati più esaurientemente nei successivi capitoli.

## 2.2 Veleni o Inibitori delle Topoisomerasi I.

### 2.2.1 La Camptotecina e i derivati camptotecina-simili.

Capostipite degli inibitori delle topoisomerasi I è l'alcaloide naturale pentaciclico camptotecina<sup>24</sup> (CPT) (Fig. 22), isolato dall'albero *Camptotheca acuminata*.<sup>25</sup> Nonostante la sua scoperta risalga agli anni '60, l'identificazione di questa molecola come antitumorale è molto più recente.

La camptotecina è un inibitore non-competitivo della topoisomerasi I, che agisce intercalandosi nel complesso covalente topoisomerasi I-DNA in modo reversibile.

L'attività antitumorale di questa molecola è dovuta infatti alla sua capacità di intercalarsi nel complesso cleavage e di stabilizzarlo mediante la formazione del

<sup>23</sup> R. W. Guthrie, A. Brossi, F. A. Mennona, J. G. Mullin, R. W. Kierstead. Ellipticine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 1975, 755-759.

<sup>24</sup> J. F. Pizzolato et. al. The camptothecins. *New Drug Classes*, 361, (2003), 2235-2242.

<sup>25</sup> M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cooke, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Slim. *J. Am. Chem. Soc.*, 88, (1966), 3888-3890.

complesso ternario camptotecina-topoisomerasi I-DNA impedendo così la reazione di risaldatura dei filamenti di DNA ed inducendo l'accumulo di "cleavage complex".<sup>26</sup>

Subito dopo la fase di taglio effettuata dall'enzima, la molecola di camptotecina si intercala infatti tra le basi del DNA, l'enzima non può quindi più procedere con la fase di rilegamento, e rimane bloccato attorno al DNA stesso.<sup>27</sup>

La scissione di un filamento di DNA, precedentemente effettuata dalla topoisomerasi diventa in questo modo permanente, con conseguente prematura terminazione della replicazione e inibizione della trascrizione.

Dalle strutture cristallografiche ottenute tramite diffrazione a raggi X, si è osservato che il farmaco, grazie alla sua struttura planare a cinque anelli, interagisce con l'enzima tramite legami idrogeno (Fig. 22).

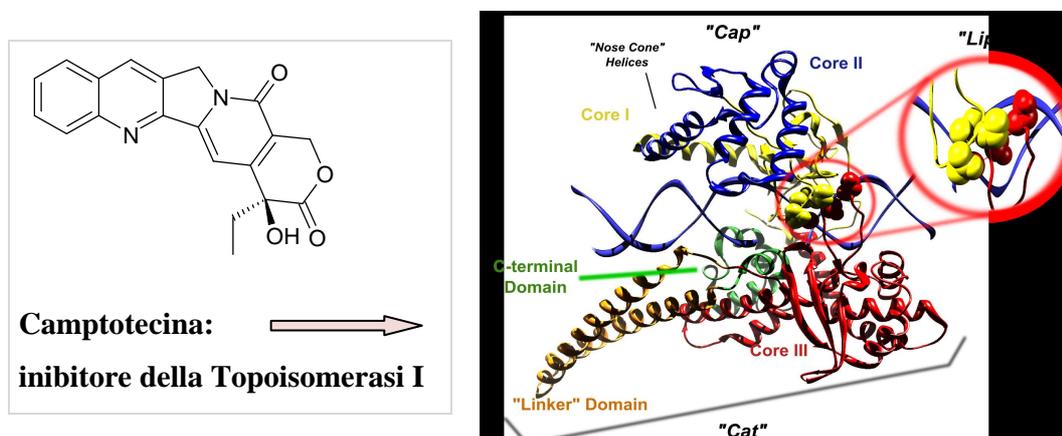


Fig. 22: Meccanismo di intercalazione della camptotecina

Nonostante l'efficacia della camptotecina come antitumorale, la sua instabilità chimica a pH fisiologico, dovuta alla rapida conversione dalla forma lattonica dotata di attività, in una forma carbossilata più solubile ma inattiva (Fig. 23); nonché la scarsa solubilità e la sua elevata tossicità legata alla dose somministrata (DTL: dose-limiting toxicity), ne hanno fortemente limitato l'uso clinico.<sup>28</sup>

<sup>26</sup> Y. H. Hsiang, M. G. Lihou, L. F. Liu. *Cancer Res.*, 49, (1989), 5077-5082.

<sup>27</sup> C. Holm, J. M. Covey, D. Kerrigan, Y. Pommier. *Cancer Res.*, 49, (1989), 6365-6368.

<sup>28</sup> C.H Takimoto, J. Wright, S. G Arbusck. Clinical applications of the camptothecins. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 107-19.

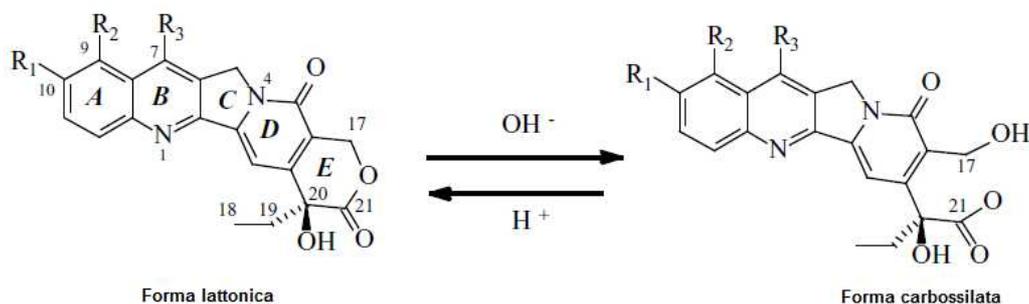


Fig. 23: Apertura dell'anello lattonico a pH fisiologico

Nel tentativo quindi di migliorare in particolare il profilo farmacocinetico e di ampliare o anche di diversificare lo spettro di attività rispetto alla tipologia tumorale, sono state effettuate numerose modifiche strutturali di tale farmaco.<sup>29,30</sup>

Studi recenti hanno dimostrato che le sostituzioni effettuate in posizione C-7 e C-9 non alterano l'attività del farmaco, così come l'aggiunta di un gruppo etile in posizione C-7<sup>31,32,33</sup> o di un gruppo ossidrilico in posizione C-10 aumenta la capacità inibitoria di tale composto. Le sostituzioni in C-11, C-12 e sull'anello E eliminano invece l'attività del farmaco, il che consente di ipotizzare un loro coinvolgimento nell'interazione con il complesso cleavage.<sup>34,35,36</sup>

Questi risultati hanno permesso la sintesi e lo sviluppo di nuovi derivati semisintetici camptotecina-simili maggiormente idrosolubili e con minori effetti collaterali.

Tra i derivati semisintetici usati correntemente nella terapia dei carcinomi umani notevole interesse rivestono il topotecan (Hycamtin<sup>®</sup>) e l'irinotecan (Campto<sup>®</sup>, CPT-11) (Fig. 24).

<sup>29</sup> B. C. Giovanella, J. S. Stehlin, M. E. Wall, M. C. Wani, A. W. Nicholas, L. F. Liu, R. Silber, M. Potmesil. *Science*, 246, (1989), 1046-1048.

<sup>30</sup> W. J. Slichenmyer, E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, S. H. Kaufmann. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, (1993), 271-287.

<sup>31</sup> A. Tanizawa, A. Fujimori, Y. Fujimori, Y. Pommier. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, (1994), 836-842.

<sup>32</sup> A. Tanizawa, K. W. Kohn, G. Kohlhagen, F. Leteurtre, Y. Pommier. *Biochemistry*, 43, (1995), 7200-7206.

<sup>33</sup> M. Valenti, W. Nieves-Neira, G. Kohlhagen, K. W. Kohn, M. E. Wall, M. C. Wani, Y. Pommier. *Mol. Pharmacol.*, 52, (1997), 82-87.

<sup>34</sup> C. Jaxel, K. W. Kohn, M. C. Wani, M. E. Wall, Y. Pommier. *Cancer Res.*, 49, (1989), 1465-1469.

<sup>35</sup> Y.H. Hsiang, L. F. Liu, M. E. Wall, M. C. Wani, A. W. Nicholas, G. Manikumar, S. Kirschenbaum, R. Silber, M. Potmesil. *Cancer Res.*, 49, (1989), 4385-4389.

<sup>36</sup> J. F. Pizzolato et. al. The camptothecins. *New Drug Classes*, 361, (2003), 2235-2242. *op. cit.*

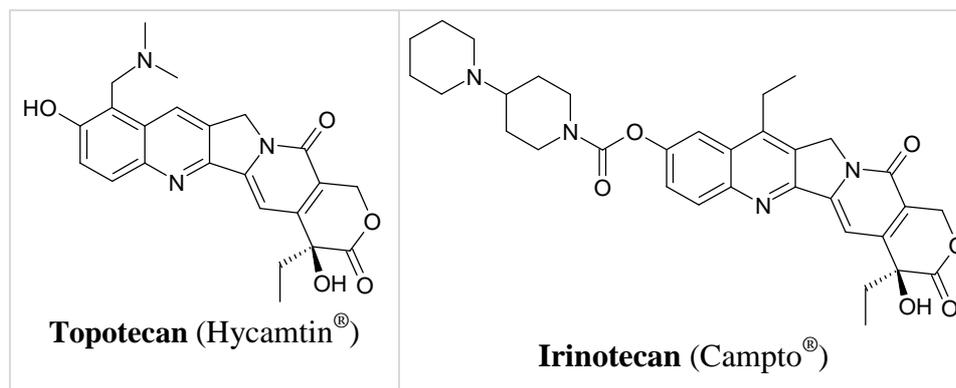


Fig. 24: Derivati Camptotecina-simili

In particolare il topotecano è caratterizzato dalla presenza di una sostituzione dimetilamminometilica in posizione C-9 e una ossidrile in posizione C-10 (Fig. 24); che gli conferiscono una maggiore idrosolubilità non alterandone l'efficacia terapeutica. Il cloridrato di topotecan (Hycamtin<sup>®</sup>), è usato tuttora nel trattamento di tumori ovarici, e di alcune forme di cancro polmonare a piccole cellule e non.<sup>37</sup>

L'irinotecano (CPT-11) è, invece, un analogo semisintetico contenente un gruppo laterale o-carbonile-1-(4-piperidino)-piperidina in posizione C-10 e uno etilico in posizione C-7 (Fig. 24). L'irinotecan cloridrato è un agente chemioterapico usato principalmente per il trattamento del carcinoma del colon-retto avanzato.<sup>38,39</sup>

Dall'irinotecan, il taglio della catena laterale ad opera delle carbossilesterasi endogene determina la formazione di un suo metabolita attivo il 7-etil-10 idrossicamptotecina (SN-38) (Fig. 25), che risulta circa mille volte più potente.<sup>40,41</sup>

<sup>37</sup> W. D. Kingsbury, J. C. Boehm, D. R. Jakas, K. G. Holden, S. M. Hecht, G. Gallagher, M. J. Caranfa, F. L. McCabe, L. F. Faucette, R. K. Johnson & et al. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J. Med. Chem.*, 34 (1), (1991), 98-107.

<sup>38</sup> J. P. Armand, M. Ducreux, M. Mahjoubi, D. Abigeres, R. Bugat, G. Chabot, P. Herait, M. de Forni, P. Rougier, *Eur. J. Cancer*, 31A, (1995), 1283-1287.

<sup>39</sup> J. Dancy, E. A. Eisenhauer, *Br. J. Cancer*, 74, (1996), 327-338.

<sup>40</sup> Tanizawa, A. Fujimori, Y. Fujimori, Y. Pommier. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, (1994), 836-842. *op. cit.*.

<sup>41</sup> A. Tanizawa, K. W. Kohn, G. Kohlhagen, F. Leteurtre, Y. Pommier. *Biochemistry*, 43, (1995), 7200-7206. *op. cit.*.

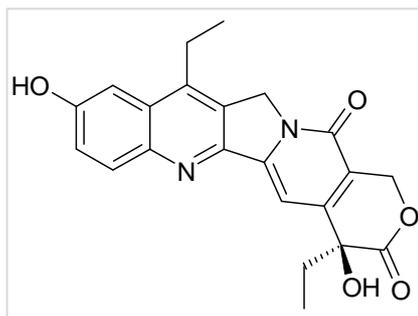


Fig. 25: 7-etil-10 idrossicamptotecina (SN-38)

Sebbene tali derivati semisintetici abbiano soddisfatto il requisito di essere più potenti e più solubili in acqua, si sono tuttavia dimostrati fallimentari rispetto all'intento di possedere strutture più semplici e minori effetti collaterali della camptotecina.

Queste osservazioni hanno portato alla ricerca di nuove classi di farmaci come i derivati indolocarbazolici, i derivati naftochinoni, ecc. che pur non essendo dal punto di vista strutturale camptotecina-simili, mantengono l'attività nei confronti della topoisomerasi I.

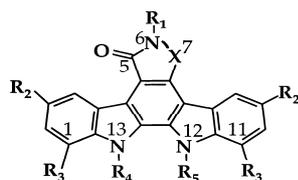
### 2.2.2 Derivati indolocarbazolici.

Gli indolocarbazoli derivati dal antibiotico *Rebeccamycin* rappresentano un importante gruppo di agenti antitumorali. Diversi indolocarbazoli sono infatti attualmente in fase di sperimentazione clinica.<sup>42,43</sup>

Questi composti inibiscono la topoisomerasi I causando rotture del DNA che sono responsabili della morte cellulare. A differenza dei classici veleni delle topoisomerasi I come la camptotecina, i glicosil-indolocarbazoli (Tab. 3) possono formare complessi stabili con il DNA anche in assenza dell'enzima.

<sup>42</sup> S. Z. Kawada, Y. Yamashita, Y. Uosaki, K. Gomi, T. Iwasaki, T. Takiguchi, H. Nakano. *J. Antibiot.*, 45, (1992), 1182-1184.

<sup>43</sup> F. Kanzawa, K. Nishio, N. Kubota, N. Saijo. *Cancer Res.*, 55, (1995), 2806-2813.



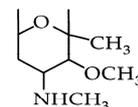
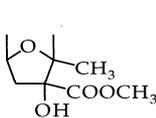
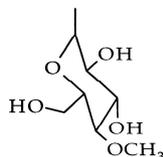
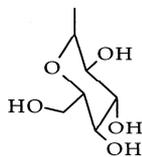
Compounds	X	R1	R2	R3	R4	R5	top1	Interc
NB-506	CO	NHCHO	H	OH	A	H	+++	++
ED-110	CO	H	H	OH	A	H	++	++
BE-13793C	CO	H	H	OH	H	H	+	-
Rebeccamycin	CO	H	H	Cl	B	H	+	+
KT6006	CH <sub>2</sub>	H	OH	H	C		+++	+
K252a	CH <sub>2</sub>	H	H	H	C		-	-
Staurosporine	CH <sub>2</sub>	H	H	H	D		-	-
7-Hydroxy-Staurosporine (UCN-01)	CHOH	H	H	H	D		-	-

A = D-glucose

B =

C =

D =



Tab. 3: Derivati indolocarbazolici inibitori della topoisomerasi I

Tra questi derivati notevole attività ha mostrato l'edotecarin (Fig. 26).

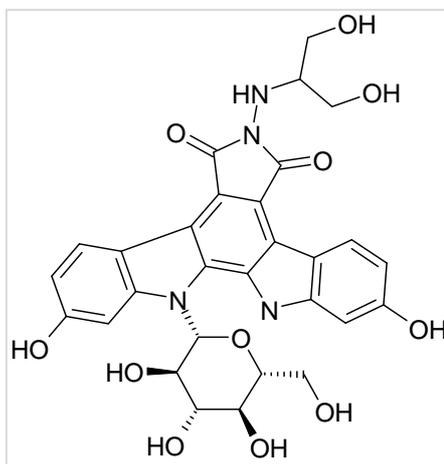


Fig. 26: Edotecarin

Si tratta di un nuovo inibitore dell'enzima topoisomerasi I, che induce la scissione del singolo filamento del DNA portando alla formazione di complessi topoisomerasi I-

DNA più stabili rispetto a quelli indotti dalla camptotecina (CPT) o da altri derivati indolocarbazolici di sintesi come l'NB-506 (Tab. 3).<sup>44</sup>

L'edotecarin è largamente usato per il trattamento di tumori solidi quali: i tumori epatici, della laringe, della prostata, dello stomaco, della cervice uterina e del polmone. Tale principio attivo risulta efficace anche nei confronti di tumori resistenti al topotecano.<sup>45</sup>

### 2.2.3 Derivati naftochinonici.

Recentemente dati sperimentali hanno dimostrato che anche alcuni derivati naftochinonici, sia sintetici che naturali sono potenti inibitori della topoisomerasi I. Tale attività sembra dovuta alla presenza di ossidrili fenolici ritenuti indispensabile ai fini della capacità inibitoria nei confronti della topoisomerasi I.

Tra questi il naftochinone naturale shikonina (Fig. 27) ed alcuni suoi esteri presentano ad esempio un'interessante attività antitumorale *in vitro*, se paragonata a quella della camptotecina.

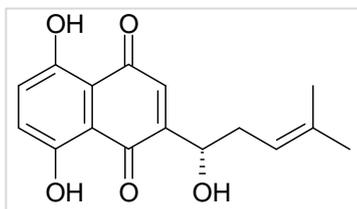


Fig. 27: Shikonina

Benché le informazioni presenti in letteratura non siano sufficienti a definire il meccanismo d'azione della shikonina e dei suoi analoghi, dagli studi condotti finora sembra che essi inibiscano l'enzima topoisomerasi I non mediante intercalazione al DNA ma per interazione diretta del principio attivo con l'enzima stesso.<sup>46</sup>

<sup>44</sup> T. Yoshinari, A. Yamada, D. Uemura, K. Nomura, H. Arakawa, K. Kojiri, E. Yoshida, H. Suda, A. Okura. *Cancer Res.*, 53, (1993), 490-494.

<sup>45</sup> Y. Yamada, T. Tamura, N. Yamamoto, T. Shimoyama, Y. Ueda, H. Murakami, H. Kusaba, Y. Kamiya, H. Saka, Y. Tanigawara et al. Phase I and pharmacokinetic study of edotecarin, a novel topoisomerase I inhibitor, administered once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 58, (2), (2006), 173-82.

<sup>46</sup> V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou, E. A. Couladouros, D. Hepworth, K. C. Nicolaou. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. In 1999; 38, 270-301.

## 2.2.4 Nuovi inibitori delle Topoisomerasi I.

Tra i nuovi inibitori delle topoisomerasi I attivo mediante un meccanismo di intercalazione nel DNA, un ruolo rilevante spetta alla nemorubicina (MMDX) (Fig. 28), derivato antraciclinico di terza generazione.<sup>47</sup>

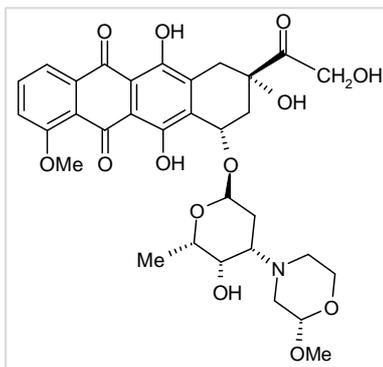


Fig. 28: Nemorubicina (MMDX)

La progettazione di tale molecola è nata dall'idea di trattare neoplasie rare per le quali vi sono ancora oggi poche soluzioni terapeutiche, o per trattare alcuni tipi di tumori resistenti alle attuali terapie riducendo in entrambi i casi gli effetti tossici.<sup>48</sup>

A tale scopo, la nemorubicina si è rivelata efficace su un ampio spettro di modelli tumorali, significativamente diverso da quello su cui altre antracicline sono attive.

A differenza ad esempio della doxorubicina, la nemorubicina è anche altamente citotossica per una varietà di linee di cellule tumorali che presentano un fenotipo multiresistente sia *in vitro* che *in vivo* alla suddetta antraciclina;<sup>49,50</sup> e non è cardiotossica a dosi terapeutiche.<sup>51</sup>

Attualmente sono in corso ulteriori studi clinici (studi di Fase I/II). Dai primi risultati sembra che la nemorubicina cloridato (PNU-152243A) somministrata tramite arteria epatica in associazione al *cis*-platino sia particolarmente indicata per il trattamento

<sup>47</sup> L. Quintieri, C. Geroni, M. Fantin, R. Battaglia, A. Rosato, W. Speed, P. Zanovello, M. Floreani. Formation and Antitumor Activity of PNU-159682, A Major Metabolite of Nemorubicin in Human Liver Microsomes. *Clinical Cancer Research*, 11, (2005), 1608-1617.

<sup>48</sup> <http://www.nervianoms.com>.

<sup>49</sup> M. Ripamonti, G. Pezzoni, E. Pesenti, et al. In vivo anti-tumour activity of FCE 23762, a methoxymorpholinyl derivative of doxorubicin active on doxorubicin-resistant tumour cells. *Br. J. Cancer*, 65, (1992), 703-7.

<sup>50</sup> M. Bakker, J. Renes, A. Groenhuijzen, et al. Mechanisms for high methoxymorpholino doxorubicin cytotoxicity in doxorubicin-resistant tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, 73, (1997), 362-6.

<sup>51</sup> R. Danesi, C. Agen, M. Grandi, V. Nardini, G. Bevilacqua, M. Del Tacca. 3V-Deamino-3V-(2-methoxy-4-morpholinyl)-doxorubicin (FCE 23762): a new anthracycline derivative with enhanced cytotoxicity and reduced cardiotoxicity. *Eur. J. Cancer*, 11, (1993), 1560-5.

loco-regionale del tumore primario del fegato, nello specifico per il trattamento dell'epatocarcinoma (HCC).

### 2.3 Veleni o Inibitori delle Topoisomerasi II.

Negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli progressi nella ricerca farmacologica per la lotta contro i tumori. Esistono però delle forme tumorali per le quali vi è ancora scarsità di soluzioni terapeutiche, ed è proprio in tale contesto che una particolare importanza riveste la classe degli inibitori delle topoisomerasi II.

Come precedentemente detto questi farmaci si dividono, in base al meccanismo d'azione, in agenti intercalanti (es. doxorubicina) e non-intercalanti, come le epipodofillotossine (es. etoposide e teniposide).

Tali veleni possono agire sia impedendo all'enzima di completare il suo ciclo catalitico con la ricucitura del DNA tagliato, che aumentando la velocità di reazione di tale fase di taglio.

Infatti ad esempio mentre l'etoposide e le amsacrine sono potenti inibitori della ricucitura del DNA tagliato,<sup>52,53</sup> altri agenti quali i chinoloni e le ellipticine aumentano invece la velocità di taglio da parte dell'enzima senza inibire il rinsaldamento.<sup>54,55,56</sup>

Le DNA topoisomerasi II rispetto alle topoisomerasi I sono bersaglio di una classe più ampia e varia di composti antineoplastici. Esempi di inibitori di tali enzimi sono:

- le amsacrine in particolare la *m-amsacrina*, usata nelle leucemie refrattarie alla terapia convenzionale;
- le actinomicine come l'*actinomicina D*, antibiotico antitumorale usato molto in passato, ora soppiantato da farmaci più efficaci;

<sup>52</sup> B. S. Sorensen, J. Sinding, A. H. Andersen, J. Alsner, P. B. Jensen, O. Westergaard. Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *J Mol Biol.*, 228, (1992), 778-86.

<sup>53</sup> A. H. Corbett, N. Osheroff. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem Res Toxicol.*, 6, (1993), 585-97.

<sup>54</sup> Ibidem.

<sup>55</sup> M. J. Robinson, B. A. Martin, T. D. Gootz, P. R. McGuirk, M. Moynihan, J. A. Sutcliffe, N. Osheroff. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. *J. Biol. Chem.*, 266, (1991), 14585-92.

<sup>56</sup> S. J. Froelich-Ammon, M. W. Patchan, N. Osheroff, R. B. Thompson. Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 270, (1995), 14998-5004.

- le antracicline, in particolare l'*adriamicina* (*doxorubicina*), uno dei farmaci antitumorali più usati in chemioterapia sia per i tumori solidi (carcinoma della mammella e sarcomi) che ematologici (leucemie mieloidi, sarcomi);
- il *mitoxantrone*, antrachinonico efficace nelle emopatie maligne e sensibilizzante agli effetti delle radiazioni;
- i derivati non intercalanti della epipodofillotossina: *etoposide* e *teniposide*, diffusamente usati per la cura dei carcinomi.

### 2.3.1 Le Amsacrine.

L'amsacrina (Fig. 29) e l'*m*-amsacrina (Fig. 30) sono derivati acridinici in grado di inibire la topoisomerasi II mediante intercalazione a livello dei solchi maggiore e minore del DNA, con cui sono in grado di formare un complesso sufficientemente stabile tale da resistere fino all'entrata del DNA nella tasca enzimatica della topoisomerasi II.

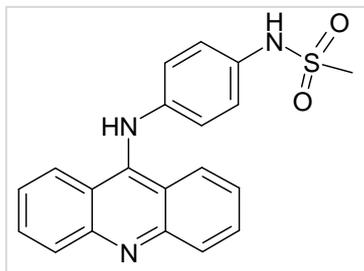


Fig. 29: Amsacrina

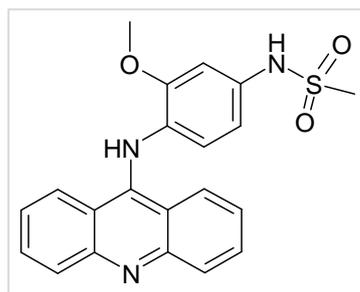


Fig. 30: *m*-Amsacrina

Nello specifico l'*m*-amsacrina, si intercala parallelamente all'asse dello scheletro del DNA con l'azoto acridinico al centro del solco maggiore e la catena metansolfonilica collocata nel solco minore. L'asse dell'elica del DNA passa direttamente al centro dell'anello acridinico, quindi il cromoforo tricyclico si trova circondato da basi su entrambi i lati (Fig. 31). Qui, la *m*-amsacrina consente il taglio del DNA, ma non la sua rinsaldatura, interrompendo così il ciclo catalitico.<sup>57</sup>

<sup>57</sup> S. Zanatta. Sintesi di nuovi inibitori della topoisomerasi II e della proteina chinasi CK2 con potenziale attività antitumorale. Ph. D. Tesi, (31.01.2008), Università degli Studi di Padova.

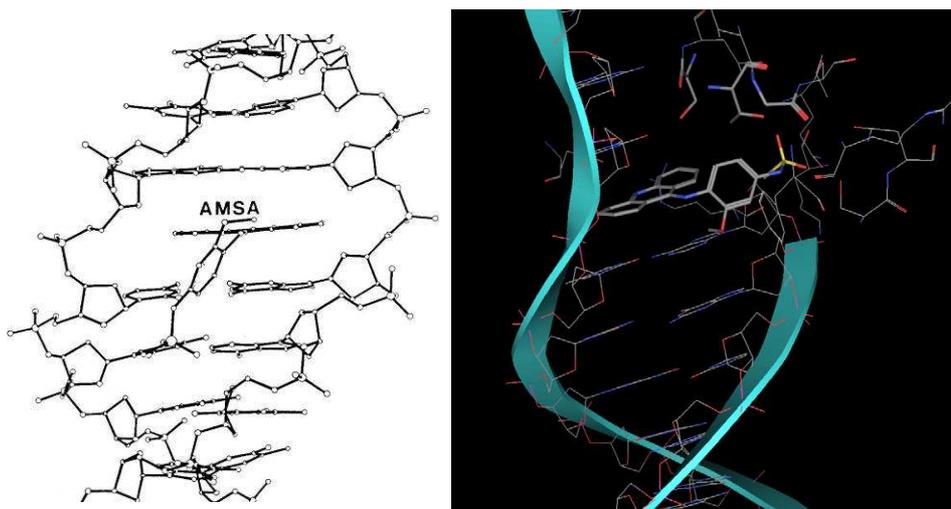


Fig. 31: Intercalazione della *m*-amsacrina nel DNA e nel complesso top. II-DNA

Tale farmaco, somministrato per via endovenosa, ha attività ed effetti tossici simili a quelli della doxorubicina. Viene impiegata principalmente nella leucemia mieloide acuta.

Gli effetti tossici includono: mielodepressione e mucosite; si sono verificati anche casi di aritmie mortali per ipopotassemia.<sup>58</sup>

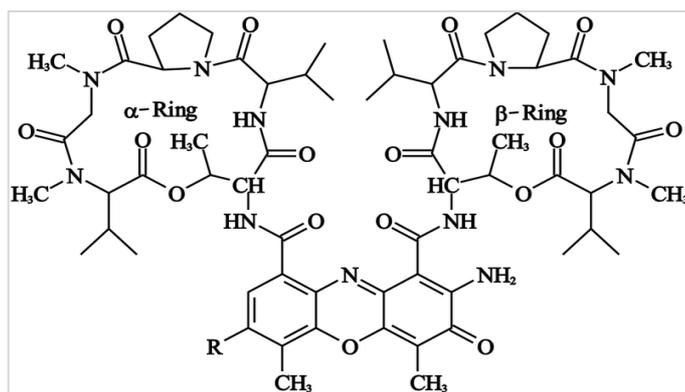
### 2.3.2 Le Actinomicine.

Le actinomicine sono cromopeptidi: la maggior parte di esse contiene lo stesso cromoforo, il fenossazone planare actinocina, che è responsabile del colore giallo-rosso di questi composti. Le differenze tra le actinomicine naturali e quelle di sintesi si limitano alle catene laterali peptidiche ed in particolare alla struttura degli amminoacidi che le costituiscono.

Tra le actinomicine importante è l'antibiotico actinomicina *D* (Fig. 32), commercializzata con il nome di dactinomicina. Si tratta di un agente chemioterapico prodotto da tre tipi di batteri appartenenti alla specie *Streptomyces*, dotato di una notevole azione citotossica. Essa inibisce infatti tutte le cellule in rapida proliferazione, per queste ragioni è tra le più potenti sostanze ad attività antitumorale oggi note.<sup>59</sup>

<sup>58</sup> <http://www.aimac.it>.

<sup>59</sup> Goodman & Gilman. “*Le Basi Farmacologiche della Terapia*”, IX Ed. Italiana, McGraw-Hill, Libri Italia Srl. *op. cit.*.

Fig. 32: Actinomicina *D* (dactinomicina)

L'attività biologica e la citotossicità delle actinomicine sono dovute in realtà a più meccanismi d'azione quali:<sup>60</sup>

- formazione di frammenti dei singoli filamenti di DNA a causa dell'inibizione dell'enzima topoisomerasi II o probabilmente a causa della formazione di un radicale libero intermedio;
- capacità di legarsi alla doppia elica del DNA mediante intercalazione dell'anello fenossazonico planare tra coppie adiacenti di guanina-citosina;
- capacità inibitoria nei confronti dell'enzima topoisomerasi I.

A causa del legame della dactinomicina alla doppia elica del DNA la trascrizione di quest'ultimo ad opera della RNA-polimerasi si blocca.

Il principale utilizzo clinico della dactinomicina è rappresentato dal trattamento delle neoplasie pediatriche, in particolare, del rhabdomyosarcoma e del tumore di Wilms, in cui è curativa in associazione con la chirurgia primaria, radioterapia ed altri farmaci come la vincristina e la ciclofosfamide.

Un'attività neoplastica è stata osservata nel tumore d'Ewing, nei sarcomi dei tessuti molli; può essere efficace in donne con coriocarcinomi in stadio avanzato, in pazienti con carcinoma metastatico del testicolo in associazione con la clorambucile ed il metotrexato; risulta scarsamente efficace in altre neoplasie dell'adulto.<sup>61</sup>

<sup>60</sup> K. Wassermann, J. Markovits, C. Jaxel, G. Capranico, K.W. Kohn, Y. Pommier. *Mol. Pharmacol.*, 38, (1990) 38-45.

<sup>61</sup> Goodman & Gilman. "Le Basi Farmacologiche della Terapia", IX Ed. Italiana, McGraw-Hill, Libri Italia Srl. *op. cit.*

### 2.3.3 Le Antracicline.

Le antracicline sono considerate tra i più efficaci farmaci antitumorali mai sviluppati appartenenti come la dactinomicina alla categoria degli antibiotici citotossici. Si tratta di un gruppo di farmaci, isolati da colture di *Streptomyces peucetius* la cui azione antineoplastica e citotossica derivano dalla sovrapposizione di molteplici meccanismi di danno cellulare avente come risultato finale l'apoptosi.<sup>62</sup>

Le antracicline agiscono principalmente come intercalanti,<sup>63</sup> facendo scivolare la loro struttura ciclica planare perpendicolarmente tra due coppie di nucleotidi dell'elica del DNA. Il risultato è un parziale srotolamento della doppia elica del DNA con successivo blocco della sintesi di DNA, RNA e proteine o di tutti e tre.

La generazione di radicali liberi da parte di tale farmaco può contribuire, ma non è la causa principale, all'effetto antineoplastico. E' stato però dimostrato che questo processo ha un ruolo nella tossicità cardiaca causata da questi farmaci.

I primi derivati antraciclinici ad essere scoperti ed utilizzati in terapia, sono stati la *doxorubicina* (o adriamicina) (Fig. 33) e la *daunorubicina* (o daunomicina) (Fig. 34).

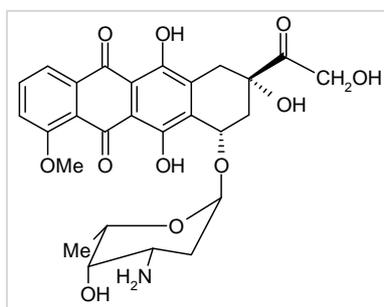


Fig. 33: Doxorubicina

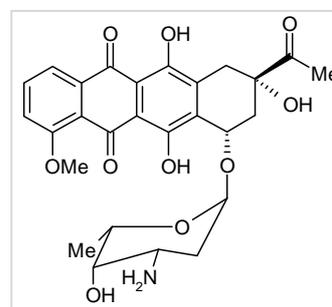


Fig. 34: Daunorubicina

Come già detto il principale meccanismo d'azione con cui le antracicline esplicano la loro azione citotossica è da ricondurre alla loro attività d'intercalanti.

La presenza d'un agente intercalante nel DNA va a perturbare anche l'azione delle topoisomerasi impedendo così l'avvolgimento delle due catene.

<sup>62</sup> B.G. Katsung. "Farmacologia generale e clinica", IV Ed. Piccin (2000). *op. cit.*

<sup>63</sup> Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 83-106. *op. cit.*

Le antracicline, dopo essersi intercalate nella doppia elica, vanno infatti a localizzarsi all'interfaccia tra il sito attivo della topoisomerasi II ed il sito "cleavage" del DNA, interagendo sia con l'uno che con l'altro.

La doxorubicina ad esempio, interagisce con la topoisomerasi II che viene intrappolata sul DNA mediante legame covalente, formando così un complesso ternario stabile: farmaco-enzima-DNA, che rende più difficile la riunificazione dei filamenti (Fig. 35 e Fig. 36).

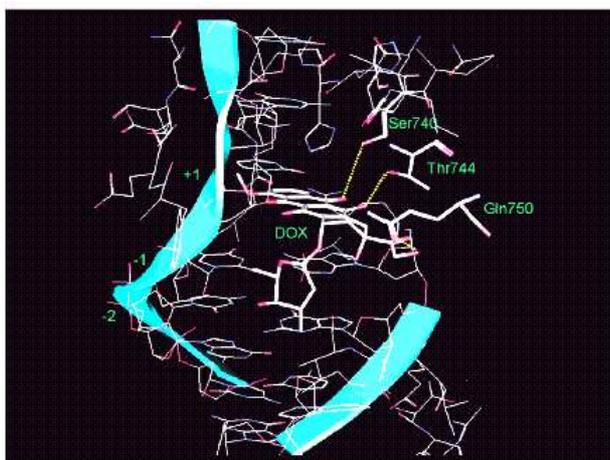


Fig. 35: Interazione della doxorubicina con la topoisomerasi II

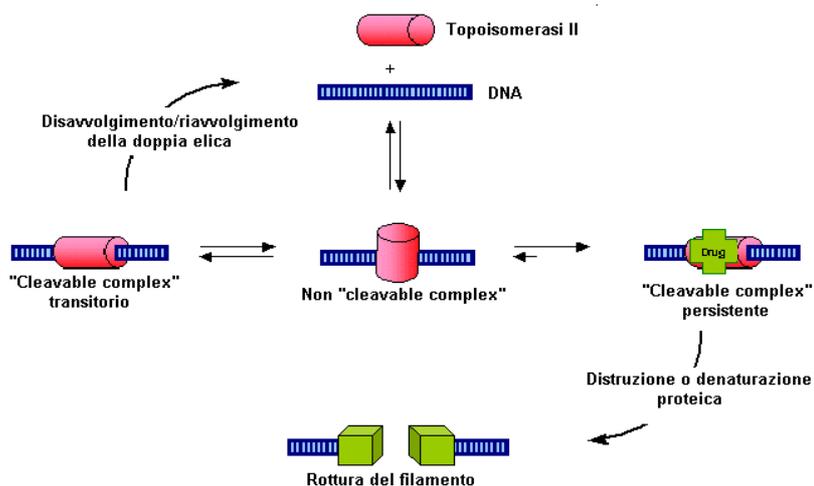


Fig. 36: Legame farmaco-enzima-DNA

La doxorubicina è molto usata per il trattamento di leucemie e linfomi; essa rappresenta, probabilmente, il miglior farmaco disponibile per il trattamento del carcinoma

metastatico della tiroide. Tale farmaco ha mostrato attività anche nei confronti di carcinomi di endometrio, testicoli, prostata, cervice, testa e collo, e nei mielomi.

La daunorubicina, è efficace anche contro numerosi tumori solidi, in particolare il tumore della mammella; è tra i farmaci più attivi nel trattamento della leucemia mieloblastica acuta negli adulti.<sup>64</sup>

Altri derivati antraciclinici utilizzati nella pratica clinica sono: l'*epirubicina* (Fig. 37) e l'*idarubicina* (Fig. 38).

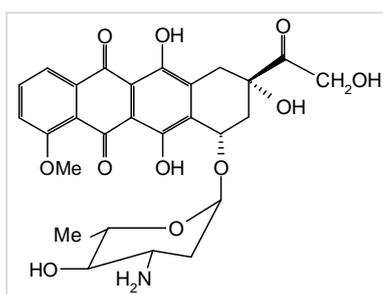


Fig. 37: Epirubicina

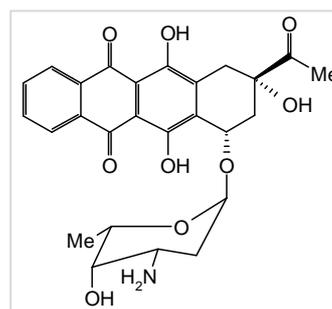


Fig. 38: Idarubicina

L'*epirubicina* è un derivato strutturale della doxorubicina; studi clinici suggeriscono che come tale è altrettanto efficace nel trattamento del tumore della mammella. L'*idarubicina* derivato sintetico della daunorubicina è insieme a questa ultima tra i chemioterapici più efficaci nel trattamento delle leucemie acute.<sup>65</sup>

### 2.3.4 Il Mitoxantrone.

Il mitoxantrone è un composto di sintesi avente struttura tricyclica con due catene laterali (Fig. 39).

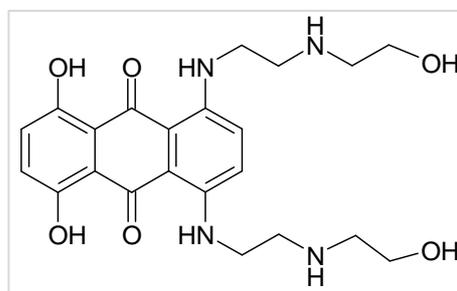


Fig. 39: Mitoxantrone

<sup>64</sup> Goodman & Gilman. "Le Basi Farmacologiche della Terapia", IX Ed. Italiana, McGraw-Hill, Libri Italia Srl. *op. cit.*

<sup>65</sup> E. Schroder, C. Rufer, R. Schmiechen. "Chimica Farmaceutica", Società editrice Scientifica, I Ed. Italiana.

Essendo un analogo strutturale della doxorubicina, come le antracicline, si intercala nel DNA interferendo con la funzione della topoisomerasi II.

Più dettagliatamente, *in vivo* il mitoxantrone si accumula nel nucleo cellulare e si comporta da agente intercalante classico inserendosi perpendicolarmente all'asse maggiore delle coppie di basi del DNA grazie alla sua porzione molecolare planare (Fig. 40). Evidenze sperimentali mostrano come questo agisca anche da veleno per la topoisomerasi II stabilizzando il complesso topoisomerasi II-DNA e disaccoppiando l'attività catalitica di tale enzima.<sup>66</sup>

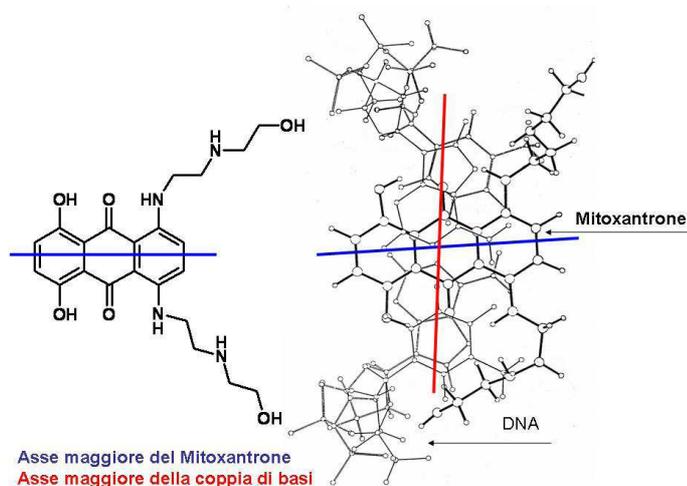


Fig. 40: Modello di intercalazione del mitoxantrone nel DNA

A differenza delle antracicline non ha la capacità di produrre radicali liberi ed è risultato molto meno cardiotossico della doxorubicina.

Viene utilizzato per il trattamento di alcune forme di leucemia acuta non-linfocitarie, nei linfomi e nel tumore della mammella, nel tumore della prostata ormone resistente.<sup>67</sup>

<sup>66</sup> E. Martina. Sintesi e caratterizzazione di inibitori delle topoisomerasi I II. Ph. D. Thesis., (02.02.2009), Università degli Studi Padova.

<sup>67</sup> E. Schroder, C. Rufer, R. Schmiechen. "Chimica Farmaceutica", Società editrice Scientifica, I Ed. Italiana. op. cit..

## 2.3.5 Agenti non-intercalanti quali inibitori delle Topoisomerasi II.

### 2.3.5.1 Derivati della epipodofillotossina: etoposide e teniposide.

L'etoposide (Etopophos<sup>®</sup>, Vepesid<sup>®</sup>, VP-16<sup>®</sup>) (Fig. 41) e il teniposide (VM-26) (Fig. 42) sono derivati semisintetici delle podofillotossine estratte dalla pianta erbacea *Podophyllum peltatum* che cresce nel sud degli Stati Uniti.<sup>68,69</sup>

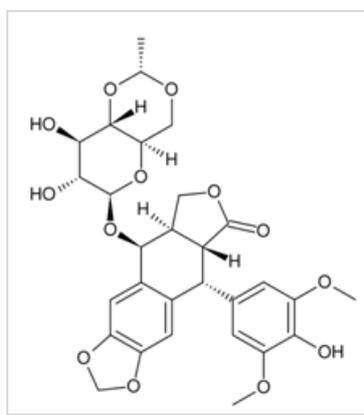


Fig. 41: Etoposide

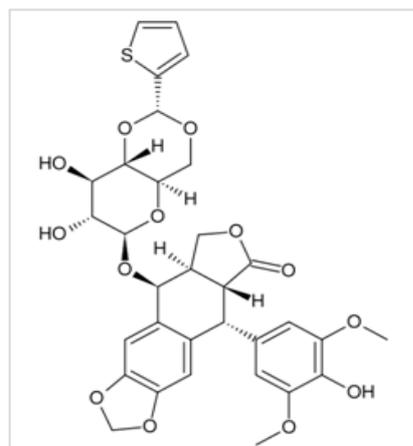


Fig. 42: Teniposide

A differenza delle podofillotossine, che come gli alcaloidi della vinca si legano alla tubulina, le epipodofillotossine sono potenti veleni non-intercalanti della topoisomerasi II.

Nello specifico l'etoposide esplica il suo effetto antitumorale causando un danno irreversibile al DNA mediante inibizione dell'enzima topoisomerasi II.<sup>70</sup> L'inibizione di tale enzima, che normalmente durante la fase di replicazione favorisce il disavvolgimento/riavvolgimento della doppia elica, riducendo quindi le tensioni causate dallo srotolamento della molecola stessa mediante la sua temporanea rottura, porta ad una rottura non riparabile del DNA cellulare impedendo di conseguenza la riunificazione dei due filamenti tagliati (Fig. 43).<sup>71</sup>

<sup>68</sup> <http://www.oncoprof.net>.

<sup>69</sup> R. Reid, P. Benedetti, M.A. Bjornsti. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 289-300.

<sup>70</sup> <http://www.emory.edu>.

<sup>71</sup> [http://www.seminari di ematologia oncologica\\_3\\_2009\\_low.pdf](http://www.seminari di ematologia oncologica_3_2009_low.pdf).

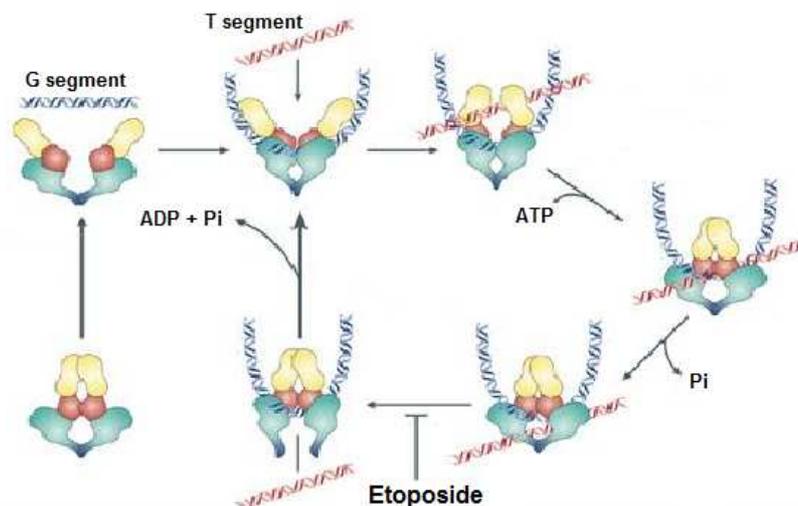


Fig. 43: Meccanismo d’azione dell’etoposide

L’etoposide è un farmaco antineoplastico da utilizzare da solo o in associazione ad altri farmaci antineoplastici. Secondo i dati attualmente disponibili, tale farmaco è indicato nella terapia dei carcinomi polmonari a piccole cellule e dei carcinomi del testicolo.

Per quanto riguarda il teniposide, proporzionalmente al dosaggio somministrato, esso provoca rotture a singolo o a doppio filamento del DNA oltre alla formazione di legami a ponte detti “cross-link” tra lo stesso DNA e le proteine.

Anche il teniposide, come l’etoposide, agisce inibendo direttamente l’enzima topoisomerasi II poiché esso non si intercala nel DNA né si lega saldamente ad esso.

I suoi effetti citotossici sono commisurati al numero di rotture a doppio filamento prodotte nelle cellule; ogni rottura corrisponde infatti ad un’interruzione dell’azione della topoisomerasi II al momento della formazione dell’intermedio DNA-topoisomerasi II.

Il teniposide viene impiegato soprattutto nel trattamento delle leucemie pediatriche.<sup>72</sup>

<sup>72</sup> J. G. Hengstler, C. K. Heimerdinger, I. B. Schiffer, S. Gebhard, J. Sagemüller, B. Tanner, H. M. Bolt, F. Oesch. Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? *EXCLI Journal*, 1, (2002), 8-14, ISSN 1611-2156.

### 2.3.5.2 Il Genistein.

Il genistein<sup>73</sup> (Fig. 44) è un isoflavone isolato per la prima volta nel 1899 dalla pianta *Genista tinctoria*. Tale principio attivo, presente in numerose piante (fave, soia, ecc.) oltre ad agire come antiossidante e antielmintico presenta anche una attività antineoplastica esplicita mediante differenti meccanismi.

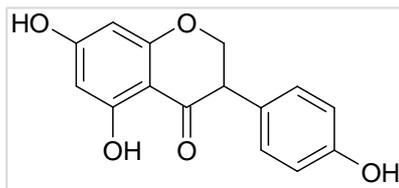


Fig.44: Genistein

Il genistein è principalmente un inibitore della protein-tirosin chinasi. Esso lega ed inibisce tale enzima interrompendo la trasduzione del segnale e inducendo la differenziazione cellulare.

E' inoltre in grado di bloccare la crescita incontrollata delle cellule tumorali, sia inibendo l'attività dei fattori di crescita, che nel corpo regolano la divisione e la sopravvivenza cellulare, sia inibendo la topoisomerasi-II, con conseguente frammentazione del DNA e apoptosi per arresto della fase G2/M del ciclo cellulare.

Vari studi hanno evidenziato che dosi moderate di genistein possono avere effetti inibitori sui tumori della prostata, della cervice uterina, del seno e del colon. Sembra inoltre in grado di rendere alcune cellule tumorali più sensibili alla radioterapia.

## 2.4 Soppressori o Inibitori catalitici delle DNA-Topoisomerasi.

Nonostante l'elevata attività antitumorale, l'uso dei veleni delle topoisomerasi come potenti agenti tumorali è limitato a causa del loro basso indice terapeutico e della

<sup>73</sup> I. R. Record, J. L. Broadbent, R. A. King, I. E. Dreosti, R. J. Head, A. L. Tonkin. Genistein inhibits growth of B16 melanoma cells in vivo and in vitro and promotes differentiation in vitro. *Int. J. Cancer.* 72, (1997), 860-4.

loro scarsa selettività causando un concomitante danno sia alle cellule neoplastiche che alle cellule e ai tessuti sani.<sup>74</sup>

Bisogna inoltre dire che la sensibilità delle cellule ai veleni aumenta con una sovraespressione delle DNA topoisomerasi, mentre la riduzione della loro espressione è la principale causa di resistenza. Un comportamento diametralmente opposto è quello che riguarda i cosiddetti soppressori o gli inibitori catalitici.

Questi farmaci sono stati progettati per impedire la fase nel ciclo catalitico (Fig. 45) che precede il taglio della doppia elica del DNA ed esercitano i loro effetti antiproliferativi riducendo la funzione enzimatica. Si ritiene inoltre che tali molecole colpiscano solo le cellule impegnate nella mitosi. Dati recenti hanno anche dimostrato che ad essi sono particolarmente sensibili cellule tumorali con difetti in alcuni checkpoint.<sup>75</sup>

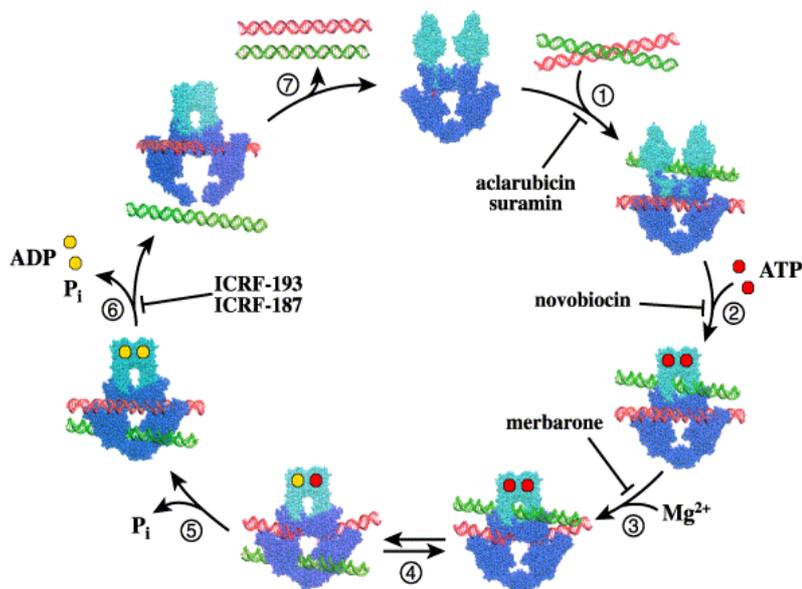


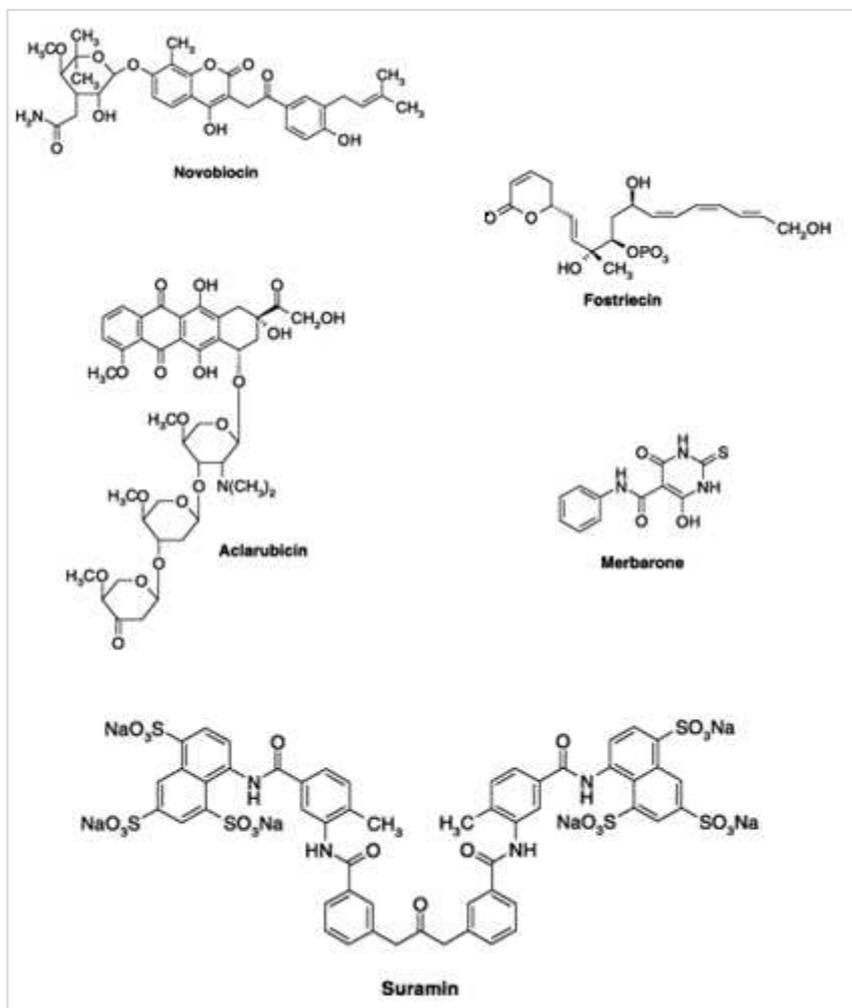
Fig. 45: Azione dei soppressori sul ciclo catalitico della topoisomerasi II

Gli inibitori catalitici (Tab. 4) sono un gruppo eterogeneo di sostanze in grado quindi di interferire con il legame DNA-topoisomerasi II come l'aclarubicin e il suramin; oppure stabilizzare complessi non covalenti DNA-topoisomerasi come il merbarone o il

<sup>74</sup> F. Degrassi, M. Fiore, F. Palitti. Chromosomal Aberrations and Genomic Instability Induced by Topoisomerase-Targeted Antitumour Drugs. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 4, (2004), 317-325.

<sup>75</sup> M. Damelin, T. H. Bestor. The decatenation checkpoint. *Br. J. Cancer*, 96 (2), (2007), 201-205.

derivato ICRF-187; o inibire il legame della girasi-ATP (topoisomerasi batterica) come la novobiocina o gli antibiotici cumarinici.<sup>76</sup>



Tab. 4: Inibitori catalitici delle topoisomerasi II

Molti di tali inibitori catalitici sono attualmente sottoposti a studi preclinici al fine di valutare la loro attività anti-proliferativa sulla base delle caratteristiche molecolari delle cellule tumorali da trattare.

<sup>76</sup> J. G. Hengstler, C. K. Heimerdinger, I. B. Schiffer, S. Gebhard, J. Sagemüller, B. Tanner, H. M. Bolt, F. Oesch. Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? *EXCLI Journal*, 1, (2002), 8-14, ISSN 1611-2156. *op. cit.*.

Capitolo III:  
Principali meccanismi d'azione dei  
Derivati-Carbazolici

---

## PRINCIPALI MECCANISMI D'AZIONE DEI DERIVATI CARBAZOLICI

### 3.1 Introduzione.

Tra i farmaci antitumorali impiegati nella lotta contro il cancro, aventi capacità selettiva sulle cellule neoplastiche tramite induzione di apoptosi o pseudo-apoptosi, un posto rilevante spetta ai principi attivi di origine vegetale.

In questo contesto ben si inseriscono la mahanina<sup>1</sup> (Fig. 46) e l'ellipticina<sup>2</sup> (Fig. 46), derivati naturali, a nucleo carbazolico, del *Micromelum Minutum* (Fig. 45) e dell'*Ochrosia Elliptica Labill* (Fig. 47) rispettivamente.

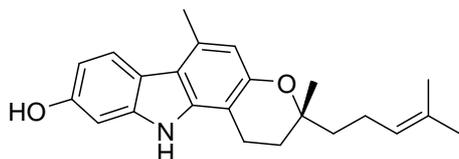
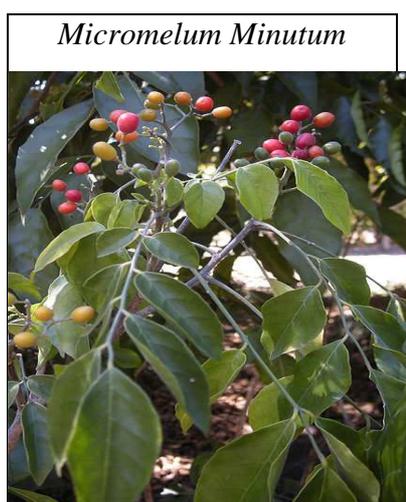


Fig. 46: Mahanina

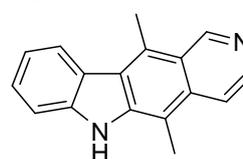
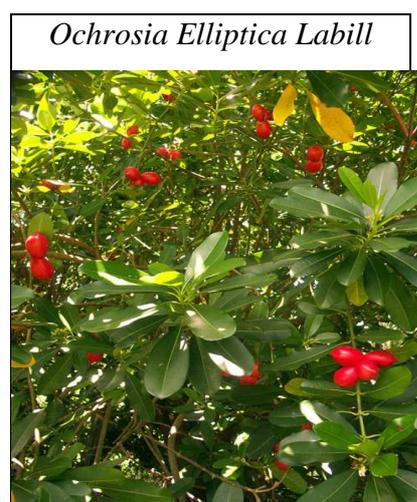


Fig. 47: Ellipticina

<sup>1</sup> M. Kumar Roy, V. Thalang, G. Trakoontivakorn, K. Nakahara. Mahanine, a carbazole alkaloid from *Micromelum minutum* inhibits cell growth and induces apoptosis in I-J937 cells through a mitochondrial dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, (2005), 145-155.

<sup>2</sup> S. Goodwin, A. F. Smith, E. C. Horning. Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, (1959), 1903-1908.

In particolare, l'ellipticina o 5,11-dimetil-6*H*-pirido[4,3-*b*]carbazolo,<sup>3</sup> alcaloide a nucleo carbazolico più semplice trovato in natura caratterizzato da una struttura planare e, dotato di notevoli proprietà biologiche, è stata presa in riferimento per questo progetto di ricerca in quanto analogo strutturale dei nuovi derivati 1-4-dimetil-9*H*-carbazoli sintetizzati e studiati in qualità di potenziali agenti citotossici.

### 3.2 Evoluzione storica e Proprietà generali dei derivati carbazolici.

E' noto da tempo che i derivati naturali e sintetici dei composti carbazolici possiedono molteplici attività biologiche.<sup>4</sup> Essenzialmente essi sono potenti antitumorali, ma possiedono anche attività antimicrobiche,<sup>5</sup> antinfiammatorie e antiossidanti.<sup>6</sup>

Recentemente, è stato dimostrato che sono anche antagonisti dei recettori del neuropeptide Y, un polipeptide molto diffuso nel sistema nervoso centrale e nel sistema nervoso autonomo dove svolge diverse azioni, tra cui l'aumento dell'appetito e la modulazione della risposta vasocostrittrice innescata dai neuroni noradrenergici.<sup>7</sup>

Alcuni derivati a nucleo carbazolico sembrano avere anche proprietà fotorefrattive e fotoconduttive.<sup>8</sup>

La scoperta del primo carbazolo, isolato dal catrame di carbon fossile da Grabe e Glazer risale al 1872;<sup>9</sup> ma fu solo più tardi (1965) che Chakraborty descrisse le modalità estrattive e le proprietà antibiotiche nei confronti di germi gram negativi, gram positivi e funghi, della murrayanina (Fig. 48), alcaloide a nucleo carbazolico estratto dalla pianta *Murraya Koenigii*.<sup>10,11</sup>

---

<sup>3</sup> R. W. Guthrie, A. Brossi, F. A. Mennona, J. G. Mullin, R. W. Kierstead. Ellipticine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 1975, 755-759. *op. cit.*

<sup>4</sup> A. Kuwabara, K. Nakano, K. Nozaki. Double N-Arylation of Primary Amines: Carbazole Synthesis from 2,2-Biphenyldiols. *Joc. Article*, 70, (2005), 413-419.

<sup>5</sup> A. Chakraborty, C. Saha, G. Padder, B. K. Chowdhury. Carbazole Alkaloid with antimicrobial activity from *Clausena Heptaphylla*. *Elsevier Scienze*, 3, (1995), 787-789.

<sup>6</sup> Y. Tachibana, H. Kikuzaki. Antioxidative Activity of Carbazole from *Murraya Koenigii* leaves. *J. A. Chem.*, 49, (2001), 5589-5594.

<sup>7</sup> G. F. Di Bona. Neuropeptide Y. *Am. J. Physio*, (2002).

<sup>8</sup> Y. Zhang, T. Wade, H. Sasabe. Carbazole photorefractive materials. *J-Mater. Chem.*, 8, (1998), 809-828.

<sup>9</sup> H. J. Knöker, K. R. Reddy. Isolation and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids. *Chem. Rev.*, 102, (2002), 4303-4427.

<sup>10</sup> D. P. Chakraborty, P. K. Bosc. *Experientia*, 21, (1965), 340.

<sup>11</sup> D. P. Chakraborty, B. K. Barmann, P. K. Bosc. *Tetrahedron*, 21, (1965), 681.

Da allora gli alcaloidi a nucleo carbazolico sono stati argomento d'interesse in molti settori.<sup>12</sup>

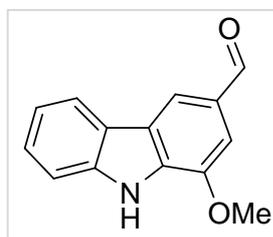


Fig. 48: Murrayanina

La maggior parte degli alcaloidi a nucleo carbazolico sono stati isolati da piante del genere *Murraya*, *Glycosmis*, e *Clausena* appartenenti alla famiglia delle *Rutaceae*.<sup>13,14</sup> Tra queste piante il genere *Murraya* rappresenta la più grossa riserva di tali alcaloidi.<sup>15</sup> Alcaloidi a nucleo 1,4-dimetil-9H-carbazolico (es. ellipticina), di notevole interesse farmacologico, sono stati invece estratti per la prima volta nell'1959 dalle foglie dell'albero sempreverde *Ochrosia Elliptica* Labill; e anche dalle specie *Streptomyces*, *Hyella caespitosa*, *Aspergillus*, *Actinomadura* e *Didemnum granulatum* sono stati estratti numerosi altri derivati.

Per quanto concerne il meccanismo biogenetico di tali composti sono state formulate molte ipotesi, ed ancora oggi non si conosce una vera e propria via biogenetica.

A parità di caratteristiche strutturali si pensa che il 3-metilcarbazolo (Fig. 49) possa rappresentare l'intermedio chiave del processo biogenetico della maggior parte dei composti carbazolici; invece il precursore biogenetico più comune per la sintesi dei carbazoli triciclici risulta essere il 2-metilcarbazolo<sup>16</sup> (Fig. 50).

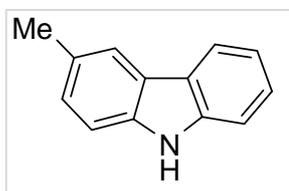


Fig. 49: 3-metilcarbazolo

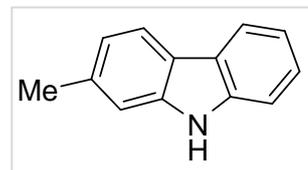


Fig. 50: 2-metilcarbazolo

<sup>12</sup> R. Jaszold-Howorko. Synthesis of 5,6-Dimethyl-9-methoxy-1-phenyl-6H-phirido (4-3b) Carbazole derivatives and their Cytotoxic Activity, *Wiley Inter Science*, 338, (2005), 556-561.

<sup>13</sup> P. Bhattacharye, B. K. Chowdhury. *Indian J. Chem.*, 24b, (1985), 452.

<sup>14</sup> P. Bhattacharye, A. Chakraborty. *Phytochemistry*, 23, (1984), 471.

<sup>15</sup> B. S. Joshi, D. H. Geward. *Indian J. Chem.*, 12, (1974), 437.

<sup>16</sup> H. J. Knöker, K. R. Reddy. Isolation and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids. *Chem. Rev.*, 102, (2002), 4303-4427. *op. cit.*

Come precedentemente detto i derivati carbazolici possiedono numerose proprietà biologiche da ricondurre a molteplici azioni:

- antiossidante, sono in grado di proteggere l'organismo nei confronti dello stress ossidativo;
- ormonale, danno effetti simili a quelli degli estrogeni naturali;
- antimicrobica, potenziano il sistema immunitario;
- di interferenza, interferiscono con l'attività degli enzimi deputati alla replicazione e al mantenimento dello stato topologico del DNA inattivando sostanze tossiche, proteggendolo dall'azione dei carcinogeni, e inibendo la moltiplicazione delle cellule tumorali.

### 3.3 Azione citotossica dei derivati 1,4-dimetil-9H-carbazoli.

Numerosi derivati 1,4-dimetil-9H-carbazolici sono potenti agenti citostatici i cui precisi meccanismi d'azione non sono stati ancora completamente chiariti.

A tal proposito, il meccanismo d'azione dell'ellipticina e dei suoi analoghi viene definito di tipo "multimodale" in quanto finora non è stato possibile dimostrare che l'attività citotossica o genotossica di questi composti sia dovuta ad uno solo dei loro molteplici meccanismi d'azione, ma sembrerebbe infatti il risultato di differenti alternativi eventi.<sup>17</sup>

La struttura policiclica aromatica di tali molecole<sup>18</sup> offre una plausibile spiegazione ai loro molteplici meccanismi d'azione quali principalmente: l'intercalazione nel DNA e l'inibizione dell'attività dell'enzima DNA-topoisomerasi II.<sup>19</sup> Entrambi questi meccanismi inducono l'apoptosi e quindi la morte delle cellule.<sup>20</sup>

Tali derivati possono inoltre portare alla formazione di addotti mediante covalente alchilazione delle macromolecole; oppure indurre stress a livello del reticolo

---

<sup>17</sup> M. Monnot, O. Mauffret, V. Simon, E. Lescot, B. Psaume, J. M. Sacier, M. Charra, J. Belehradec, Jr. S. Femandjian. *J. Biol. Chem.*, 266, (1991), 1820-1829.

<sup>18</sup> N. Haider, R. Jbara. J. Käferböck. U. Traar. Synthesis of tetra- and pentacyclic carbazole-fused imides as potential antitumor agents. *Arkivoc*, (2009), 38-47.

<sup>19</sup> M. Stiborova, M. Rupertova, H. Schmeiser, E. Frei. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repu.*, 150 (1), (2006), 13-23.

<sup>20</sup> Y. Kuo, P. Kuo, Y. Hsu, C. Cho, C. Lin. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sciences*, 78, (2006), 2550-2557.

endoplasmatico mediante la formazione di radicali liberi; o ancora determinare una selettiva inibizione della fosforilazione della proteina p53.<sup>21</sup>

Recentemente è stato dimostrato che essi presentano anche attività antitubulinica,<sup>22</sup> antimitotica,<sup>23</sup> e che sono inoltre in grado di inibire le mieloperossidasi.<sup>24</sup>

### 3.3.1 Intercalazione nel DNA ed Inibizione dell'enzima Topoisomerasi II.

Uno dei principali meccanismi responsabili dell'attività antitumorale e citotossica dei derivati 1,4-dimetil-9H-carbazoli è la loro capacità d'intercalarsi nel DNA.

Come già menzionato nel capitolo precedente, l'evento determinante per l'azione antitumorale di molti principi attivi è il legame, reversibile o irreversibile, al DNA. Tale legame può essere appunto di tipo intercalativo. La molecola del farmaco si lega strettamente ma reversibilmente al DNA inserendosi tra le coppie di basi della doppia elica, causando danni allo stesso ed impedendo di conseguenza la replicazione delle cellule tumorali.<sup>25</sup>

La presenza d'un agente intercalante nel DNA va a perturbare anche l'azione delle topoisomerasi impedendo così il disavvolgimento/riavvolgimento delle catene della doppia elica.

Il meccanismo d'interazione tra questi enzimi e gli agenti chemioterapici a nucleo carbazolico non è stato ancora del tutto definito. Tuttavia, sono stati ipotizzati tre possibili meccanismi mediante i quali si ha la formazione del complesso ternario farmaco-topoisomerasi-DNA.

Nella prima ipotesi si è evidenziato che il farmaco si lega solo al complesso enzima-DNA e non ha interazione né con l'enzima né con il DNA considerati singolarmente.

Una seconda teoria ipotizza che il farmaco diventi parte del complesso ternario interagendo inizialmente solo con il DNA. Nella terza ipotesi, il farmaco diviene parte del

---

<sup>21</sup> Y. Pommier, O. Sordet, S. Antony, R. L. Hayward, K. W. Kohn. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, 23, (2004), 2934-2949.

<sup>22</sup> J. P. Liou, C. Y. Wu. 4- and 5-Aroylindoles as Novel Classes of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.*, 50, (2007), 4548-4552.

<sup>23</sup> H. Laixing, L. Zhuo-rong. Synthesis and Structures-Activity Relationships of Carbazole Sulfonamides as a Novel Class of Antimitotic Agents Against Solid Tumors. *J. Med. Chem.*, 49, (2006), 6273-6282.

<sup>24</sup> S. J. Klebanoff. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, 77, (2005), 598-615.

<sup>25</sup> M. Stiborova, M. Rupertova, H. Schmeiser, E. Frei. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repu.*, 150 (1), (2006), 13-23. *op. cit.*

complesso ternario principalmente attraverso la diretta interazione con l'enzima in assenza di DNA.<sup>26,27</sup>

Per meglio definire il meccanismo d'azione dei derivati carbazolici che hanno come target la topoisomerasi eucariotica, è stato chiarito il meccanismo dell'interazione tra la topoisomerasi del lievito *Saccharomyces cerevisiae* e l'ellipticina (intercalante quadriciclico).

L'ellipticina è infatti in grado di coniugare un'efficiente capacità di intercalazione tra le coppie di basi del DNA, con un'azione combinata sugli enzimi responsabili del rilassamento della sequenza di tale acido nucleico. Nello specifico tale agente mostra una debole capacità nell'inibire il riavvolgimento del DNA tagliato dall'enzima, ma sembra invece favorire la rottura del DNA aumentando (spingendo) la velocità con cui avviene il taglio.

Attraverso studi di spettroscopia in fluorescenza è stato dimostrato che l'ellipticina forma un complesso stabile con la topoisomerasi II in assenza del DNA, e che l'enzima detta lo stato ionico del farmaco. Tali studi hanno consentito l'ipotesi di un modello in cui l'ellipticina entra nel complesso ternario attraverso l'iniziale associazione o con il DNA o con l'enzima senza richiedere necessariamente la presenza del complesso topoisomerasi II-DNA preformato.

Si è inoltre osservato che a pH neutro l'ellipticina può essere presente nella forma deprotonata o in quella protonata (all'equilibrio tra di loro). La forma protonata si intercala al DNA libero (complesso 1); al contrario la forma deprotonata lega principalmente la topoisomerasi II in assenza di DNA (complesso 2). E' proprio in questa forma deprotonata in cui il farmaco è presente nel complesso ternario topoisomerasi II-ellipticina-DNA (complesso 3).

La formazione di tale complesso ternario (complesso 3) favorisce un aumento dei livelli dei complessi "cleavage" enzima-DNA (complesso 4); in conseguenza a ciò l'enzima diventa un vero e proprio veleno cellulare poiché lascia i filamenti di DNA non saldati (Fig. 51).<sup>28</sup>

---

<sup>26</sup> M. Waring. *J. Annu. Rev. Biochem.*, 50, (1981), 159-192.

<sup>27</sup> K. C. Chow, T. L. MacDonald, W. E. Ross. *Mol. Pharmacol.*, 34, (1988), 467-473.

<sup>28</sup> S. J. Froelich-Ammon, M. W. Patchan, N. Osheroff, R. B. Thompson. Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 270, (1995), 14998-5004. *op. cit.*

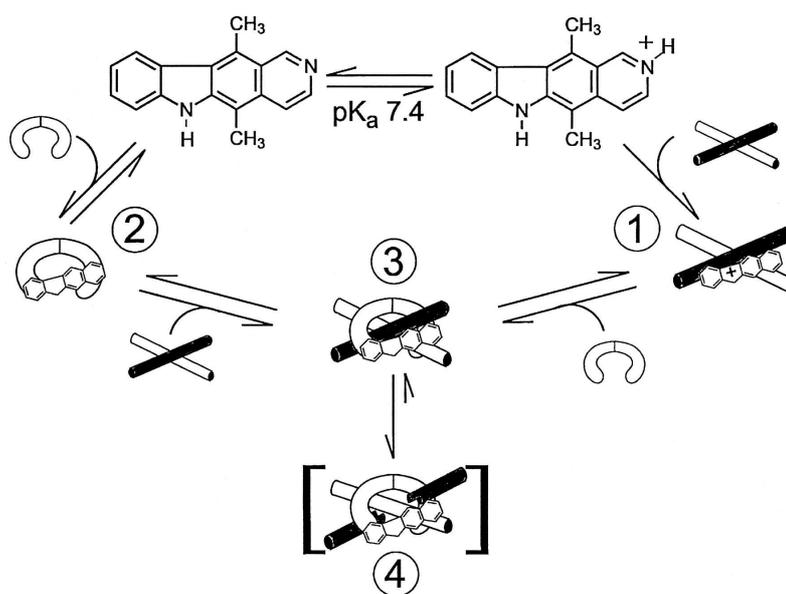


Fig. 51: Meccanismo di formazione del complesso ternario topoisomerasi II-ellipticina-DNA

### 3.3.2 Meccanismi alla base del processo apoptotico.

La maggior parte dei derivati carbazolici attualmente impiegati nella pratica clinica devono la loro attività al fatto che possono essere anche agenti pro-apoptotici. Per tale motivo è opportuno definire l'apoptosi ed i fattori che ne determinano la comparsa.

L'apoptosi può essere considerata come un processo di morte cellulare "pulito" con danno minimo delle cellule e dei tessuti circostanti in quanto interessa singole cellule. Dal punto di vista biochimico, l'aspetto più tipico è quello della frammentazione del DNA ad opera di endonucleasi che agiscono a livello internucleosomiale e che portano alla formazione di oligonucleosomi. Questo processo, responsabile dell'eliminazione delle cellule danneggiate o prodotte in eccesso, viene regolato a livello genico e richiede la sintesi di RNA e delle proteine. L'induzione del processo apoptotico, inteso come meccanismo di difesa, è pertanto importante in numerosi processi fisiologici e patologici riguardanti sia lo sviluppo embrionale che molti tessuti nella vita adulta.<sup>29</sup>

<sup>29</sup> I. N. Lavrik, A. Golks, P. H. Krammer. Caspases: pharmacological manipulation of cells death. *J. Clin. Invest.* 115, (2005), 2665-2672.

L'apoptosi è inoltre fondamentale per i processi di regressione tumorale, anche se è stato purtroppo dimostrato che le cellule di alcune forme tumorali hanno una maggiore resistenza all'induzione apoptotica.

Alla base di tale induzione sono stati identificati due meccanismi principali: il processo mediato dai cosiddetti "recettori della morte" ed il processo mitocondriale.<sup>30</sup>

Il primo di questi processi è innescato per attivazione da parte dei rispettivi ligandi dei "recettori della morte", come ad esempio il Fas/APO-1. Il legame Fas/APO-1 con l'anticorpo agonista o con il suo ligando maturo (Fas ligando), induce l'oligomerizzazione del recettore e la formazione di complessi segnale di "morte-inducente", seguita dall'attivazione delle caspasi 8.

Il processo apoptotico mitocondriale, è invece controllato dalla famiglia delle proteine Bcl-2, che comprendono Bax (fattore pro-apoptotico), Bcl-2 e Bcl-XL (fattori antiapoptotici). I segnali "di morte" inducono il rilascio del citocromo c, della procaspasi 9 e di altri fattori pro-apoptotici dai mitocondri al citoplasma, portando quindi all'attivazione delle caspasi effettrici (come la caspasi 3).<sup>31,32</sup>

Si può quindi dire che i segnali di apoptosi, convergono nell'attivazione di caspasi iniziatrici (es. caspasi 8) che portano all'attivazione proteolitica delle caspasi effettrici (es. caspasi 3) e che quindi tagliano il substrato cellulare, con conseguente morte cellulare (Fig. 52):

---

<sup>30</sup> R. Paletti, S. Nicosia, F. Clementi, G. Fumagalli. "Farmacologia generale e molecolare", II Ed. Italiana, (1999), UTET, Torino.

<sup>31</sup> M. O. Hengartner. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, (2000), 770-776.

<sup>32</sup> T. Suda, T. Takahashi, P. Golstein, S. Nagata. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75, (1993), 1169-1178.

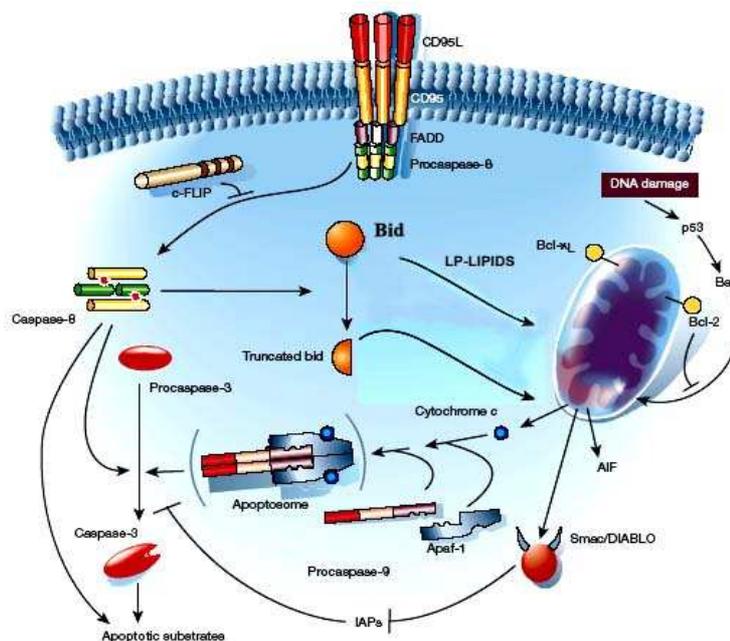


Fig. 52: Attivazione delle caspasi nell'apoptosi

Per quanto riguarda i derivati carbazolici l'induzione del processo apoptotico è dovuto all'attivazione di differenti meccanismi.

A tal proposito è stato dimostrato che il trattamento di cellule cancerose (es. tumore alla mammella) con i suddetti derivati induce inibizione della crescita cellulare (in modo dose-dipendente) arrestando il ciclo cellulare alla fase G2/M (Fig. 53).

Questo effetto è associato: ad un marcato aumento dell'espressione della proteina p53;<sup>33</sup> ad un aumento dell'espressione di Fas/APO1 e dei suoi ligandi; alla conseguente attivazione della caspasi 8; all'aumento del livello della proteina Bax e alla riduzione dei livelli dell'espressione di Bcl-2 e di Bcl-XL a livello mitocondriale.<sup>34</sup>

<sup>33</sup> M. Ohashi, E. Sugikawa, N. Nakanishi. Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *J. Cancer Res.*, 86, (1995), 819-829.

<sup>34</sup> P. Kuo, Y. Hsu, C. Chang, C. Lin, The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Letters*, 223, (2005), 293-301.

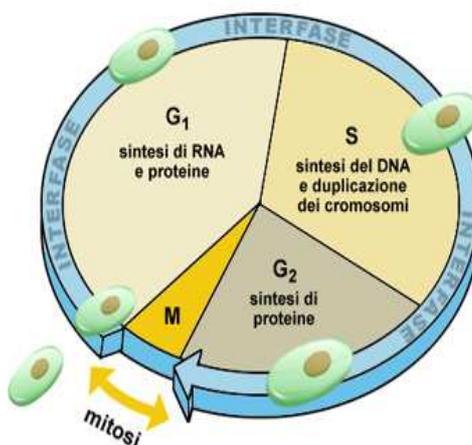


Fig. 53: Ciclo cellulare

Tra i composti a nucleo carbazolico in grado di indurre morte cellulare mediante differenti meccanismi importante è la mahanina (Fig. 46). In un recente studio, la mahanina è stata infatti identificata come agente pro-apoptotico nei confronti delle cellule HL-60 (cellule della leucemia mieloidee) U-937 (linea cellulare di origine monocitaria). Essa causa tutte quelle trasformazioni tipiche che culminano con l'apoptosi, producendo perdita del potenziale di membrana mitocondriale, traslocazione del citocromo *c* nel citosol e attivazione della caspasi 3. Quest'ultima attiva il DFF-45, un fattore di frammentazione genica di 45KDa, il cui compito è quello di "tagliare" i filamenti di DNA.<sup>35</sup>

Tra i derivati dell'ellipticina utilizzati nella pratica clinica molto importante è l'elliptinio (*Celiptium*<sup>®</sup>)<sup>36</sup> (Fig. 54). Tale derivato sembra avere un'elevata attività citotossica contro le cellule p53 mutanti mediante inibizione della fosforilazione della proteina p53. (La proteina p53 è un gene soppressore tumorale che si trova mutato in più del 50% dei tumori umani. Tale gene si attiva in seguito a danni al DNA innescando risposte cellulari come l'arresto della fase G1 e l'apoptosi).<sup>37</sup>

<sup>35</sup> M. Kumar Roy, V. Thalang, G. Trakoontivakorn, K. Nakahara. Mahanine, a carbazole alkaloid from *Micromelum minutum* inhibits cell growth and induces apoptosis in I-J937 cells through a mitochondrial dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, (2005), 145-155. *op. cit.*.

<sup>36</sup> T. Conroy. Principes et indications de la chimiothérapie anti-cancéreuse.

<sup>37</sup> Y. Pommier, O. Sordet, S. Antony, R. L. Hayward, K. W. Kohn. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, 23, (2004), 2934-2949. *op. cit.*.

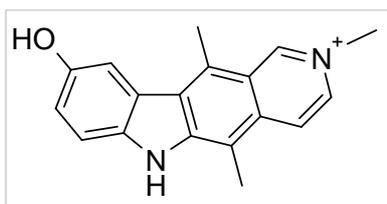


Fig. 54: Elliptinio (Celiptium®)

In linee cellulari quali MCF-7 (adenocarcinoma della mammella) i derivati 1,4-dimetil-9*H*-carbazolici, agiscono determinando un aumento dell'espressione di p53 ed inibendo la crescita cellulare attraverso l'amplificazione del processo apoptotico.<sup>38</sup>

Altri derivati come la 6-propilammina-ellipticina<sup>39</sup> (Fig. 55) e la 9-metossi-6-propilammina-ellipticina (Fig. 56) inducono rapida apoptosi in MDA-MB-231 (cellule tumorali del seno) mediante rilascio del citocromo *c* e variazioni conformazionali delle proteine Bax e Bak.

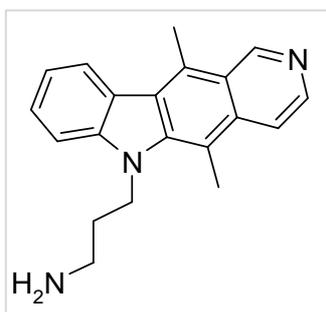


Fig. 55: 6-propilammina-ellipticina

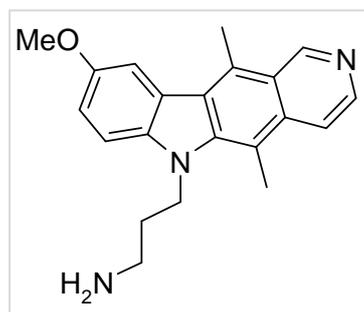


Fig. 56: 9-metossi-6-propilammina-ellipticina

Essi, inoltre provocano stress ossidativo a livello del reticolo endoplasmatico incrementando l'espressione del caperone GRP78. Diversi test evidenziano infatti una certa correlazione tra l'attività pro-apoptotica di tali derivati carbazolici e l'abilità di aumentare l'espressione del caperone GRP78.<sup>40</sup>

<sup>38</sup> P. Kuo, Y. Hsu, C. Chang, C. Lin, The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Letters*, 223, (2005), 293-301. *op. cit.*

<sup>39</sup> M. Hagg, M. Berndtsson, A. Mandic, R. Zhou, M. C. Shoshou e S. Linder. Induction of endoplasmatic reticulum stress by Ellipticine plant alkaloids. *Mol. Cancer. Ther.*, 3, (2004), 485-489.

<sup>40</sup> *Ibidem.* pg.489-497.

Tali composti, inducono inoltre “splicing” di RNA ed “encoding” del fattore trascrizionale XBP1, caratteristico nell'indurre stress ossidativo per attivazione della caspasi 12, soprattutto nelle cellule CT51 del colon.

Infine è stato dimostrato che l'ellipticina forma *in vitro* addotti covalenti con il DNA e che la formazione di tali addotti è dipendente dall'attivazione dell'ellipticina da parte degli isoenzimi del citocromo P450 (CYP);<sup>41</sup> la formazione di tali addotti è stata individuata come un nuovo meccanismo d'azione dell'ellipticina che può in parte spiegare la sua specificità come chemioterapico. Essa, viene pertanto considerata come un profarmaco la cui efficienza farmacologica dipende dalla sua attivazione enzimatica.<sup>42</sup>

### 3.3.3 Attività antitubulinica e antimitotica.

Da recenti dati riportati in letteratura è stato evidenziato che derivati a nucleo carbazolico sono anche in grado di indurre morte cellulare mediante inibizione della proteina tubulina.

La tubulina è una proteina globulare presente nel citoplasma sottoforma di subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , le quali si organizzano a loro volta in gruppi di 13 per formare strutture filamentose dette microtubuli. I microtubuli possiedono un'intrinseca polarità dovuta alla disposizione delle subunità proteiche di tubulina; essi possiedono inoltre una parte centrale vuota, circondata da filamenti lineari chiamati protofilamenti.<sup>43</sup>

Ciascun protofilamento è costituito da sequenze di eterodimeri di tubulina assemblati in modo che catene di tubulina omologhe, formino una geometria elicoidale destrorsa che stabilizza fortemente la struttura (Fig. 57):

---

<sup>41</sup> M. Stiborová, A. Breuer, D. Aimov, M. Stiborová-Rupertová, M. Wiessler, E. Frei. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by <sup>32</sup>P postlabeling. *International Journal of Cancer*, 107, (2003), 885-890.

<sup>42</sup> E. Frei, C. A. Bieler, V. M. Arlt, M. Wiessler, M. Stiborova. Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA in V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 64, (2002), 289-295.

<sup>43</sup> J. P. Liou, C. Y. Wu. 4- and 5-Aroylindoles as Novel Classes of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.*, 50, (2007), 4548-4552. *op. cit.*.

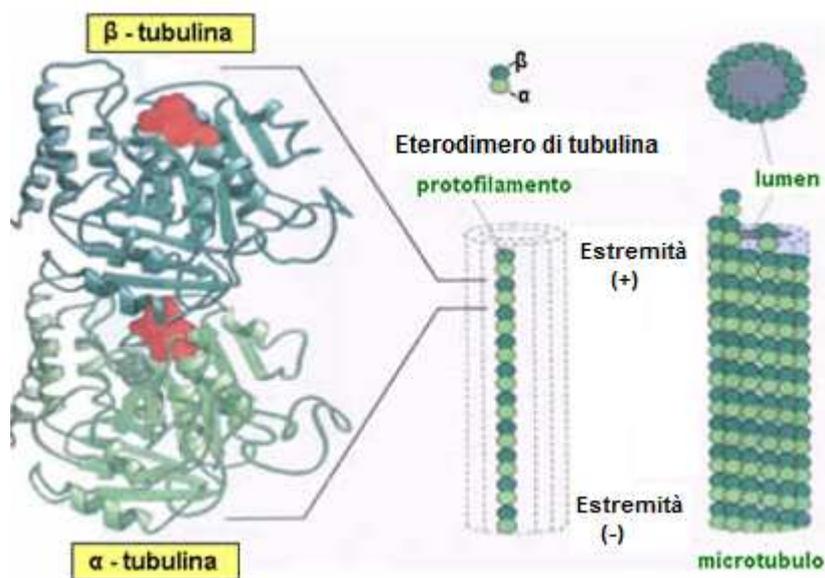


Fig. 57: Struttura di un microtubulo

I microtubuli sono strutture altamente dinamiche che si assemblano e si disassemblano in risposta alle funzioni cellulari; e in quanto costituenti del citoscheletro, svolgono una serie di funzioni di natura trofica e meccanica. I loro ruolo principale è tuttavia quello di ripartire, durante la mitosi, i cromosomi duplicati in cellule figlie attraverso la formazione del fuso mitotico.<sup>44,45</sup>

Durante la suddetta fase mitotica, la dinamicità dei microtubuli è notevolmente aumentata in quanto la formazione del fuso mitotico richiede la raccolta di tutte le subunità di tubulina disponibili nella cellula, e i microtubuli che formano il fuso, devono subire un processo dinamico di polimerizzazione e depolimerizzazione per potersi legare ai cromosomi correttamente e per separarli in modo sincrono ed efficiente.

I farmaci antimitotici, agiscono proprio sul processo di polimerizzazione/depolimerizzazione dei microtubuli.<sup>46</sup> A tal proposito si distinguono principi attivi detti destabilizzanti i microtubuli, e principi attivi detti stabilizzanti.

<sup>44</sup> M. A. Jordan, L. Wilson. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer*, 4, (2004), 253-265.

<sup>45</sup> [http://it.wikipedia.org/wiki/Fuso\\_mitotico](http://it.wikipedia.org/wiki/Fuso_mitotico).

<sup>46</sup> A. Jordan, J. A. Hadfield. Tubulin as a Target for Anticancer Drugs: Agents which Interact with the Mitotic Spindle. *Med. Res. Rev.*, 18, (1998), 259-296.

Nello specifico i composti come la vinblastina e la colchicina destabilizzano i microtubuli in quanto inibiscono la polimerizzazione della tubulina all'interno del fuso mitotico; mentre composti come il paclitaxel li stabilizzano poiché impediscono la depolimerizzazione dei microtubuli a tubulina durante la divisione cellulare legandosi ad essi.<sup>47</sup>

La perturbazione dell'equilibrio dinamico tubulina-microtubuli, in entrambi i casi, conduce all'arresto della divisione cellulare a livello della metafase ed all'induzione di apoptosi. L'avvio del processo apoptotico è una conseguenza del fatto che il fuso mitotico non è più integro e i cromosomi dispersi nel citoplasma si associano in raggruppamenti anomali.

Poiché i microtubuli intervengono nella crescita cellulare, essi sono da tempo oggetto di studi e considerati target farmacologici per il trattamento di diversi tumori, in quanto tali processi risultano accelerati nei casi di neoplasie.

Tutto ciò ha spinto i ricercatori verso lo studio di nuovi chemioterapici a potenziale attività antitubulinica e antimitotica.<sup>48</sup> In questo contesto si inseriscono gli studi relativi ai carbazoli solfonamidici<sup>49</sup> le cui strutture generali sono riportate nella figura 58.

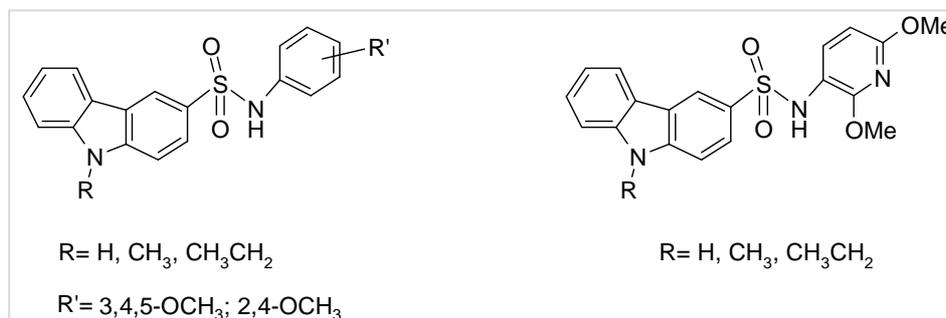


Fig. 58: Derivati solfonamidici

Gli effetti antiproliferativi di tali composti carbazolici solfonamidici, sono stati valutati su una serie di linee cellulari tumorali umane e murine, quali linee cellulari di cancro al seno (MCF-7), linee cellulari di leucemie (CEM), linee cellulari di epatocarcinomi murini.

<sup>47</sup> H. Openshaw, K. Beamon, W. SynoldT, et al. Neurophysiological study of peripheral neuropathy after high-dose paclitaxel: lack of neuroprotective effect of amifostine. *Clin Cancer Res.*, 10, (2004), 461-7.

<sup>48</sup> L. Hu, Z. R. Li, Y. M. Wang, Y. Wu, J. D. Jiang, D. W. Boykin. Novel pyridinyl and pyrimidinylcarbazole sulphonamides as antiproliferative agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, (2007), 1193-6.

<sup>49</sup> H. Laixing, L. Zhuo-rong. Synthesis and Structures-Activity Relationships of Carbazole Sulfonamides as a Novel Class of Antimitotic Agents Against Solid Tumors. *J. Med. Chem.*, 49, (2006), 6273-6282. *op. cit.*

In particolare, nelle linee cellulari (MCF-7), dopo solo 24 ore di trattamento, più del 50% delle cellule trattate, ha mostrato una dispersione cromosomica caratteristica dell'arresto mitotico in fase M con morte apoptotica di alcune cellule (Fig. 59).<sup>50</sup>

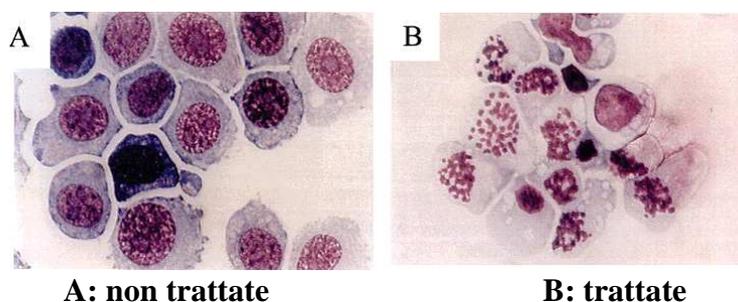


Fig. 59: Arresto mitotico e apoptosi delle linee cellulari MCF-7

Tra i suddetti derivati la *N*-(2,6-dimetossipiridin-3-il)-9-metilcarbazol-3-sulfonammide (IG-105) ( Fig. 60) mostra una potente attività contro le leucemie, i tumori al seno, fegato, colon e prostata con una  $IC_{50}$  compresa tra 0.0012 e 0.298  $\mu\text{mol/ml}$ .<sup>51</sup>

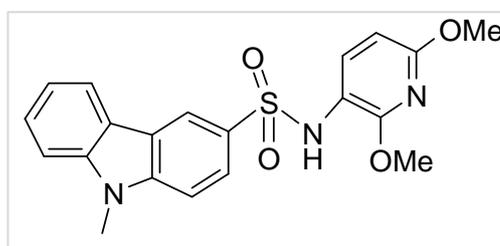


Fig. 60: IG-105

L'attività citotossica di tale derivato carbazolico sembra dovuto a differenti meccanismi quali: inibizione dell'assemblaggio dei microtubuli seguito da arresto del ciclo cellulare nella fase M, inattivazione di Bcl2 ed induzione dell'apoptosi attraverso l'attivazione delle caspasi. Tale composto determina inoltre un accumulo della ciclina B1, la quale, non viene degradata e si pone in un punto cardine tra l'arresto mitotico e

<sup>50</sup> Ibidem.

<sup>51</sup> Y. M. Wang, L. X. Hu, Z. M. Liu, X. F. You, S. H. Zhang, J. R. Qu, Z. R. Li, Y. Li, W. J. Kong. *N*-(2,6-Dimethoxypyridine-3-yl)-9-Methylcarbazole-3-Sulfonamide as a novel tubulin ligand against human cancer. *Clinical Cancer Research*, 14 (19), (2008), 6218-6227.

l'induzione dell'apoptosi. La ciclina B1 fosforila Bcl2, una proteina integrale della membrana mitocondriale. Essa risulta essere inattivata e quindi incapace di formare un eterodimero con il fattore pro-apoptotico BAX. Tale processo induce l'attivazione di più caspasi, come la caspasi 3-8 e 9.<sup>52,53</sup> Inoltre, viene aumentata l'espressione di p53 e p21, i quali inducono la cellula all'apoptosi.

Diversamente dagli altri agenti antitubulinici, tale derivato è attivo anche verso linee cellulari tumorali epatiche multi-resistenti dette SMMC-7721. Non per ultimo, presenta una bassa tossicità e non causa perdita di peso o anomalie nel comportamento.<sup>54</sup>

Altro derivato rilevante è la 9-etil-N-(3,4,5-trimetossifenil)-carbazol-3-sulfonammide<sup>55</sup> (Fig. 61). Tale composto mostra una significativa attività antitumorale nei confronti delle MCF-7 (linee cellulari di cancro al seno) e delle BEL-7402 (linee cellulari di tumore epatico) mediante l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi dovuta all'aumentata l'espressione di p53 ed alla fosforilazione di Bcl2. Inaspettatamente, a differenza degli altri derivati solfonamidici, essa inibisce debolmente la polimerizzazione della tubulina probabilmente per la sua interazione con la dineina e la kinesina, proteine cosiddette "motore" in quanto regolatrici del movimento dei microtubuli all'interno del fuso mitotico.

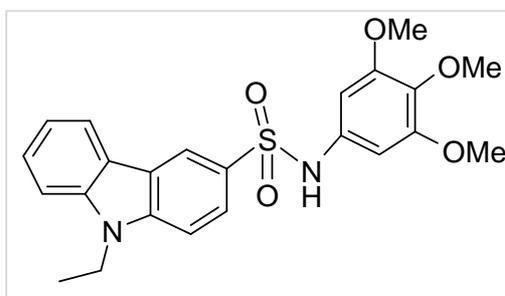


Fig. 61: 9-Etil-N-(3,4,5-trimetossifenil)-carbazol-3-sulfonammide

<sup>52</sup> Ibidem.

<sup>53</sup> R. B. Tishler, D. M. Lamppu, S. Park, B. D. Price. Microtubule-active drugs Taxol, vinblastine, and nocodazole increase the levels of transcriptionally active p53. *Cancer Res.*, 55, (1995), 6021-5.

<sup>54</sup> J. N. Li, D. Q. Song, Y. H. Lin, et al. Inhibition of microtubule polymerization by 3-bromopropionylamino benzoylurea (JIMB01), a new cancericidal tubulin ligand. *Biochem. Pharmacol.*, 65, (2003), 1691-9.

<sup>55</sup> L. Hu, Z. R. Li, Y. Li, J. Qu, Y. H. Ling, J. D. Jiang e D. W. Boykin. Carbazoles Sulfonamides as a novel class of antimetabolic agents against solid tumor. *J. Med. Chem.*, 49, (2006), 6273-6282.

### 3.3.4 Inibizione delle mieloperossidasi.

Il sistema enzimatico delle mieloperossidasi, rappresenta un “marker” biologico molto importante per l'individuazione dello stress ossidativo delle cellule in particolari condizioni; a tal proposito molti studi hanno evidenziato l'iperattività di tale sistema in varie patologie ed in alcune forme di cancro.

Tra gli inibitori delle mieloperossidasi in qualità di antitumorali sono riportati in letteratura numerosi derivati a nucleo carbazolico appartenenti alla classe degli intercalanti.<sup>56</sup>

Le mieloperossidasi (MPO) sono degli enzimi presenti all'interno dei granuli azzurofilo dei neutrofilo polimorfonucleati e dei macrofagi e possono essere rilasciati nei fluidi extracellulari durante il processo infiammatorio. La funzione principale di tale sistema enzimatico risulta essere quella di microbicida durante il processo di fagocitosi. Quando i microrganismi esterni entrano all'interno dell'organismo umano, vengono attaccati dai neutrofilo polimorfonucleati e dai macrofagi, i quali li fagocitano e li invaginano all'interno di strutture dette fagosomi. Nei fagosomi, vengono riversati diversi sistemi enzimatici microbicidi, tra cui il sistema delle mieloperossidasi che viene rilasciato insieme al perossido d'idrogeno.<sup>57</sup>

La mieloperossidasi è una emoproteina che catalizza la conversione del cloruro e del perossido d'idrogeno in acido ipocloroso, HClO, specie molto reattiva.<sup>58</sup> Quest'ultimo reagisce con il perossido d'idrogeno, per formare ossigeno radicalico capace di ossidare diverse molecole organiche, quali lipidi di membrana, proteine, acidi nucleici e carboidrati.<sup>59</sup>

Queste ossidazioni, possono portare di conseguenza a perdita del trasporto attraverso la membrana microbica, interruzione del trasporto elettronico a livello delle membrane, dissipazione dell'energia metabolica, soppressione della sintesi del DNA ed infine degenerazione e morte cellulare. Quindi se da una parte, le mieloperossidasi

---

<sup>56</sup> W. Sajewicz, A. Dlugosz. Cytotoxicity of some Potential DNA Intercalators (Carbazole, Acridine and Anthracene Derivatives) Evaluated through Neutrophil Chemiluminescence. *J. Appl. Toxicol.*, 20, (2000), 305-312.

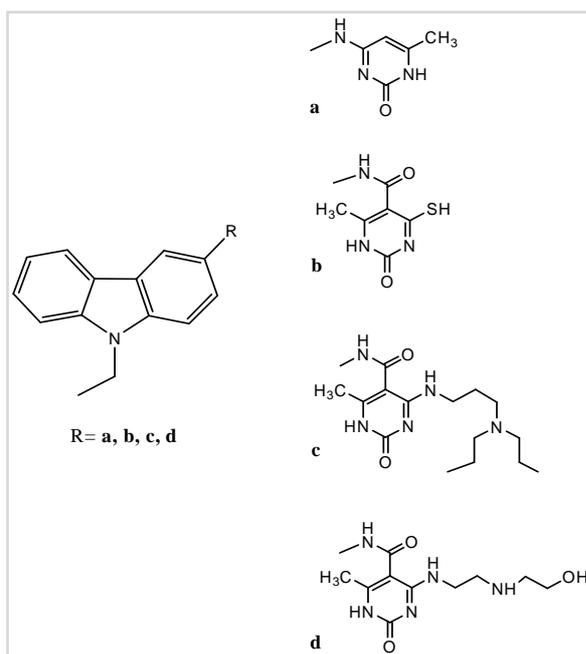
<sup>57</sup> J. Schultz, K. Kaminker. Myeloperoxidase of the Leucocyte of normal human blood. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, (1962), 465-467.

<sup>58</sup> N. Takahito, U. Makiko. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*, 106, (23) (2002), 2894-2900.

<sup>59</sup> S. J. Klebanoff. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, 77, (2005), 598-615. *op. cit.*.

rappresentano un efficiente sistema antimicrobico, dall'altra rappresentano un sistema enzimatico produttore di specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS), capaci di dare danno ossidativo.

Il meccanismo d'inibizione delle mieloperossidasi da parte dei composti a nucleo carbazolico (Tab. 5), probabilmente è dovuto all'ossidazione delle specie radicaliche prodotte dal sistema stesso, con conseguente diminuzione del danno citotossico nelle linee cellulari tumorali sottoposte al trattamento.



Tab. 5: Derivati carbazolici con attività sulle mieloperossidasi

La capacità di tali composti di inibire il sistema delle mieloperossidasi nei neutrofili polimorfonucleati è stata valutata mediante la tecnica di chemiluminescenza luminol-dipendente.<sup>60</sup>

La chemiluminescenza, è un fenomeno che consiste nell'emissione di luce da parte di composti radicalici formati dalle reazioni di ossidazione, tipiche delle mieloperossidasi. Tale tecnica si avvale dell'utilizzo del composto luminol (Fig. 62), il quale viene ossidato dalle specie reattive prodotte dalle mieloperossidasi, quali HClO e ROS, con produzione di chemiluminescenza.<sup>61</sup> L'intensità della luce emessa dalle cellule, è direttamente

<sup>60</sup> W. Sajewicz, A. Dlugosz. Cytotoxicity of some Potential DNA Intercalators (Carbazole, Acridine and Anthracene Derivatives) Evaluated through Neutrophil Chemiluminescence. *J. Appl. Toxicol.*, 20, (2000), 305-312. *op. cit.*.

<sup>61</sup> Ibidem.

proporzionale alla quantità di specie radicaliche prodotte dal sistema delle mieloperossidasi.



Fig. 62: Struttura Luminol

In presenza di composti a nucleo carbazolico è stata osservata la mancata produzione di chemiluminescenza attribuibile alla capacità di tali composti di inibire il sistema enzimatico delle mieloperossidasi, con mancata produzione di specie radicaliche reattive, dannose per le cellule.

Il meccanismo d'inibizione delle mieloperossidasi, da parte dei composti carbazolici presi in esame, probabilmente è dovuto all'ossidazione delle specie radicaliche prodotte dal sistema stesso, con conseguente diminuzione del danno citotossico nelle linee cellulari tumorali sottoposte al trattamento.<sup>62</sup>

Considerando il duplice effetto che gli enzimi MPO possiedono in quanto possono essere potenti agenti protettivi grazie alla loro azione microbica nei neutrofili ma, possono essere altrettanto dannosi in quanto esplicano la loro azione a livello extracellulare a seguito del loro elevato potere ossidante; e tenendo conto del loro coinvolgimento in numerose ed importanti patologie, indubbiamente la sintesi di nuovi composti in grado di inibire tale sistema, potrà dare importanti risultati terapeutici.

---

<sup>62</sup> Ibidem.

## Capitolo IV:

# Nuove proprietà terapeutiche del nucleo carbazolico

---

## NUOVE PROPRIETÀ TERAPEUTICHE DEL NUCLEO CARBAZOLICO

### 4.1 Composti carbazolici antagonisti NPY5 usati per il trattamento dell'obesità.

L'obesità rappresenta uno dei maggiori problemi della società occidentale ed è un fattore di rischio per diverse patologie, soprattutto quelle cardiovascolari. Numerose sono state pertanto, le ricerche volte alla comprensione dei meccanismi neurochimici che stanno alla base dell'assunzione del cibo e dello stimolo all'appetito.

Tra i diversi sistemi studiati quello che ha suscitato maggiore interesse è il neuropeptide Y, i suoi recettori e gli eventuali antagonisti recettoriali che potrebbero inibire i processi alla base dell'appetito.<sup>1,2</sup> Tali studi hanno indotto molti ricercatori alla progettazione di nuovi principi attivi, tra cui i derivati a struttura ammino-carbazolica<sup>3</sup> che, dai primi test effettuati, risultano essere potenti e selettivi inibitori del neuropeptide Y5.

Tali composti, nonostante abbiano una bassa biodisponibilità orale e una potenziale tossicità (dovuta al frammento amminico rilasciato), rappresentano un interessante punto di partenza per la terapia clinica dell'obesità. Di particolare interesse è risultato il derivato 3-ammino-9-isopropil-4-metil-9H-carbazolo (Fig. 63).

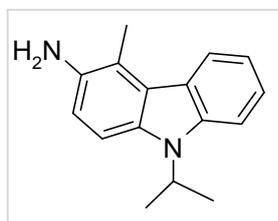


Fig. 63: 3-ammino-9-isopropil-4-metil-9H-carbazolo

<sup>1</sup> G. F. Di Bona. Neuropeptide Y. *Am. J. Physio.*, (2002). *op. cit.*

<sup>2</sup> E. Parker, M. Van Heek, A. Stamford. Neuropeptide Y receptors as targets for anti-obesity drug development: perspective and current status. *Eur. J. Pharmacol.*, (2002).

<sup>3</sup> M. H. Block, S. Boyer, W. Brailsford, D. R. Brittain, D. Carroll, S. Chapma, D. S. Clarke, C. S. Donald, K. M. Foote, L. Michael, R. O'Donovan, J. Elizabeth Pease, A. G. Pickup, J. W. Rayner, A. Roberts, P. Schofield, A. Suleman, and A. V. Turnbull. Discovery and Optimization of a Series of Carbazole Ureas as NPY5 Antagonists for the Treatment of Obesity. *J. Med. Chem.*, 45, (2002), 3509-3523.

Al suddetto derivato, al fine di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche e di ridurre la mutagenicità (dimostrata con il test di Ames), sono state in seguito apportate modifiche strutturali, quali, per esempio, l'aggiunta di una catena laterale al gruppo amminico in posizione C-3 ottenendo l'*N*-(9-isopropil-4-metil-9*H*-carbazol-3-il)-morfolin-4-carbossamide (Fig. 64); o l'introduzione di atomi di F a livello del C-2 e C-4 del nucleo carbazolico ottenendo l'*N*-(2,4-difluoro-9-isopropil-9*H*-carbazol-3-il)-morfolin-4-carbossammide (Fig. 65)

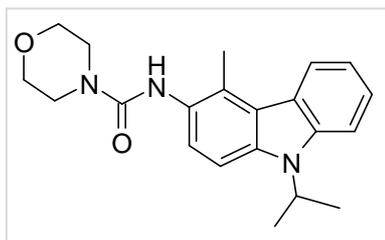


Fig. 64: *N*-(9-isopropil-4-metil-9*H*-carbazol-3-il)-morfolin-4-carbossamide

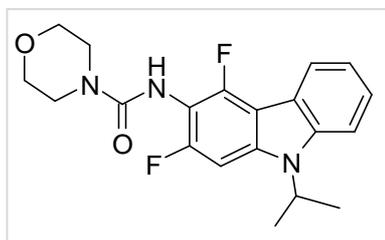


Fig. 65: *N*-(2,4-difluoro-9-isopropil-9*H*-carbazol-3-il)-morfolin-4-carbossammide

Dagli studi condotti è emerso che il gruppo isopropilico sull'atomo di azoto carbazolico favorisce il legame con il recettore e diminuisce la mutagenicità rispetto ai gruppi *N*-Me ed *N*-Et; così come la presenza di gruppi NH e NHCO a livello del nucleo carbazolico oltre a migliorare il legame con il recettore rende la molecola più selettiva. Importante è risultata anche la sostituzione 2,4-difluoro (Fig. 65) perché sembra potenziare l'azione e ridurre l'effetto mutageno.

In particolare, l'*N*-(9-isopropil-4-metil-9*H*-carbazol-3-il)-morfolin-4-carbossamide (NPYSRA-972) (Fig. 64) non solo lega con alta affinità il recettore, ma possiede anche un'eccellente selettività nei confronti di diversi sottotipi recettoriali e nei confronti di altri recettori, enzimi e trasportatori. Mostra ad esempio una buona affinità per il recettore 5-HT2B con parziale inibizione del trasportatore dell'adenosina. Questo derivato inoltre,

subisce poche trasformazioni metaboliche *in vitro* ed ha un'eccellente farmacocinetica includendo una bassa clearance renale, buona disponibilità orale, un'emivita di 3-7 ore, buona capacità di attraversare la barriera emato-encefalica (BEE). Tuttavia tale molecola non blocca completamente lo stimolo dell'appetito poiché alla base di tale processo sembrano coinvolti altri fattori neurochimici.<sup>4</sup>

## 4.2 Carbazoli complessati con ammidi macrocicliche a potenziale attività antimicrobica.

La sintesi di nuove molecole a nucleo carbazolico,<sup>5</sup> complessate con sistemi di diversa natura, quali, per esempio, macrolidi è attualmente oggetto di studio per diversi chimici sintetici, in quanto, la sostituzione di atomi di ossigeno nella corona eterea con gruppi ammidici ed esterei potrebbe risultare interessante per l'interazione con sistemi biologici costituiti da proteina-metallo.

A tale scopo sono riportati in letteratura la sintesi e la valutazione biologica di "supermolecole" a nucleo carbazolico<sup>6,7</sup>(Tab. 6) dotate di attività antibatterica ed antimicotica probabilmente dovute alla struttura conformazionale rigida di tali molecole.

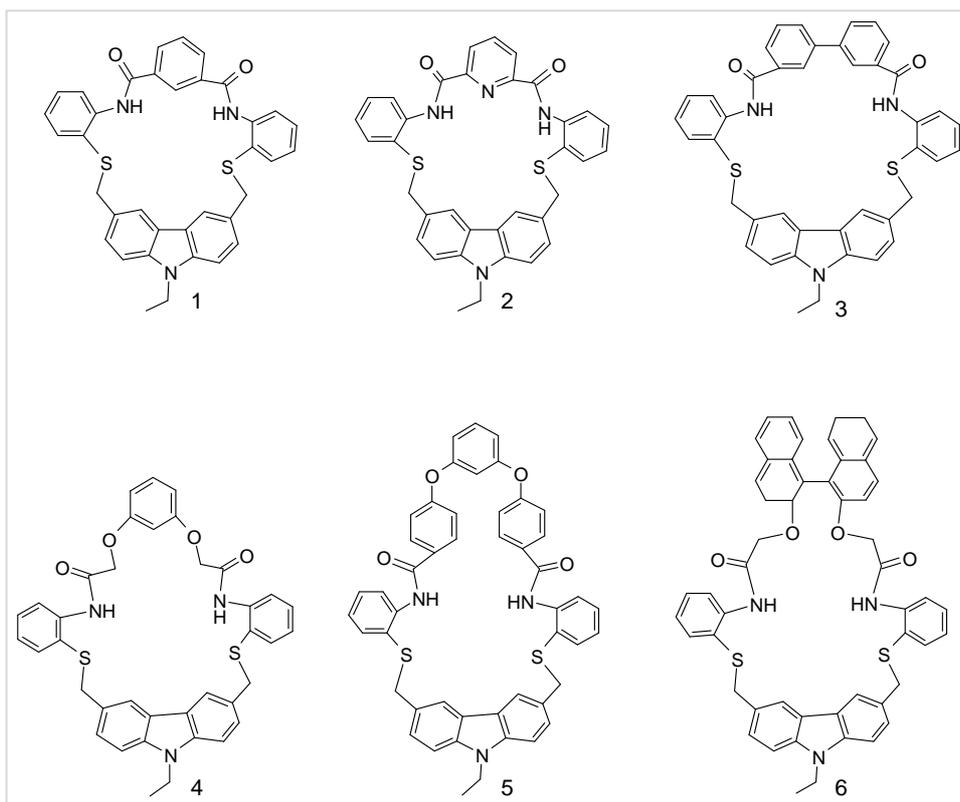
---

<sup>4</sup> Ibidem.

<sup>5</sup> P. Rajakumar, K. Sekar, V. Shanmugaiah and N. Mathivanan. Synthesis of novel carbazole based macrocyclic amides as potential antimicrobial agents. *European J. Med. Chem.*, 44, (2009), 3040-3045.

<sup>6</sup> K. Tani, Y. Tohda, K. Hisada, M. Yamamoto. *Chem. Lett.*, (1996), 145.

<sup>7</sup> P. Rajakumar, R. Kanagalatha. *Tetrahedron*, 62, (2006), 9735.



Tab. 6: Carbazoli a potenziale attività antibatterica

Le suddette molecole sono state testate su differenti ceppi batterici quali il *P. Mirabilis*, *P. Vulgaris*, *S. Aureus*, *Salmonella Typhi* e su funghi patogeni quali *Rhizoctomia Solaris*, *Macroformina Phaseolina*, *Curvularia Lunata* e *Alternaria Alternata*.<sup>8</sup> Dai risultati ottenuti è risultato che le molecole esibiscono diversi gradi di attività antibatterica, sono dose-dipendenti e maggiormente efficaci a concentrazioni più alte. La MIC (concentrazione minima inibente), di tali composti si aggira nel range di 5-80 µg/ml. Tra tutti il derivato № 6 risulta essere il più attivo (MIC compresa tra i 5-10 µg/ml), seguito dal derivato № 2 (con una MIC compresa tra i 5-30µg/ml).

Parallelamente all'attività antibatterica, tutti i composti esibiscono un'attività antifungina presentando valori di MIC compresi tra 10-45µg/ml. Anche in questo caso i derivati che hanno mostrato maggiore attività contro i funghi patogeni utilizzati, sono i carbazolofani № 6 e № 2 (MIC compresa tra i 10-20µg/ml).

<sup>8</sup> A. Pandurangan, N. Mathivanan, V.R. Prabavathy, V. Kabilan, V. Murugesan, K. Murugesan. *Indian J. Exp. Biol.*, 33, (1995), 357.

Considerando i risultati ottenuti si può concludere che tra tutte le molecole testate (Tab. 6) il carbazolofano № 6 è quello che agisce sia da eccellente antibatterico che da antimicotico.<sup>9</sup>

Studi d'interazione tra queste molecole ed i più importanti sistemi anionici biologici sono tuttora in corso.

### 4.3 Attività antimicotica di nuove molecole a nucleo carbazolico.

L'incidenza di infezioni fungine in pazienti immunocompromessi è notevolmente aumentata negli ultimi due decenni. Sempre più frequenti infezioni causate da funghi appartenenti al genere *Candida Albicans* e *Cryptococcus Neoformans*, risultano infatti resistenti agli antifungini azolici largamente impiegati per tali trattamenti. Alla luce di questi sviluppi, diventa pertanto indispensabile l'introduzione nella pratica clinica di nuovi agenti antifungini.<sup>10</sup>

A tale proposito, recenti studi *in vitro* condotti su differenti serie di composti tra cui anche derivati a nucleo carbazolico, hanno evidenziato che essi presentano un'attività inibitoria nei confronti di questi due funghi (*C. Albicans* e *C. Neoformans*) più potente di quella mostrata dal fluconazolo o dall'amfotericina B.

Tali studi evidenziano che il nucleo carbazolico risulta avere proprietà antifunginee soprattutto nei confronti della *Candida Neoformans*. Dalla tabella 7, si nota come gli analoghi 2,7 disostituiti (№ 10, № 11 e № 12) siano più efficaci rispetto ai corrispondenti 3,6 disostituiti (№1, №3 e №5) contro i suddetti ceppi. L'unica eccezione riguarda il composto №9 sostituito nelle posizioni 3 e 6 da una catena benzoimidazolica. Dai test effettuati il composto più attivo risulta essere il carbazolo № 10, che presenta una MIC= 0,78µg/ml ed una MFC= 1,56µg/ml (concentrazione minima fungina).<sup>11</sup>

---

<sup>9</sup> P. Rajakumar, K. Sekar, V. Shanmugaiah and N. Mathivanan. Synthesis of novel carbazole based macrocyclic amides as potential antimicrobial agents. *European J. Med. Chem.*, 44, (2009), 3040-3045. *op. cit.*

<sup>10</sup> M. L. Cameron, W. A. Schell, S. Bruch, J. A. Bartlett, H. A. Waskin, and J. R. Perfect. Correlation of *in vitro* fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, (1993), 2449–2453.

<sup>11</sup> M. Del Poeta, W. A. Schell, C. C. Dykstra, S. K. Jones, R. R. Tidwell, A. Kumar, D. W. Boykin and J. R. Perfect. *In Vitro* Antifungal Activities of a Series of Dication-Substituted Carbazoles, Furans and Benzimidazoles, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (1998), 2503–2510.

Composto	X <sub>1</sub> <sup>a</sup>	X <sub>2</sub> <sup>a</sup>	Posizione X	R	<i>C. albicans</i>		<i>C. neoformans</i>	
					MIC (μg/ml)	MFC (μg/ml)	MIC (μg/ml)	MFC (μg/ml)
1	Am	Am	3,6	H	25	25	12.5	25
2	Am	Am	3,6	CH <sub>3</sub>	100	>100	25	50
3	Im	Im	3,6	H	>100	>100	3.12	25
4	IsopropAm	IsopropAm	3,6	H	>100	>100	>100	>100
5	Im	Im	3,6	CH <sub>3</sub>	50	>100	1.56	1.56
6	Im	Im	3,6	CHM	25	25	1.56	3.12
7	THP	THP	3,6	CHM	100	>100	6.25	6.25
8	THP	THP	3,6	CH <sub>3</sub>	>100	NT	25	50
9	BzIm	BzIm	3,6	H	1.56	6.25	3.12	6.25
10	Am	Am	2,7	H	0.78	1.56	6.25	50
11	Im	Im	2,7	H	3.12	3.12	1.56	3.12
12	Im	Im	2,7	CH <sub>3</sub>	12.5	50	1.56	3.12
13	BzIm	BzIm	2,7	H	100	>100	25	50
14	Im	OCH <sub>3</sub>	2,7	H	>100	>100	>100	NT
15	Im	OCH <sub>3</sub>	2,7	CH <sub>3</sub>	>100	>100	>100	NT

NT, non testato

Leggenda:

Am

Im

THP

CHM

BzIm

IsopropAm

 Tab. 7: Strutture ed attività *in vitro* dei carbazoli diversamente sostituiti

#### 4.4 Carbazoli a potenziale attività antimalarica.

La malaria è una malattia infettiva causata dal protozoo *Plasmodium*, trasmesso all'uomo da un vettore specifico, la zanzara anofele. Essa risulta diffusa soprattutto nelle zone tropicali e subtropicali e, negli ultimi anni, ha mostrato una certa resistenza al trattamento dei tradizionali farmaci. Ciò ha condotto molti studiosi a ricercare nuovi antimalarici<sup>12,13</sup> che avessero come “target” l'enzima mitocondriale diidrodoorotato

<sup>12</sup> R. Pink, A. Hudson, M. A. Mouries, M. Bendig. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 4, (2005), 727-740.

<sup>13</sup> H. Tamta, A. K. Mukhopadhyay. Biochemical targets for malaria chemotherapy. *CRIPS*, 4, (2003), 6-9.

deidrogenasi il quale catalizza la quarta tappa della biosintesi *de novo* dei nucleotidi pirimidinici ovvero: la reazione di ossidazione del diidroorotato ad orotato.<sup>14</sup>

L'inibizione di tale via biosintetica rappresenta un obiettivo fondamentale per i nuovi potenziali farmaci antimalarici in quanto viene bloccata la "via" che consente il recupero delle basi pirimidiniche.

Da recenti dati riportati in letteratura si evidenzia, che i composti inibitori si legano al residuo *N*-terminale del canale idrofobico dell'enzima diidroorotato deidrogenasi impedendo in questo modo l'ossidazione del diidroorotato ad orotato e conseguentemente la crescita delle colture parassitarie.

I modelli studiati suggeriscono inoltre che la capacità inibitoria di questi principi attivi si basa sulla complementarietà tra le regioni idrofobiche della molecola inibitrice e le regioni idrofobiche degli enzimi, nonché sulle interazioni di tali inibitori con i residui amminoacidici F88, H185 ed R265. A tal proposito, sono stati identificati diversi composti, tra cui il 2-ciano-3-(9-etil-9*H*-carbazol-3-il-ammino) acrilato di etile (Fig. 66).<sup>15</sup>

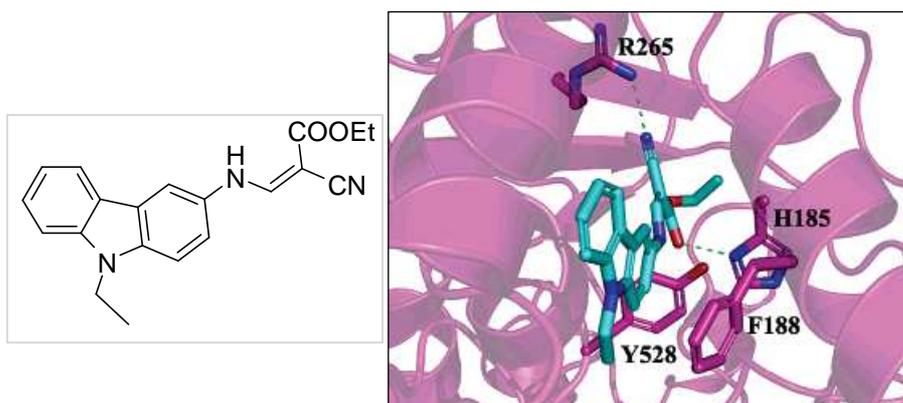


Fig. 66: Legame del 2-ciano-3-(9-etil-9*H*-carbazol-3-il-ammino) acrilato di etile con l'enzima

Per comprendere meglio l'interazione di tale derivato carbazolico con l'enzima sono stati costruiti dei modelli usando la cristallografia ai raggi X. Tali studi, hanno consentito di capire come questo composto si leghi, con alta affinità, al canale idrofobico tramite la formazione di legami ad idrogeno con alcuni residui amminoacidici. Dalla figura

<sup>14</sup> L. Bolognanini, N. Volpi. *Tavole metaboliche-Google-libri*, (1998), 166.

<sup>15</sup> T. Heikkila, C. Ramsey, M. Davies, C. Galtier, A. M. W. Stead, A. Peter Johnson, Colin W. G. Fishwick, A. N. Boa, and G. A. McConkey. Design and Synthesis of Potent Inhibitors of the Malaria Parasite Dihydroorotate Dehydrogenase. *J. Med. Chem.*, 50, (2007), 186-191.

66 si evince che l'atomo di azoto della catena laterale interagisce con il residuo R265 mentre l'ossigeno carbonilico, con H185. Altre interazioni si hanno con i residui Y528 e F188.

Dalla cristallografia RX emerge come la struttura planare dei carbazoli sia fondamentale per l'ingresso e per l'interazione con il canale stesso.

Il suddetto composto ha mostrato infatti una notevole attività nei confronti di colture parassitarie responsabili della malaria con una  $IC_{50}$  di  $4.0 \pm 1.2 \mu M$ .<sup>16</sup>

Questi risultati evidenziano come l'enzima diidrodiootato deidrogenasi possa essere quindi il nuovo obiettivo per gli interventi chemioterapici nella prevenzione della malaria.

#### **4.5 EPED3: nuovo antineoplastico carbazolico usato nel trattamento del mieloma multiplo.**

Il mieloma multiplo è un tumore dell'età avanzata che colpisce le plasmacellule, componenti molto importante del sistema immunitario. Il ruolo delle plasmacellule, che si trovano soprattutto nel midollo osseo, è quello di produrre e liberare anticorpi per combattere le infezioni, ma in alcuni casi la loro crescita procede in maniera incontrollata dando origine al tumore.<sup>17</sup>

Con il progredire della malattia il midollo osseo sviluppa una certa resistenza a diversi antitumorali ed è irreversibile in diversi casi. Tramite l'analisi del genoma e lo "screening" molecolare sono emerse varie anomalie che potrebbero essere la causa scatenante.

Una delle più importanti scoperte è stata l'amplificazione e la superespressione del gene Cdc28, che codifica per la proteina chinasi regolatrice CKS1B, localizzato sul cromosoma 1q21.

Per individuare nuovi principi attivi è stata messa in relazione l'espressione del gene e l'attività del principio attivo preso ad esame. Da questa analisi è risultato che l'ellipticina e, soprattutto i suoi derivati sintetici, mostrano una forte correlazione tra l'inibizione della crescita ( $IC_{50}$ ) nelle linee cellulari NCI-60 (linee cellulari mielomatose) e l'espressione del suddetto gene.

---

<sup>16</sup> Ibidem.

<sup>17</sup> <http://www.airc.it>.

Il composto più attivo risulta essere l'EPED3 (Fig. 67) che presenta un'alta affinità *in vitro* per le cellule del mieloma. L'EPED3<sup>18</sup> è un derivato idrofilico dell'ellipticina, funzionalizzato in posizione 9 (Fig. 67). Esso induce l'arresto del ciclo cellulare ed una progressione apoptotica che sembra essere una conseguenza dell'effetto del composto sugli organelli citoplasmatici, particolarmente sui mitocondri.

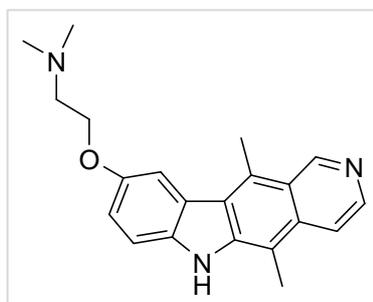


Fig. 67: EPED3

Gli studi condotti finora hanno dimostrato che esso agisce attraverso vari meccanismi e regola l'apoptosi tramite l'attivazione delle caspasi 9. Per visualizzare l'attività dell'EPED3 e la sua distribuzione a livello cellulare si è sfruttato il suo effetto alla fluorescenza osservando un'immediata permeabilità con distribuzione nel citosol entro 15 minuti. Dopo sei ore si evidenziano la formazione di grandi vacuoli e l'innescarsi della disintegrazione della membrana cellulare con formazione dei cosiddetti "corpi apoptotici".

Il composto EPED3 agisce anche a livello mitocondriale causando la lisi dei mitocondri ed il rilascio del citocromo *c*, con effetti devastanti sulla fosforilazione ossidativa e sulla deplezione dell'energia chimica della cellula. Infine tale composto, risulta essere meno sensibile alle pompe multi farmaco, le quali funzionano come veri e propri sistemi di difesa per le cellule tumorali regolando l'eliminazione del farmaco e aumentando la chemio-resistenza.<sup>19</sup>

<sup>18</sup> E. Tian, T. H. Landowoski, O. W. Stephens, S. Yaccoby, B. Barlogic e J. D. Shaughnessy. Ellipticine derivatives NSC 338258 (EPD3) represents a potenzial new antineoplastic agents for the treatment of multiple myeloma. *Mol. Cancer. Ther.*, 7, (2008), 1158-1164.

<sup>19</sup> Ibidem.

# Capitolo V: Scopo della Ricerca

---

## SCOPO DELLA RICERCA

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un ampio progetto di ricerca riguardante lo studio di molecole a nucleo 1,4-dimetil-9*H*-carbazolico (D.M.C.) (Fig. 68).

Obiettivo principale è stato pertanto lo studio chimico-farmaceutico, la caratterizzazione e la valutazione biologica di nuove molecole a struttura carbazolica aventi potenziale attività antitumorale e profili farmacologici e farmacocinetici migliorati rispetto ai derivati naturali già comunemente impiegati in terapia.<sup>1,2,3</sup>

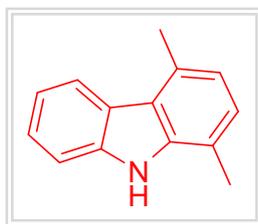


Fig. 68: Nucleo 1,4-dimetil-9*H*-carbazolico (D.M.C.)

Il CERMN, Centro di Studi e di Ricerca dei Medicamenti della Normandia, presso il quale ho svolto una buona parte del lavoro sperimentale di tesi si interessa da tempo con successo dello studio di composti a nucleo carbazolico.

Di recente, infatti è stata riportata in letteratura la sintesi e l'attività biologica di nuovi composti carbazolici (Tab. 8).<sup>4,5,6</sup>

<sup>1</sup> W. K. Anderson, A. Gopalsamy, P. S. Reddy. *J. Med. Chem.*, 37, (1994), 1955-1963.

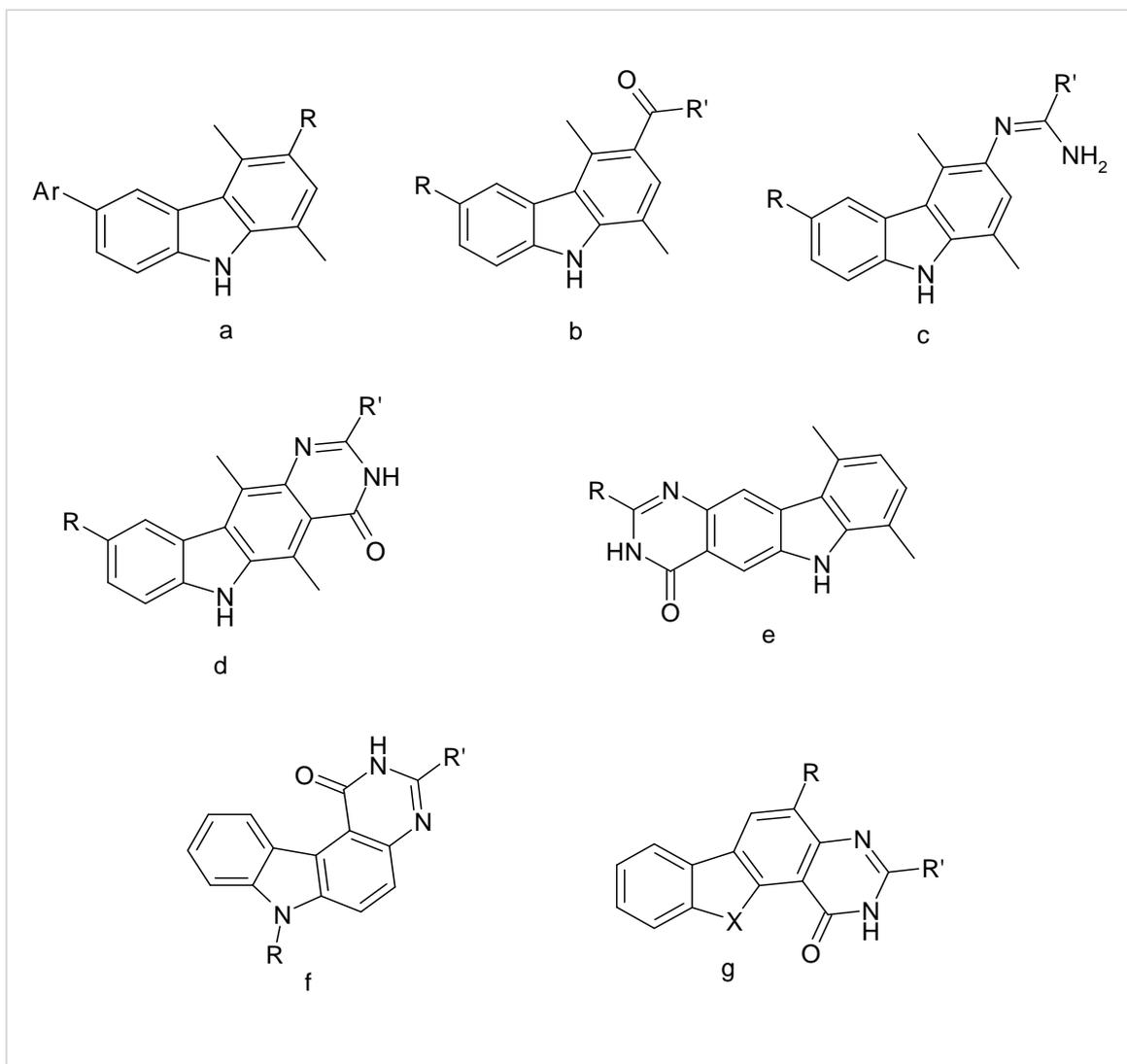
<sup>2</sup> T. Conroy. *Principes et indications de la chimiothérapie anti-cancéreuse. op. cit.*

<sup>3</sup> M. Romero, P. Renard, D. H. Caignard, G. Atassi, X. Solans, P. Constance, C. Bailly, M. D. Pujol. *J. Med. Chem.*, 50, (2007), 294-307.

<sup>4</sup> A. Caruso, A. S. Voisin-Chiret, J. C. Lancelot, M. S. Sinicropi, A. Garofalo, S. Rault. Efficient and simple synthesis of 6-Aryl-1,4-dimethyl-9*H*-carbazoles. *Molecules*, 13, (2008), 1312-1320.

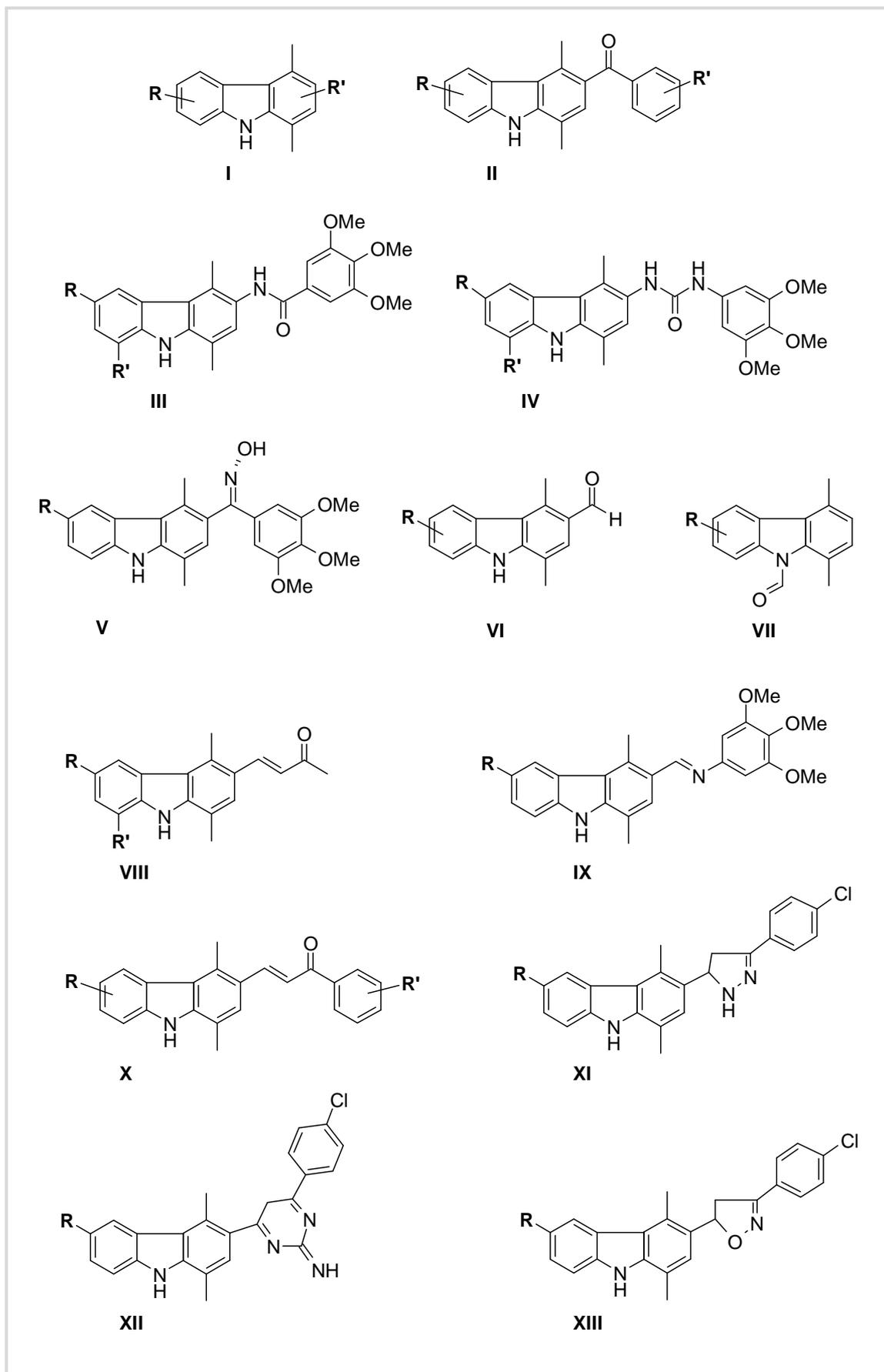
<sup>5</sup> A. Caruso, A. S. Voisin-Chiret, J. C. Lancelot, M. S. Sinicropi, A. Garofalo, S. Rault. Novel and efficient synthesis of 5,8-dimethyl-9*H*-carbazol-3-ol via a hydroxydeboronation reaction. *Heterocycles*, 71, (2007), 2203-2210.

<sup>6</sup> A. Caruso. Synthesis of novel dimethylcarbazole, dimethylpyrimidocarbazole, benzofuro quinazolinone, benzothienoquinazolinone derivatives with potential anticancer activity. Ph.D. Thesis, (17.12.2008), University of Calabria-Italy.



Tab. 8

I composti studiati nel presente lavoro (Tab. 9; Serie I-XIII), ottenuti mediante semplici metodiche sintetiche e a bassi costi, sono strutturalmente correlati e opportunamente funzionalizzati rispetto agli analoghi già riportati in letteratura.



Tab. 9: Nuove library di derivati carbazolicci (Serie I-XIII)

Nello specifico nella prima fase di tale progetto di ricerca si sono preparate le seguenti serie degli:

- *1,4-dimetil-9H-carbazoli diversamente sostituiti (2a-i);*
- *1,4-dimetil 3-nitro, 6-nitro, e 3,6-dinitro-9H-carbazoli (3a-g);*
- *1,4-dimetil-3-ammino e 3,6-diammino-9H-carbazoli (4a-e, 6, 7, 8);*
- *1,4-dimetil-benzoil-9H-carbazoli diversamente sostituiti (10a-d; 11a-d; 12a-d).*

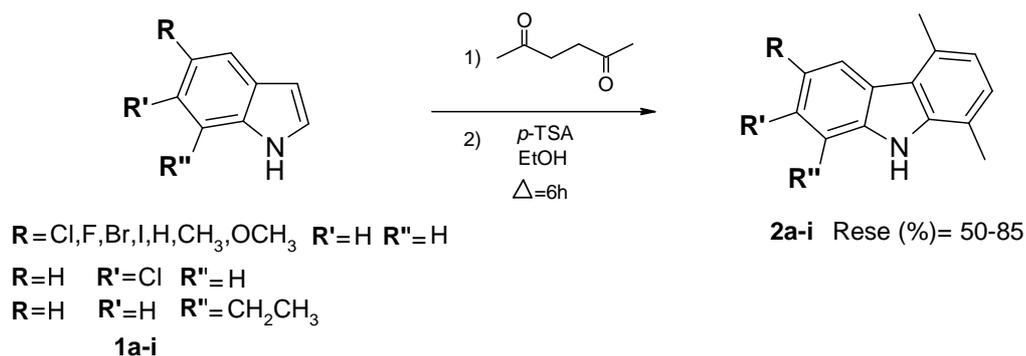
Alcuni di essi (Tab. 9; Serie I-II) sono stati impiegati come starting materials per l'ottenimento di nuovi derivati di interesse chimico-farmaceutico e nello stesso tempo sono stati sottoposti a test di citotossicità su cellule KB (cellule di carcinoma epidermiodi).

In un secondo tempo, l'interesse è stato rivolto alla sintesi di nuove library di derivati del 1,4-dimetil-9H-carbazolo (Tab. 9; Serie III-XIII), progettati tenendo conto delle caratteristiche strutturali necessarie per un'attività antitumorale. Tali derivati, oltre ai test di citotossicità su cellule KB, saranno testati come potenziali intercalanti del DNA (in grado quindi di stabilizzare il "cleavable complex" DNA-Topoisomerasi II) e/o potenziali antimetotici (mediante inibizione della polimerizzazione della tubulina).

Il terzo obiettivo raggiunto è stato la messa a punto di nuovi metodi di sintesi per l'ottenimento di analoghi strutturali quadriciclici dell'Ellipticina (Fig. 47, pag. 47).

## 5.1 Sintesi degli 1,4-dimetil-9H-carbazoli diversamente sostituiti.

La sintesi di tali derivati è stata effettuata con il metodo di Cranwell e Saxton<sup>7</sup> di seguito riportato (Schema 1). I composti **2a-i** sono stati ottenuti a partire dai corrispondenti indoli **1a-i** per ciclizzazione ad opera dell'acetilacetone e dell'acido *p*-toluensolfonico, in etanolo assoluto.



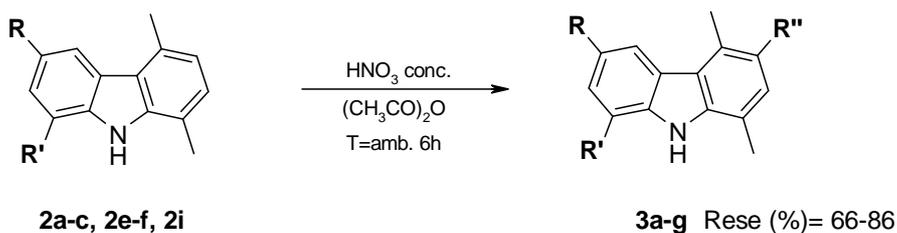
Prodotti	R	R'	R''
<b>2a</b>	Cl	H	H
<b>2b</b>	F	H	H
<b>2c</b>	Br	H	H
<b>2d</b>	I	H	H
<b>2e</b>	H	H	H
<b>2f</b>	CH <sub>3</sub>	H	H
<b>2g</b>	OCH <sub>3</sub>	H	H
<b>2h</b>	H	Cl	H
<b>2i</b>	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

Schema 1

<sup>7</sup> A. Cranwell, J. E. Saxton. Synthesis of ellipticine. *J. Chem. Soc. III*, (1962), 3482-3487.

## 5.2 Sintesi dei nitro carbazoli diversamente sostituiti.

I derivati 1,4-dimetil-9*H*-carbazolici **2a-c**, **2e-f**, **2i** sono stati solubilizzati a temperatura ambiente in anidride acetica. A tale soluzione, alla temperatura di 0-5°C, è stato aggiunto goccia a goccia l'acido nitrico fumante al 100% (d= 1.52g/mL) negli opportuni rapporti molari (Schema 2).<sup>8,9</sup>



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'	R''
<b>2a</b>	Cl	H	<b>3a</b>	Cl	H	NO <sub>2</sub>
<b>2b</b>	F	H	<b>3b</b>	F	H	NO <sub>2</sub>
<b>2c</b>	Br	H	<b>3c</b>	Br	H	NO <sub>2</sub>
<b>2e</b>	H	H	<b>3d</b>	NO <sub>2</sub>	H	NO <sub>2</sub>
<b>2f</b>	CH <sub>3</sub>	H	<b>3e</b>	CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>
<b>2i</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>3f</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>
<b>2e</b>	H	H	<b>3g</b>	NO <sub>2</sub>	H	H

Schema 2

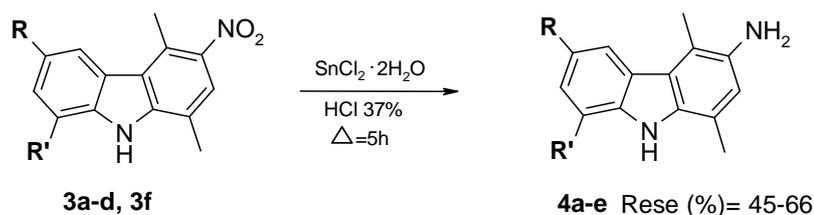
## 5.3 Sintesi degli ammino carbazoli diversamente sostituiti.

I nitro-derivati **3a-d**, **3f** sono stati ridotti,<sup>10</sup> con cloruro stannoso negli opportuni rapporti molari, in presenza di acido cloridrico al 37%. Si sono ottenuti i derivati amminici **4a-e** rispettivamente (Schema 3).

<sup>8</sup> T. Tabka, L. Bartrand, J. C. Lancelot, et al. *European-Journal of Medicinal Chemistry*, 24, (6), (1989), 605-10.

<sup>9</sup> J. C. Lancelot, B. Letois, S. Rault, M. Robba. *Heterocycles*, 31, (2), (1990), 241-6.

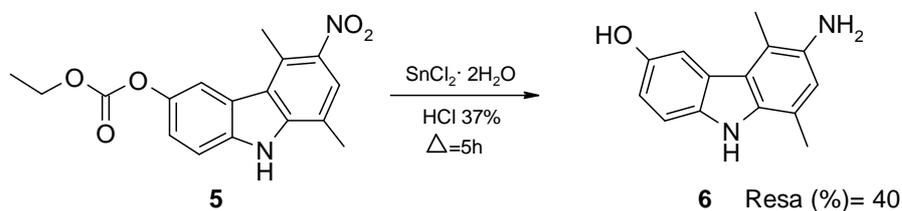
<sup>10</sup> J.C. Lancelot et al. Efficient synthesis of 6*H*-pyrido[3,2-*b*]carbazole. derivatives from 3-amino-1,4-dimethyl-carbazole. *Chem. Pharm. Bull.*, 35 (1), (1987), 425-428.



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'
<b>3a</b>	Cl	H	<b>4a</b>	Cl	H
<b>3b</b>	F	H	<b>4b</b>	F	H
<b>3c</b>	Br	H	<b>4c</b>	Br	H
<b>3d</b>	NO <sub>2</sub>	H	<b>4d</b>	NH <sub>2</sub>	H
<b>3f</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>4e</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

Schema 3

Con la stessa metodica, a partire dal nitro derivato 5,8-dimetil-3-etossicarbonilossi-9*H*-carbazolo (**5**)<sup>11,12</sup> è stata effettuata la sintesi del composto 6-ammino-5,8-dimetil-9*H*-carbazolo-3-olo (**6**)<sup>13</sup> (Schema 4) utilizzato come prodotto di partenza per steps reazionali successivi.



Schema 4

In altri casi i composti amminici sono stati ottenuti, a partire dai corrispondenti nitro derivati, mediante idrogenazione sotto pressione in presenza di palladio su carbone.

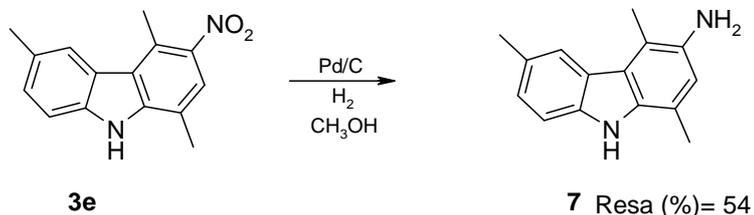
Nello specifico dalla riduzione del composto **3e** si è ottenuta la corrispondente ammina **7** (Schema 5); mentre riducendo nelle stesse condizioni sperimentali, il

<sup>11</sup> Ibidem.

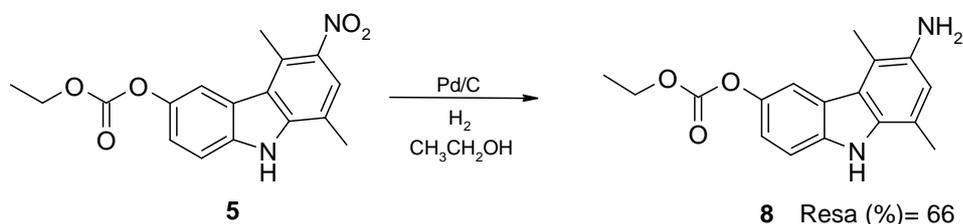
<sup>12</sup> B. Letois. Synthèse et étude physicochimique de nouveaux 5,11-diméthyl-6*H*-pyrido [3,2-*b*] carbazoles a visée antitumorale. Ph. D. Thèse, (17.12.1990), Université de Caen, France.

<sup>13</sup> Ibidem.

nitroderivato 5,8-dimetil-3-etossicarbonilossi-9*H*-carbazolo (**5**) si è ottenuto il composto amminico **8** (Schema 6).<sup>14</sup>

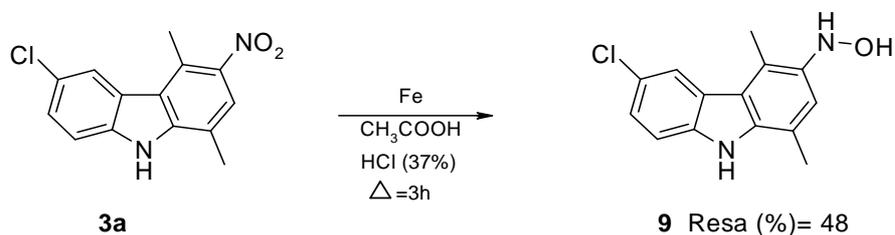


Schema 5



Schema 6

Un'ulteriore metodica sintetica ci ha permesso di ottenere, a partire dal nitro derivato **3a**, il composto 6-cloro-1,4-dimetil-3-idrossilammino-9*H*-carbazolo (**9**). In questo caso al composto **3a**, solubilizzato in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  e  $\text{HCl}$  al 37%, si aggiunge la limatura di ferro, in quantità catalitiche, e si lascia a riflusso per circa 3 ore (Schema 7).

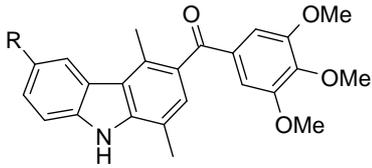


Schema 7

<sup>14</sup> A. Caruso. Synthesis of novel dimethylcarbazole, dimethylpyrimidocarbazole, benzofuro quinazolinone, benzothienoquinazolinone derivatives with potential anticancer activity. Ph.D. Thesis, (17.12.2008), University of Calabria-Italy.

## 5.4 Sintesi degli 1,4-dimetil-benzoil-9H-carbazoli diversamente sostituiti.

I rilevanti e promettenti risultati di citotossicità mostrati dai derivati carbazolici **7177** e **7178**<sup>15</sup> (Tab. 10), precedentemente sintetizzati dal gruppo di ricerca del CERMN, ci hanno indotto verso la sintesi di una nuova serie di composti (Schema 8) aventi il nucleo 1,4-dimetil-9H-carbazolico e l'anello benzoilico opportunamente metossilato.



**7177-7178**

<b>7177</b>		<b>7178</b>	
$10^{-5}$ M (%)	88	$10^{-5}$ M (%)	89
$10^{-6}$ M (%)	88	$10^{-6}$ M (%)	86
IC <sub>50</sub> (nM)	5.0	IC <sub>50</sub> (nM)	3.3

Tab. 10: Derivati 7177-7178

Nello specifico i derivati benzoilici **10a-d**; **11a-d**; **12a-d**<sup>16,17</sup> sono stati preparati attraverso una metodica basata su due steps di reazione. Il primo step ha previsto la preparazione dei carbazoli **2a-c**; **2e**; **2g**; **2h** grazie alla reazione di Cronwell e Saxton<sup>18</sup> (Schema 1). Il secondo step sintetico ha invece previsto una reazione di acilazione di Friedel-Kraft.<sup>19,20</sup>

Gli 1,4-dimetil-9H-carbazoli (**2a-c**; **2e**; **2g**; **2h**) solubilizzati in cloroformio dry, sono stati acilati negli opportuni rapporti molarli e in presenza di tricloruro di alluminio con benzoil-cloruri opportunamente metossilati.

<sup>15</sup> Ibidem.

<sup>16</sup> T. Tabka, L. Bartrand, J. C. Lancelot, et al. *European-Journal of Medicinal Chemistry*, 24, (6), (1989), 605-10. *op. cit.*

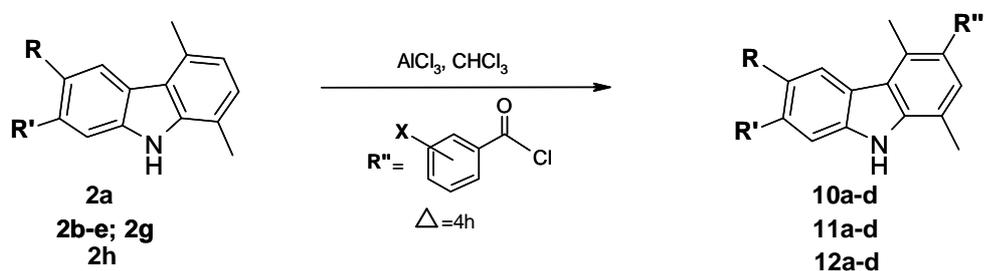
<sup>17</sup> B. Letois, J. C. Lancelot, S. Rault, M. Robba, et al. *European-Journal of Medicinal Chemistry*, 25 (9), (1990), 775-84.

<sup>18</sup> A. Cranwell, J. E. Saxton. Synthesis of ellipticine. *J. Chem. Soc. III*, (1962), 3482-3487. *op. cit.*

<sup>19</sup> C. Friedel, J. M. Crafts. *Compt. Rend.*, 84, (1877), 1392-1450.

<sup>20</sup> J. C. Lancelot, B. Letois, S. Rault, N. H. Dung, C. Saturnino, M. Robba. *Gazzetta Chimica Italiana*, 121, (1991), 301-307.

Si sono ottenuti così i derivati benzilici (**10a-d**; **11a-d**; **12a-d**) attesi con rese (%) = 40-69 (Schema 8).



Starting	R	R'	Prodotti	R''
2a	Cl	H	10a	
2a	Cl	H	10b	
2a	Cl	H	10c	
2a	Cl	H	10d	
2b	F	H	11a	
2c	Br	H	11b	
2e	H	H	11c	
2g	OCH <sub>3</sub>	H	11d	
2h	H	Cl	12a	
2h	H	Cl	12b	
2h	H	Cl	12c	
2h	H	Cl	12d	

Schema 8

Di notevole interesse sono risultati i test metabolici a cui è stato sottoposto il derivato (6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone (**10d**) come riportato nella sezione dei risultati biologici pag. 126.

## 5.5 Sintesi di:

### ***N*-(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammidi**

**diversamente sostituite; sintesi di: *N*-(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(2,3,4-trimetossifenil)uree diversamente sostituite.**

Nella seconda fase di tale progetto di ricerca, come già detto, la mia attenzione ha riguardato principalmente la sintesi e la caratterizzazione di una nuova serie di derivati carbazolici quali potenziali intercalanti del DNA.

In particolare l'idea della progettazione delle molecole appartenenti alle serie III-IV (Fig. 69) è scaturita dall'analisi di dati riportati in letteratura. Tali studi hanno dimostrato che per realizzare un'efficace intercalazione oltre alla presenza di sistemi poliaromatici fusi, costituiti da tre-sei anelli è necessaria la presenza di gruppi amminici e/o ammidici.

Tali gruppi potrebbero infatti contribuire alla formazione di complessi stabili, favorendo una migliore interazione con i siti del DNA mediante formazione di legami ad idrogeno.<sup>21</sup>

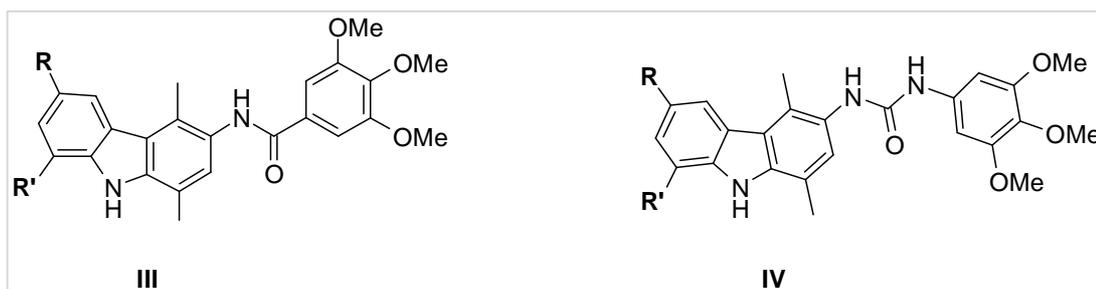


Fig. 69: Derivati appartenenti alla serie III- IV

Le serie ammidiche ed ureidiche preparate presentano come porzioni comuni il nucleo carbazolico ed il sistema fenilico, opportunamente metossilato, potenzialmente responsabile dell'attività antitubulinica e antimitotica. Tale nucleo risulta infatti essere

<sup>21</sup> A. Rescifina, A. Corsaro, A. Piperno, D. Iannazzo. Progettazione, docking, sintesi ed attività antitumorale di nuovi intercalanti del DNA a struttura isossazolidinica. *XIII Convegno Nazionale sulle Reazioni Pericicliche*, Pavia 17-18 settembre 2009.

comune ai composti naturali: *Combrestatina A-4* (Fig. 70) e *Colchicina* (Fig. 71) a nota attività antitubulinica.<sup>22</sup>

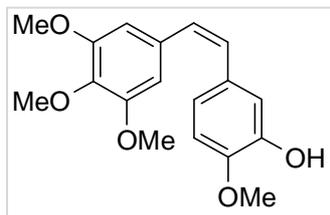


Fig. 70: Combrestatina

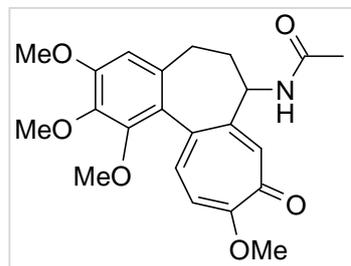


Fig. 71: Colchicina

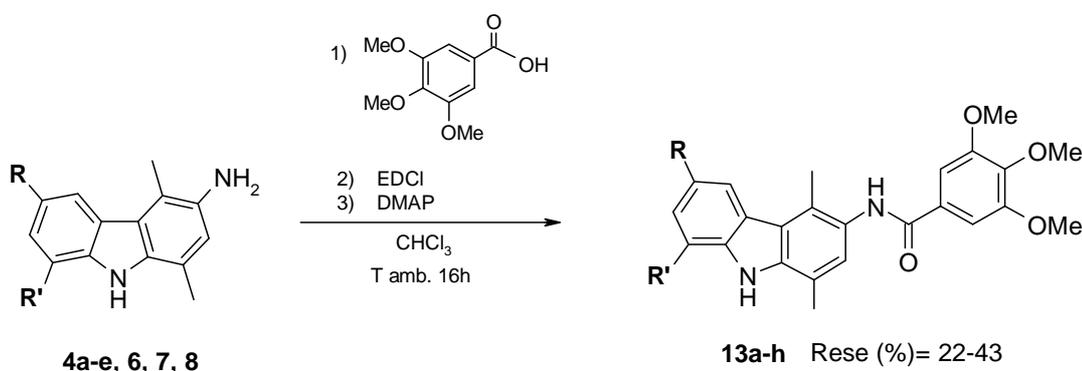
Nello specifico sono state preparate le seguenti serie (Tab. 9; Serie III-IV):

- *N*-(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammidi diversamente sostituite (13a-h);
- *N*-(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-*N'*-(2,3,4-trimetossifenil)uree diversamente sostituite (14a-h).

<sup>22</sup> G. De Martino, M. C. Edler, G. La Regina, A. Coluccia, New Arylthioindoles: Potent Inhibitors of Tubulin Polymerization Structure-Activity Relationships and Molecular Modeling Studies. *J. Med. Chem.*, 49, (2006), 947-954.

### 5.5.1 Sintesi di *N*-(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammidi diversamente sostituite.

Mediante una semplice procedura sintetica (Schema 9) a partire dai derivati amminici **4a-e**, **6**, **7**, **8**, solubilizzati in cloroformio, per aggiunta in successione dell'acido 3,4,5-trimetossi-benzoico, dell'1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDCI) e della 4-dimetilamminopiridina (DMAP) è stata possibile la preparazione della serie delle 3,4,5-trimetossibenzammidi diversamente sostituite (**13a-h**) di interesse farmaceutico.



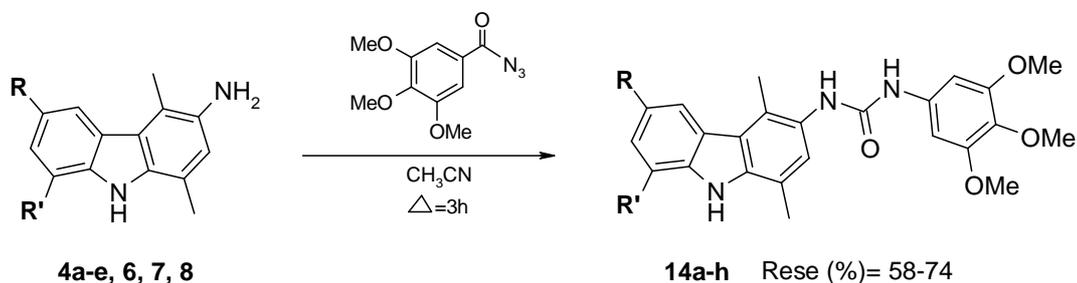
Starting	R	R'	Prodotti	R	R'
<b>4a</b>	Cl	H	<b>13a</b>	Cl	H
<b>4b</b>	F	H	<b>13b</b>	F	H
<b>4c</b>	Br	H	<b>13c</b>	Br	H
<b>4d</b>	NH <sub>2</sub>	H	<b>13d</b>		H
<b>4e</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>13e</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>6</b>	OH	H	<b>13f</b>		H
<b>7</b>	CH <sub>3</sub>	H	<b>13g</b>	CH <sub>3</sub>	H
<b>8</b>	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	<b>13h</b>	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H

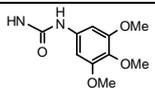
Schema 9

### 5.5.2 Sintesi di *N*-(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(2,3,4-trimetossifenil)uree diversamente sostituite.

Gli stessi derivati amminici **4a-e**, **6**, **7**, **8** sono stati anche utilizzati per la preparazione della serie delle uree (**14a-h**).

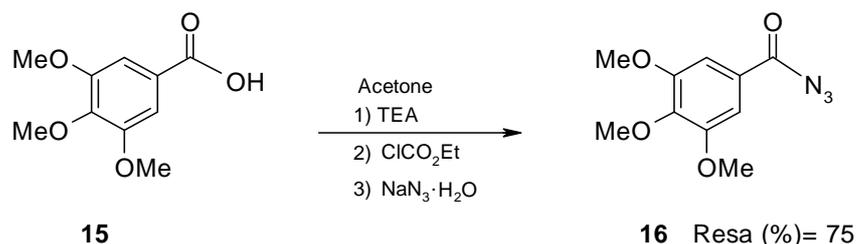
Ai suddetti composti di partenza solubilizzati in acetonitrile viene aggiunto l'azido(3,4,5-trimetossifenil)metanone (**16**) e si lascia a riflusso per 3 ore (Schema 10).



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'
<b>4a</b>	Cl	H	<b>14<sup>o</sup></b>	Cl	H
<b>4b</b>	F	H	<b>14b</b>	F	H
<b>4c</b>	Br	H	<b>14c</b>	Br	H
<b>4d</b>	NH <sub>2</sub>	H	<b>14d</b>		H
<b>4e</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>14e</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>6</b>	OH	H	<b>14f</b>	OH	H
<b>7</b>	CH <sub>3</sub>	H	<b>14g</b>	CH <sub>3</sub>	H
<b>8</b>	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	<b>14h</b>	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H

Schema 10

L'azido(3,4,5-trimetossifenil)metanone (**16**) viene ottenuto mediante dissoluzione dell'acido 3,4,5-trimetossi benzoico (**15**) in acetone, e successiva aggiunta di trietilammina, cloroformiato di etile e sodio azide (Schema 11).



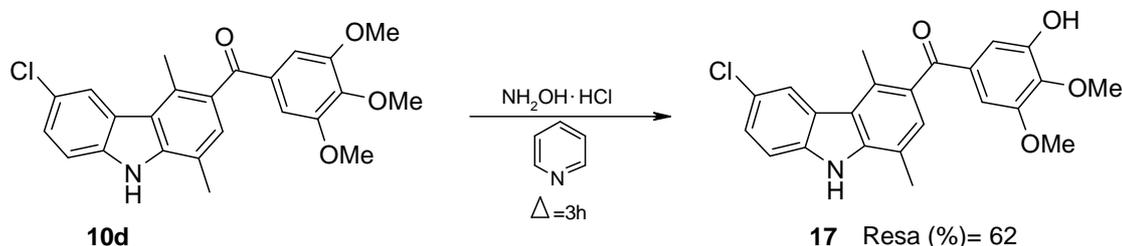
Schema 11

Anche questa via sintetica, messa a punto per la preparazione delle uree (**14a-h**), si dimostra nel complesso semplice: prevede infatti pochi steps di reazione e semplici metodi di purificazione mediante lavaggi con etere etilico.

## 5.6 Sintesi di derivati opportunamente idrossilati.

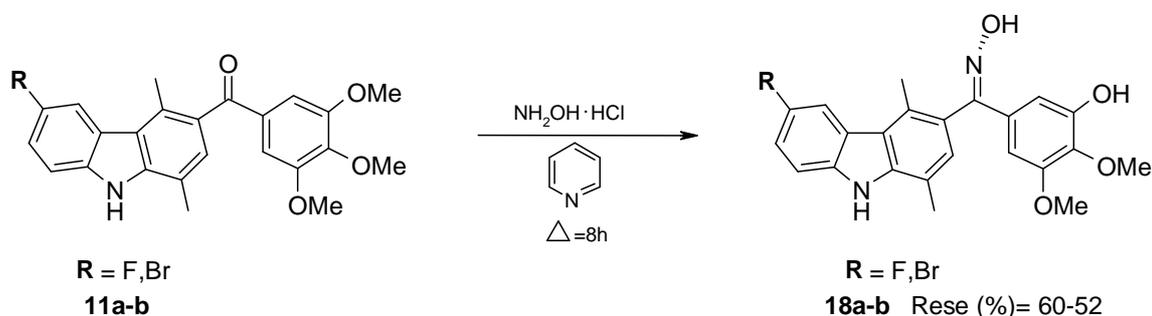
Dai composti 1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9*H*-carbazoli **10d**; **11a-b**; **11d**, particolarmente interessante è risultata la sintesi dei derivati opportunamente idrossilati, (Schemi: 12; 13; 14; 15; 16).

Nello specifico per l'ottenimento del composto **17** il derivato **10d** è stato solubilizzato in piridina, ed alla soluzione ottenuta è stata successivamente aggiunta in rapporto molare (1/10) l'idrossilamina idrocloruro. La soluzione si lascia a riflusso moderato ( $T=50^{\circ}\text{C}$ ) per circa 3 ore e poi a temperatura ambiente tutta la notte (Schema 12).



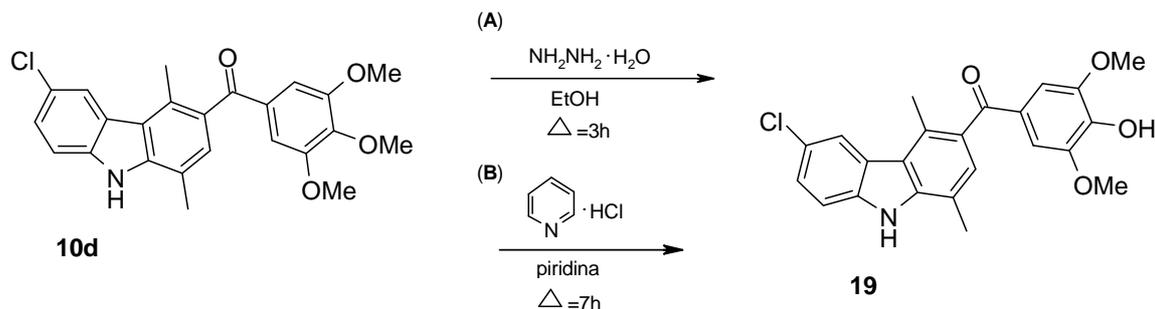
Schema 12

Tale metodica sintetica si è dimostrata molto vantaggiosa in quanto a partire dai derivati 1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9*H*-carbazoli **11a-b** variando semplicemente le condizioni di reazione (riflusso 8 ore,  $T=80^{\circ}\text{C}$ ), è stato possibile ottenere le 6-fluoro e le 6-bromo ossime **18a-b** rispettivamente idrossisostituite a livello del C-3' dell'anello 4,5 dimetossi-fenilico (Schema 13).



Schema 13

Dal derivato 6-cloro-1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9H-carbazolo (**10d**) mediante due differenti metodiche sintetiche (Schema 14) è stato inoltre possibile preparare il (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(4-idrossi-3,5-dimetossi)metanone (**19**).

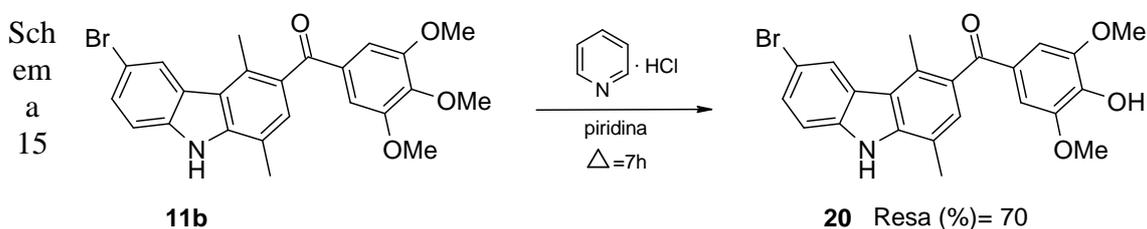


Schema 14

Il procedimento **A** prevede la solubilizzazione di **10d** in etanolo assoluto e la successiva aggiunta ad esso dell'idrazina idrata; mentre il procedimento **B** prevede la solubilizzazione di **10d** in piridina e la successiva aggiunta della piridina cloridrata (Schema 14).

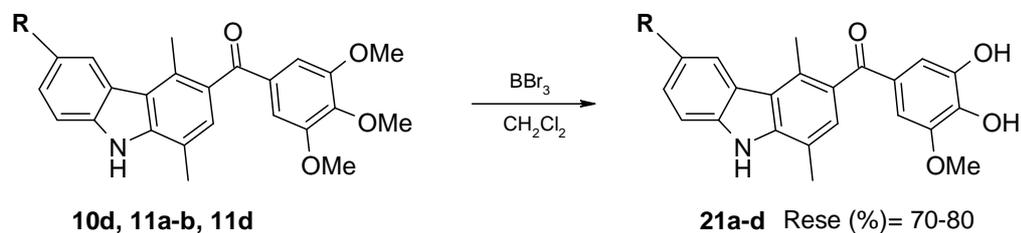
La messa a punto della metodica **B** ha consentito di migliorare notevolmente la resa (%) passando da una resa del 45 % ad una del 65 %.

Questa seconda metodica, ci ha inoltre permesso di ottenere con una resa del 70%, anche il 6-bromo derivato (**20**) a partire dal corrispondente composto trimetossilato **11b** (Schema 15).



Gli 1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9H-carbazoli **10d**; **11a-b**; **11d** sono stati inoltre impiegati come starting materials anche per la sintesi dei derivati **21a-d** didrossisostituiti a livello del C-3' e del C-4' dell'anello benzoilico.

In questo caso i suddetti composti trimetossilati sono stati solubilizzati in diclorometano ed alla soluzione ottenuta è stato successivamente aggiunto in rapporto molare (1/20) il  $\text{BBr}_3$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $d= 1,467\text{g/mL}$ ) (Schema 16).



Starting	R	Prodotti
<b>10d</b>	Cl	<b>21a</b>
<b>11a</b>	F	<b>21b</b>
<b>11b</b>	Br	<b>21c</b>
<b>11d</b>	$\text{OCH}_3$	<b>21d</b>

Schema 16

Tutti i composti idrossisostituiti sono stati sottoposti a prove di citotossicità (effettuate presso il CNRS di Parigi) su ceppi di cellule KB (cellule di carcinoma epidermoidi); molti di questi hanno mostrato *in vitro* buona attività citotossica (come riportato nella sezione dedicata ai risultati biologici).

## 5.7 Sintesi di nuovi derivati carbonilici a nucleo 1,4-dimetil carbazolico.

Molecole a struttura carbazolica, estratte dalla *Clausena Excavata* e *Micromelum Hirsutum* sono state studiate e testate sul batterio *Mycobacterium tuberculosis*, o bacillo di Koch, batterio responsabile della Tubercolosi o TBC (malattia infettiva).

I risultati ottenuti dimostrano che i carbazoli diversamente sostituiti in posizione 2 e 6 (Fig. 72) quali la 2-idrossi-6-metossi-9*H*-carbazol-3-carbaldeide e la 6-metossi-9*H*-carbazol-3-carbaldeide sono attivi sui suddetti ceppi (MIC di  $14,3\ \mu\text{g/mL}$  e  $15,6\ \mu\text{g/mL}$ ).<sup>23</sup>

<sup>23</sup> N. Kishore, B. B. Mishra, V. Tripathi, V. K. Tiwar. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. *Science Direct*, (2009), 149-163.

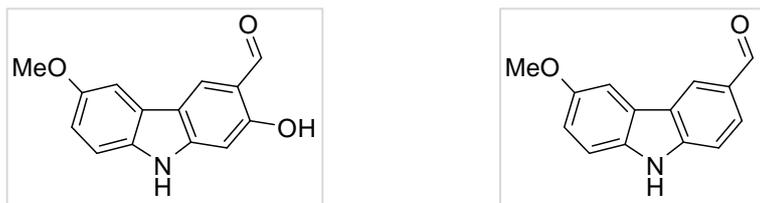


Fig. 72: Carbazoli a potenziale attività antitubercolare

Tali risultati ci hanno suggerito la sintesi di nuovi derivati aldeidici<sup>24</sup> a nucleo 1,4-dimetil-9*H*-carbazolico (Tab. 9 Serie VI-VII) di cui riportiamo di seguito le metodiche sintetiche.

A partire dal 1,4-dimetil-9*H*-carbazolo (**2d**) mediante due differenti metodiche sintetiche (vedi parte sperimentale) sono state ottenute la 3-carbaldeide **22** e la 3,6-dicarbaldeide **23**.

Nello specifico la 1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**22**) è stata ottenuta mediante una metodica già descritta in letteratura<sup>25,26,27</sup> che utilizza come previsto nella reazione di Vilsmeier-Haack, l'*N*-metil-formanilide (o *N*-metil-*N*-fenil-formammide) e l'ossicloruro di fosforo (POCl<sub>3</sub>) (T= 0°C),<sup>28</sup> mentre come solvente l'*o*-1,2-diclorobenzene (reflusso 4 ore; T= 80°C) in luogo della *N,N*-dimetilformammide (DMF) (Schema 17).

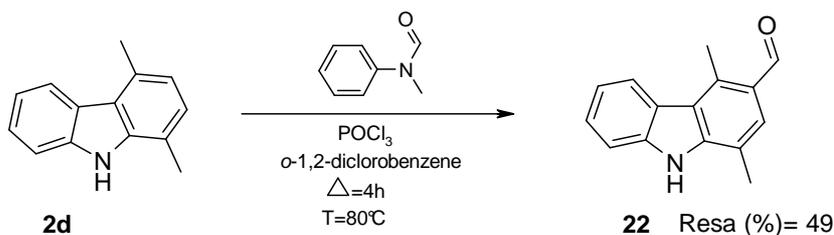
<sup>24</sup> R. W. Guthrie, A. Brossi, F. A. Mennona, J. G. Mullin, R. W. Kierstead. Ellipticine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 1975, 755-759. *op. cit.*

<sup>25</sup> L. Hsueh-Yun et al. Efficient microwave-assisted synthesis of ellipticine through *N*-(1,4-dimethyl-9*H*-carbazol-3-ylmethyl)-*N*-tosylaminoacetaldehyde diethyl acetal. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 47 (2), (2010), 454-458.

<sup>26</sup> B. Letois. Synthèse et étude physicochimique de nouveaux 5,11-diméthyl-6*H*-pyrido [3,2-*b*] carbazoles a visée antitumorale. Ph. D. Thèse, (17.12.1990), Université de Caen, France. *op. cit.*

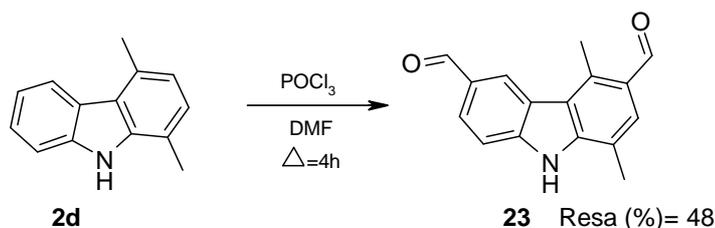
<sup>27</sup> A. Cranwell, J. E. Saxton. Synthesis of ellipticine. *J. Chem. Soc. III*, (1962), 3482-3487.

<sup>28</sup> J. Gurnos, S. P. Stanforth. The Vilsmeier reaction of fully conjugated carbocycles and heterocycles. *Organic Reactions* (Hoboken, NJ, United States), 49, (1997).



Schema 17

Dal derivato **2d** è stata preparata anche la 1,4-dimetil-9H-carbazol-3,6-dicarbaldeide (**23**) (Schema 18), ottenuta aggiungendo **2d** solido al complesso di Vilsmeier-Haack (formato a sua volta in seguito all'aggiunta goccia a goccia dell'ossicloruro di fosforo ( $\text{POCl}_3$ ) alla *N,N*-dimetilformamide (DMF) alla  $T=0^\circ\text{C}$ ).<sup>29</sup>



Schema 18

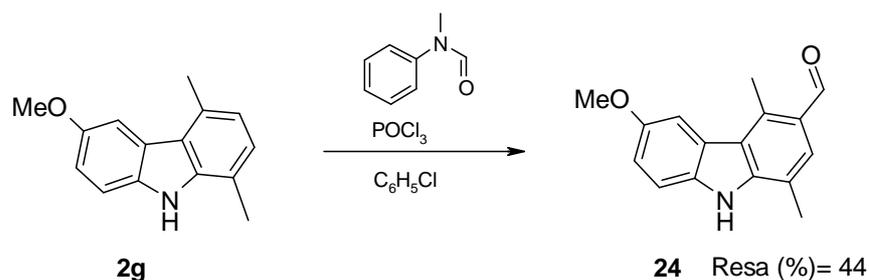
In modo analogo si ottiene il derivato 6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide (**24**).<sup>30,31,32</sup> In questo caso al complesso formato tra l'ossicloruro di fosforo e l'*N*-metilformanilide si aggiunge il 6-metossi-carbazolo (**2g**) precedentemente solubilizzato in clorobenzene (Schema 19).

<sup>29</sup> B. Letois. Synthèse et étude physicochimique de nouveaux 5,11-diméthyl-6H-pyrido [3,2-b] carbazoles a visée antitumorale. Ph. D. Thèse, (17.12.1990), Université de Caen, France. *op. cit.*

<sup>30</sup> J. Gurnos, S. P. Stanforth. The Vilsmeier reaction of fully conjugated carbocycles and heterocycles. *Organic Reactions* (Hoboken, NJ, United States), 49, (1997). *op. cit.*

<sup>31</sup> R. W. Guthrie, A. Brossi, F. A. Mennona, J. G. Mullin, R. W. Kierstead. Ellipticine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 1975, 755-759. *op. cit.*

<sup>32</sup> N. Kishore, B. B. Mishra, V. Tripathi, V. K. Tiwar. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. *Science Direct*, (2009), 149-163. *op. cit.*

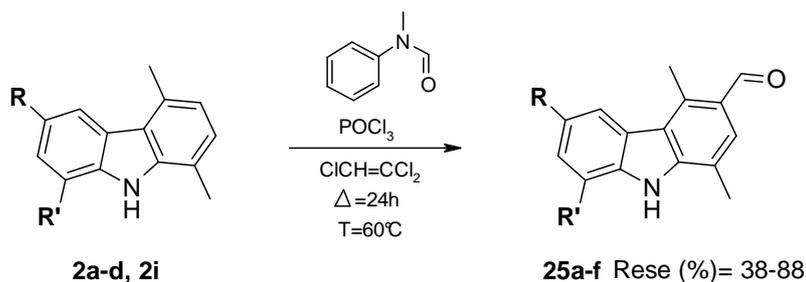


Schema 19

Tale via sintetica ha consentito anche la progettazione e la preparazione dei derivati aldeidici **25a-f** sostituiti da alogeni al C-6 o etil sostituiti al C-8. Per la preparazione di tali derivati è stata tuttavia determinante la scelta del solvente.

Infatti la scarsa solubilità degli starting materials **2a-d**, **2i** ci ha indotto a cercare nuove condizioni di reazione.

I migliori risultati sono stati ottenuti impiegando come solvente il tricloroetilene (riflusso T= 60°C per 24 ore) (Schema 20).



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'
<b>2a</b>	Cl	H	<b>25a</b>	Cl	H
<b>2b</b>	F	H	<b>25b</b>	F	H
<b>2c</b>	Br	H	<b>25c</b>	Br	H
<b>2d</b>	I	H	<b>25d</b>	I	H
<b>2i</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>25e</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>2i</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>25f</b>	CHO	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

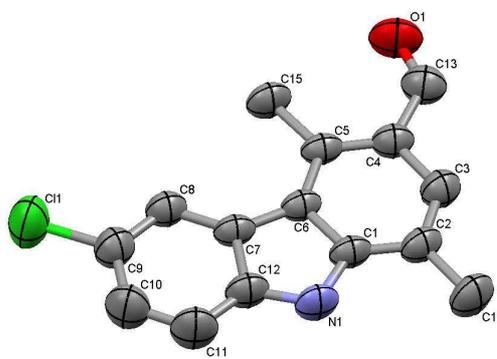
Schema 20

Grazie all'aumento dei tempi di reazione rispetto a quanto riportato in letteratura per la preparazione dei 6-fluoro e 6-bromo derivati è stato possibile migliorare le rese %.

In particolare abbiamo ottenuto il 6-fluoro derivato con una resa del 58% (resa riportata in letteratura pari al 46%)<sup>33</sup> e il 6-bromo derivato con una resa del 65% (resa riportata in letteratura pari al 45%).<sup>34</sup>

Dalla ricristallizzazione dei derivati **25a** e **25b** in acetonitrile abbiamo ottenuto cristalli di colore giallo e verde scuro rispettivamente che sono stati sottoposti successivamente all'analisi di diffrazione dei raggi X la cui rappresentazione è di seguito riportata:

➤ Rappresentazione di diffrazione a Raggi X e relativa caratterizzazione del derivato 6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**25a**) (Fig. 73):



Crystal data of **25a**: Bruker Kappa APEXII CCD diffractometer ( $\text{MoK}\alpha$   $\lambda=0.71073$  Å; graphite monochromator;  $T=291(2)$  K. Formula  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClNO}$ , formula weight 257.71, crystal system monoclinic, space group  $C2/m$ , crystal dimensions  $0.48 \times 0.38 \times 0.28$  mm<sup>3</sup>,  $a=19.4798(5)$ ,  $b=6.8358(2)$ ,  $c=9.1534(6)$  Å,  $\beta=95.663(1)^\circ$ ,  $V=1212.92(5)$  Å<sup>3</sup>,  $Z=4$ ,  $\rho_{\text{calcd}}=1.411$  Mg m<sup>-3</sup>,  $\mu=0.30$  mm<sup>-1</sup>,  $2\theta_{\text{max}}=63.04^\circ$ , 14751 measured reflections, 1621 independent reflections ( $R_{\text{int}}=0.0226$ ),  $R1 [I>2\sigma(I)]=0.0412$ ,  $wR2 [I>2\sigma(I)]=0.1175$ ,  $\text{GOF}=1.054$ , 114 parameters, final difference map within 0.37 and  $-0.31$  eÅ<sup>-3</sup>. The structure was solved using direct methods and refined by full-matrix least-squares analysis on  $F^2$ .

Fig. 73: Diffrazione RX derivato **25a**

<sup>33</sup> P. Groundwater, R. Lewis, *J. Chem. Res., Synopses*, 6, (1995), 215

<sup>34</sup> K. L. Dalton, S. Demerac, B. C. Elmes, W. J. Loder, J. M. Swan, T. Tsutomu. *Australian Journal of Chemistry*, 20 (12), (1967), 2715-27.

La molecola è stabilizzata mediante legami ad idrogeno intermolecolari ( $d=2.04 \text{ \AA}$ ): il donatore di idrogeno è l'atomo di azoto e l'accettore l'atomo di ossigeno di un'altra molecola formando delle colonne di carbazoli secondo l'asse C (Fig. 74).

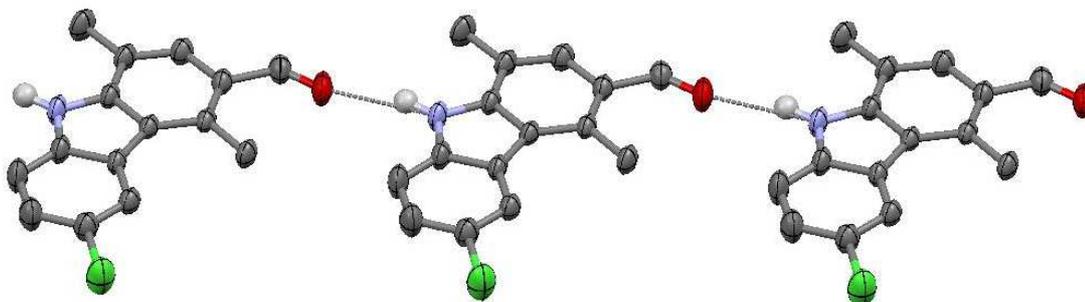


Fig. 74: Rappresentazione dei legami ad idrogeno intermolecolari (derivato **25a**)

Nel cristallo la molecola è presente sottoforma di dimero grazie ad una debole interazione di tipo C-H $\cdots$ Cl ( $d=2.94 \text{ \AA}$ ) (Fig. 75).

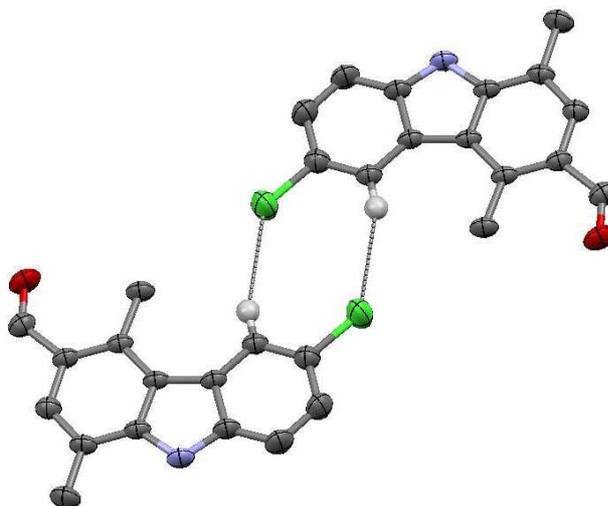
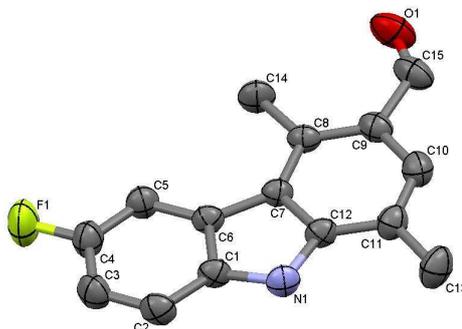


Fig. 75: Rappresentazione del dimero del composto **25a**

- Rappresentazione di diffrazione a Raggi X e relativa caratterizzazione del derivato 6-fluoro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**25b**) (Fig. 76):



Crystal data of **25b**: Bruker Kappa APEXII CCD diffractometer ( $\text{MoK}\alpha$   $\lambda=0.71073$  Å; graphite monochromator;  $T=291(2)$  K. Formula  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FNO}$ , formula weight 241.26, crystal system monoclinic, space group  $P2_1/n$ , crystal dimensions  $0.39 \times 0.26 \times 0.11$  mm<sup>3</sup>,  $a=12.4022(3)$ ,  $b=7.4017(2)$ ,  $c=12.7406(3)$  Å,  $\beta=90.937(1)^\circ$ ,  $V=1169.40(5)$  Å<sup>3</sup>,  $Z=4$ ,  $\rho_{\text{calcd}}=1.370$  Mgm<sup>-3</sup>,  $\mu=0.097$  mm<sup>-1</sup>,  $2\theta_{\text{max}}=60.98^\circ$ , 33946 measured reflections, 3587 independent reflections ( $R_{\text{int}}=0.0381$ ),  $R1 [I>2\sigma(I)]=0.0476$ ,  $wR2 [I>2\sigma(I)]=0.1297$ , GOF=1.009, 211 parameters, final difference map within 0.34 and  $-0.24$  eÅ<sup>-3</sup>. The structure was solved using direct methods and refined by full-matrix least-squares analysis on  $F^2$ .

Fig. 76: Diffrazione RX derivato **25b**

La molecola è “ugualmente” stabilizzata mediante legami ad idrogeno intermolecolari ( $d=2.08$  Å) in cui il donatore di idrogeno è l’atomo di azoto e l’accettore l’atomo di ossigeno di un’altra molecola. (Fig. 77).

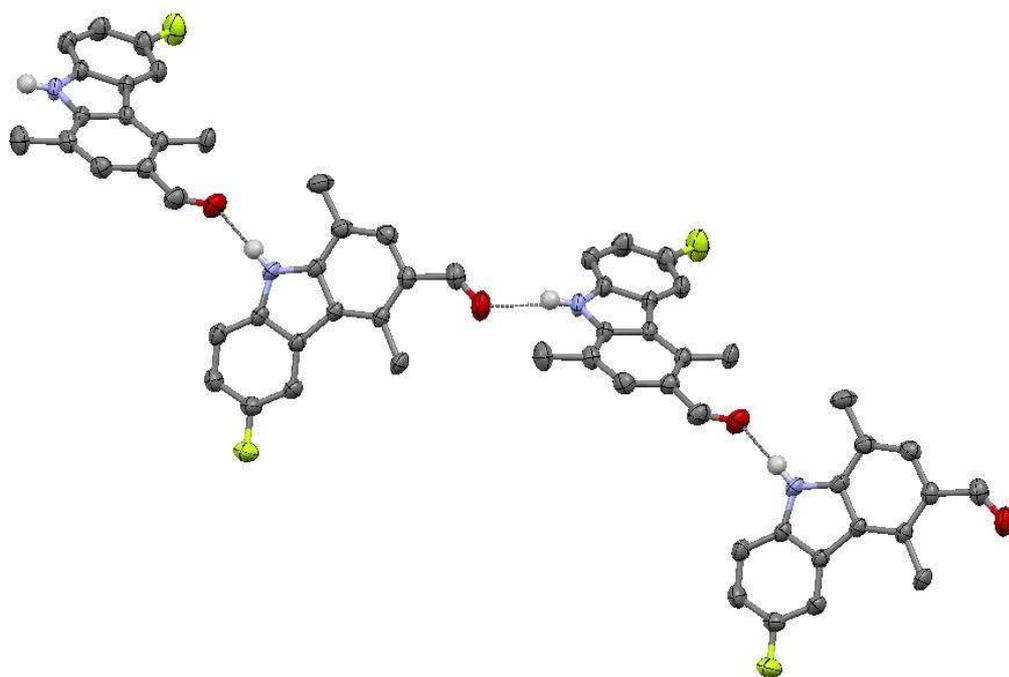


Fig. 77: Rappresentazione dei legami ad idrogeno intermolecolari (derivato **25b**)

Nel cristallo la molecola è presente sottoforma di dimero grazie ad una debole interazione di tipo C-H $\cdots$ F ( $d=2.53 \text{ \AA}$ ) (Fig. 78).

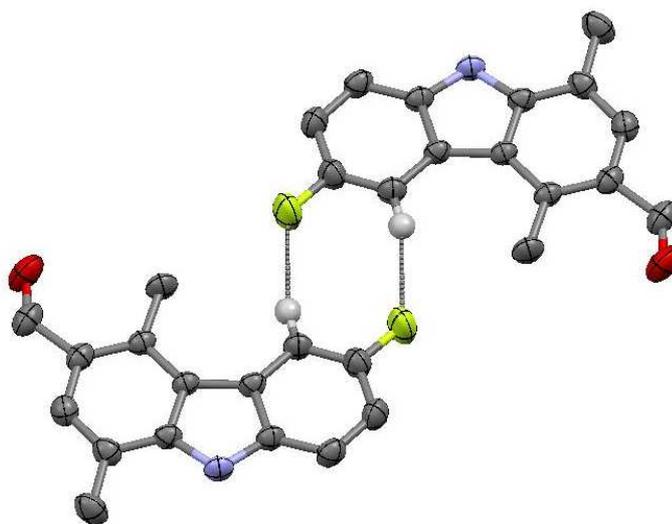
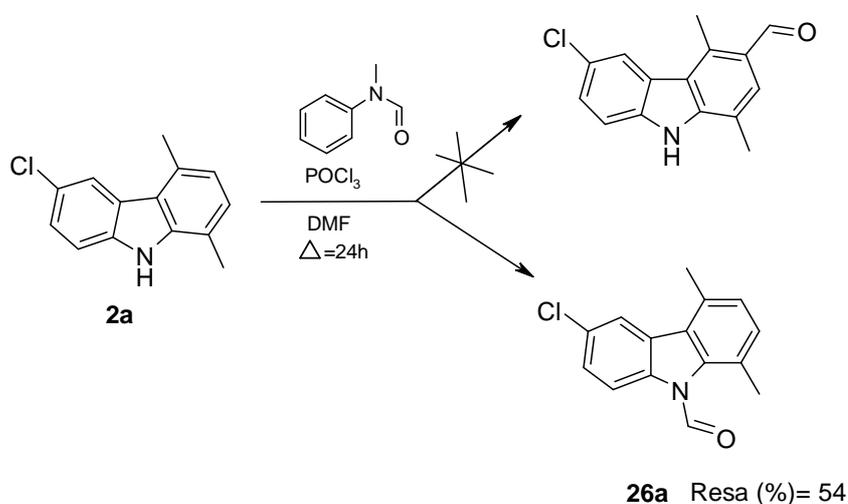


Fig. 78: Rappresentazione del dimero del composto **25b**

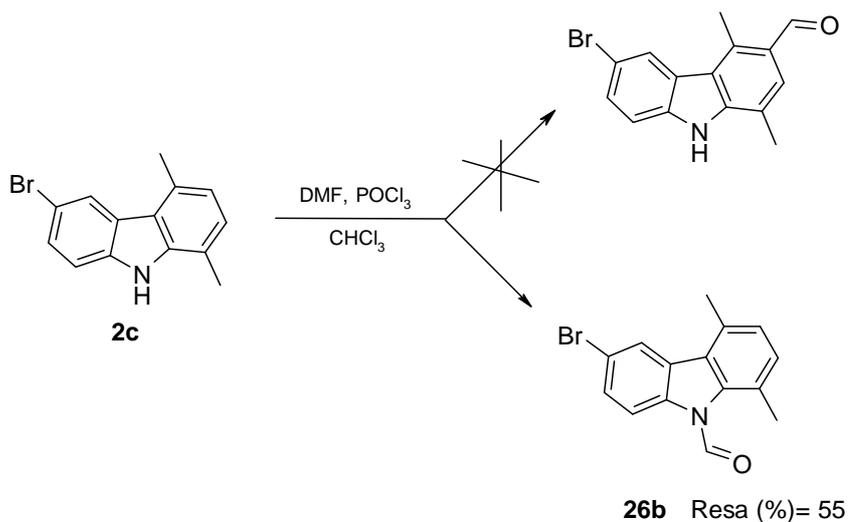
Come detto, la scelta del solvente è risultata fondamentale per la formilazione dei derivati carbazolici alogeno sostituiti al C-6.

Infatti, in un primo momento la procedura sintetica prevista dalla reazione di Vilsmeier-Haack era stata applicata sia al 6-cloro carbazolo **2a** che al 6-bromo carbazolo **2c** utilizzando, rispettivamente come solvente di reazione, la *N,N*-dimetilformammide (Schema 21) o il cloroformio (Schema 22).

In entrambi i casi, invece delle 3-carbaldeidi attese, si sono ottenuti nuovi derivati (**26a-b**) caratterizzati dalla presenza del gruppo carbonilico legato direttamente all'azoto carbazolico (Schemi 21-22).<sup>35</sup>



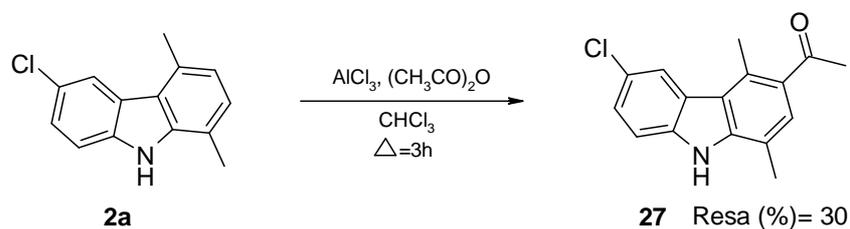
Schema 21



Schema 22

<sup>35</sup> B. Letois. Synthèse et étude physicochimique de nouveaux 5,11-diméthyl-6*H*-pyrido [3,2-*b*] carbazoles a visée antitumorale. Ph. D. Thèse, (17.12.1990), Université de Caen, France. *op. cit.*.

Un ulteriore composto carbonilico (**27**) è stato ottenuto dal derivato **2a** per reazione con l'anidride acetica in presenza del tricloruro d'alluminio (Schema 23).<sup>36,37</sup>



Schema 23

Le molecole aldeidiche preparate verranno valutate come potenziali agenti antibatterici.

La costruzione della library carbonil-carbazolica è stata sicuramente importante da un punto di vista farmaceutico, ma anche di fondamentale importanza per il proseguo del mio lavoro di ricerca, in quanto tali composti sono stati utilizzati successivamente come starting materials per l'ottenimento di altre serie di derivati carbazolici quali (Tab. 9; Serie VIII-IX-X):

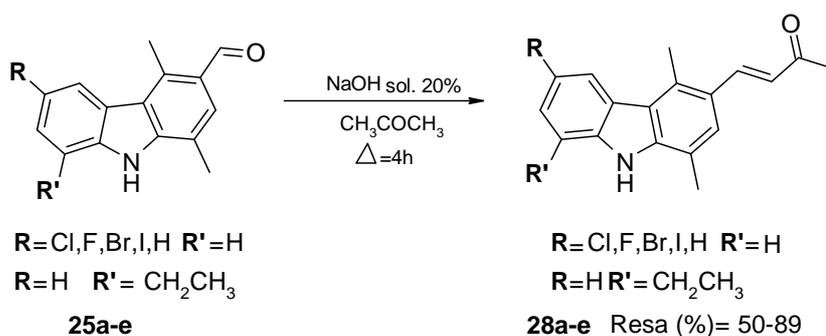
- *4-(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-oni diversamente sostituiti (28a-e);*
- *N-[(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammine diversamente sostituite (29a-d);*
- *1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il-1-fenilprop-2-en-1-oni diversamente sostituiti (32a-o).*

<sup>36</sup> C. Friedel, J. M. Crafts, *Compt. Rend.*, 84, (1877), 1392-1450. *op. cit.*

<sup>37</sup> J. C. Lancelot, B. Letois, S. Rault, N. H. Dung, C. Saturnino, M. Robba. *Gazzetta Chimica Italiana*, 121, (1991), 301-307. *op. cit.*

## 5.8 Sintesi dei 4-(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-oni diversamente sostituiti.

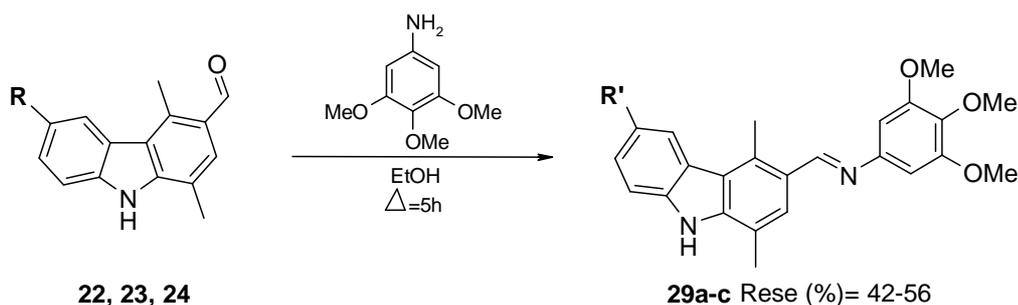
Dai composti aldeidici **25a-e**, per semplice reazione in una soluzione di idrossido di sodio al 20% ed acetone (Schema 24) si sono preparati i derivati carbonilici **28a-e** (Tab. 9; Serie VIII).



Schema 24

## 5.9 Sintesi di nuovi derivati trimetossifenil-enamminici; sintesi di N-[(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metil]-N-(3,4,5-trimetossifenil)acetammide (31).

Alcuni derivati aldeidici (**22**, **23**, **24**) sono stati successivamente utilizzati per la sintesi dei derivati 3,4,5-trimetossifenil-enamminici diversamente sostituiti (**29a-c**) (Schema 25).

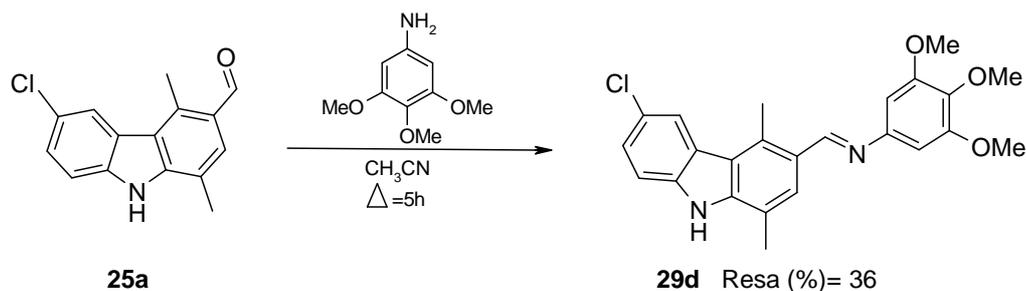


Starting	R	Prodotti	R'
<b>22</b>	H	<b>29a</b>	H
<b>23</b>	CHO	<b>29b</b>	
<b>24</b>	OCH <sub>3</sub>	<b>29c</b>	OCH <sub>3</sub>

Schema 25

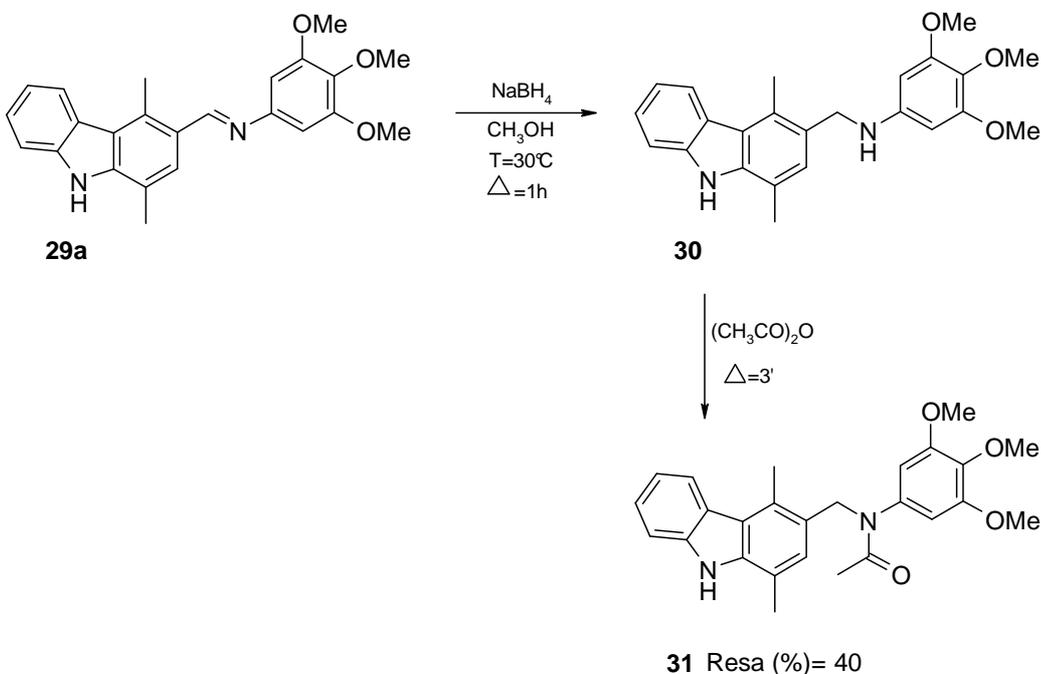
Tali derivati fenil-enamminici sono stati ottenuti mediante l'applicazione di una metodica molto semplice, in cui le suddette carbaldeidi, solubilizzate in etanolo assoluto, sono state fatte reagire con la 3,4,5-trimetossianilina.

Con la stessa metodica sostituendo l'etanolo con l'acetonitrile, a causa della scarsa solubilità in etanolo dell'alogeno derivato di partenza, è stata anche ottenuta la 6-cloro-fenil -enammina **29d** (Schema 26).



Schema 26

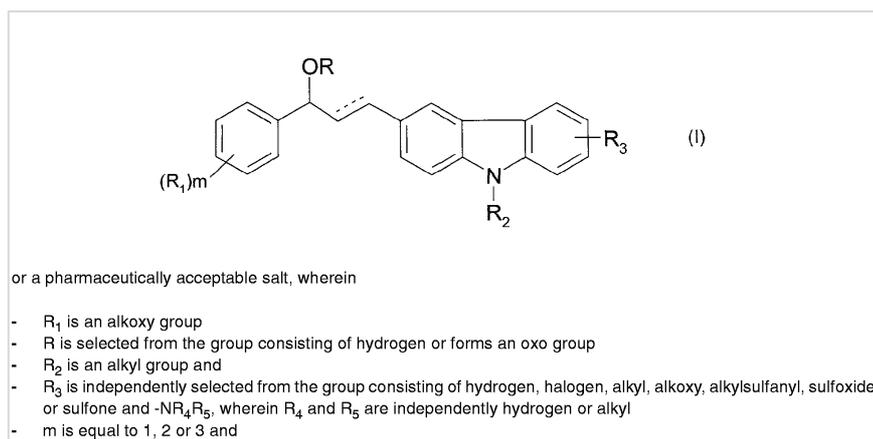
Tra i derivati fenil-enamminici il composto **29a** è stato dapprima ridotto dando il derivato **30** e successivamente acetilato ottenendo l'*N*-[(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)metil]-*N*-(3,4,5-trimetossifenil)acetammide (**31**) (Schema 27).



Schema 27

## 5.10 Sintesi di nuovi derivati 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il-1-fenilprop-2-en-1-oni diversamente sostituiti.

Recentemente in letteratura<sup>38</sup> sono stati riportati nuovi derivati carbazolici (Tab. 11) quali potenziali inibitori della polimerizzazione della proteina tubulina, principale componente dei microtubuli del citoscheletro cellulare.



Tab. 11

È risultato che essi inibiscono la proliferazione delle cellule neoplastiche agendo proprio sul processo di polimerizzazione/depimerizzazione dei microtubuli.

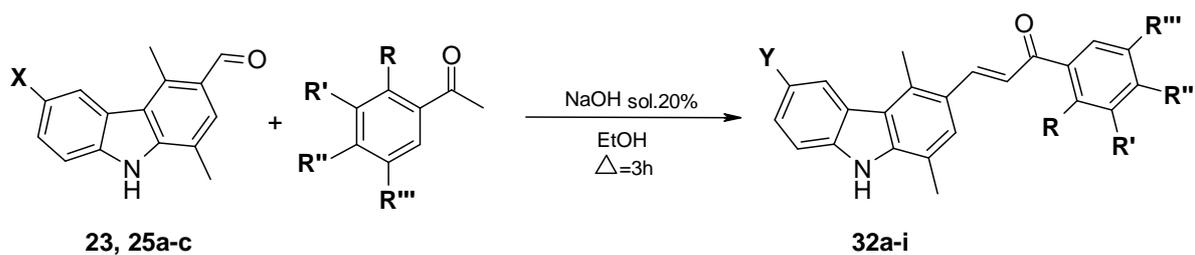
Alcuni di questi derivati si sono rivelati molto attivi, in quanto, presentano una IC<sub>50</sub> (μM) compresa tra 2 e 25.

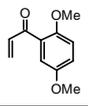
Questi risultati ci hanno incoraggiato verso lo studio chimico-farmaceutico e la sintesi di nuovi analoghi strutturalmente modificati. A tale scopo sono state messe a punto strategie sintetiche semplici e a bassi costi.

Mediante una reazione di condensazione tra le 3-carbazol-carbaldeidi e l'acetofenone opportunamente sostituito è stato infatti possibile ottenere con ottime rese la serie degli 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il-1-fenilprop-2-en-1-oni diversamente sostituiti (**32a-o**) (Tab. 9; Serie X).

Nello specifico i derivati **32a-i** sono stati ottenuti per reazione, in etanolo ed in presenza di una base (soluzione al 20% di idrossido di sodio), tra le 3-carbazol-carbaldeidi **23** e **25a-c** sostituite al C-6 del nucleo 1,4 dimetil-9H-carbazolico e l'acetofenone opportunamente sostituito (reflusso 3 ore) (Schema 28).

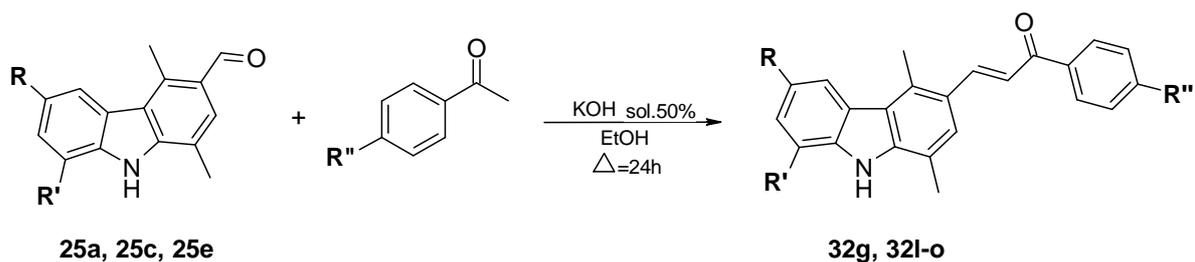
<sup>38</sup> T. Caulfield, M. P. Cherrier, C. Combeau, P. Mailliet. (2002), EP 1 253 141 A1.



Starting	X	Prodotti	Y	R	R'	R''	R'''	Resa%
25a	Cl	32a	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	60
25a	Cl	32b	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	58
25a	Cl	32c	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	60
25b	F	32d	F	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	59
25c	Br	32e	Br	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	64
23	CHO	32f		OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	69
25a	Cl	32g	Cl	H	H	Cl	H	78
25a	Cl	32h	Cl	H	H	F	H	55
25a	Cl	32i	Cl	H	H	CH <sub>3</sub>	H	56

Schema 28

Sempre attraverso una reazione di condensazione tra l'acetofenone opportunamente sostituito in *para* (con un atomo di cloro, o di fluoro, o di un gruppo metilico) e le 3-carbazol-carbaldeidi **25a**, **25c**, **25e** precedentemente solubilizzate in etanolo e in una soluzione al 50% di idrossido di potassio, abbiamo ottenuto i derivati **32g**, **32l-o** (Schema 29).



Starting	R	R'	Prodotti	R''	Resa%
25a	Cl	H	32g	Cl	88
25c	Br	H	32l	Cl	81
25c	Br	H	32m	F	74
25c	Br	H	32n	CH <sub>3</sub>	71
25e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	32o	Cl	45

Schema 29

Come si evince dagli schemi 28 e 29, dalla variazione della metodica sintetica (si è utilizzata una soluzione al 50% di idrossido di potassio e si sono prolungati i tempi di reazione fino a 24 ore) si è ottenuto il derivato **32g** con maggiore resa %.

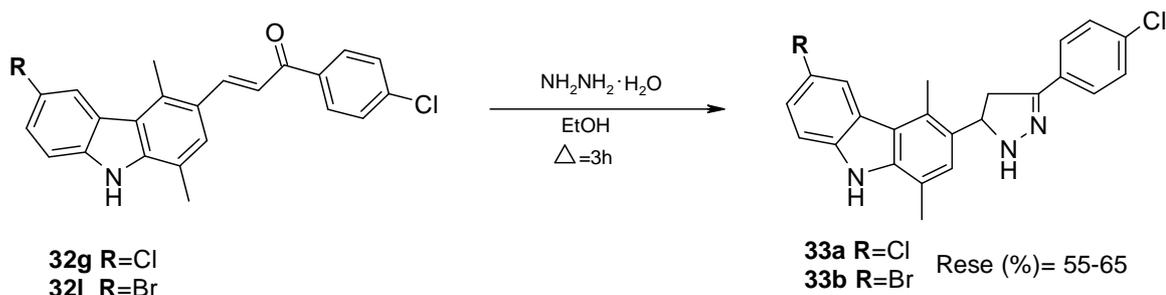
I derivati **32a-i** attualmente sottoposti a test di citotossicità su cellule KB, saranno successivamente sottoposti a test specifici per valutare la loro citotossicità in qualità di potenziali agenti antimitotici.

I derivati 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one (**32g**) e 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one (**32l**) sono stati a loro volta impiegati per l'ottenimento di varie serie di composti le cui strutture generali sono riportate in Tab. 9 pag.79.

- **3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-5-il]-1,4-dimetil-9*H*-carbazoli diversamente sostituiti (Serie XI);**
- **4-(4-clorofenil)-6-(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)pirimidin-2(5*H*)-immine diversamente sostituite (Serie XII);**
- **3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidroisoxazol-5-il]-1,4-dimetil-9*H*-carbazoli diversamente sostituiti (Serie XIII).**

### 5.11 Sintesi dei 3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-5-il]-1,4-dimetil-9*H*-carbazoli diversamente sostituiti.

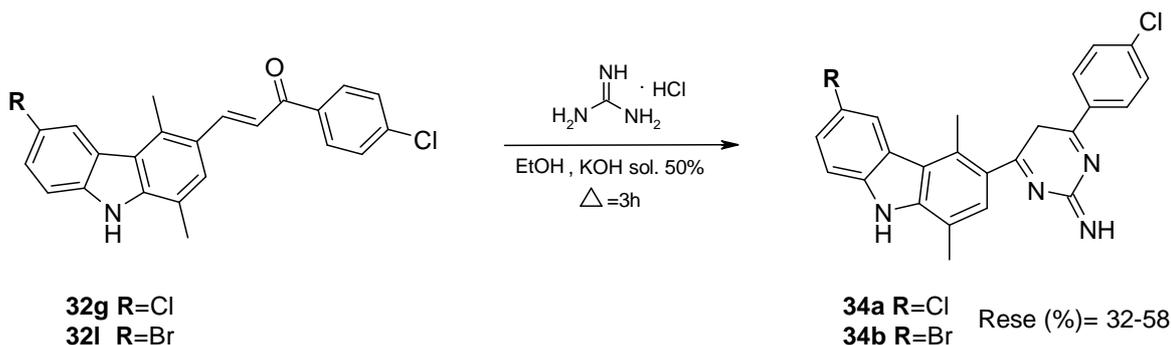
Mediante una semplice reazione di condensazione/ciclizzazione per aggiunta di idrazina idrata ai 6-cloro e 6-bromo derivati **32g** e **32l** in etanolo assoluto abbiamo ottenuto i pirazol-carbazoli **33a-b** (Schema 30).



Schema 30

### 5.12 Sintesi delle 4-(4-clorofenil)-6-(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)pirimidin-2-(5H)-immine diversamente sostituite.

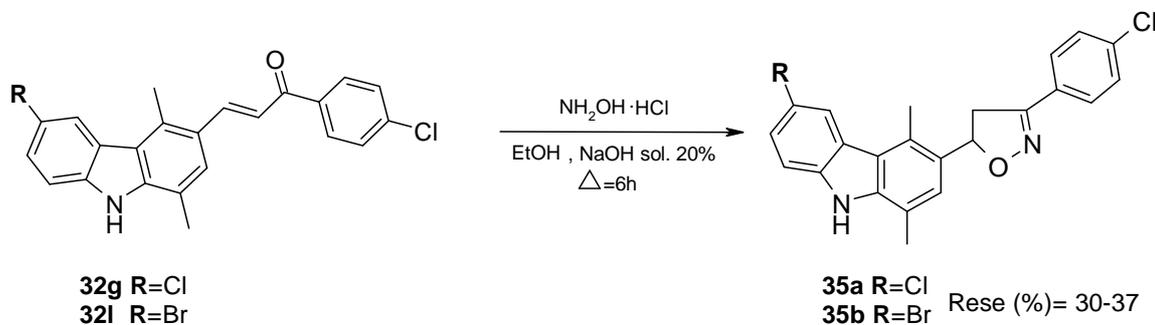
Anche in questo caso mediante una semplice reazione di condensazione/ciclizzazione per aggiunta della guanidina cloridrata ai 6-cloro e 6-bromo derivati **32g** e **32l** in etanolo assoluto/idrossido di potassio abbiamo ottenuto i pirimidin-carbazoli **34a-b** (Schema 31).



Schema 31

### 5.13 Sintesi dei 3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidroisossazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazoli diversamente sostituiti.

Mediante una semplice reazione di condensazione/ciclizzazione per aggiunta di idrossilammina cloridrata ai 6-cloro e 6-bromo derivati **32g** e **32l** in etanolo assoluto abbiamo ottenuto gli isossazol-carbazoli **35a-b** (Schema 32).

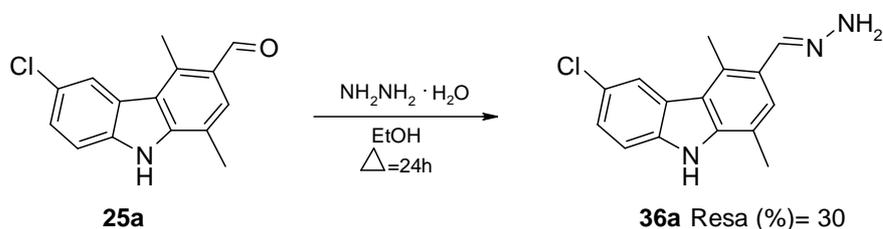


Schema 32

### 5.14 Sintesi degli 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide idrazoni.

Come precedentemente detto, la presenza di gruppi amminici legati ad anelli policiclici aromatici sembra contribuire alla formazione di complessi stabili in grado di garantire una migliore interazione con i siti del DNA mediante formazione di legami ad idrogeno. Per tale motivo si è pensato di effettuare la preparazione dei derivati 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide idrazone.

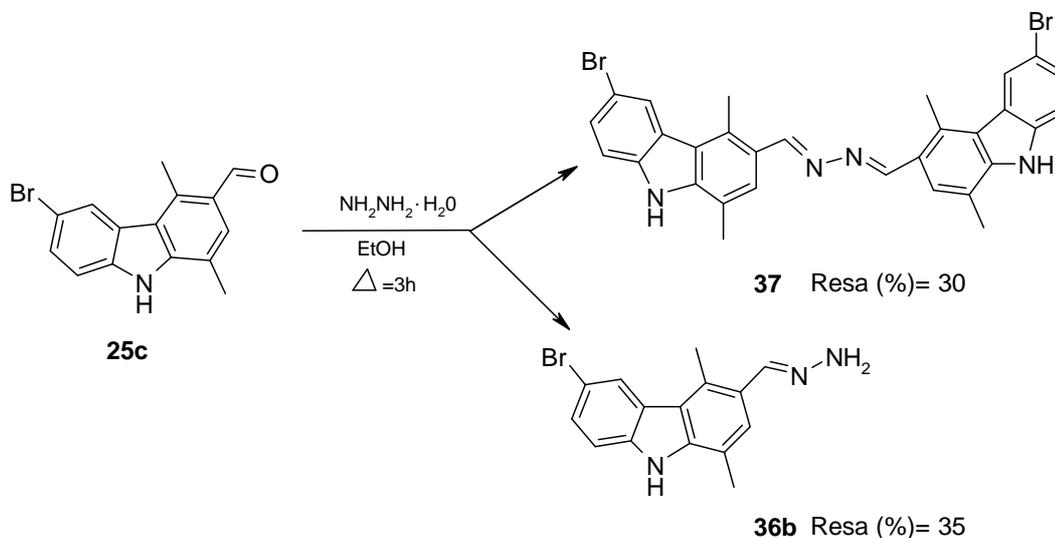
Nello specifico il derivato 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide idrazone (**36a**) è stato ottenuto mediante reazione tra la corrispondente carbaldeide (**25a**) e l'idrazina idrata, in etanolo assoluto (Schema 33).



Schema 33

Tale metodica sintetica parzialmente modificata (tempo di riflusso 3 ore) applicata alla 6-bromo carbaldeide **25c**, ha determinato la formazione di una miscela di prodotti.

Sono stati infatti ottenuti e separati: il 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide idrazone (**36b**) e il 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide-N-[(E)-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metilene]idrazone (**37**) (Schema 34).



Schema 34

La difficoltà di purificazione dei prodotti (descritta nella parte sperimentale pag. 94) e le basse rese % non ci hanno consentito di effettuare la sintesi dell'intera library idrazonica progettata.

### 5.15 Sintesi di analoghi strutturali dell'ellipticina.

L'ultima fase del progetto ha riguardato la messa a punto di metodiche sintetiche per la preparazione di altri carbazoli, analoghi strutturali dell'Ellipticina (Fig. 79).

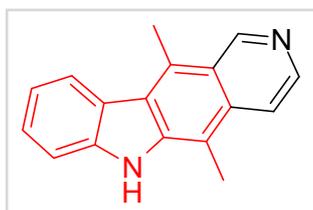


Fig. 79: Ellipticina (5,11-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazolo)

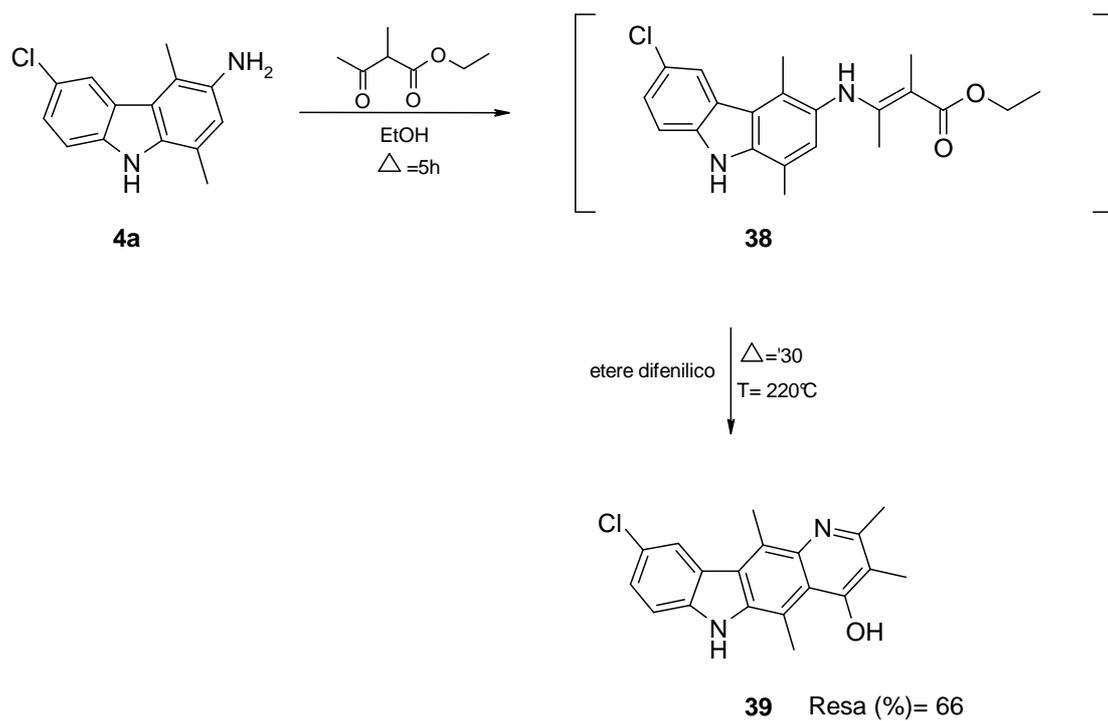
A tale scopo sono stati sintetizzati il 9-cloro-2,3,5,11-tetrametil-6H-pirido[3,2-b]carbazol-4-olo (**39**) e il 7-etil-5,11-dimetil-6H-pirido(4,3-b)carbazolo (**41**).

#### 5.15.1 Sintesi di: etil 3-[(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)ammino]2-metil-2-butenato (**38**); 9-cloro-2,3,5,11-tetrametil-6H-pirido[3,2-b]carbazol-4-olo (**39**).

I due composti **38** e **39** si ottengono per aggiunta al 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-ammino (**4a**) di etil-2-metil-acetoacetato.

In particolare per cristallizzazione in difenil etero si ottiene il derivato **38** successivamente ciclizzato con difenil etero dando il derivato 9-cloro-2,3,5,11-tetrametil-6H-pirido[3,2-b]carbazol-4-olo (**39**) (Schema 35).<sup>39</sup>

<sup>39</sup> B. Letois. Synthèse et étude physicochimique de nouveaux 5,11-diméthyl-6H-pyrido [3,2-b] carbazoles a visée antitumorale. Ph. D. Thèse, (17.12.1990), Université de Caen, France. *op. cit.*.

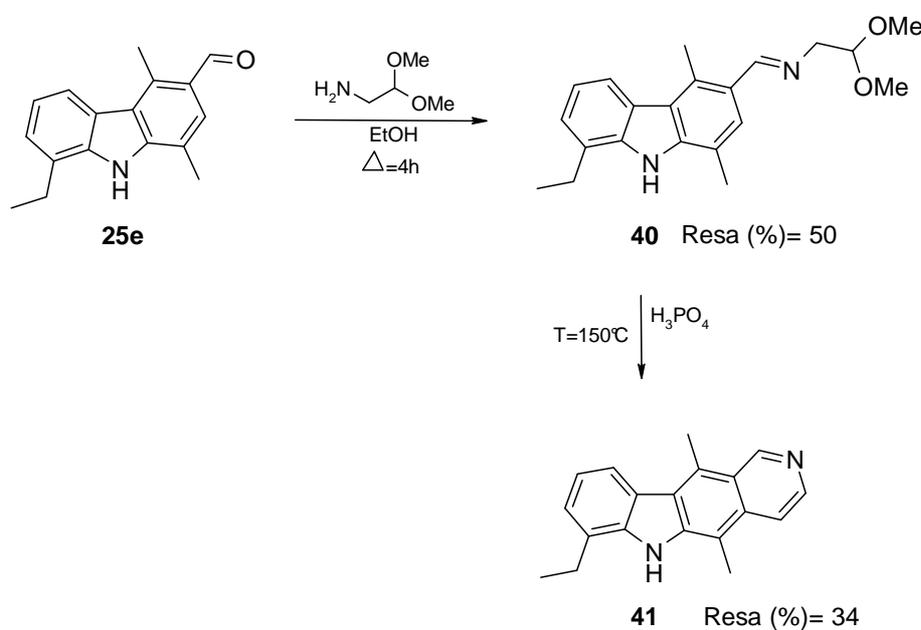


Schema 35

### 5.15.2 Sintesi di: *N*-[(8-etil-1,4-dimetil-9*H*-carbazolo-3-il)metilene]-2,2-dimetossietanammina (**40**); 7-etil-5,11-dimetil-6*H*-pirido[4,3-*b*]carbazolo (**41**).

I due composti **40** e **41** si ottengono per aggiunta all'8-etil-1,4-dimetil-9*H*-carbazolo-3-carbaldeide (**25e**) di 2,2-dimetossi-etanammina.

In particolare per cristallizzazione in cicloesano si ottiene il derivato **40** che successivamente ciclizzato con acido fosforico dà il derivato 7-etil-5,11-dimetil-6*H*-pirido(4,3-*b*)carbazolo (**41**) (Schema 36).

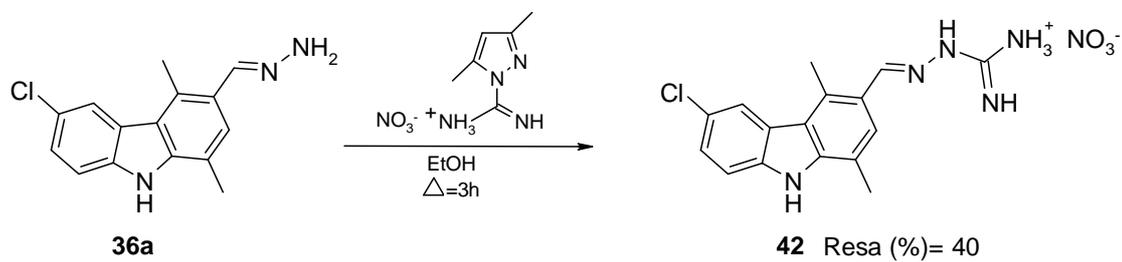


Schema 36

### 5.16 Sintesi di 2-[(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazolo-3-il)metilene]idrazino(immino)metanammino nitrato (**42**).

Per aggiunta al 6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazolo-3-carbaldeide idrazone (**36a**) del 3,5-dimetilpirazolo-1-carbossiammide nitrato e successiva purificazione con acetonitrile ed etere etilico si ottiene il derivato 2-[(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazolo-3-

il)metilindene]idrazino(immino)metanammino nitrato (**42**) a potenziale attività antibatterica (Schema 37).



Schema 37

## 5.17 Risultati e test biologici.

Dei 113 composti sintetizzati nel presente lavoro 59 sono stati saggiati farmacologicamente (vedi tabelle 12-19) come riportato nel protocollo seguente:

*Cell culture and cell proliferation assay*—The human cell lines KB (mouth epidermoid carcinoma) was obtained from ECACC (Salisbury, UK) and grown in D-MEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen), in the presence of penicilline, streptomycine and fungizone in 75cm<sup>2</sup> flask under 5% CO<sub>2</sub>. Cells were plated in 96-well tissue culture microplates at a density of 650 cells/well in 200µl medium and treated 24h later with compounds dissolved in DMSO with compound concentrations ranged 0.5nM to 10µM using a Biomek 3000 automate (Beckman-Coulter). Controls received the same volume of DMSO (1% final volume). After 72h exposure MTS reagent (Promega) was added and incubated for 3h at 37°C: the absorbance was monitored at 490 nm and results expressed as the inhibition of cell proliferation calculated as the ratio  $[(1-(OD_{490} \text{ treated}/OD_{490} \text{ control})) \times 100]$ . For IC<sub>50</sub> determinations (50% inhibition of cell proliferation) experiments were performed in separate duplicate.

Le molecole risultate più attive sono evidenziate in rosso nelle tabella 12 e 15.

Come si evince dalla tabella 12 tutti i derivati benzoilici trimetossilati sottoposti al suddetto test su cellule KB, hanno mostrato una potente attività antiproliferativa con valori di IC<sub>50</sub> compresi tra 9.1 e 3.3 nM. In particolare il derivato (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone (**10d**) è risultato il più attivo con una IC<sub>50</sub> (nM) pari a 3.3. Rilevante è, tuttavia, risultata anche l'efficacia mostrata dal derivato (1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone (**11c**) sia alla concentrazione di 10<sup>-5</sup>M che alla concentrazione 10<sup>-6</sup>M in quanto mostrano la massima percentuale di inibizione.

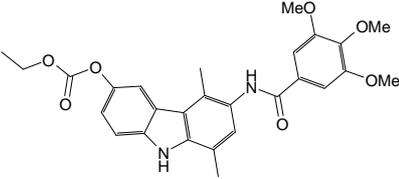
Si può concludere quindi, che nella serie benzoilica trimetossilata, la non sostituzione al C-6 dà composti con un'elevata efficacia d'azione (derivato **11c**), mentre la sostituzione nella suddetta posizione con un atomo di Cl dà composti che mostrano la potenza maggiore (derivato **10d**)

Num. prodotto	STRUTTURA	10 <sup>-5</sup> M (%)	10 <sup>-6</sup> M(%)	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>10d</b> sr7178		<b>89</b>	<b>86</b>	<b>3.3</b>
<b>11a</b> sr7177		<b>88</b>	<b>88</b>	<b>5.0</b>
<b>11b</b> sr7058		<b>87</b>	<b>87</b>	<b>9.0</b>
<b>11c</b> sr7324		<b>100</b>	<b>102</b>	<b>5.0</b>
<b>11d</b> sr7169		<b>89</b>	<b>91</b>	<b>9.1</b>

Tab. 12

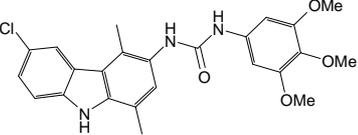
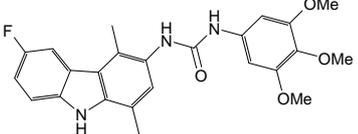
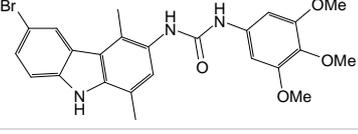
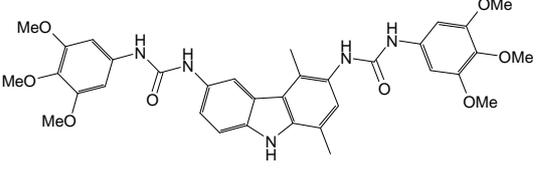
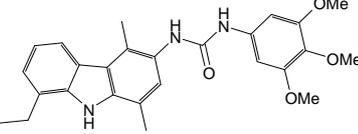
Per quanto riguarda i derivati benzenamidici riportati nella tabella 13 seguente, solo il derivato 3,4,5-trimetossi-*N*-(1,4,6-trimetil-9*H*-carbazol-3-il)benzammide (**13g**) ha mostrato una rilevante efficacia alla concentrazione di  $10^{-5}$ M.

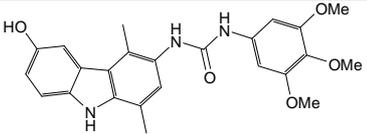
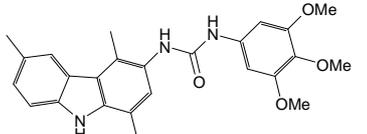
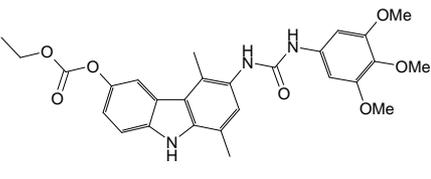
Num. prodotto	STRUTTURA	$10^{-5}$ M (%)	$10^{-6}$ M(%)	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>13a</b>		<b>-5</b>	<b>-9</b>	/
<b>13b</b>		<b>2</b>	<b>-33</b>	/
<b>13c</b>		<b>35</b>	<b>-7</b>	/
<b>13d</b>		<b>-7</b>	<b>-8</b>	/
<b>13e</b>		<b>7</b>	<b>-10</b>	/
<b>13f</b>		<b>-6</b>	<b>-12</b>	/
<b>13g</b>		<b>81</b>	<b>-11</b>	/

<b>13h</b>		<b>-14</b>	<b>-14</b>	/
------------	---	------------	------------	---

Tab. 13

Dal confronto dei diversi valori di citotossicità mostrata dai composti trimetossibenzenammidici (Tab. 13) e dalle trimetossifenil-uree (Tab. 14 ) rispettivamente, si evidenzia in queste ultime un aumento dell'efficacia alla concentrazione di  $10^{-5}$ M dovuta probabilmente proprio alla presenza del gruppo ureidico. In particolare tale differenza è maggiormente evidente per i derivati ammidici **13c/13g** e i corrispondenti derivati ureidici **14c/14g**.

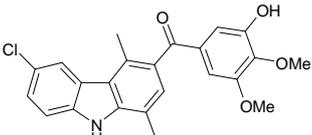
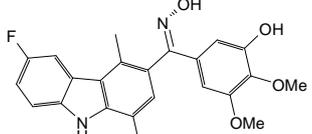
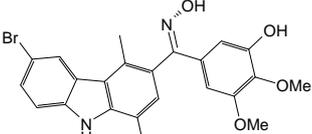
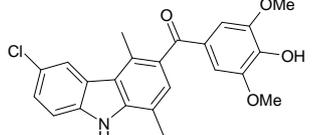
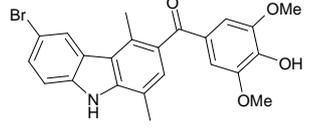
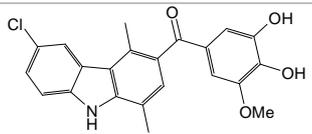
Num. prodotto	STRUTTURA	$10^{-5}$ M (%)	$10^{-6}$ M(%)	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>14a</b>		<b>51</b>	<b>3</b>	/
<b>14b</b>		<b>33</b>	<b>-24</b>	/
<b>14c</b>		<b>101</b>	<b>-2</b>	/
<b>14d</b>		<b>-2</b>	<b>-15</b>	/
<b>14e</b>		<b>50</b>	<b>-20</b>	/

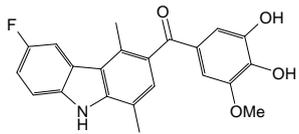
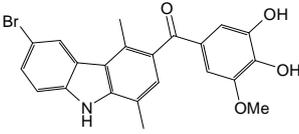
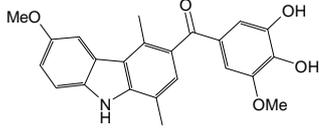
<b>14f</b>		<b>-14</b>	<b>-2</b>	/
<b>14g</b>		<b>100</b>	<b>-15</b>	/
<b>14h</b>		<b>-91</b>	<b>-28</b>	/

Tab. 14

Analizzando i dati riportati nella tabella 15 seguente si evince che la presenza di un gruppo OH al C-4' dell'anello benzoico (derivati **19** e **20**) determina una buona citotossicità sia alla concentrazione di  $10^{-5}$ M che alla concentrazione  $10^{-6}$ M con una  $IC_{50}$  (nM) di 41,1 e 35,0 rispettivamente.

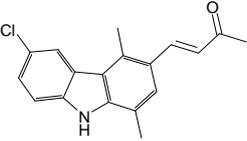
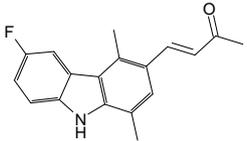
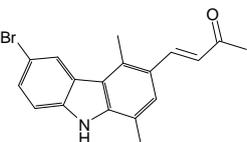
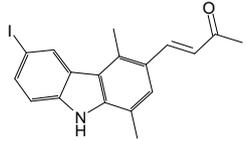
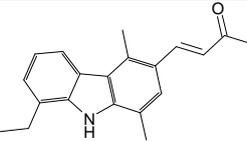
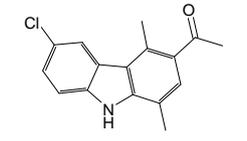
L'introduzione di un secondo gruppo OH al C-3' dell'anello benzoico (diidrossiderivati **21a**, **21b**, **21c** e **21d**) aumenta invece i valori dell' $IC_{50}$  (nM) pur mantenendo una buona efficacia sia alla concentrazione di  $10^{-5}$ M che alla concentrazione  $10^{-6}$ M. Tali valori risultano ulteriormente incrementati nel derivato **17** (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanone monoidrossisostituito al C-3'; e nei derivati diidrossisostituiti (**18a**, **18b**) 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanon ossime.

Num. prodotto	STRUTTURA	$10^{-5}$ M (%)	$10^{-6}$ M (%)	$IC_{50}$ (nM)
<b>17</b>		<b>101</b>	<b>101</b>	<b>67.3</b>
<b>18a</b>		<b>101</b>	<b>100</b>	<b>243.0</b>
<b>18b</b>		<b>101</b>	<b>96</b>	<b>276.0</b>
<b>19</b> <b>sr7307</b>		<b>101</b>	<b>102</b>	<b>41.1</b>
<b>20</b> <b>sr7310</b>		<b>102</b>	<b>102</b>	<b>35.0</b>
<b>21a</b> <b>sr7308</b>		<b>99</b>	<b>101</b>	<b>44.7</b>

<b>21b</b>		<b>96</b>	<b>100</b>	<b>61.0</b>
<b>21c</b>		<b>99</b>	<b>101</b>	<b>68.3</b>
<b>21d</b>		<b>94</b>	<b>100</b>	<b>92.8</b>

Tab. 15

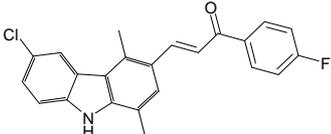
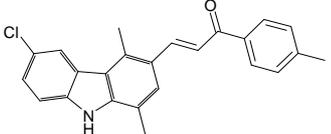
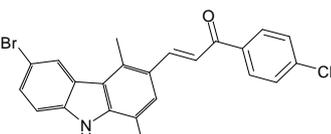
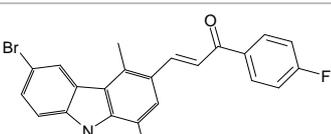
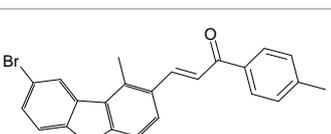
Un ulteriore confronto tra i valori di citotossicità dimostrata dai suddetti derivati mono e/o diidrossisostituiti riportati nella tabella 15, e quelli mostrati dai derivati trimetossi benzoilici (Tab. 12) ha evidenziato come la citotossicità sia notevolmente incrementata dalla presenza dei tre gruppi metossilici sull'anello benzoilico piuttosto che dalla presenza/o non di sostituenti in posizione C-6 del nucleo carbazolico.

Num. prodotto	STRUTTURA	10 <sup>-5</sup> M (%)	10 <sup>-6</sup> M (%)	IC <sub>50</sub> (nM)
28a		-7	2	/
28b		15	3	/
28c		14	-9	/
28d		68	-6	/
28e		3	2	/
27		-2	-2	/

Tab. 16

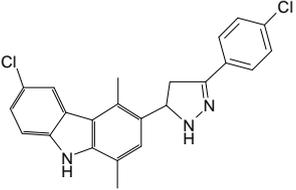
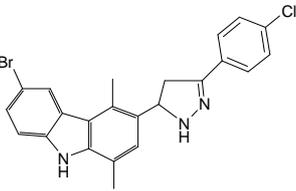
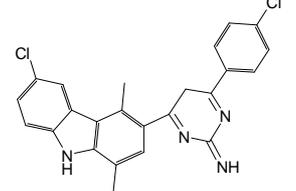
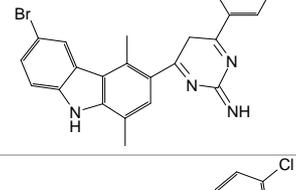
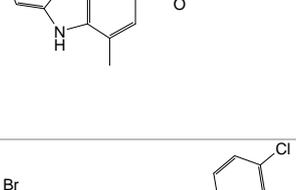
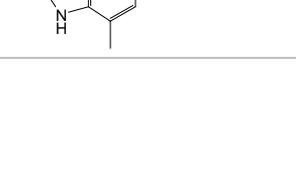
Dai dati presenti in tabella 17 si evince che un numero limitato di molecole (**32a**, **32f**, **32g**, **32h**, **332i**, **32m**) è risultato citotossico sulle cellule KB alla concentrazione di  $10^{-5}$  M, nessun derivato risulta invece attivo alla concentrazione di  $10^{-6}$  M.

Num. prodotto	STRUTTURA	$10^{-5}$ M (%)	$10^{-6}$ M (%)	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>32a</b>		<b>89</b>	<b>-40</b>	/
<b>32b</b>		<b>15</b>	<b>3</b>	/
<b>32c</b>		<b>0</b>	<b>-25</b>	/
<b>32d</b>		<b>64</b>	<b>-31</b>	/
<b>32e</b>		<b>56</b>	<b>-11</b>	/
<b>32f</b>		<b>72</b>	<b>-50</b>	/
<b>32g</b>		<b>91</b>	<b>1</b>	/

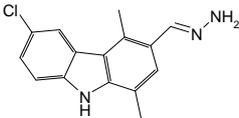
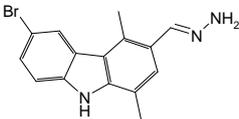
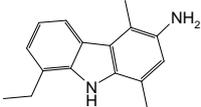
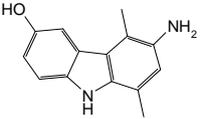
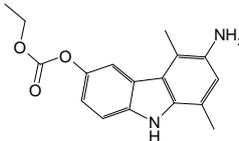
<b>32h</b>		<b>74</b>	<b>-4</b>	<b>/</b>
<b>32i</b>		<b>76</b>	<b>-2</b>	<b>/</b>
<b>32l</b>		<b>63</b>	<b>-11</b>	<b>/</b>
<b>32m</b>		<b>92</b>	<b>-18</b>	<b>/</b>
<b>32n</b>		<b>63</b>	<b>-21</b>	<b>/</b>

Tab. 17

I derivati riportati nella seguente tabella 18 non hanno mostrato alcuna citotossicità rilevante su linee cellulari KB. Attualmente su tali derivati sono in corso test farmacologici quali potenziali antiinfiammatori.

Num. prodotto	STRUTTURA	10 <sup>-5</sup> M (%)	10 <sup>-6</sup> M (%)	IC <sub>50</sub> (nM)
33a		45	5	/
33b		39	5	/
34a		103	-4	/
34b		102	14	/
35a		16	-2	/
35b		2	3	/

Tab. 18

Num. prodotto	STRUTTURA	10 <sup>-5</sup> M (%)	10 <sup>-6</sup> M (%)	IC <sub>50</sub> (nM)
36a		15	-1	/
36b		106	10	/
4e		0	0	/
6		-28	-5	/
8		-42	-32	/

Tab. 19

### 5.17.1 Test metabolici.

Come precedentemente detto, interessanti sono risultati i test metabolici effettuati sul derivato trimetossilato **10d** (sr7178) (Fig. 80).

A tal proposito su tessuti campione (fegato, tumore e sangue) di topi, questi ultimi indicati come #12 e #18, precedentemente trattati con il derivato **10d** sono state effettuate dell'estrazioni. Nello specifico per la cavia #18, 1.16g di fegato, 411mg di tumore e 566mg di sangue (circa 566 $\mu$ L) sono stati omogeneizzati con una soluzione di PBS (Phosphate buffered saline= tampone fosfato salino). In particolare sono stati addizionati 4mL per il fegato, 2mL per il tumore e 1mL per il sangue; successivamente tali miscele sono state estratte per due volte con 5mL di diclorometano.

Per la cavia #12: 1.899g di fegato, 438mg di tumore e 955mg sono stati sottoposti allo stesso trattamento.

Le fasi organiche sono state successivamente anidificate e poi evaporate sotto azoto.

Le analisi effettuate all'LC-MS di tali campioni hanno evidenziato, sia nel caso del campione di fegato del topo #18 che del topo #12, la presenza del metabolita demetossilato:

(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-

dimetossifenil)metanone (Fig. 80)

Le analisi degli altri campioni relativi ai tessuti tumore e sangue rispettivamente, non hanno invece evidenziato la presenza di alcun metabolita.

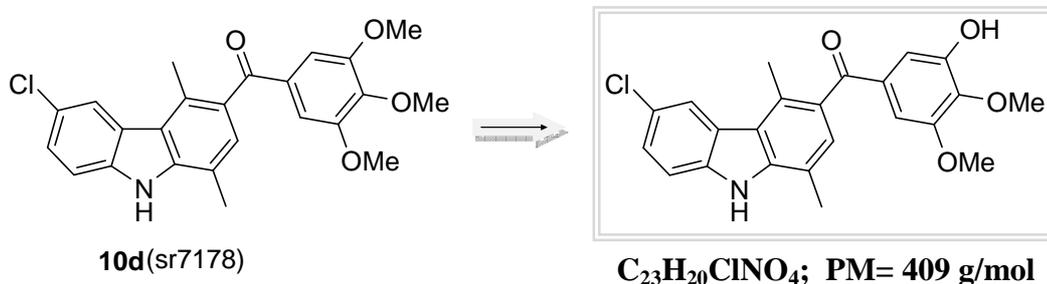


Fig. 80

MS (ESI<sup>+</sup>): 410 (M+H)<sup>+</sup>.

# Capitolo VI: Parte Sperimentale

---

## PARTE SPERIMENTALE

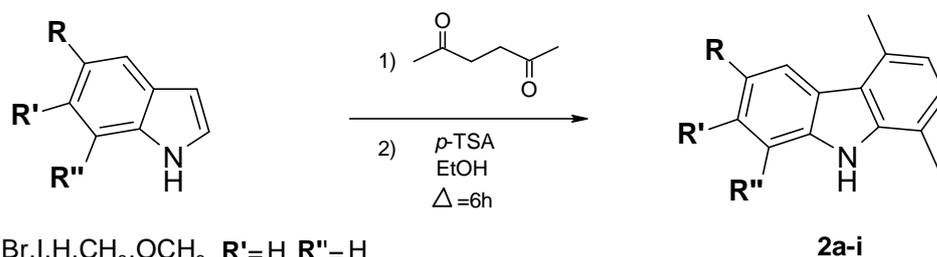
Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{CDCl}_3$  sono stati registrati con uno spettrometro Bruker 300MHz mentre gli spettri  $^1\text{H}$  NMR e i  $^{13}\text{C}$  NMR in DMSO deuterato ed in  $\text{CDCl}_3$  sono stati registrati con uno spettrometro JEOL Lamda 400MHz ed i chemical shifts sono stati riportati in ppm ( $\delta$ ) con  $\text{Me}_4\text{Si}$  come standard interno.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrometro Perkin Elmer BX-FT-IR. Le analisi GC-MS sono state eseguite con un HP 5890 serie II, mentre le LC-MS con uno spettrometro Waters alliance 2695 (ESI<sup>+</sup>). Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro JEOL JMS GCmate a potenziale di ionizzazione di 70eV (EI).

I punti di fusione sono stati misurati con uno strumento Kofler Melting Point. Per la cromatografia su strato sottile sono state adoperate lastrine Riedel-de Haen 5x10cm di gel di silice 60 F<sub>254</sub>, spessore 0.2mm, le macchie sulle TLC sono state osservate con luce ultravioletta.

I reagenti chimici ed i solventi ad elevato grado di purezza utilizzati sono stati acquistati dall'Aldrich Chemical Co, dalla Alfa Aesar, dalla Sigma Chemical Co e dalla Lancaster.

## 6.1 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 1,4-dimetil-9H-carbazoli diversamente sostituiti(2a-i).



R=Cl,F,Br,I,H,CH<sub>3</sub>,OCH<sub>3</sub> R'=H R''=H

R=H R'=Cl R''=H

R=H R'=H R''=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

1a-i

Prodotti	R	R'	R''	Resa %
2a	Cl	H	H	73
2b	F	H	H	64
2c	Br	H	H	78
2d	I	H	H	53
2e	H	H	H	51
2f	CH <sub>3</sub>	H	H	53
2g	OCH <sub>3</sub>	H	H	50
2h	H	Cl	H	68
2i	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	85

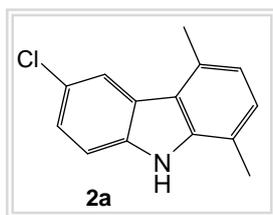
### Procedimento:

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano Xg (Xmmol) di 1H-indolo diversamente sostituito (**1a-i**) in XmL di EtOH assoluto.

Di seguito, si aggiungono il 2,5-esandione Xg (Xmmol) con rapporto molare: (**1a-i**)/2,5-esandione= 1/1.5, e l'acido *p*-toluensolfonico monoidrato Xg (Xmmol) in quantità equimolare (**1a-i**)/*p*-TSA= 1/1. La soluzione si lascia a riflusso per circa 6 ore sotto agitazione (T=270°C).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione si versa in H<sub>2</sub>O (300mL) e si estrae la fase organica con Et<sub>2</sub>O (300mL).

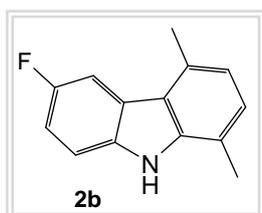
Successivamente quest'ultima si lava con una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub>, si anidrifca su MgSO<sub>4</sub> anidro, si decolora su carbone vegetale, si filtra ed infine si concentra a pressione ridotta ottenendo il grezzo di reazione. Per la purificazione di tale grezzo si utilizza una colonna cromatografica (gel di silice, miscela eluente Et<sub>2</sub>O/Cicloesano: 7/3).

**6.1.1 Sintesi di: 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2a).**

✓ **Solido di colore crema**  
**C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClN**; **PM = 229 g/mol**  
**Resa % =73**; **p.F = 130°C**

**Analisi spettroscopica:**

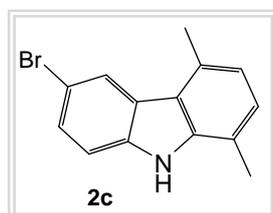
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.83 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.08 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.36 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.50 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.04 (s, 1H, Ar); 11.34 (s, 1H, NH).

**6.1.2 Sintesi di: 6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2b).**

✓ **Solido di colore crema**  
**C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>FN**; **PM = 213 g/mol**  
**Resa % =64**; **p.F = 106°C**

**Analisi spettroscopica:**

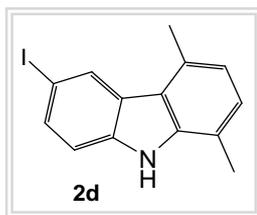
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.88 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.14 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.25-7.31 (m, 1H, Ar); 7.53-7.57 (m, 1H, Ar); 7.87 (dd, J<sub>1</sub>=9.75Hz, J<sub>2</sub>=1.96Hz, 1H, Ar); 11.27 (s, 1H, NH).

**6.1.3 Sintesi di: 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2c).**

✓ **Solido di colore violetto**  
**C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>BrN**; **PM = 274 g/mol**  
**Resa % =78**; **p.F = 148°C**

**Analisi spettroscopica:**

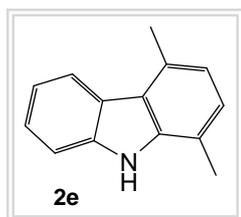
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.85 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.10 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.47-7.51 (m, 2H, Ar); 8.16 (s, 1H, Ar); 11.36 (s, 1H, NH).

**6.1.4 Sintesi di: 6-iodio-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2d).**

✓ **Solido di colore crema**  
**C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>I<sub>N</sub>**; PM = 321 g/mol  
**Resa % =53; p.F = 174°C**

**Analisi spettroscopica:**

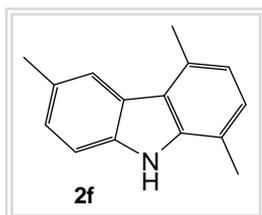
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.85 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.10 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.37 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.63 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 8.34 (s, 1H, Ar); 11.33 (s, 1H, NH).

**6.1.5 Sintesi di: 1,4-dimetil-9H-carbazolo(2e).**

✓ **Solido di colore crema**  
**C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N**; PM = 195 g/mol  
**Resa % =51; p.F = 102°C**

**Analisi spettroscopica:**

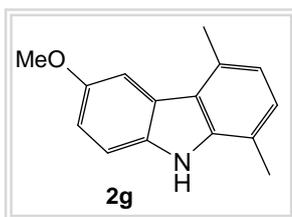
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.82 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.05 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.13 (t, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.35 (t, J=7.81Hz, 1H, Ar); 7.50 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.07 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 11.14 (s, 1H, NH).

**6.1.6 Sintesi di: 1,4,6-trimetil-9H-carbazolo(2f).**

✓ **Solido di colore marrone**  
**C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N**; PM = 209 g/mol  
**Resa % =53; p.F = 124°C**

**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.80 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.02 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.19 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.41 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.89 (s, 1H, Ar); 11.01 (s, 1H, NH).

**6.1.7 Sintesi di: 6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2g).**

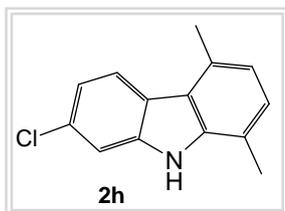
✓ Solido di colore marrone chiaro

 $C_{15}H_{15}NO$ ; PM = 225 g/mol

Resa % =50; p.F = 134°C

**Analisi spettroscopica:**

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.53 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.80 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.89 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 6.84 (d,  $J=6.83$ Hz, 1H, *Ar*); 7.06-7.11 (m, 2H, *Ar*); 7.47 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, *Ar*); 7.62 (s, 1H, *Ar*); 11.00 (s, 1H, *NH*).

**6.1.8 Sintesi di: 7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2h).**

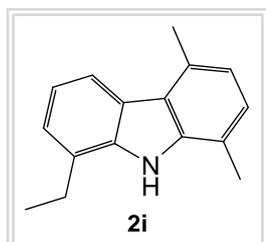
✓ Solido di colore viola

 $C_{14}H_{12}ClN$ ; PM = 229 g/mol

Resa % =68; p.F = 140°C

**Analisi spettroscopica:**

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  2.52 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.81 (s, 3H,  $CH_3$ ); 6.95 (d, 1H, *Ar*); 7.14 (d, 1H, *Ar*); 7.22 (dd, 1H, *Ar*); 7.44 (d, 1H, *Ar*); 8.02 (br, 1H, *NH*); 8.05 (s, 1H, *Ar*).

**6.1.9 Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazolo(2i).**

✓ Solido di colore crema

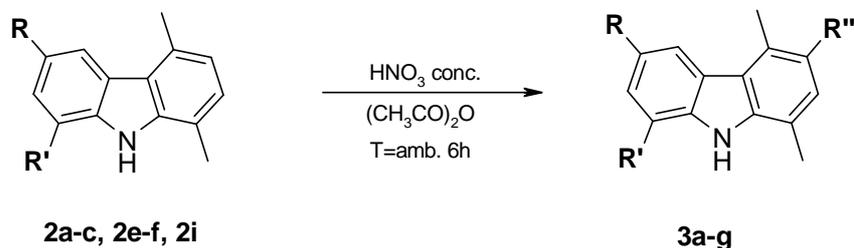
 $C_{16}H_{17}N$ ; PM = 223 g/mol

Resa % = 85; p.F = 118°C

**Analisi spettroscopica:**

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.36 (t,  $J=7.33$ Hz, 3H,  $CH_2CH_3$ ); 2.61 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.78 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.05-3.11 (q,  $J=7.33$ Hz, 2H,  $CH_2CH_3$ ); 6.87 (d,  $J=6.83$ Hz, 1H, *Ar*); 7.10 (d,  $J=6.83$ Hz, 1H, *Ar*); 7.15 (t,  $J=7.81$ Hz, 1H, *Ar*); 7.25 (d,  $J=6.83$ Hz, 1H, *Ar*); 7.98 (d,  $J=7.83$ Hz, 1H, *Ar*); 10.72 (s, 1H, *NH*).

## 6.2 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 1,4-dimetil-3-nitro, 6-nitro, e 3,6-dinitro-9H-carbazoli diversamente sostituiti(3a-f).



Starting	R	R'	Prodotti	R	R	R''	Resa %
2a	Cl	H	3a	Cl	H	NO <sub>2</sub>	84
2b	F	H	3b	F	H	NO <sub>2</sub>	66
2c	Br	H	3c	Br	H	NO <sub>2</sub>	86
2e	H	H	3d	NO <sub>2</sub>	H	NO <sub>2</sub>	81
2f	CH <sub>3</sub>	H	3e	CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	70
2i	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3f	H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	75
2e	H	H	3g	NO <sub>2</sub>	H	H	75

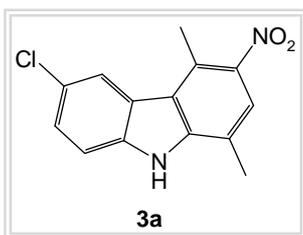
### Procedimento:

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si dissolvono Xg (Xmmol) di 1,4-dimetil-9H-carbazolo diversamente sostituito in XmL di (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O.

Di seguito alla T=0-5°C, raggiunta mediante l'aiuto di un bagno di ghiaccio, si aggiunge goccia a goccia e negli opportuni rapporti molarli HNO<sub>3</sub> fumante al 100% (d=1.52 g/mL).

Nello specifico per la preparazione degli 1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazoli (**3a-c**; **3e-g**) si aggiunge ai composti di partenza **2a-c**; **2e-f** e **2i** HNO<sub>3</sub> in rapporto equimolare; mentre per la preparazione del derivato **3d**, al composto di partenza **2e** si aggiunge acido nitrico in rapporto molare (1/2). Si lascia, quindi reagire a temperatura ambiente per 6 ore. Il precipitato ottenuto si filtra sottovuoto e si lava con Et<sub>2</sub>O ottenendo un solido puro.

### 6.2.1 Sintesi di: 6-cloro-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3a).



✓ Solido di colore giallo

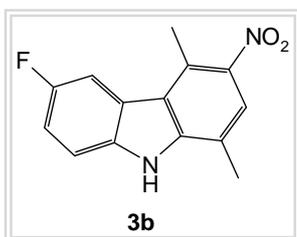
$C_{14}H_{11}ClN_2O_2$ ; PM = 274 g/mol

Resa % = 84; p.F = 244°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.54 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.91 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.50 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 7.60 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 7.86 (s, 1H, Ar); 8.18 (s, 1H, Ar); 12.03 (s, 1H, NH).

### 6.2.2 Sintesi di: 6-fluoro-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3b).



✓ Solido di colore arancio

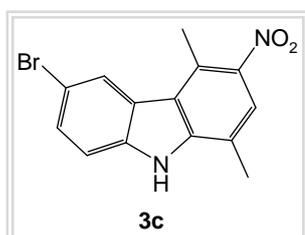
$C_{14}H_{11}FN_2O_2$ ; PM = 258 g/mol

Resa % = 66; p.F = 184°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.47 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.84 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.28-7.33 (m, 1H, Ar); 7.51-7.55 (m, 1H, Ar); 7.79 (s, 1H, Ar); 7.89 (dd,  $J_1=1.95$ Hz,  $J_2=9.75$ Hz, 1H, Ar); 11.85 (s, 1H, NH).

### 6.2.3 Sintesi di: 6-bromo-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3c).



✓ Solido di colore giallo

$C_{14}H_{11}BrN_2O_2$ ; PM = 319 g/mol

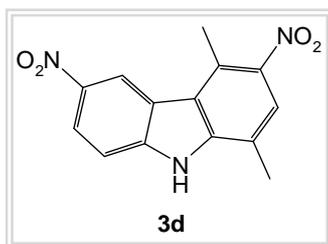
Resa % = 86; p.F = 264°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.54 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.90 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.54 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 7.59-7.63 (m, 1H, Ar); 7.85 (s, 1H, Ar); 8.30 (s, 1H, Ar); 12.03 (s, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3317 (NH); 1304 ( $NO_2$ ); altre bande 1712; 1454; 1244; 1193; 625.

### 6.2.4 Sintesi di: 1,4-dimetil-3,6-dinitro-9H-carbazolo(3d).



✓ Solido di colore giallo ocra

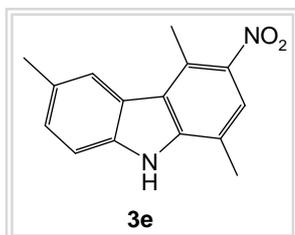
$C_{14}H_{11}N_3O_4$ ; PM = 285 g/mol

Resa % = 81; p.F > 260°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.52 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.87 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.63 (d, J=9.75Hz, 1H, Ar); 7.86 (s, 1H, Ar); 8.30 (d, J=8.75Hz, 1H, Ar); 8.85 (s, 1H, Ar); 12.46 (s, 1H, NH).

### 6.2.5 Sintesi di: 1,4,6-trimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3e).



✓ Solido di colore marrone

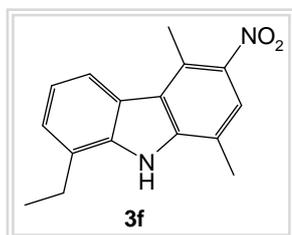
$C_{15}H_{14}N_2O_2$ ; PM = 254 g/mol

Resa % = 70; p.F = 168°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.49 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.53 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.94 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.30 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 7.48 (d, J=8.75Hz, 1H, Ar); 7.81 (s, 1H, Ar); 8.02 (s, 1H, Ar); 11.74 (s, 1H, NH).

### 6.2.6 Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo(3f).



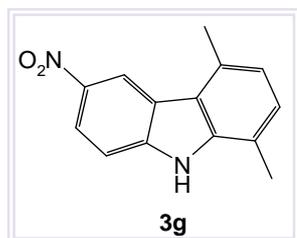
✓ Solido di colore giallo ocra

$C_{16}H_{16}N_2O_2$ ; PM = 268 g/mol

Resa % = 75; p.F = 232°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.30 (t, J=7.31Hz, 3H,  $CH_2CH_3$ ); 2.59 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.90 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.99-3.03 (q, J=7.31Hz, 2H,  $CH_2CH_3$ ); 7.17-7.21 (m, 1H, Ar); 7.30 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.80 (s, 1H, Ar); 8.03 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 11.28 (s, 1H, NH).

**6.2.7 Sintesi di: 6-nitro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(3g).**

✓ **Solido di colore giallo ocra**

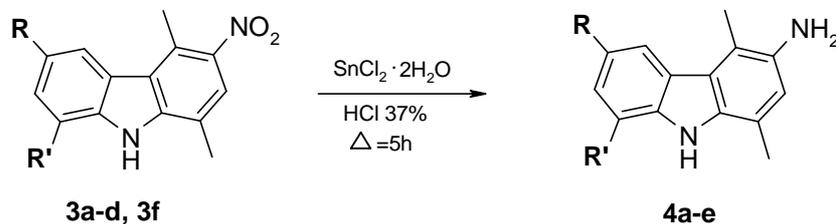
**C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; PM = 240 g/mol**

**Resa % = 75; p.F = 162°C**

**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.93 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.16 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.57 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.24 (d, J=9.75Hz, 1H, Ar); 8.79 (s, 1H, Ar); 11.93 (s, 1H, NH).

### 6.3 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 3-ammino-1,4-dimetil-9H-carbazoli diversamente sostituiti(4a-e).



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'	Resa %
3a	Cl	H	4a	Cl	H	52
3b	F	H	4b	F	H	46
3c	Br	H	4c	Br	H	66
3d	NO <sub>2</sub>	H	4d	NH <sub>2</sub>	H	61
3f	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4e	H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	45

#### Procedimento:

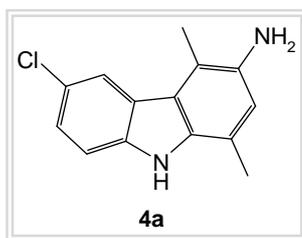
In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si dissolvono Xg (Xmmol) di 1,4-dimetil-3-nitro-9H-carbazolo diversamente sostituito in circa 20mL di HCl al 37%.

Di seguito si aggiungono per l'ottenimento dei composti (**4a-c**; **4e**) Xg (Xmmol) di cloruro stannoso in rapporto molare (**3a-c**; **3e**)/SnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O= 1/6; mentre per il composto diammino **4d** si aggiunge cloruro stannoso in rapporto molare: **3d**/SnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O= 1/10.

La soluzione si lascia a riflusso per circa 5 ore sotto agitazione.

Dopo raffreddamento la miscela di reazione è dapprima versata in una soluzione acquosa di NaOH al 20% e di seguito estratta con AcOEt. La fase organica estratta si anidrifca su MgSO<sub>4</sub> anidro, si filtra ed infine si evapora a pressione ridotta ottenendo di volta in volta l'ammina desiderata.

### 6.3.1 Sintesi di: 3-ammino-6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4a).



✓ Solido di colore crema

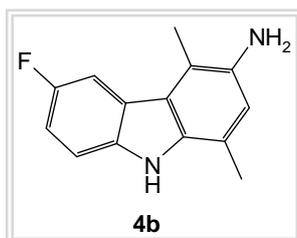
$C_{14}H_{13}ClN_2$ ; PM = 244 g/mol

Resa % = 52; p.F = 182°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.40 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.50 (s, 3H,  $CH_3$ ); 4.45 (br, 2H,  $NH_2$ ); 6.70 (s, 1H, *Ar*); 7.28 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, *Ar*); 7.41 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, *Ar*); 8.04 (s, 1H, *Ar*); 10.88 (s, 1H, *NH*).

### 6.3.2 Sintesi di: 3-ammino-6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4b).



✓ Solido di colore marrone-rossiccio

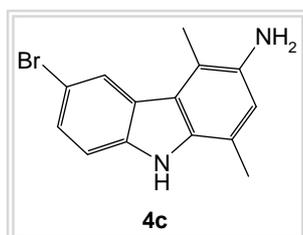
$C_{14}H_{13}FN_2$ ; PM = 228 g/mol

Resa % = 46; p.F = 183°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.40 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.50 (s, 3H,  $CH_3$ ); 4.49 (br, 2H,  $NH_2$ ); 6.70 (s, 1H, *Ar*); 7.14 (t,  $J=8.79$ Hz, 1H, *Ar*); 7.37-7.40 (m, 1H, *Ar*); 7.82 (d,  $J=10.75$ Hz, 1H, *Ar*); 10.74 (s, 1H, *NH*).

### 6.3.3 Sintesi di: 3-ammino-6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4c).



✓ Solido di colore crema

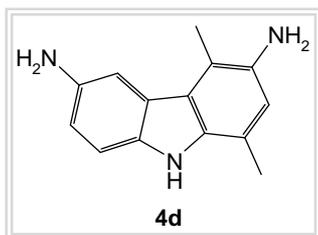
$C_{14}H_{13}BrN_2$ ; PM = 289 g/mol

Resa % = 66; p.F = 184°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.46 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.54 (s, 3H,  $CH_3$ ); 4.51 (br, 2H,  $NH_2$ ); 6.76 (s, 1H, *Ar*); 7.40-7.48 (m, 2H, *Ar*); 8.23 (s, 1H, *Ar*); 10.96 (s, 1H, *NH*).

### 6.3.4 Sintesi di: 3,6-diammino-1,4-dimetil-9H-carbazolo(4d).



✓ Solido di colore marrone

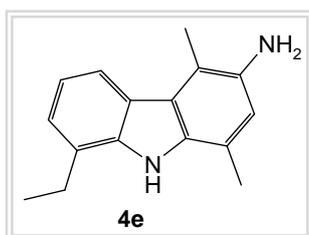
$C_{14}H_{15}N_3$ ; PM = 225 g/mol

Resa % = 61; p.F = 210°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.36 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.52 (s, 3H,  $CH_3$ ); 4.26 (br, 2H,  $NH_2$ ); 4.52 (br, 2H,  $NH_2$ ); 6.59 (s, 1H, *Ar*); 6.68 (d,  $J=6.83$ Hz 1H, *Ar*); 7.14 (d,  $J=7.79$ Hz 1H, *Ar*); 7.38 (s, 1H *Ar*); 10.08 (s, 1H, *NH*).

### 6.3.5 Sintesi di: 3-ammino-1,4-dimetil-8-etil-9H-carbazolo(4e).



✓ Solido di colore ocra

$C_{16}H_{18}N_2$ ; PM = 238 g/mol

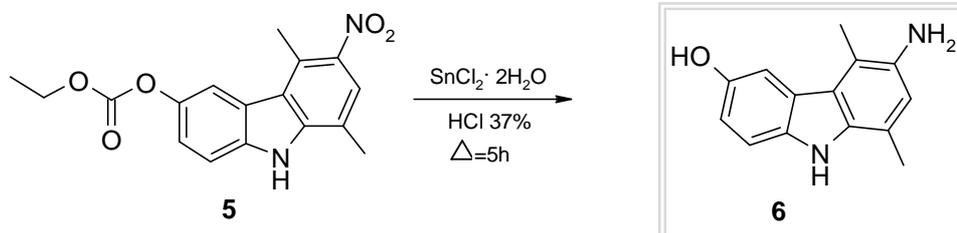
Resa % = 45; p.F = 182°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.29 (t,  $J=7.81$ Hz, 3H,  $CH_2CH_3$ ); 2.45 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.48 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.93-3.00 (q,  $J=7.81$ Hz, 2H,  $CH_2CH_3$ ); 4.35 (br, 2H,  $NH_2$ ); 6.63 (s, 1H, *Ar*); 6.98 (t,  $J=7.81$ Hz, 1H, *Ar*); 7.09 (d,  $J=6.83$ Hz, 1H, *Ar*); 7.92 (d,  $J=7.79$ Hz, 1H, *Ar*); 10.16 (s, 1H, *NH*).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3410 ( $NH_2$ ); 3254 (*NH*); 2964 ( $CH_3$ ) altre bande; 1614; 1515; 1308; 750.

## 6.4 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-ammino-5,8-dimetil-9H-carbazol-3-olo(6).



✓ **Solido di colore argento**

**$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ ; PM = 226 g/mol**

**Resa % =40; p.F = 234°C**

### Procedimento:

Il 6-ammino-5,8-dimetil-9H-carbazol-3-olo (**6**) è stato ottenuto seguendo la stessa procedura di sintesi dei composti (**4a-e**), utilizzando 1.5g (4.57mmol) di 5,8-dimetil-6-nitro-3-etossicarbonilossi-9H-carbazolo (**5**), 6.19g (27.4mmol) di cloruro stannoso (rapp. molari:  $5/\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 1/6$ ) in 40mL di HCl al 37%. La soluzione si lascia a riflusso per circa 5 ore sotto agitazione.

Dopo raffreddamento la miscela di reazione è dapprima versata in una soluzione acquosa di NaOH al 20% e di seguito estratta con AcOEt.

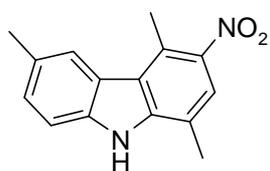
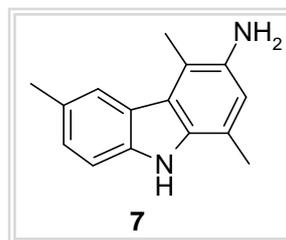
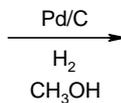
La fase organica si anidrifca su  $\text{MgSO}_4$  anidro, si filtra e poi si evapora a pressione ridotta ottenendo un solido puro.

### Analisi spettroscopica:

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  2.52 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 4.35 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6.68 (s, 1H, Ar); 6.84 (d,  $J=7.83\text{Hz}$ , 1H, Ar); 7.26 (d,  $J=7.83\text{Hz}$ , 1H, Ar); 7.53 (s, 1H, Ar); 8.74 (s, 1H, OH); 10.32 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3448 (OH); 3401-3363 ( $\text{NH}_2$ ); 3298 (NH); altre bande 2922; 1514; 1461; 1206; 1146; 848.

## 6.5 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 3-ammino-1,4,6-trimetil-9H-carbazolo(7).

**3e****7**

✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>; PM = 224 g/mol**

**Resa % =54; p.F = 180°C**

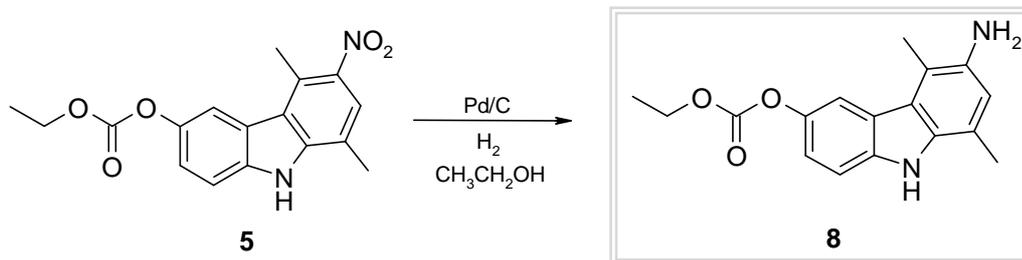
### Procedimento:

Una soluzione di 1,4,6-trimetil-3-nitro-9H-carbazolo (**3e**) (5g, 19,7mmoli) in metanolo (200mL) in presenza di 0,70g di Pd/C (al 10%), sotto la pressione di 30Kg d'idrogeno, si lascia in autoclave sotto agitazione per 24 ore. Successivamente eliminato l'eccesso d'idrogeno tale soluzione si filtra e si concentra a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto cristallizza da etere etilico, ottenendo un solido puro.

### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.39 (br, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.69 (s, 1H, Ar); 7.15 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.35 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.95 (s, 1H, Ar); 10.55 (s, 1H, NH).

## 6.6 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-ammino-5,8-dimetil-3-etossicarbonilossi-9H-carbazolo(8).



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; PM = 298 g/mol**

**Resa % =66; p.F = 184°C**

### Procedimento:

Una soluzione di 5,8-dimetil-6-nitro-3-etossicarbonilossi-9H-carbazolo (**5**) (1,5g, 4.57mmol) in etanolo (200mL) in presenza di 0,70g di Pd/C (al 10%), sotto la pressione di 30Kg d'idrogeno, si lascia in autoclave sotto agitazione per 24 ore. Successivamente la soluzione si filtra e si concentra a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto cristallizza da etere etilico, ottenendo un solido puro.

### Analisi spettroscopica:

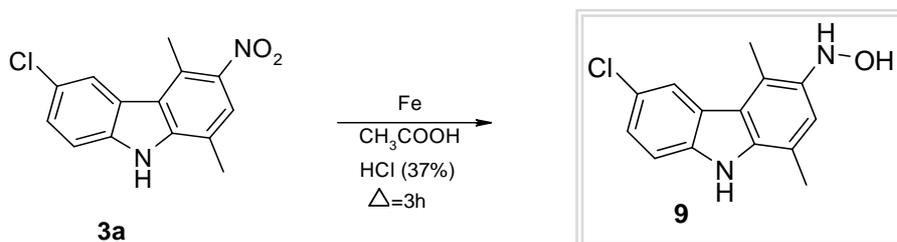
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.29-1.36 (m, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.24-4.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4.44 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.71 (s, 1H, Ar); 7.14 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.41 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 7.89 (s, 1H, Ar); 10.82 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3380 (NH<sub>2</sub>); 3184 (NH); 2983 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1746 (C=O); 1579 (CN); altre bande; 1523; 1259; 1192; 899.

## 6.7 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-cloro-1,4-dimetil-3-idrossilammino-9H-carbazolo(9).

Un'ulteriore metodica sintetica ci ha permesso di ottenere, a partire dal nitro derivato **3a**, il composto 3-ammino-6-cloro-*N*-idrossi-1,4-dimetil-9H-carbazolo (**9**).

In questo caso al composto **3a** (1,5g; 5.46mmol), solubilizzato in 30mL di CH<sub>3</sub>COOH e 3mL di HCl al 37%, si aggiunge la limatura di ferro (1,52g; 2.73mmol); (rapp. molari: **3a**/limatura di ferro= 1/5), e si lascia a riflusso per circa 3 ore.



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O**; PM = 260 g/mol

**Resa % =48**; p.F>260°C

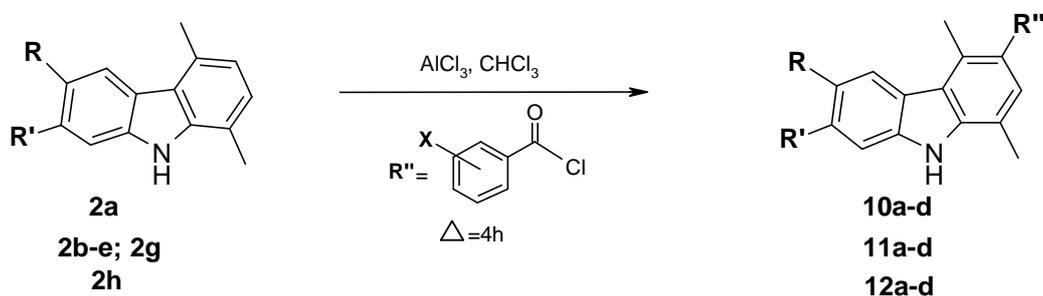
Dopo raffreddamento si idrolizza (pH=10-12) con una soluzione di NaOH al 20%. La fase organica viene di seguito estratta con AcOEt, anidrificata su MgSO<sub>4</sub>, decolorata su carbone vegetale, infine filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Dalla cristallizzazione prima con Et<sub>2</sub>O e poi con CH<sub>3</sub>CN si ottiene un solido di colore crema.

### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.33 (s, 1H, Ar); 7.43-7.49 (m, 1H, Ar); 7.58 (d, J=8.75Hz, 1H, Ar); 8.17 (s, 1H, Ar); 8.35 (s, 1H, OH); 9.71 (s, 1H, NH); 11.45 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3290 (NH, OH); 2915-2861 (CH<sub>3</sub>); 1646 (NH amina); altre bande 1508; 1450; 1298; 804; 654.

## 6.8 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 1,4-dimetil-9H-benzoil carbazoli diversamente sostituiti(10a-d; 11a-d; 12a-d).



Starting	R	R'	Prodotti	R''	Resa %
2a	Cl	H	10a		57
2a	Cl	H	10b		61
2a	Cl	H	10c		50
2a	Cl	H	10d		50
2b	F	H	11a		59
2c	Br	H	11b		50
2e	H	H	11c		51
2g	-OCH <sub>3</sub>	H	11d		40
2h	H	Cl	12a		69
2h	H	Cl	12b		47
2h	H	Cl	12c		63
2h	H	Cl	12d		67

**Procedimento:**

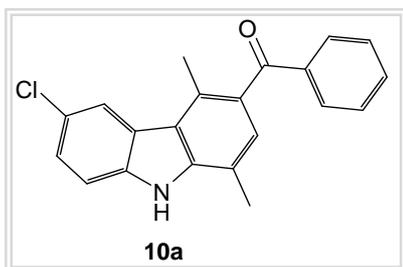
In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano Xg (Xmmol) di 1,4-dimetil-9H-carbazolo diversamente sostituito, in XmL di CHCl<sub>3</sub> anidro.

Si aggiungono successivamente negli opportuni rapporti molari Xg (Xmmol) di AlCl<sub>3</sub> (**derivato carbazolico/AlCl<sub>3</sub>**= 1/3) e Xg (Xmmol) di benzoilcloruro opportunamente sostituito (**derivato carbazolico/benzoilcloruro opportunamente sostituito**= 1/1.3). La soluzione si lascia a riflusso per circa 4 ore sotto agitazione (T=70°C) e poi a temperatura ambiente tutta la notte.

Successivamente si versa la soluzione in acqua e ghiaccio e si acidifica mediante l'aggiunta di circa 1mL di HCl concentrato al 37%.

Si estrae con CHCl<sub>3</sub> e la fase organica ottenuta, si lava più volte con H<sub>2</sub>O, si anidifica su MgSO<sub>4</sub> anidro, si filtra ed infine si evapora a pressione ridotta ottenendo il grezzo di reazione. La purificazione di tale grezzo avviene mediante semplice cristallizzazione prima con CH<sub>3</sub>CN e poi con Et<sub>2</sub>O.

### 6.8.1 Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-fenil-metanone(10a).



✓ Solido di colore giallo ocra

$C_{21}H_{16}ClNO$ ; PM = 334 g/mol

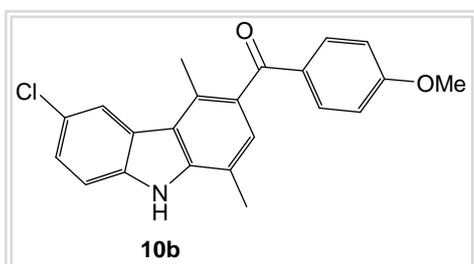
Resa % = 57; p.F > 260°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  2.48 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.71 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.22 (s, 1H, Ar); 7.31-7.44 (m, 4H, Ar); 7.51-7.53 (m, 1H, Ar); 7.74-7.81 (m, 2H, Ar); 8.10 (d, 1H, Ar); 8.22 (br, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3296 (NH); 2963 ( $CH_3$ ); 1637 (C=O); altre bande 1582; 1445; 1261; 1096; 1020; 799, 594.

### 6.8.2 Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-4-metossifenil-metanone(10b).



✓ Solido di colore marrone chiaro

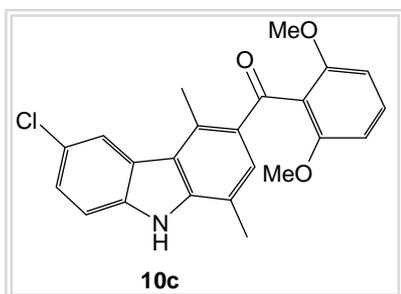
$C_{22}H_{18}ClNO_2$ ; PM = 364 g/mol

Resa % = 61; p.F = 192°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  2.48 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.68 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 6.88 (d, J=8.70 Hz, 2H, Ar); 7.10-7.30 (m, 2H, Ar); 7.42 (d, 1H, Ar); 7.78 (d, J=9.00 Hz, 2H, Ar); 8.02 (d, J=8.40 Hz, 1H, Ar); 8.20 (br, 1H, NH).

**6.8.3 Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(2,6-dimetossifenil)-metanone(10c).**



✓ **Solido di colore rosa scuro**

**C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>3</sub>; PM = 394 g/mol**

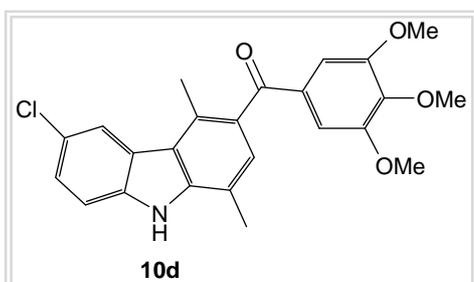
**Resa % = 50; p.F>260°C**

**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.67 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.56 (d, J=8.40Hz, 2H, Ar); 7.17-7.38 (m, 4H, Ar); 8.22 (s, 1H, Ar); 8.42 (br, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3328 (NH); 2962 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); 1635 (C=O); altre bande 1580; 1470; 1261; 1109; 799; 597.

**6.8.4 Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone(10d).**



✓ **Solido di colore grigio scuro**

**C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>; PM = 423 g/mol**

**Resa % = 50; p.F=230°C**

**Analisi spettroscopica:**

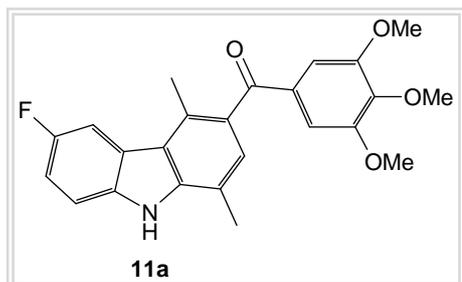
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.71 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>); 7.00 (s, 2H, Ar); 7.20 (s, 1H, Ar); 7.45 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.58 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.14 (s, 1H, Ar) 11.67 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3461 (NH); 2938 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); 1636 (C=O); altre bande 1577; 1331; 1129; 738.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 424 (M+H)<sup>+</sup>.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 16.48; 17.65; 55.97 (2C); 60.19; 107.31 (2C); 112.69; 117.40; 120.31; 121.83; 123.46; 124.55; 125.29; 127.51; 129.60; 130.50; 133.85; 138.81; 140.67; 141.69; 152.66 (2C); 196.62.

### 6.8.5 Sintesi di: (6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone(11a).



✓ **Solido di colore verde chiaro**

$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{FNO}_4$ ;  $\text{PM} = 407 \text{ g/mol}$

**Resa % = 59; p.F=192°C**

#### Analisi spettroscopica:

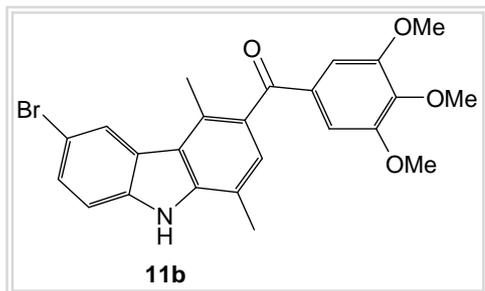
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.63 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.67 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.69 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 6.95 (s, 2H, *Ar*); 7.16 (s, 1H, *Ar*); 7.20-7.27 (m, 1H, *Ar*); 7.48-7.56 (m, 1H, *Ar*); 7.85 (dd,  $J_1=9.75\text{Hz}$ ,  $J_2=1.95\text{Hz}$ , 1H, *Ar*), 11.53 (s, 1H, *NH*).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3334 (*NH*); 2935 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ ); 1637 ( $\text{C=O}$ ); altre bande 1577; 1332; 1127; 996; 778.

**MS (ESI):** 406 (M-H) $^-$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 16.48; 17.54; 55.97 (2C); 60.18; 107.30 (2C); 108.09 (d,  $J=23.95\text{Hz}$ ); 112.04 (d,  $J=9.08\text{Hz}$ ); 113.11 (d,  $J=24.78\text{Hz}$ ); 117.29; 120.86 (d,  $J=4.12\text{Hz}$ ); 123.60 (d,  $J=9.90\text{Hz}$ ); 127.40; 129.17; 130.57; 133.96; 136.83; 141.13; 141.62, 152.63 (2C), 156.55 (d,  $J=232.10\text{Hz}$ ); 196.62.

### 6.8.6 Sintesi di: (6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone(11b).



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>BrNO<sub>4</sub>; PM = 468 g/mol**

**Resa % = 50; p.F=188°C**

#### Analisi spettroscopica:

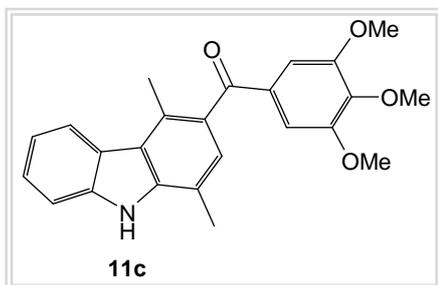
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.69 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.97 (s, 2H, Ar); 7.19 (s, 1H, Ar); 7.48-7.53 (m, 2H, Ar); 8.22 (s, 1H, Ar); 11.68 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3342 (NH); 2932 (CH<sub>3</sub>; OCH<sub>3</sub>); 1638 (C=O); altre bande 1579; 1412; 1331; 1129; 996; 731.

**MS (ESI):** 466 e 468 (M-H)<sup>-</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 16.48; 17.66; 55.97 (2C); 60.18; 107.30 (2C); 111.29; 113.17; 117.38; 120.19; 124.70; 125.21; 127.51; 127.89; 129.64; 130.46; 133.84; 130.07; 140.47; 141.68; 152.66 (2C); 196.61.

### 6.8.7 Sintesi di: (1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone(11c).



✓ Solido di colore crema

$C_{24}H_{23}NO_4$ ; PM = 389 g/mol

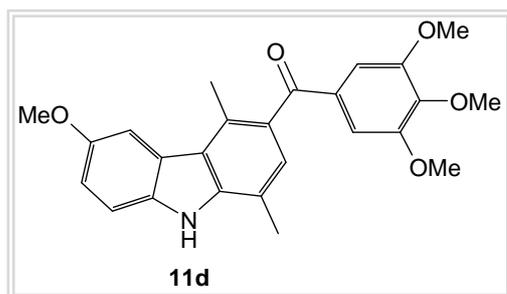
Resa % =51; p.F=177°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.55 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.79 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.80 (t, J=8.79Hz, 9H,  $OCH_3$ ); 7.08 (s, 2H, Ar); 7.23-7.30 (m, 2H, Ar); 7.47-7.53 (m, 1H, Ar); 7.65 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.22-8.26 (m, 1H, Ar); 11.60 (s, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3314 (NH); 2936 ( $CH_3$ ,  $OCH_3$ ); 1633 ( $C=O$ ); altre bande 1579; 1337; 1118; 731.

### 6.8.8 Sintesi di: (6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone(11d).



✓ Solido di colore giallo chiaro

$C_{25}H_{25}NO_5$ ; PM = 419 g/mol

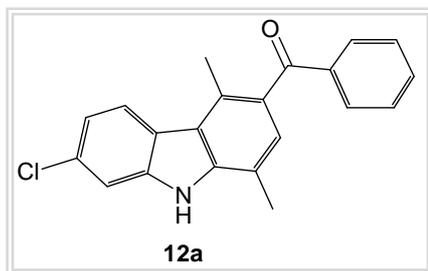
Resa % =48; p.F=184°C

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.51 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.73 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.72 (s, 9H,  $OCH_3$ ); 3.84 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 7.01 (s, 2H, Ar); 7.09 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.13-7.17 (m, 1H, Ar); 7.48 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.65 (s, 1H, Ar); 11.30 (s, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3385 (NH); 2941 ( $CH_3$ ,  $OCH_3$ ); 1642 ( $C=O$ ); altre bande 1582; 1469; 1333; 1128; 775.

**6.8.9 Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-fenilmetanone(12a).**

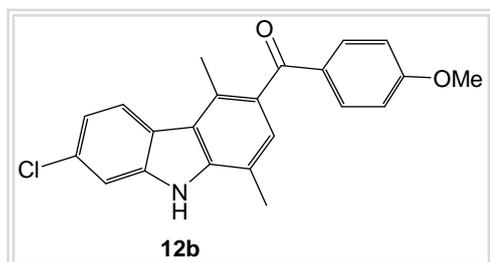


✓ **Solido di colore giallo scuro**  
**C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>ClNO**; **PM = 334 g/mol**  
**Resa % = 69**; **p.F > 260°C**

**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 2.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.19 (s, 1H, Ar); 7.25-7.45 (m, 2H, Ar); 7.46-7.756 (m, 2H, Ar); 7.70-7.82 (m, 2H, Ar); 7.98 (d, 1H, Ar); 8.11 (d, 1H, Ar); 8.90 (br, 1H, NH).

**6.8.10 Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-4-metossifenilmetanone(12b).**



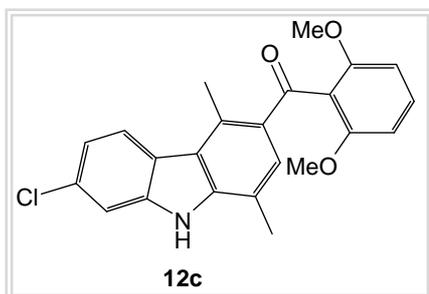
✓ **Solido di colore marrone scuro**  
**C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub>**; **PM = 364 g/mol**  
**Resa % = 47**; **p.F = 192°C**

**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.88 (d, J=8.70 Hz, 2H, Ar); 7.10-7.30 (m, 2H, Ar); 7.42 (d, 1H, Ar); 7.78 (d, J=9.00 Hz, 2H, Ar); 8.02 (d, J=8.40 Hz, 1H, Ar); 8.20 (br, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3275 (NH); 2963 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); 1634 (C=O); altre bande 1597; 1335; 1260; 1093; 1025; 798; 596.

**6.8.11 Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(2,6-dimetossifenil)-metanone(12c).**



✓ **Solido di colore rosa**

**C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>3</sub>; PM = 394 g/mol**

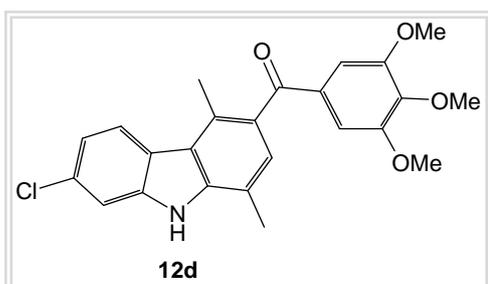
**Resa % = 63; p.F>260°C**

**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.68 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.59 (dd, J<sub>1</sub>=8.40Hz, J<sub>2</sub>=2.01Hz, 2H, Ar); 7.17-7.38 (m, 4H, Ar); 8.10 (br, 1H, NH); 8.16 (d, J=8.40 Hz, 1H, Ar);

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3327 (NH); 2963 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); 1638 (C=O); altre bande 1573; 1469; 1261; 1021; 800; 595.

**6.8.12 Sintesi di: (7-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone(12d).**



✓ **Solido di colore bianco**

**C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>; PM = 423 g/mol**

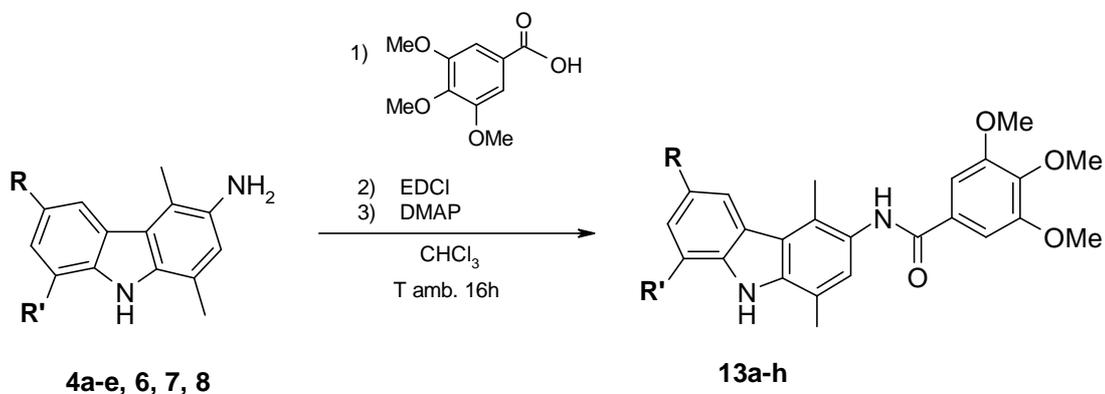
**Resa % = 67; p.F=192°C**

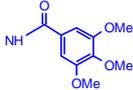
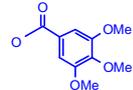
**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.74 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>); 7.02 (s, 2H, Ar); 7.24 (m, 2H, Ar); 7.53 (d, 1H, Ar); 8.17 (d, 1H, Ar); 11.41 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** Bande principali: 3414 (NH); 1644 (C=O).

## 6.9 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: *N*-(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammidi diversamente sostituite(13a-h).



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'	Resa %
4a	Cl	H	13a	Cl	H	40
4b	F	H	13b	F	H	30
4c	Br	H	13c	Br	H	43
4d	NH <sub>2</sub>	H	13d		H	36
4e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	13e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	23
6	OH	H	13f		H	41
7	CH <sub>3</sub>	H	13g	CH <sub>3</sub>	H	22
8	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	13h	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	31

### Procedimento:

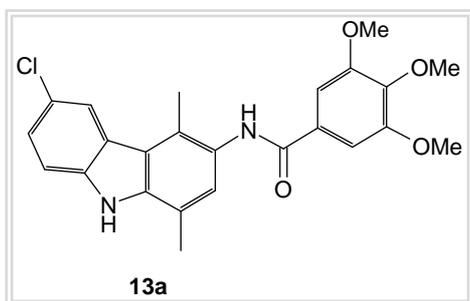
In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano Xg (Xmmol) di 3-ammino-1,4-dimetil-9*H*-carbazolo diversamente sostituito (**4a-e**; **6**; **7**; **8**), in XmL di CHCl<sub>3</sub>. Successivamente si aggiungono negli opportuni rapporti molari: Xg (Xmmol) di acido 3,4,5-trimetossi-benzoico (**4a-c**; **4e**; **6**; **7**; **8**)/ATM-benzoico= 1/1.3); Xg (Xmmol) di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDCI) (**4a-c**; **4e**; **6**; **7**; **8**)/EDCI= 1/1.3); ed infine in quantità catalitiche la 4-dimetilamminopiridina (DMAP). La soluzione si lascia sotto agitazione per circa 16 ore a temperatura ambiente.

Si estrae la fase organica mediante ulteriore aggiunta di CHCl<sub>3</sub> e successivi lavaggi prima con una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> e poi semplicemente con H<sub>2</sub>O. Si anidifica su MgSO<sub>4</sub> anidro, si filtra ed infine si evapora a pressione ridotta ottenendo il grezzo di

reazione. La purificazione di tale grezzo avviene mediante semplice cristallizzazione prima con CH<sub>3</sub>CN e poi con Et<sub>2</sub>O.

Per la sintesi e la purificazione del derivato **13d** vedere il paragrafo 6.9.4 pag. 158.

### 6.9.1 Sintesi di: *N*-(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzamide(13a).



✓ **Solido di colore bianco**

**C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 438 g/mol**

**Resa % = 40; p.F > 260°C**

#### Analisi spettroscopica:

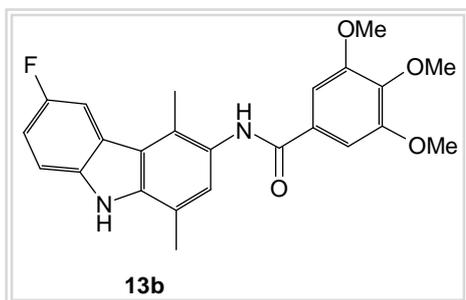
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 7.13 (s, 1H, Ar); 7.37-7.43 (m, 3H, Ar); 7.55 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.12 (s, 1H, Ar); 9.98 (s, 1H, NHC=O); 11.44 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3243 (NH); 2939 (OCH<sub>3</sub>); 1700-1623 (C=O amide); 1131 (C-N); altre bande 1580; 1493; 814; 766.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 438 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.19; 16.57; 56.07 (2C); 60.16; 105.16 (2C); 112.51; 117.73; 120.01; 121.33; 122.88; 124.60; 124.71; 126.69; 126.74; 127.53; 129.78; 138.25; 138.71; 140.14; 152.71 (2C); 165.18.

### 6.9.2 Sintesi di: *N*-(6-fluoro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammide(13b).



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 422 g/mol**

**Resa % = 30; p.F > 260°C**

#### Analisi spettroscopica:

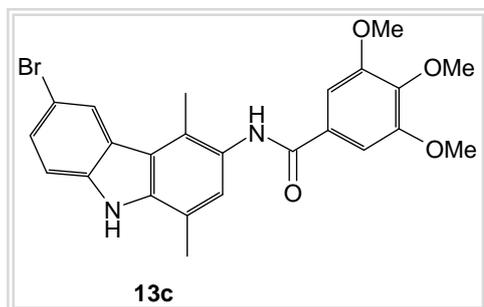
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 7.08 (s, 1H, Ar); 7.22 (t, J=8.77Hz, 1H, Ar); 7.35 (s, 2H, Ar); 7.47-7.51 (m, 1H, Ar); 7.86 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 9.95 (s, 1H, NHC=O); 11.28 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3240 (NH); 2941 (OCH<sub>3</sub>); 1622 (C=O ammido); 1130 (CN); altre bande 1580; 1491; 1005; 827; 763.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 423 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 15.08; 16.57; 56.06 (2C); 60.15; 105.12 (2C); 107.52 (d, J=23.95Hz); 111.81 (d, J=9.08Hz); 112.54 (d, J=26.61Hz); 117.66; 120.55 (d, J=4.12Hz); 123.59 (d, J=9.91Hz); 126.51; 126.62; 127.11; 129.81; 136.76; 138.69; 140.10; 152.70 (2C); 156.32 (d, J=230.45Hz); 165.14.

### 6.9.3 Sintesi di: *N*-(6-bromo-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammide(13c).



✓ **Solido di colore bianco**

**C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 483 g/mol**

**Resa % = 43; p.F > 260°C**

#### Analisi spettroscopica:

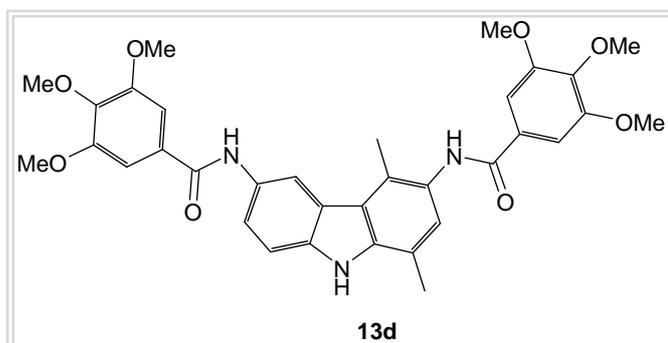
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 7.13 (s, 1H, Ar); 7.38 (s, 2H, Ar); 7.51 (s, 2H, Ar); 8.25 (s, 1H, Ar); 9.98 (s, 1H, NHC=O); 11.46 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3242 (NH); 2939 (OCH<sub>3</sub>); 1644 (C=O amide); 1130 (CN); altre bande 1580; 1491; 1005; 737.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 483 e 485 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.20; 16.57; 56.07 (2C); 60.15; 105.17 (2C); 110.70; 113.01; 117.73; 119.89; 124.20; 125.29; 126.69; 126.77; 127.32; 127.57; 129.76; 138.06; 138.96; 140.14; 152.71 (2C); 165.18.

### 6.9.4 Sintesi di: *N*-{1,4-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossibenzoil)ammino]-9*H*-carbazol-3-il}-3,4,5-trimetossibenzamide(**13d**).



✓ **Solido di colore bianco-argento**

**C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>; PM = 613 g/mol**

**Resa % = 36; p.F > 260°C**

#### Procedimento:

L'*N*-{1,4-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossibenzoil)ammino]-9*H*-carbazol-3-il}-3,4,5-trimetossibenzamide (**13d**) è stata ottenuta seguendo la stessa procedura di sintesi di (**13a-h**) utilizzando in questo caso 0.4g (1.77mmol) di 1,4-dimetil-9*H*-carbazolo-3,6-diammino (**4d**), 0.750g (3.54mmol) di ATM-benzoico, 0.678g (3.54mmol) di EDCI e 0.43g (3.54mmol) di DMAP, il tutto solubilizzato in circa 250mL di CHCl<sub>3</sub>. In questo caso non è necessario effettuare l'estrazione poichè, dopo 16 ore si nota la formazione di un precipitato bianco che viene recuperato mediante semplice filtrazione sotto pressione ridotta, ottenendo un solido puro.

#### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>); 7.08 (s, 1H, Ar); 7.34 (s, 2H, Ar); 7.39 (s, 2H, Ar); 7.52 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.71 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.58 (s, 1H, Ar); 9.96 (s, 1H, NHC=O); 10.18 (s, 1H, NHC=O); 11.22 (s, 1H, NH).

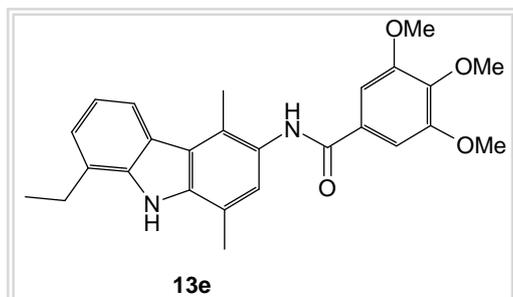
**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3367-3215 (NH); 2940 (OCH<sub>3</sub>); 1631 (C=O ammido); 1127 (CN); altre bande 1582; 1467; 1233; 1127; 751.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 614 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.10; 16.64; 56.09 (2C); 56.14 (2C); 60.18 (2C); 105.17 (2C); 105.22 (2C); 110.73; 114.98; 117.55; 119.90; 120.84; 123.24; 126.06; 126.32; 127.13;

129.86; 130.45; 130.66; 137.28; 138.20; 140.10; 140,14; 152.67 (2C); 152.73 (2C); 164.69; 165.19.

**6.9.5 Sintesi di: N-(8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-3,4,5-trimetossibenzammide(13e).**



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 432 g/mol**

**Resa % = 23; p.F=172°C**

**Analisi spettroscopica**

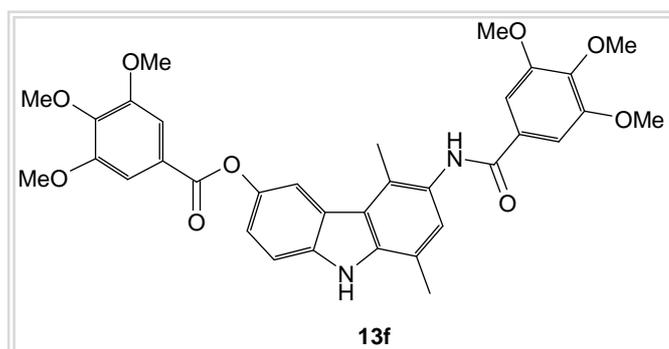
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.33 (t, J=7.33Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.04 (q, J=6.83Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 7.07 (s, 1H, Ar); 7.12 (t, 1H, Ar); 7.22 (d, 1H, Ar); 7.38 (s, 2H, Ar); 7.99 (d, 1H, Ar); 9.96 (s, 1H, NHC=O); 10.73 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3283 (NH); 2936 (OCH<sub>3</sub>); 1645 (C=O ammido); 1126 (CN); altre bande 2963; 1583; 1488; 1336; 754.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 433 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.58; 15.29; 17.09; 23.79; 56.07 (2C); 60.16; 105.13 (2C); 117.75; 119.09; 119.71; 121.36; 123.52; 123.73; 125.91; 126.22; 126.75; 127.24; 129.89; 137.57; 138.76; 140.09; 152.72 (2C); 165.13.

### 6.9.6 Sintesi di: 5,8-dimetil-6-(3,4,5-trimetossibenzammide)-9H-carbazol-3-il-3,4,5-trimetossibenzoato(13f).



✓ **Solido di colore bianco-argento**

**C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>; PM = 614 g/mol**

**Resa % = 41; p.F=150°C**

#### Analisi spettroscopica:

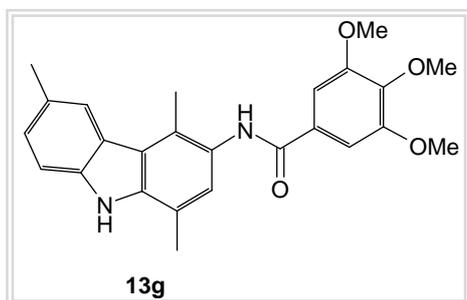
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.88 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 7.12 (s, 1H, Ar); 7.28 (d, J=8.75Hz, 1H, Ar); 7.38 (s, 2H, Ar); 7.46 (s, 2H, Ar); 7.59 (d, J=11.15Hz, 1H, Ar); 7.99 (s, 1H, Ar) 9.97 (s, 1H, NHC=O); 11.38 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3361 (NH); 2938 (OCH<sub>3</sub>); 1715 (C=O estere); 1646 (C=O ammido); 1180; altre bande 1585; 1463; 1337; 1001; 757.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 615 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.14; 16.64; 56.08 (2C); 56.17 (2C); 60.16; 60.32; 105.17 (2C); 107.16 (2C); 111.38; 114.83; 117.69; 119.19; 120.66; 123.56; 124.42; 126.46; 126.56; 127.30; 129.82; 138.10; 138.45; 140,14; 142.27; 143.34; 152.72 (2C); 152.94 (2C); 165.13; 165.18.

**6.9.7 Sintesi di: 3,4,5-trimetossi-N-(1,4,6-trimetil-9H-carbazol-3-il)benzamide(13g).**



✓ **Solido di colore bianco**

**C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 418 g/mol**

**Resa % = 22; p.F > 260°C**

**Analisi spettroscopica:**

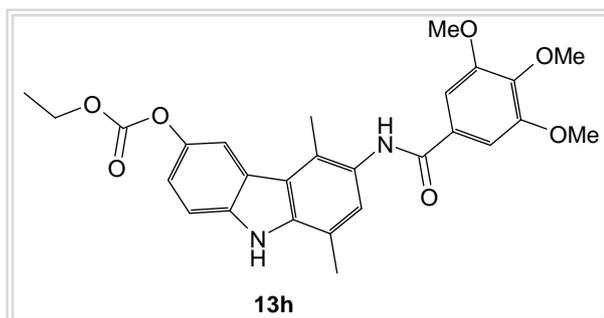
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 2.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 7.04 (s, 1H, Ar); 7.21 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 7.38 (s, 2H, Ar); 7.42 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 7.95 (s, 1H, Ar) 9.94 (s, 1H, NHC=O); 11.08 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3249 (NH); 2938 (OCH<sub>3</sub>); 1644 (C=O ammide); 1129 (CN); altre bande 1581; 1492; 1338; 1007; 805.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 419 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.27; 16.62; 21.39; 56.06 (2C); 60.14; 105.12 (2C); 110.78; 117.21; 120.58; 122.00; 123.72; 125.72; 126.17; 126.37; 126.92; 127.12; 129.87; 137.82; 138.51; 140.06; 152.68 (2C); 165.09.

### 6.9.8 Sintesi di: 5,8-dimetil-6-(3,4,5-trimetossibenzammide)-9H-carbazol-3-il-etilcarbonato(13h).



✓ **Solido di colore bianco-argento**  
**C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; PM = 492 g/mol**  
**Resa % = 31; p.F=206°C**

#### Analisi spettroscopica:

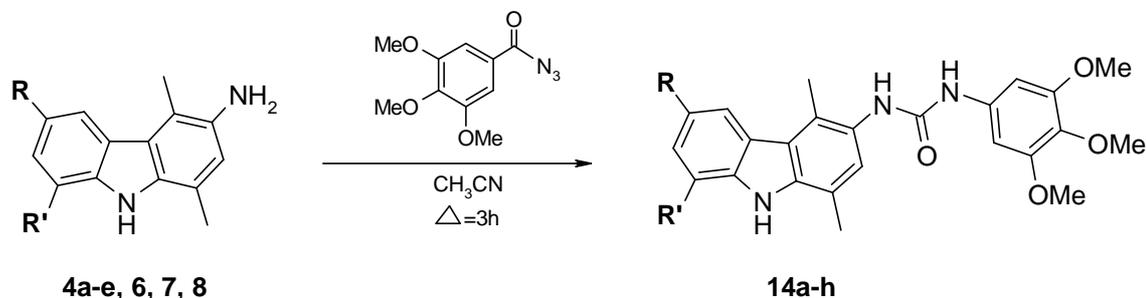
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.30 (t, J=6.83Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4.26 (q, J=6.83Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 7.11 (s, 1H, Ar); 7.25 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.38 (s, 2H, Ar); 7.54 (d, J=8.75Hz, 1H, Ar); 7.95 (s, 1H, Ar) 9.97 (s, 1H, NHC=O); 11.36 (s, 1H, NH).

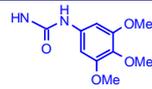
**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3366-3265 (NH); 2935 (OCH<sub>3</sub>); 1733 (C=O estere); 1645 (C=O ammido); 1129 (CN); altre bande 1583; 1492; 1266; 1003; 762.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 493 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.13; 15.12; 16.59; 56.07 (2C); 60.15; 64.43; 105.14 (2C); 111.29; 114.32; 117.65; 118.61; 120.58; 123.37; 126.44; 126.54; 127.29; 129.80; 138.04; 138.46; 140.10; 143.60; 152.70 (2C); 154.03; 165.10.

## 6.10 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: *N*-(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(2,3,4-trimetossifenil)uree diversamente sostituite(14a-h).



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'	Resa %
4a	Cl	H	14a	Cl	H	70
4b	F	H	14b	F	H	60
4c	Br	H	14c	Br	H	74
4d	NH <sub>2</sub>	H	14d		H	60
4e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	14e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	62
6	OH	H	14f	OH	H	58
7	CH <sub>3</sub>	H	14g	CH <sub>3</sub>	H	68
8	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	14h	OCO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	67

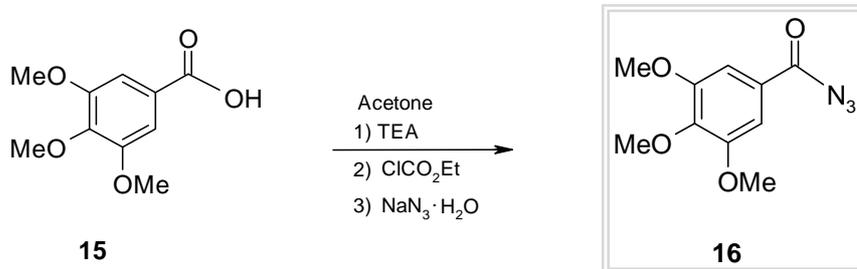
### Procedimento:

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano Xg (Xmmol) di ammino carbazolo diversamente sostituito (**4a-e**; **6**; **7**; **8**) in XmL di CH<sub>3</sub>CN.

Successivamente si aggiungono in quantità equimolare Xg (Xmmol) di azido(3,4,5-trimetossifenil)metanone. La stessa procedura sintetica viene utilizzata per il derivato **14d**, a partire dall'ammino carbazolo **4d** utilizzando i seguenti rapporti molari: **4d/azido(3,4,5-trimetossifenil)metanone**= 1/2. Si lascia la miscela di reazione a riflusso per 3 ore.

Infine si filtra sottovuoto ed il filtrato viene purificato mediante semplice lavaggio con Et<sub>2</sub>O ottenendo di volta in volta l'urea desiderata.

### 6.10.1 Procedura per la sintesi di: azido(3,4,5-trimetossifenil)metanone(16).



✓ **Solido di colore bianco**

**C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; PM = 237 g/mol**

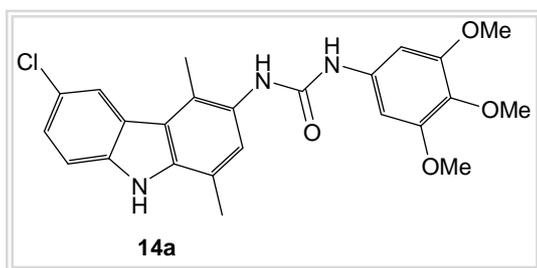
**Resa % = 75; p.F=96°C**

Per la preparazione dell'azido(3,4,5-trimetossifenil)metanone (**16**) si dissolvono in 70mL di acetone e alla temperatura di 0°C 5g (23.5mmol) di acido 3,4,5-trimetossi benzoico (**15**) e 2.47g (23.5mmol) di trietilammina, si lascia quindi agitare a tale temperatura per circa 40 minuti. Successivamente si aggiungono goccia a goccia 2.55g (23.5mmol) di cloroformiato di etile e si lascia reagire ancora per 30minuti (T=0°C); infine si aggiungono 1.68g (1.1eq) di sodio azide precedentemente disciolto in 2.5mL di H<sub>2</sub>O. Tale miscela di reazione si lascia sotto agitazione alla temperatura di 0°C ancora per 40minuti.

La soluzione è di seguito evaporata a pressione ridotta (T=20°C), idrolizzata ed estratta mediante 150mL di Et<sub>2</sub>O. La fase organica è anidrificata su MgSO<sub>4</sub> anidro, evaporata a pressione ridotta (T=20°C) ottenendo infine un solido bianco.

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3005-2493 (OCH<sub>3</sub>); 2145 (COCH<sub>3</sub>); 1674 (C=O); altre bande 1332; 1206; 1126; 735.

### 6.10.2 Sintesi di: *N*-(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(3,4,5-trimetossifenil)urea(14a).



✓ **Solido di colore marrone chiaro**

**C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; PM = 453 g/mol**

**Resa % = 70; p.F=210°C**

#### Analisi spettroscopica:

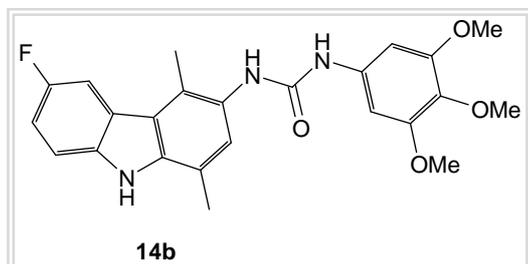
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.81 (s, 2H, Ar); 7.32 (s, 1H, Ar); 7.35-7.38 (m, 1H, Ar); 7.51 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.96 (s, 1H, Ar); 8.10 (s, 1H, NHC=O); 8.70 (s, 1H, NHC=O); 11.33 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3254 (NH); 2932 (OCH<sub>3</sub>); 1642 (C=O ammide); 1128 (CN); altre bande 1604; 1448; 797.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 454 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.61; 16.69; 55.63 (2C); 60.15; 95.66 (2C); 112.40; 117.42; 119.98; 121.31; 122.66; 124.07; 124.54; 124.59; 125.51; 128.00; 132.08; 136.57; 137.33; 138.67; 152.86 (2C); 154.00.

### 6.10.3 Sintesi di: *N*-(6-fluoro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(3,4,5-trimetossifenil)urea(14b).



✓ **Solido di colore marrone**

**C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; PM = 437 g/mol**

**Resa % = 60; p.F=208°C**

#### Analisi spettroscopica:

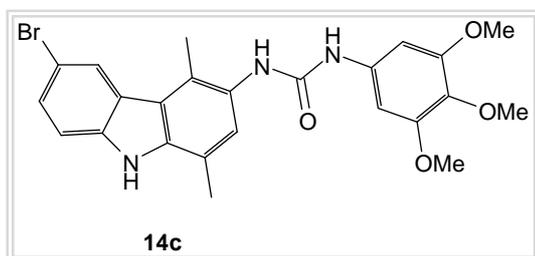
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.82 (s, 2H, Ar); 7.21 (t, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.29 (s, 1H, Ar); 7.47-7.51 (m, 1H, Ar); 7.87 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.95 (s, 1H, NHC=O); 8.68 (s, 1H, NHC=O); 11.19 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3331 (NH); 2932 (OCH<sub>3</sub>); 1644 (C=O ammido); 1129 (CN); altre bande 1507; 1001; 800; 540.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 438 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.51; 16.69; 55.64 (2C); 60.15; 95.67 (2C); 107.48 (d, J=23.95Hz); 111.70 (d, J=9.08Hz); 112.37 (d, J=24.78Hz); 117.40; 120.46 (d, J=4.12Hz); 123.58 (d, J=9.08Hz); 124.19; 125.45; 127.57; 132.09; 136.58; 136.76; 137.86; 152.87 (2C); 154.05; 156.23 (d, J=230.43Hz).

**6.10.4 Sintesi di: *N*-(6-bromo-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(3,4,5-trimetossifenil)urea(14c).**



✓ **Solido di colore argento**

**C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; PM = 498 g/mol**

**Resa % = 74; p.F=212°C**

**Analisi spettroscopica:**

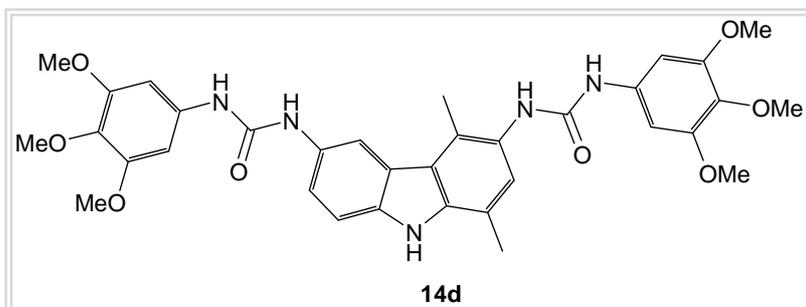
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.81 (s, 2H, Ar); 7.33 (s, 1H, Ar); 7.48 (s, 2H, Ar); 7.94 (s, 1H, Ar); 8.23 (s, 1H, NHC=O); 8.68 (s, 1H, NHC=O); 11.34 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3345-3251 (NH); 2932 (OCH<sub>3</sub>); 1644 (C=O ammido); 1131 (CN); altre bande 1507; 1228; 1002; 684.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 498 e 500 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.62; 16.69; 55.65 (2C); 60.16; 95.69 (2C); 110.49; 112.93; 117.44; 119.78; 124.05; 124.20; 125.29; 125.52; 127.16; 128.04; 132.11; 136.54; 137.16; 138.94; 152.88 (2C); 153.99.

**6.10.5 Sintesi di: N-(1,4-dimetil-6-[[3,4,5-trimetossianilina)carbonil]ammino}-9H-carbazol-3-il)-N'-(3,4,5-trimetossifenil)urea(14d).**



✓ **Solido di colore rosato**  
**C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>**;  
**PM = 643 g/mol**  
**Resa % = 60**;  
**p.F > 260°C**

**Analisi spettroscopica:**

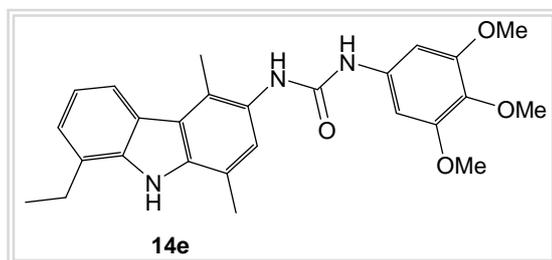
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.62 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.75 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.81 (s, 2H, Ar); 6.83 (s, 2H, Ar); 7.24 (s, 1H, Ar); 7.38-7.46 (m, 2H, Ar); 7.91 (s, 1H, NHC=O); 8.24 (s, 1H, NHC=O); 8.52 (s, 1H, NHC=O); 8.54 (s, 1H, NHC=O); 8.67 (s, 1H, Ar); 11.00 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3289 (NH); 2934 (OCH<sub>3</sub>); 1640 (C=O ammido); 1129 (CN); altre bande 1506; 675.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 644 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.39; 16.43; 55.66 (2C); 55.76 (2C); 60.00 (2C); 96.12 (2C); 96.50 (2C); 110.64; 112.89; 116.96; 118.25; 120.59; 123.40; 123.94; 124.68; 127.29; 130.91; 132.43; 132.68; 136.02; 136.36; 136.46; 137.29; 152.76 (2C); 152.80 (2C); 153.16; 153.94.

### 6.10.6 Sintesi di: *N*-(8-etil-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(3,4,5-trimetossifenil)urea(14e).



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; PM = 447 g/mol**

**Resa % = 62; p.F=240°C**

#### Analisi spettroscopica:

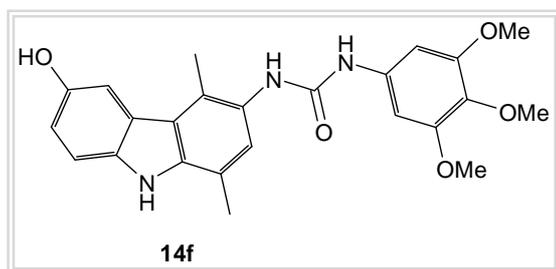
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1.32 (t, J=7.31Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.03 (q, J=6.83Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.82 (s, 2H, Ar); 7.06-7.11 (m, 1H, Ar); 7.18-7.22 (m, 1H, Ar); 7.25 (s, 1H, Ar); 7.92 (s, 1H, NHC=O); 7.98 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 8.67 (s, 1H, NHC=O); 10.62 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3307 (NH); 2933 (OCH<sub>3</sub>); 1640 (C=O ammido); 1133 (CN); altre bande 1554; 998; 745.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 448 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.20; 14.45; 16.89; 23.49; 56.66 (2C); 60.00; 96.15 (2C); 117.33; 118.72; 119.45; 121.22; 123.34; 123.44; 123.79; 124.68; 126.47; 127.58; 132.45; 136.38; 136.68; 138.67; 152.77 (2C); 153.96.

**6.10.7 Sintesi di: *N*-(6-idrossi-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-*N'*-(3,4,5-trimetossifenil)urea(14f).**



✓ **Solido di colore argento**

**C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>; PM = 435 g/mol**

**Resa % = 58; p.F=210°C**

**Analisi spettroscopica:**

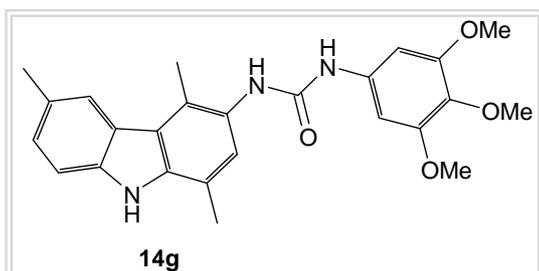
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.81 (s, 2H, Ar); 6.88 (d, J=7.83 Hz, 1H, Ar); 7.17 (s, 1H, Ar); 7.30 (d, J=7.83 Hz, 1H, Ar); 7.50 (s, 1H, Ar); 7.86 (s, 1H, NHC=O); 8.63 (s, 1H, OH); 8.84 (s, 1H, NHC=O); 10.76 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3479-3291 (OH, NH); 2935 (OCH<sub>3</sub>); 1631 (C=O ammido); 1126 (CN); altre bande 1508; 1229; 1001; 809.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 436 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.53; 16.69; 55.60 (2C); 60.12; 95.59 (2C); 107.05; 111.26; 114.07; 116.90; 120.50; 124.06; 124.10; 124.68; 126.80; 131.98; 134.32; 136.61; 137.53; 150.15; 152.81 (2C); 154.08.

### 6.10.8 Sintesi di: *N*-(3,4,5-trimetossifenil)-*N'*-(1,4,6-trimetil-9*H*-carbazol-3-il)urea(14g).



✓ **Solido di colore marrone chiaro**

**C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; PM = 433 g/mol**

**Resa % = 68; p.F=244°C**

#### Analisi spettroscopica:

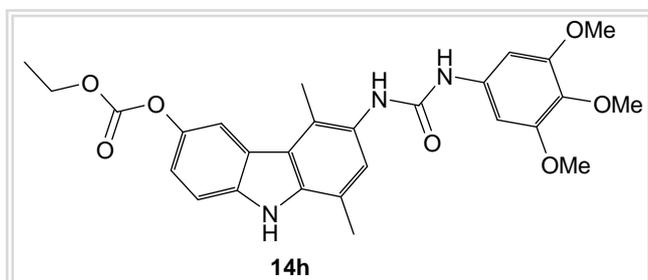
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 2.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.83 (s, 2H, Ar); 7.19 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 7.24 (s, 1H, Ar); 7.40 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 7.90 (s, 1H, NHC=O); 7.95 (s, 1H, Ar); 8.66 (s, 1H, NHC=O); 10.60 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3298 (NH); 2934 (OCH<sub>3</sub>); 1641 (C=O ammido); 1131 (CN); altre bande 1506; 1228; 999; 797.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 434 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 14.75; 16.76; 21.39; 55.64 (2C); 60.16; 95.67 (2C); 110.73; 116.98; 120.52; 122.03; 123.74; 124.03; 124.67; 126.05; 126.94; 127.36; 132.08; 136.64; 137.03; 138.54; 152.88 (2C); 145.10.

**6.10.9 Sintesi di: 5,8-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossianilina)carbonil]ammino}-9H-carbazol-3-il-etil-carbonato(14h).**



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>; PM = 507 g/mol**

**Resa % = 67; p.F=218°C**

**Analisi spettroscopica:**

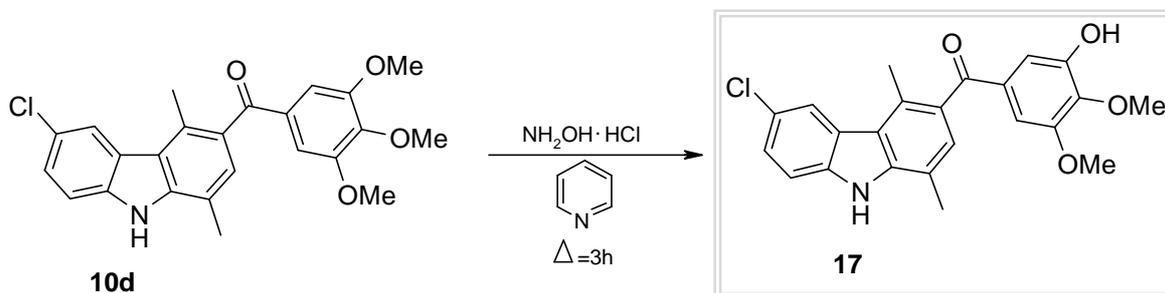
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.30 (t, J=6.83Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4.26 (q, J=6.83Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 6.82 (s, 2H, Ar); 7.22 (d, J=10.75Hz, 1H, Ar); 7.31 (s, 1H, Ar); 7.50 (d, J=8.75Hz, 1H, Ar); 7.94 (s, 1H, Ar); 7.96 (s, 1H, NHC=O); 8.71 (s, 1H, NHC=O); 11.26 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3428-3247 (NH); 2932 (OCH<sub>3</sub>); 1740 (C=O estere); 1646 (C=O ammido); 1129 (CN); altre bande; 1507; 1006; 782.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 508 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.13; 14.58; 16.71; 55.64 (2C); 60.16; 64.43; 95.70 (2C); 111.20; 114.34; 117.40; 118.43; 120.52; 123.40; 124.00; 125.28; 127.78; 132.12; 136.60; 137.60; 138.06; 143.50; 152.89 (2C); 154.04; 154.08.

## 6.11 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanone(17).



✓ Solido di colore crema

$C_{23}H_{20}ClNO_4$ ; PM= 409 g/mol

Resa % =62; p.F=252°C

### Procedimento:

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano 0.7g (1.65mmol) di (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-(3,4,5-trimetossifenil)-metanone (**10d**), in 30mL di piridina.

Di seguito si aggiungono 1.14g (16.5mmol) di idrossilamina idrocloruro in rapporto molare **10d**/ $NH_2OH \cdot HCl$ = 1/10. La soluzione si lascia a riflusso moderato ( $T=50^\circ C$ ) per circa 3 ore e poi a temperatura ambiente tutta la notte.

Successivamente si evapora a pressione ridotta, si riprende il residuo con  $H_2O$  e si estrae la fase organica con AcOEt. Quest'ultima si lava più volte prima con una soluzione acquosa acida ( $H_2O/HCl$  al 37%) e poi semplicemente con acqua; quindi si anidrifca su  $MgSO_4$  anidro, si filtra e si evapora a pressione ridotta ottenendo l'ossima desiderata.

### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.54 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.66 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.71 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 7.00 (s, 2H, Ar); 7.20 (s, 1H, Ar); 7.46 (d,  $J=7.79Hz$ , 1H, Ar); 7.58 (d,  $J=8.79Hz$ , 1H, Ar); 8.14 (s, 1H, Ar); 9.48 (br, 1H, OH); 11.70 (s, 1H, NH).

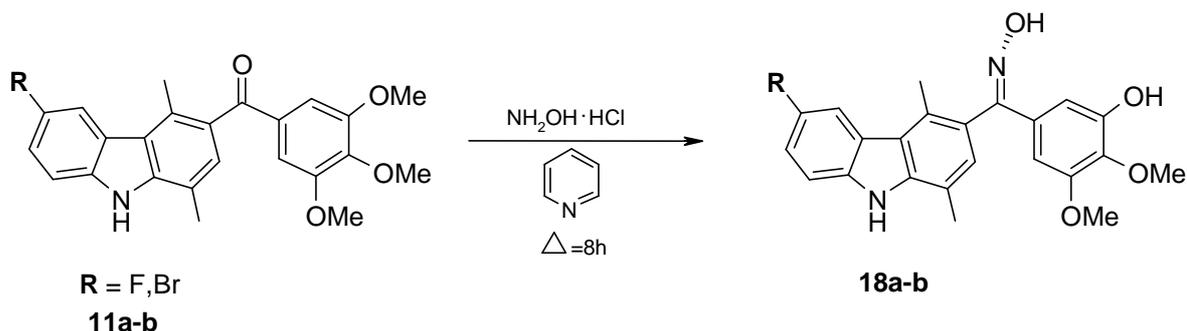
IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3450 (OH); 3380 (NH); 2938 ( $OCH_3$ ); 1651 (C=O); 1118 (CN); altre bande 1605; 1457; 798.

MS (ESI<sup>+</sup>): 410 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 16.52; 17.64; 56.04 (2C); 107.82 (2C); 112.64; 117.36; 120.16; 121.77; 123.35; 124.56; 125.18; 127.17; 128.64; 129.71; 130.27; 138.78; 140.39; 141.00; 147.50 (2C); 196.35.

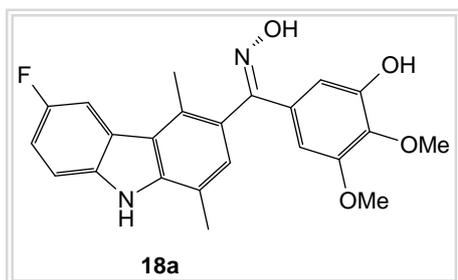
## 6.12 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanon ossime diversamente sostituite(18a-b).

A partire dai derivati 1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9H-carbazoli **11a-b** variando semplicemente le condizioni di reazione (riflusso 8 ore, T=80°C), la metodica sintetica descritta nel precedente paragrafo ha consentito di ottenere i composti **18a-b**.



Prodotti	R	Resa %
<b>18a</b>	F	<b>60</b>
<b>18b</b>	Br	<b>52</b>

**6.12.1 Sintesi di: (E)-(6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanon ossima(18a).**



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 408 g/mol**

**Resa % =60; p.F>260°C**

**Analisi spettroscopica:**

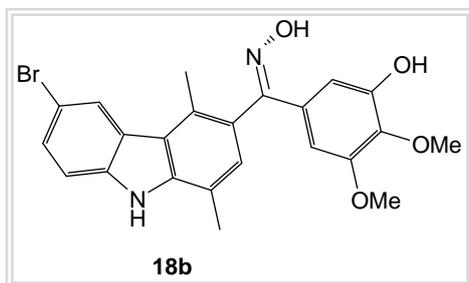
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.59 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.64 (s, 2H, Ar); 6.84 (s, 1H, Ar); 7.22-7.27 (m, 1H, Ar); 7.50-7.54 (m, 1H, Ar); 7.83-7.86 (m, 1H, Ar); 8.65 (br, OH); 10.88 (s, 1H, N-OH); 11.33 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3510 (OH); 3460-3389 (NH, N-OH); 2940 (OCH<sub>3</sub>); altre bande 1725; 1600; 1504; 1332; 1116; 775.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 409 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 16.62; 17.31; 55.81; 60.07; 104.48 (2C); 107.62 (d, J=24.78Hz); 111.75 (d, J=9.08Hz); 112.01 (d, J=24.78Hz); 117.60; 120.30 (d, J=4.12Hz); 123.59 (d, J=9.91Hz); 124.32; 126.51; 127.61; 128.18; 136.51; 136.94; 139.87; 147.78 (2C); 152.63; 156.38 (d, J=230.45Hz).

### 6.12.2 Sintesi di: (E)-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3-idrossi-4,5-dimetossifenil)metanon ossima(18b).



✓ **Solido di colore bianco**

**C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 469 g/mol**

**Resa % =52; p.F=170°C**

#### Analisi spettroscopica:

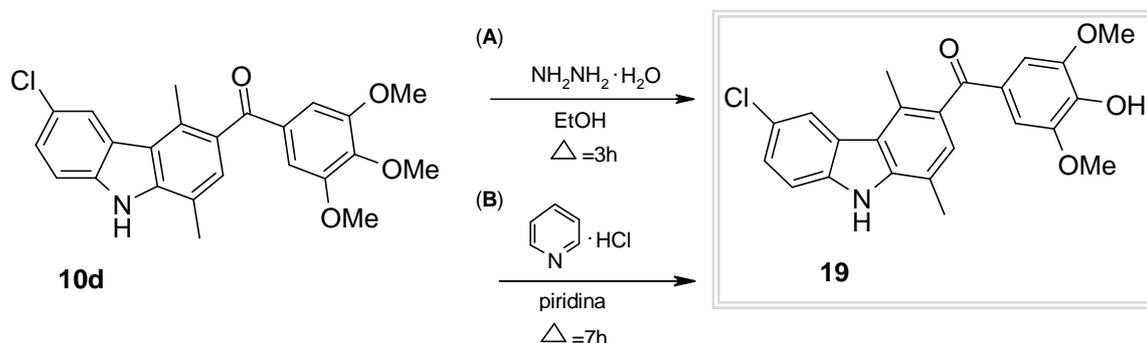
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.59 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.63 (s, 2H, Ar); 6.86 (s, 1H, Ar); 7.50 (s, 2H, Ar); 8.21 (s, 1H, Ar); 8.42 (br, 1H, OH); 10.88 (s, 1H, N-OH); 11.48 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3350 -2974 (NH, N-OH); 2935 (OCH<sub>3</sub>); altre bande 1579; 1513; 1441; 1104; 756.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 469 e 471 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 16.60; 17.41; 55.98; 64.92; 104.42 (2C); 110.75; 112.93; 117.64; 119.59; 124.28; 124.81; 125.25; 126.71; 127.29; 127.48; 128.19; 136.94; 138.71; 139.22; 147.76 (2C); 155.52.

### 6.13 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: derivati carbazolici idrossisostituiti a livello del C-4' dell'anello benzoilico(19-20).



✓ Solido di colore crema

$\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$ ; PM= 409 g/mol;

p.F=240°C

#### Procedimento (A):

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano 0,5g (1.8mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9H-carbazolo (**10d**) in circa 20mL di EtOH assoluto.

Di seguito si aggiungono circa 10mL di idrazina idrata (d=1.029g/mL). La soluzione si lascia a riflusso per circa 3 ore.

Successivamente la miscela di reazione viene filtrata sottovuoto, ed il filtrato viene lavato con EtOH assoluto e poi cristallizzato in Et<sub>2</sub>O.

✓ Resa %= 45.

#### Procedimento (B):

In un pallone da 250 mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano 0,7g (1.65mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9H-carbazolo (**10d**) in circa 30mL di piridina. Di seguito si aggiungono 3.81g (33.0mmol) di piridina cloridrata in rapporto molare di: 1/20.

La soluzione si lascia a riflusso per circa 7 ore e poi a temperatura ambiente tutta la notte sempre sotto agitazione

Successivamente si evapora a pressione ridotta, si riprende il residuo con H<sub>2</sub>O e si estrae la fase organica con AcOEt. Quest'ultima si lava più volte prima con una soluzione acquosa di HCl al 37% e poi semplicemente con H<sub>2</sub>O.

Quindi si anidrifica su MgSO<sub>4</sub> anidro, si filtra ed infine si evapora a pressione ridotta ottenendo il (6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)(4-idrossi-3,5-dimetossi)metanone (**19**) desiderato.

✓ Resa % = 65.

### Analisi spettroscopica:

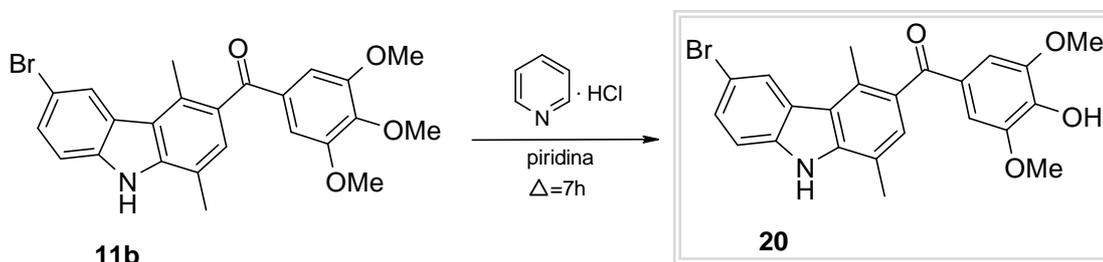
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.51 (br, 1H, OH); 3.69 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.98 (s, 2H, Ar); 7.19 (s, 1H, Ar); 7.45 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.58 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.13 (s, 1H, Ar); 11.70 (s, 1H, NH).

IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 3450 (OH); 3381 (NH); 2936 (OCH<sub>3</sub>); 1641 (C=O); altre bande 1585; 1332; 1117; 540.

MS (ESI<sup>+</sup>): 410 (M+H)<sup>+</sup>.

MS (EI) m/z (%): 409 (M<sup>+</sup> 100); 394 (31); 378 (66); 363 (8); 228 (19); 181 (11).

Questa seconda metodica ha permesso di ottenere anche il bromo derivato (**20**) a partire dal corrispondente trimetossilato **11b**.



✓ Solido di colore crema

C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>4</sub>; PM = 454 g/mol

Resa % = 70; p.F=227°C

**Reagenti:**

- 6-bromo-1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9*H*-carbazolo (**11b**): 0,9g (1.92mmol)
- piridina cloridrata: 4.44g (38.4mmol)
- piridina= 30mL

Rapp. molari: **11b**/Piridina cloridrata= 1/20

**Analisi spettroscopica:**

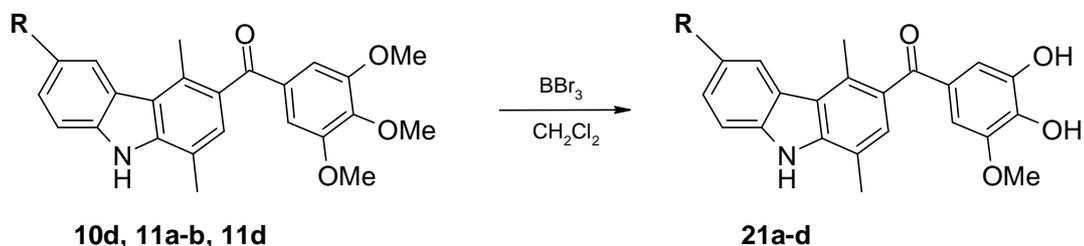
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.44 (s, 3H, *CH*<sub>3</sub>); 2.61 (s, 3H, *CH*<sub>3</sub>); 3.30 (br, 1H, *OH*); 3.69 (s, 6H, *OCH*<sub>3</sub>); 6.96 (s, 2H, *Ar*); 7.16 (s, 1H, *Ar*); 7.50 (s, 2H, *Ar*); 8.21 (s, 1H, *Ar*); 11.65 (s, 1H, *NH*).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3450 (*OH*); 3381 (*NH*); 2936 (*OCH*<sub>3</sub>); 1651 (*C=O*); altre bande 1735; 1583; 1335; 1119; 796.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 454 e 456 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 16.52; 17.66; 56.04 (2C); 107.81 (2C); 111.19; 113.14; 117.35; 120.04; 124.64; 125.22; 127.18; 127.80; 128.62; 129.68; 130.32; 139.04; 140.20; 141.00; 147.50 (2C); 196.35.

**6.14 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: (3,4-diidrossi-5-metossifenil)(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metanoni diversamente sostituiti(21a-d).**



Starting	R	Prodotti	Resa %
<b>10d</b>	<b>Cl</b>	<b>21a</b>	<b>80</b>
<b>11a</b>	<b>F</b>	<b>21b</b>	<b>70</b>
<b>11b</b>	<b>Br</b>	<b>21c</b>	<b>74</b>
<b>11d</b>	<b>OCH<sub>3</sub></b>	<b>21d</b>	<b>72</b>

**Procedimento:**

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano Xg (Xmmol) di 1,4-dimetil-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-9H-carbazolo diversamente sostituiti in XmL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

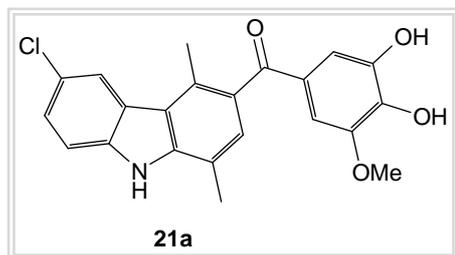
Successivamente alla soluzione ottenuta si aggiunge in rapporto molare (1/20) il BBr<sub>3</sub> in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (d=1,467g/mL).

Inizialmente la soluzione viene fatta reagire circa 1 ora alla T=0-5°C, raggiunta mediante l'aiuto di un bagno di ghiaccio, e poi a temperatura ambiente per altre 3 ore.

Si estrae la fase organica in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con circa 150mL di H<sub>2</sub>O, quindi si anidifica su MgSO<sub>4</sub> anidro, si decolora su carbone vegetale, si filtra ed infine si concentra a pressione ridotta.

Il solido ottenuto viene ripreso con Et<sub>2</sub>O e quindi rifiltrato sottovuoto ottenendo di volta in volta le diossime desiderate.

### 6.14.1 Sintesi di: (6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3,4-diidrossi-5-metossifenil)metanone(21a).



✓ **Solido di colore bianco**

**C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>4</sub>; PM = 395g/mol**

**Resa % =80; p.F=264°C**

#### Analisi spettroscopica:

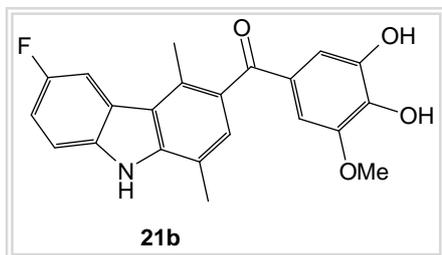
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.30 (br, 1H, OH); 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.73 (s, 1H, Ar); 6.93 (s, 1H, Ar); 7.11 (s, 1H, Ar); 7.40 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.54 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.08 (s, 1H, Ar); 9.20 (br, 1H, OH); 11.62 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3510 (OH); 3341 (NH); 1640 (C=O); 1585 (CN); altre bande 1342; 1230; 1198; 749.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 396 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 16.55; 17.55; 55.85; 104.55; 112.55; 112.63; 117.28; 120.03; 121.68; 123.30; 124.50; 125.15; 126.69; 128.64; 129.12; 130.74; 138.75; 139.82; 140.21; 144.98; 148.08; 196.67.

### 6.14.2 Sintesi di: (3,4-diidrossi-5-metossifenil)(6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metanone(21b).



✓ **Solido di colore verde**

**C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>4</sub>; PM = 379g/mol**

**Resa % = 70; p.F=253°C**

#### Analisi spettroscopica:

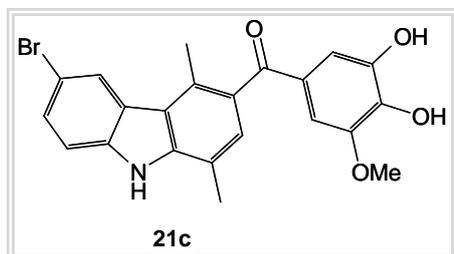
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.73 (s, 1H, Ar); 6.93 (s, 1H, Ar); 7.10 (s, 1H, Ar); 7.25 (t, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.50-7.55 (m, 1H, Ar); 7.86 (d, J=9.75Hz, 1H, Ar).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3540 (OH); 3359 (NH); 1639 (C=O); 1583 (CN); altre bande 1344; 1162; 746.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 380 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 16.57; 17.46; 55.85; 104.53; 107.94 (d, J=24.78Hz); 111.98 (d, J=9.08Hz); 112.54; 112.98 (d, J=24.78Hz); 117.21; 120.59 (d, J=4.13Hz); 123.54 (d, J=9.91Hz); 126.58; 128.75; 129.17; 130.32; 136.79; 139.76; 140.68; 144.98; 148.09; 156.49 (d, J=232.10Hz); 196.75.

### 6.14.3 Sintesi di: (6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)(3,4-diidrossi-5-metossifenil)metanone(21c).



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>BrNO<sub>4</sub>; PM = 440g/mol**

**Resa % = 74; p.F=260°C**

#### Analisi spettroscopica:

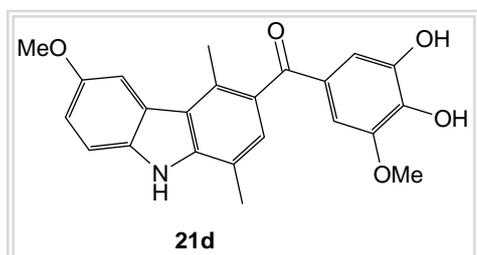
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.32 (br, 1H, OH); 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.77 (s, 1H, Ar); 6.97 (s, 1H, Ar); 7.16 (s, 1H, Ar); 7.53 (s, 2H, Ar); 8.26 (s, 1H, Ar); 9.25 (br, 1H, OH); 11.65 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3468 (OH); 3337 (NH); 1639 (C=O); 1585 (CN); altre bande 1343; 1231; 1098; 749.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 440 e 442 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 16.55; 17.57; 55.85; 104.55; 111.12; 112.54; 113.13; 117.27; 119.90; 124.55; 125.17; 126.70; 127.76; 128.57; 129.10; 130.79; 139.01; 139.88; 140.01; 144.99; 148.08; 196.66.

#### 6.14.4 Sintesi di: (3,4-diidrossi-5-metossifenil)(6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metanone(21d).



✓ **Solido di colore senape**

**C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>; PM = 391g/mol**

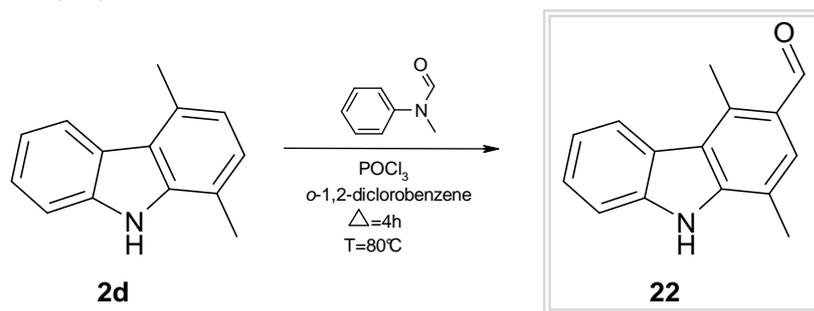
**Resa % = 72; p.F=222°C**

#### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.36 (br, 1H, OH); 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.77 (s, 1H, Ar); 6.97 (s, 1H, Ar); 7.08 (s, 2H, Ar); 7.48 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.64 (s, 1H, Ar).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3350 (OH, NH); 2935 (NH); 1641 (C=O); 1587 (CN); altre bande 1347; 1201; 1162; 745.

## 6.15 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(22).



✓ **Solido di colore verde chiaro**

**C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO; PM = 223 g/mol**

**Resa % =49; p.F = 188°C**

### Procedimento:

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, alla T=0°C raggiunta mediante l'aiuto di un bagno di ghiaccio, si effettua la formazione di un complesso di colore bianco (complesso di Vilsmeier-Haack) per aggiunta goccia a goccia di 1.6mL di ossicloruro di fosforo (POCl<sub>3</sub>; d=1.675g/mL; 10.9mmol) a 1.40mL di N-metil-formanilide (o N-metil-N-fenil-formammide) (d=1.095g/mL; 11.3mmol).

Dopo la formazione di tale complesso nello stesso pallone di reazione si aggiungono l'o-1,2-diclorobenzene (15mL) e l'1,4-dimetil-9H-carbazolo (**2d**) 2g (10.2mmol). Si lascia a riflusso sotto agitazione per circa 4 ore (T=80°C).

Dopo raffreddamento la miscela di reazione si versa in una una soluzione di acetato di sodio (30g/400mL di H<sub>2</sub>O) e successivamente si estrae con AcOEt. Si anidrifica su MgSO<sub>4</sub> anidro, si decolora su carbone vegetale ed infine si concentra a pressione ridotta ottenendo un solido puro.

### Analisi spettroscopica:

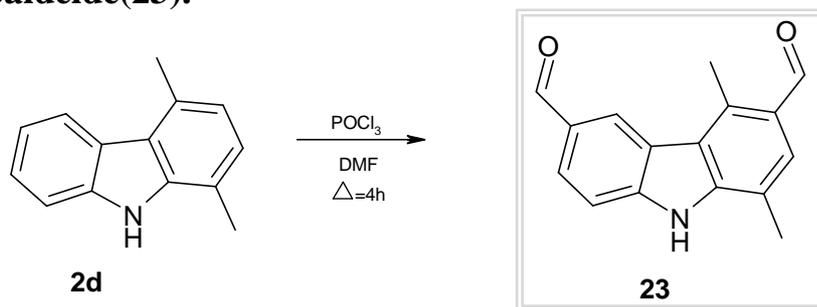
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.25 (t, J=7.33Hz, 1H, Ar); 7.45 (t, J=7.33Hz, 1H, Ar); 7.59 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.68 (s, 1H, Ar); 8.25 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 10.36 (s, 1H, CHO); 11.73 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3243 (NH); 1646 (C=O); altre bande 1584; 1334; 1203; 1090; 736.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 224 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.72; 16.58; 111.65; 118.16; 119.78; 121.28; 122.80; 123.56; 125.61; 125.65; 127.99; 135.72; 140.61; 142.49; 191.53.

## 6.16 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 1,4-dimetil-9H-carbazol-3,6-dicarbaldeide(23).



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>; PM = 251 g/mol**

**Resa % =48; p.F = 230°C**

### Procedimento:

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, alla T=0°C raggiunta mediante l'aiuto di un bagno di ghiaccio, si effettua la formazione del cosiddetto complesso di Vilsmeier-Haack per aggiunta goccia a goccia di 2.05mL di ossicloruro di fosforo (POCl<sub>3</sub>) (d=1.675g/mL; 22.4mmol) a 1.74mL di *N,N*-dimetil-formammide (DMF) (d=0.944g/mL; 22.5mmol).

Di seguito nello stesso pallone di reazione (a caldo) si aggiungono 1.5g (7.5mmol) di 1,4-dimetil-9H-carbazolo (**2d**), e senza l'aggiunta di solvente si porta a riflusso sotto agitazione per circa 4 ore. Dopo raffreddamento il grezzo di reazione viene versato in H<sub>2</sub>O (150 mL) e lasciato sotto agitazione per circa 30 minuti.

Si effettua quindi l'idrolisi alcalina mediante l'aggiunta di una soluzione di NaOH al 40% ottenendo la formazione di un precipitato che viene dapprima filtrato sottovuoto, lavato ancora con H<sub>2</sub>O e poi con la minima quantità di CH<sub>3</sub>CN; quindi filtrato a pressione ridotta. La purificazione di tale precipitato avviene mediante semplice lavaggio con Et<sub>2</sub>O.

### Analisi spettroscopica:

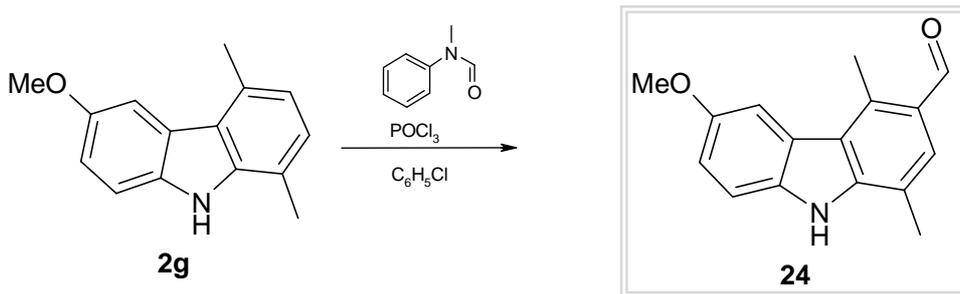
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.61-7.65 (m, 2H, Ar); 7.91 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.67 (s, 1H, Ar); 10.02 (s, 1H, CHO); 10.31 (s, 1H, CHO); 12.10 (br, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3251 (NH); 1684-1667 (C=O); altre bande 1583; 1201; 1113; 811.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 252 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.65; 16.47; 112.05; 118.87; 121.40; 123.43; 126.08; 126.62; 126.88; 128.91; 129.06; 135.78; 142.99; 144.28; 191.69; 192.36.

## 6.17 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(24).



✓ **Solido di colore marrone**  
**C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>; PM = 253 g/mol**  
**Resa % =44; p.F = 192 °C**

### Procedimento:

La stessa procedura sintetica utilizzata per il derivato **22** viene applicata per la sintesi del derivato **24**. In questo caso si solubilizzano 1.2g (5.74 mmol) di 6-metossi-1,4-dimetil-9H-carbazolo (**2g**) in circa 40mL di clorobenzene.

Tale soluzione si aggiunge al complesso di Vilsmeier-Haack precedentemente formato per aggiunta goccia a goccia di 0.56mL di POCl<sub>3</sub> (d=1.675g/mL; 6.11mmol) a 0.92mL di *N*-metil-formanilide (d=1.095g/mL; 7.45mmol); si lascia a riflusso, inizialmente per circa 4 ore alla T=250°C, e poi per tutta la notte alla temperatura di 100°C.

Si ha così la formazione di un precipitato, il quale viene dapprima filtrato sottovuoto e poi ripreso a caldo con la minima quantità di CH<sub>3</sub>CN; quindi si evapora a pressione ridotta ottenendo un prodotto ancora grezzo. La purificazione di tale grezzo avviene mediante semplice lavaggio con Et<sub>2</sub>O.

### Analisi spettroscopica:

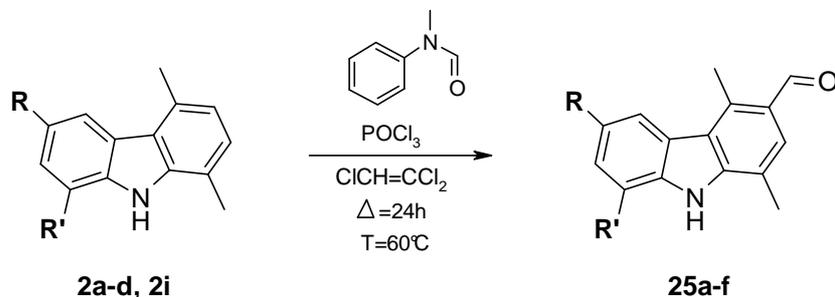
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.83(s, 1H, OCH<sub>3</sub>); 7.08 (dd, J<sub>1</sub>=1.96Hz, J<sub>2</sub>=8.79Hz, 1H, Ar); 7.47 (d, J=8.75Hz 1H, Ar); 7.60 (s, 1H, Ar); 7.66 (s, 1H, Ar); 10.31 (s, 1H, CHO); 11.53 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3352 (NH); 2836-2727 (OCH<sub>3</sub>); 1667 (C=O); altre bande 1576; 1475; 1322; 1216; 794.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 254 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.58; 16.54; 55.63; 106.14; 112.13; 114.30; 118.11; 121.14; 124.00; 125.31; 127.73; 135.17; 136.02; 142.90; 153.57; 191.38.

### 6.18 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: derivati 1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeidi e 3,6-dicarbaldeidi diversamente sostituiti(25a-f).



Starting	R	R'	Prodotti	R	R'	Resa %
2a	Cl	H	25a	Cl	H	75
2b	F	H	25b	F	H	65
2c	Br	H	25c	Br	H	58
2d	I	H	25d	I	H	50
2i	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	25e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	88
2i	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	25f	CHO	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	38

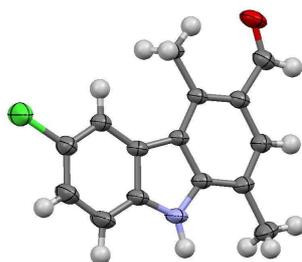
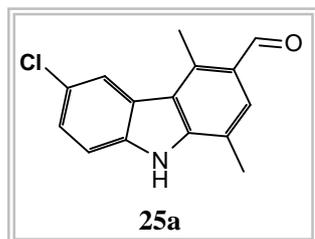
#### Procedimento:

In un pallone da 250mL munito di agitatore elettromagnetico, alla T=0°C si effettua la formazione del complesso di Vilsmeier-Haack per aggiunta di XmL di POCl<sub>3</sub> ad XmL di N-metil-formanilide. A freddo si aggiungono successivamente XmL di tricloroetilene ed Xg (Xmmol) di derivato 1,4-dimetil-9*H*-carbazolico (**2a-d**; **2i**) nei seguenti rapporti molari: (**2a-d**; **2i**)/ POCl<sub>3</sub>= 1/1.6; (**2a-d**; **2i**)/N-metil-formanilide= 1/1.6.

Si lascia a riflusso per circa 24 ore (T=60°C).

Dopo raffreddamento si idrolizza con una soluzione di NaOH al 20% ed il precipitato ottenuto viene filtrato sottovuoto e successivamente lavato con la minima quantità di H<sub>2</sub>O. Dalla cristallizzazione con CH<sub>3</sub>CN e semplice lavaggio con Et<sub>2</sub>O si ottiene un prodotto solido puro.

Per la sintesi del derivato di aldeidico **25f** vedere il paragrafo 6.18.6 pag. 192.

**6.18.1 Sintesi di: 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25a).**

✓ Cristalli di colore giallo  
 $C_{15}H_{12}ClNO$ ; PM = 257 g/mol  
 Resa % =75; p.F =232°C

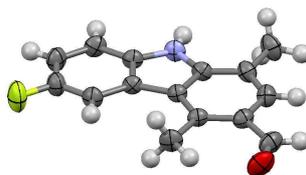
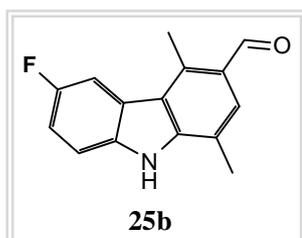
**Analisi spettroscopica:**

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.53 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.07 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.46 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 7.58 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 7.68 (s, 1H, Ar); 8.19 (s, 1H, Ar); 10.35 (s, 1H, CHO); 11.90 (s, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3249-3197 (NH); 1651 ( $C=O$ ); altre bande 1580; 1497; 1201; 706.

MS (ESI $^+$ ): 258 (M+H) $^+$ .

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 14.54; 16.50; 112.97; 118.47; 120.45; 122.00; 124.02; 124.64; 125.49; 125.95; 128.41; 136.11; 138.90; 142.84; 191.48.

**6.18.2 Sintesi di: 6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25b).**

✓ Cristalli di colore verde scuro  
 $C_{15}H_{12}FNO$ ; PM = 241 g/mol  
 Resa % =65; p.F =222°C

**Analisi spettroscopica:**

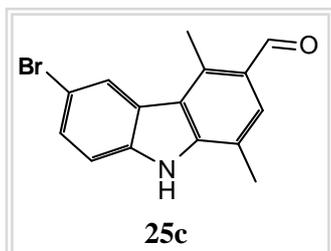
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.49 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.02 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.27 (t,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 7.51-7.55 (m, 1H, Ar); 7.63 (s, 1H, Ar); 7.93 (d,  $J=10.75$ Hz, 1H, Ar); 10.31 (s, 1H, CHO); 11.73 (s, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3367-3222 (NH); 1618 ( $C=O$ ); altre bande 1561; 1495; 1196; 1002.

MS (ESI $^+$ ): 242 (M+H) $^+$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ): 14.47; 16.52; 108.26; 108.58; 112.37; 112.50; 113.30; 113.47; 118.49; 125.67; 128.15; 136.31; 136.90; 143.35; 191.48.

**6.18.3 Sintesi di: 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25c).**



✓ **Solido di colore crema**  
 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrNO}$ ; PM = 302 g/mol  
 Resa % =58; p.F =250°C

**Analisi spettroscopica:**

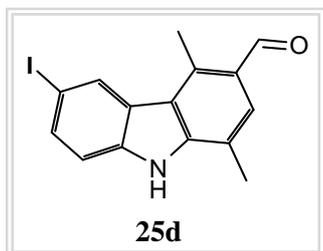
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7.49 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 1H, Ar); 7.54 (d,  $J=9.75\text{Hz}$ , 1H, Ar); 7.64 (s, 1H, Ar); 8.26 (s, 1H, Ar); 10.31 (s, 1H, CHO); 11.84 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3243-3193 (NH); 1648 (C=O); altre bande 1584; 1496; 1201; 706.

**MS (ESI $^+$ ):** 302 e 304 (M+H) $^+$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ): 14.56; 16.49; 111.89; 113.43; 118.44; 120.34; 124.85; 125.27; 125.97; 128.11; 128.46; 136.07; 139.16; 142.64; 191.48.

**6.18.4 Sintesi di: 6-iodio-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide(25d).**



✓ **Solido di colore marrone**  
 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{INO}$ ; PM = 349 g/mol  
 Resa % =50; p.F =250°C

**Analisi spettroscopica:**

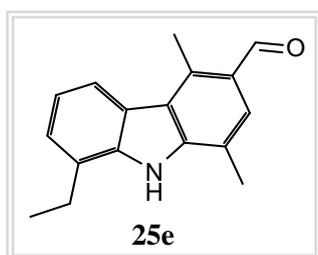
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7.38 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 1H, Ar); 7.62 (s, 1H, Ar); 7.67-7.69 (m, 1H, Ar); 8.41 (s, 1H, Ar); 10.30 (s, 1H, CHO); 11.83 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3246-3196 (*NH*); 1647 (*C=O*); altre bande 2969; 1582; 1496; 1201; 569.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 350 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.65; 16.51; 83.22; 113.96; 118.40; 120.15; 126.04; 126.10; 128.49; 130.78; 133.71; 136.05; 139.57; 142.31; 191.55.

### 6.18.5 Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide(25e).



✓ **Solido di colore crema**

**C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO; PM = 251 g/mol**

**Resa % =88; p.F =252°C**

#### Analisi spettroscopica:

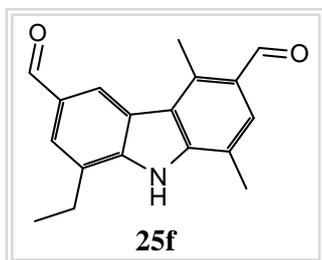
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.33 (t, J= 7.79Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.06 (q, J=7.32Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.20 (t, J= 7.81Hz, 1H, Ar); 7.29 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.66 (s, 1H, Ar); 8.08 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 10.36 (s, 1H, CHO); 11.07 (br, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3276 (*NH*); 1650 (*C=O*); altre bande 2961; 1577; 1230; 743.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 252 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.63; 14.65; 17.07; 23.63; 118.51; 120.22; 120.31; 121.80; 123.52; 124.61; 125.77; 127.32; 128.12; 135.47; 138.86; 142.34; 191.60.

### 6.18.6 Sintesi di: 8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3,6-dicarbaldeide(25f).



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>; PM = 279 g/mol**

**Resa % =38; p.F>260°C**

#### Procedimento:

L'8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3,6-dicarbaldeide (**25f**) è stata ottenuta seguendo la stessa metodica sintetica dei derivati **25a-f**, a partire da 3g (13.4mmol) di 8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazolo (**2i**) solubilizzato in circa 100mL di tricloroetilene ed addizionato al complesso di Vilsmeier-Haack precedentemente formato (rapp. molari: **2i/N-metil-formanilide**= 1/3; e **2i/POCl<sub>3</sub>**= 1/3.1). Questa reazione ha portato alla formazione di due prodotti: la 3-carbaldeide (**25e**) e la 3,6-dicarbaldeide (**25f**), separate mediante colonna cromatografica (gel di silice, miscela eluente: Et<sub>2</sub>O/cicloesano: 6/4).

#### Analisi spettroscopica:

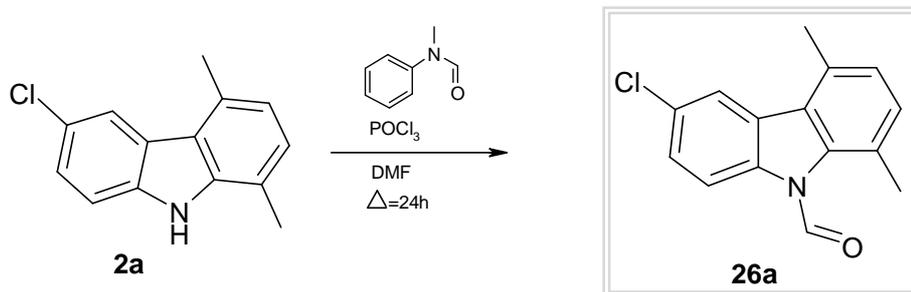
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.35 (t, J= 7.79Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.11 (q, J=7.32Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.73 (s, 1H, Ar); 7.82 (s, 1H, Ar); 8.66 (s, 1H, Ar); 10.08 (s, 1H, CHO); 10.40 (s, 1H, CHO); 11.67 (br, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3267 (NH); 1686-1659 (C=O); altre bande 2960; 1577; 1203; 1126.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 280 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.15; 14.65; 17.03; 23.43; 119.35; 121.96; 123.48; 124.19; 125.01; 126.74; 128.09; 129.01; 129.48; 135.60; 142.95; 142.50; 191.79; 192.50.

## 6.19 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-9-carbaldeide(26a).



✓ Solido di colore bianco

C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClNO; PM = 257 g/mol

Resa % =54; p.F = 180°C

### Procedimento:

In un pallone da 100mL si solubilizzano 1.5g (6.53mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo (**2a**) in circa 20mL di *N-N*-dimetil-formammide (DMF).

Successivamente tale soluzione si aggiunge al complesso di Vilsmeier-Haack [1.77mL di *N*-metil-formanilide (6.53mmol; d=1.095g/mL); 1.31mL di POCl<sub>3</sub>. (13.6mmol; d=1.675g/mL)] precedentemente formato e si lascia a riflusso sotto agitazione per circa 24 ore.

Dopo raffreddamento la miscela di reazione si versa in una soluzione acquosa di NaOH al 40% e si lascia sotto agitazione per circa 30 minuti.

Si filtra sottovuoto; il filtrato si lava dapprima semplicemente con H<sub>2</sub>O e poi con Et<sub>2</sub>O per donare un solido puro.

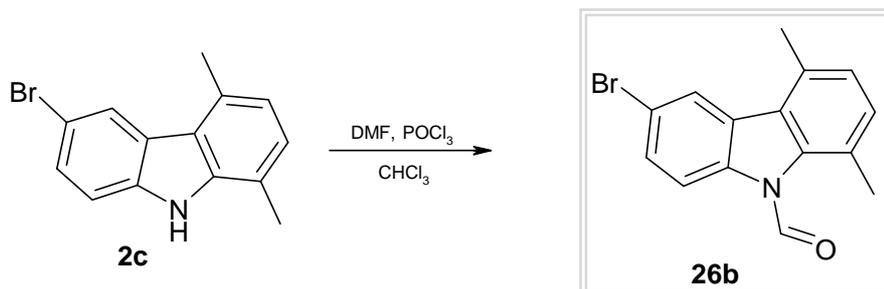
### Analisi spettroscopica:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.15-7.28 (m, 2H, Ar); 7.56-7.61 (m, 1H, Ar); 8.06 (s, 1H, Ar); 8.57-8.70 (m, 1H, Ar); 9.86 (s, 1H, CHO), 11.90 (s, 1H, NH).

IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 1693 (C=O); altre bande 2970; 1446; 1308; 806.

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 19.71; 21.33; 117.40; 120.36; 121.37; 122.84; 125.61; 126.32; 127.74; 128.43; 130.93; 131.00; 135.48; 136.66; 160.67.

## 6.20 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-9-carbaldeide(26b).



✓ Solido di colore giallo

$C_{15}H_{12}BrNO$ ; PM = 302 g/mol

Resa % =55; p.F = 182°C

### Procedimento:

La stessa procedura sintetica descritta nel precedente paragrafo viene utilizzata per l'ottenimento del derivato **26b**. In questo caso il 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazolo **2c** (2.5g; 9.12 mmol) dissolto in 200mL di CHCl<sub>3</sub> viene addizionato al complesso precedentemente formato [1.05mL (13.5mmol; d=0.944g/mL) di *N,N*-dimetil-formammide (DMF) e 1.25mL (13.6mmol; d=1.675g/mL) di ossicloruro di fosforo (POCl<sub>3</sub>)].

Si lascia a riflusso, inizialmente per circa 6 ore alla temperatura di 250-300°C e poi per tutta la notte alla temperatura di 100°C.

Dopo raffreddamento si idrolizza la miscela di reazione con una soluzione di NaOH al 40%. La fase organica alcalinizzata si versa in H<sub>2</sub>O (200mL), quindi si estrae, si anidrifca su MgSO<sub>4</sub> ed infine si evapora a pressione ridotta. Il solido ottenuto viene purificato con semplici lavaggi in Et<sub>2</sub>O.

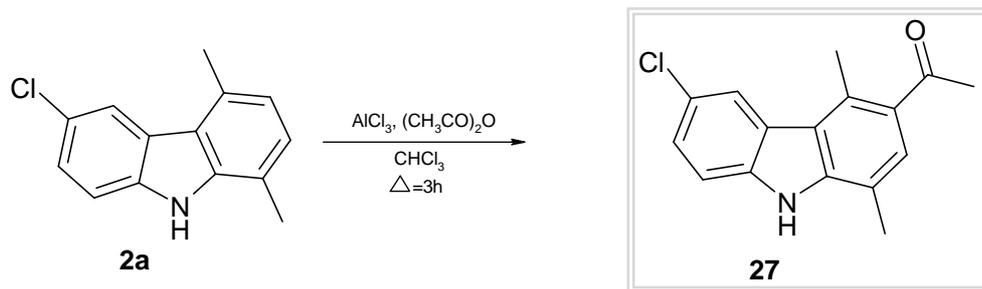
### Analisi spettroscopica:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.15 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.28 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.69 (d, J=9.75Hz, 1H, Ar); 8.19 (s, 1H, Ar); 8.53 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 9.87 (s, 1H, CHO).

IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 1682 (C=O); altre bande 2964; 1447; 1309; 1158; 817.

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 19.75; 21.35; 116.49; 117.80; 120.35; 122.73; 124.27; 125.61; 128.19; 129.13; 130.93; 131.02; 135.84; 136.53; 160.72.

## 6.21 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 1-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)etanone(27).



✓ **Solido di colore verde chiaro**  
 **$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClNO}$ ; PM = 271 g/mol**  
**Resa % =30; p.F >260 °C**

### Procedimento:

In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano 1.5g (6.5mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo (**2a**) in 120mL di  $\text{CHCl}_3$ ; di seguito si aggiungono il  $\text{AlCl}_3$  1.86g (13.9mmol) e  $1'(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  0.77mL (d=1.08g/mL; 8.23mmol).

Si lascia a riflusso per 3 ore. Dopo raffreddamento nello stesso pallone di reazione si aggiungono circa 100mL di  $\text{H}_2\text{O}$  e 2mL di  $\text{HCl}$  al 37%. Si lascia sotto agitazione ancora per circa 30 minuti ed infine si procede con l'estrazione della fase organica.

La fase organica ottenuta si anidrifca su  $\text{MgSO}_4$ , si decolora su carbone vegetale ed infine si concentra a pressione ridotta ottenendo un prodotto grezzo.

Tale grezzo viene ripreso con la minima quantità di  $\text{CH}_3\text{CN}$ , filtrato sottovuoto ed infine cristallizzato da  $\text{Et}_2\text{O}$ .

### Analisi spettroscopica:

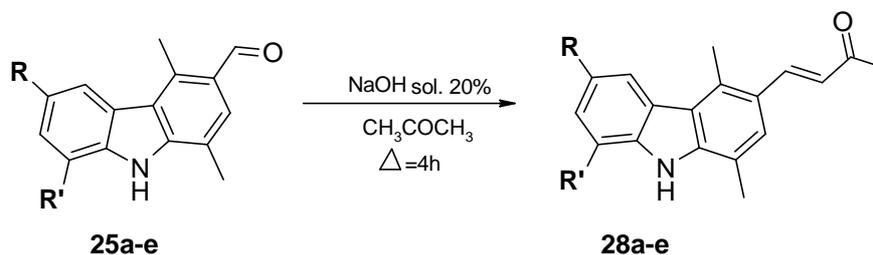
**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  2.55 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ); 2.60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.89 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7.45 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 1H, *Ar*); 7.56 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 1H, *Ar*); 7.70 (s, 1H, *Ar*); 8.17 (s, 1H, *Ar*); 11.70 (s, 1H, *NH*).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3298 (*NH*); 2971-2915 ( $\text{OCH}_3$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1648 ( $\text{C=O}$ ); altre bande 1580; 1242; 578.

**MS (ESI $^+$ ):** 272 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):** 16.61; 17.27; 30.34; 112.71; 117.31; 120.72; 121.96; 123.51; 124.79; 125.29; 128.22; 129.81; 131.91; 138.88; 141.11; 201.21.

## 6.22 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 4-(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-oni diversamente sostituiti(28a-e).



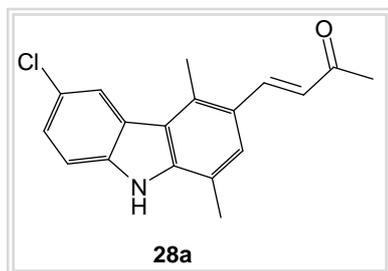
Starting	R	R'	Prodotti	Resa %
25a	Cl	H	28a	62
25b	F	H	28b	52
25c	Br	H	28c	89
25d	I	H	28d	59
25e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	28e	50

### Procedimento:

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano 0.3g (Xmmol) di derivato aldeidico (**25a-e**) in 15mL di soluzione di NaOH al 20% ed 30mL di CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>. Si lascia a riflusso per 4 ore.

Successivamente si evapora sotto pressione il CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, si filtra sottovuoto, quindi si lava con la minima quantità di H<sub>2</sub>O ed una volta con la minima quantità di CH<sub>3</sub>CN ed Et<sub>2</sub>O ottenendo composti solidi.

### 6.22.1 Sintesi di: 4-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28a).



✓ Solido di colore verde chiaro

$C_{18}H_{16}ClNO$ ; PM = 297 g/mol

Resa % =62; p.F = 230°C

#### Analisi spettroscopica:

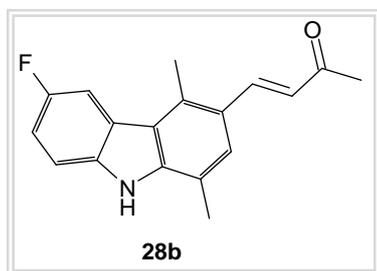
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.36 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.72 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 7.43 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.55 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.68 (s, 1H, Ar); 8.07 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 8.18 (s, 1H, Ar); 11.70 (br, 1H, NH).

IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 3437-3292 (NH); 1666 (C=O); altre bande 1634; 1250; 938; 594.

MS (ESI<sup>+</sup>): 298 (M+H)<sup>+</sup>.

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 15.64; 16.67; 27.57; 112.78; 118.80; 120.38; 121.77; 123.52; 125.55; 125.00; 125.17; 125.57; 128.68; 132.05; 138.62; 140.49; 140.92; 197.83.

### 6.22.2 Sintesi di: 4-(6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28b).



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FNO; PM = 281 g/mol**

**Resa % =52; p.F = 238°C**

#### Analisi spettroscopica:

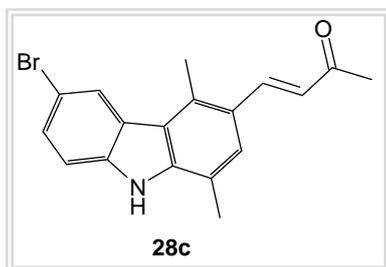
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.34 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.65 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 7.15-7.21 (m, 1H, Ar); 7.46-7.51 (m, 1H, Ar); 7.58 (s, 1H, Ar); 7.89 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.08 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3458-3280 (NH); 1659 (C=O); altre bande 1633; 1255; 964; 600.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 282 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.24; 16.36; 27.31; 107.75 (d, J=23.95Hz); 111.89 (d, J=9.08Hz); 112.54 (d, J=24.77Hz); 118.52; 120.80 (d, J=4.12Hz); 123.13; 123.49 (d, J=9.90Hz); 124.79; 125.27; 131.70; 136.57; 140.68; 141.92; 156.48 (d, J=232.10Hz); 197.33.

### 6.22.3 Sintesi di: 4-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28c).



✓ Solido di colore giallo

$C_{18}H_{16}BrNO$ ; PM = 342 g/mol

Resa % =89; p.F >260°C

#### Analisi spettroscopica:

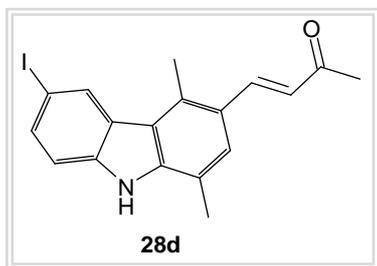
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.28 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.53 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 7.17 (d, J=8.75Hz, 1H, Ar); 7.38-7.42 (m, 2H, Ar); 8.04-8.14 (m, 1H, CH=CHCO; 1H, Ar).

IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 3430-3266 (NH); 1672 (C=O); altre bande 1634; 1268; 865; 551.

MS (ESI<sup>+</sup>): 342 e 344 (M+H)<sup>+</sup>.

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 15.45; 16.36; 27.34; 111.12; 113.10; 118.62; 120.19; 123.57; 124.41; 125.04; 125.12; 125.51; 127.37; 131.70; 138.94; 140.63; 140.92; 197.39.

### 6.22.4 Sintesi di: 4-(6-iodio-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28d).



✓ **Solido di colore marrone**  
**C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>INO**; PM = 389 g/mol  
**Resa % =59**; p.F >260°C

#### Analisi spettroscopica:

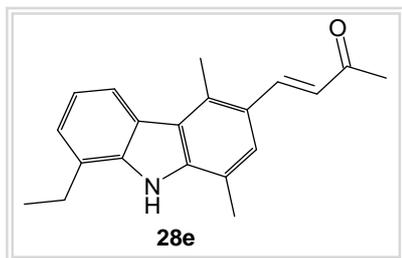
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.36 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.71 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 7.40 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.63-7.70 (m, 2H, Ar); 8.07 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 8.46 (s, 1H, Ar).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3427-3253 (NH); 1670 (C=O); altre bande 1634; 1573; 1487; 1232; 969; 549.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 390 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.68; 16.68; 27.58; 82.39; 113.88; 118.77; 120.03; 123.49; 125.04; 125.41; 126.10; 130.50; 132.00; 133.08; 139.53; 140.82; 140.92; 197.74.

### 6.22.5 Sintesi di: 4-(8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)but-3-en-2-one(28e).



✓ Solido di colore senape  
 $C_{20}H_{21}NO$ ; PM = 291 g/mol  
 Resa % =50; p.F = 168°C

#### Analisi spettroscopica:

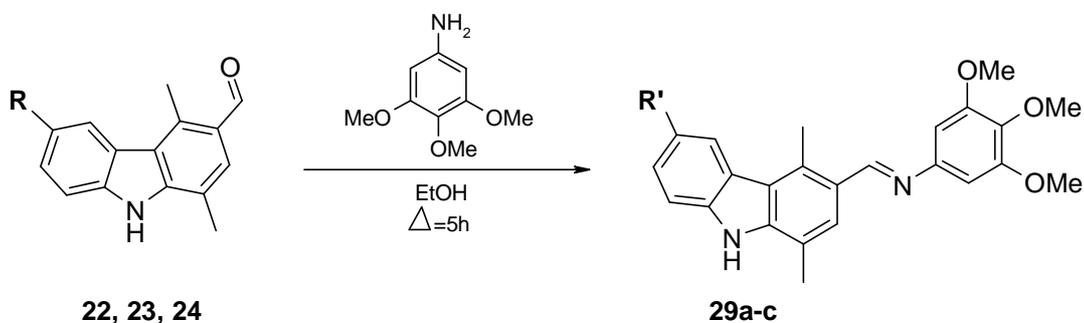
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.31 (t,  $J=7.31$ Hz, 3H,  $CH_3$ ); 2.36 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 2.59 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.88 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.03 (q,  $J=7.33$ Hz, 2H,  $CH_2CH_3$ ); 6.70 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 7.13-7.18 (m, 1H, *Ar*); 7.24 (d,  $J=6.83$ Hz, 1H, *Ar*); 7.62 (s, 1H, *Ar*); 8.04 (d,  $J=7.79$ Hz, 1H, *Ar*); 8.10 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3447-3321 (*NH*); 1660 ( $C=O$ ); altre bande 1639; 1576; 1232; 741; 546.

MS (ESI $^+$ ): 292 (M+H) $^+$ .

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 14.25; 15.46; 16.85; 23.39; 27.31; 118.59; 119.50; 119.82; 121.57; 123.26; 123.30; 123.83; 124.40; 125.13; 126.84; 131.25; 138.46; 140.33; 140.89; 197.30.

**6.23 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: N-[(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammine diversamente sostituite(29a-c).**



Starting	R	Prodotti	R'	Resa%
22	H	29a	H	56
23	CHO	29b		42
24	-OCH <sub>3</sub>	29c	-OCH <sub>3</sub>	55

**Procedimento:**

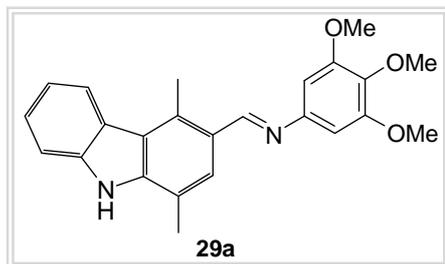
In un pallone da 250mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano Xg (Xmmol) di 1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide (**22, 24**), in XmL di EtOH assoluto.

Successivamente si aggiungono in quantità equimolari Xg (Xmmol) di 3,4,5-trimetossianilina e si lascia a riflusso per 5 ore.

Si evapora a pressione ridotta ottenendo il grezzo di reazione il quale viene ripreso nella minima quantità di CH<sub>3</sub>CN, filtrato sottovuoto ed infine lavato con Et<sub>2</sub>O.

La stessa procedura sintetica viene utilizzata per il derivato **29b**, a partire dalla 1,4-dimetil-9H-carbazol-3,6-dicarbaldeide (**21**) utilizzando i seguenti rapporti molari: **21/3,4,5-trimetossianilina**= 1/2.

### 6.23.1 Sintesi di: *N*-[(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammina(29a).



✓ **Solido di colore verde**

**C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; PM = 388 g/mol**

**Resa % = 56; p.F=210°C**

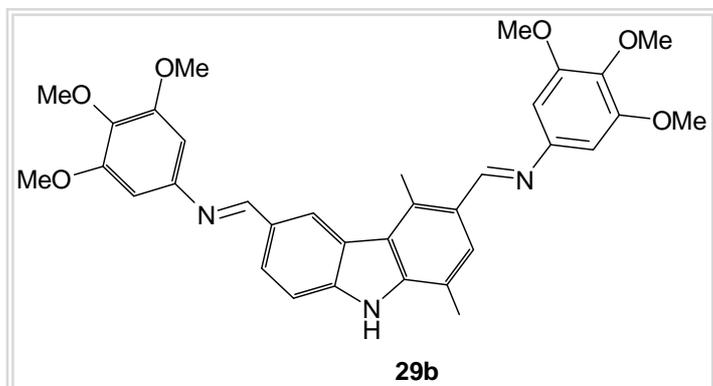
#### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 2.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.61 (s, 2H, Ar); 7.22 (t, J=7.81Hz, 1H, Ar); 7.42 (t, J=7.33Hz, 1H, Ar); 7.57 (d, J=7.83Hz, 1H, Ar); 7.98 (s, 1H, Ar); 8.24 (s, 1H, Ar); 9.03 (s, 1H, CH=N); 11.54 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3375 (NH); 2935-2830 (OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>); altre bande 1583; 1502; 1126; 729.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 15.24; 16.75; 55.89 (2C); 60.11; 98.55 (2C); 111.37; 118.01; 120.94; 122.61; 122.82; 124.88; 125.12; 125.48; 128.08; 133.06; 135.27; 140.82; 142.33; 148.65; 153.20 (2C); 158.35.

**6.23.2 Sintesi di: *N*-[(1,4-dimetil-6-[(3,4,5-trimetossifenil)immino]metil}-9*H*-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammina(29b).**



✓ **Solido di colore crema**  
**C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>; PM = 581 g/mol**  
**Resa % =42; p.F=220°C**

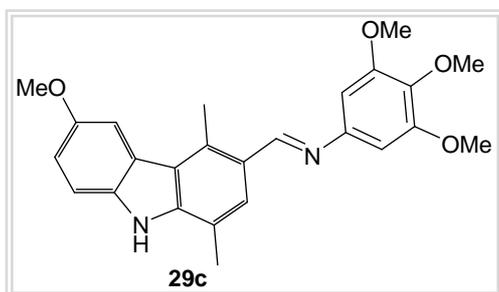
**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.67 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.62 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>); 6.62 (s, 2H, Ar); 6.65 (s, 2H, Ar); 7.66 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.03 (s, 1H, Ar); 8.08 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.77 (s, 1H, Ar); 8.83 (s, 1H, CH=N); 9.05 (s, 1H, CH=N); 11.90 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3312 (NH); 2935-2835 (OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>), altre bande 1583; 1502; 1232; 1124; 1007.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.31; 16.72; 55.91 (4C), 60.12 (2C); 98.60 (4C); 111.78; 118.55; 121.11; 123.62; 124.93; 125.15; 125.67 (2C); 125.97; 127.99, 133.13; 135.40, 141.31, 142.22; 147.84; 148.50; 153.21 (4C); 158.25, 160.74.

### 6.23.3 Sintesi di: 3,4,5-trimetossi-*N*-[(6-metossi-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)metilene]fenil-enammina(29c).



✓ **Solido di colore rosato**

**C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PM = 418 g/mol**

**Resa % =55; p.F=208°C**

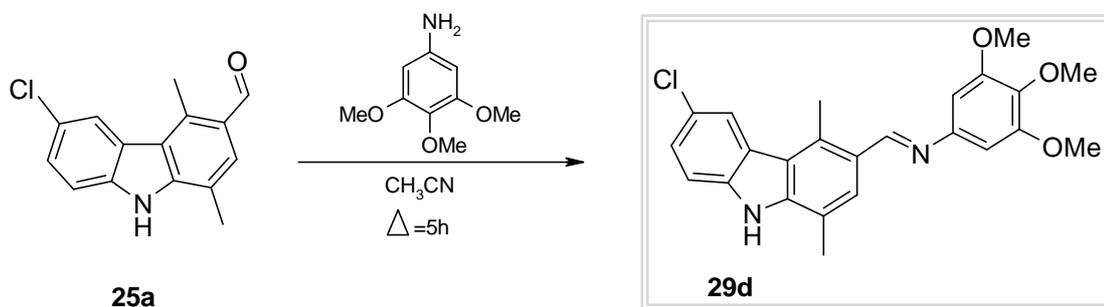
#### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.84 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.66 (s, 2H, Ar); 7.09 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.48 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.71 (s, 1H, Ar); 7.98 (s, 1H, Ar); 9.04 (s, 1H, CH=N); 11.45 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3422 (NH); 2941-2829 (OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>); altre bande 1582; 1502; 1223; 1126; 820.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.16; 16.70; 55.62; 55.90 (2C); 60.100; 98.56 (2C); 106.07; 111.93; 113.80; 118.21; 120.90; 123.94; 125.35; 134.08; 134.96; 135.94; 136.00; 141.79; 147.35; 153.19 (2C); 153.26; 158.49.

### 6.23.4 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: *N*-[(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)metilene]-3,4,5-trimetossifenil-enammina(29d).



✓ Solido di colore marrone

$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}$ ; PM = 422 g/mol

Resa % =36; p.F = 192°C

#### Procedimento:

In un pallone da 250mL si solubilizzano in circa 30mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  0.2g (0.78mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**25a**) e 0.143g (0.78mmol) di 3,4,5-trimetossianilina. Si lascia a riflusso per 5 ore e poi a temperatura ambiente tutta la notte.

Si filtra sottovuoto e si purifica il grezzo di reazione mediante semplici lavaggi con EtOH assoluto; quindi si evapora a pressione ridotta. Dalla cristallizzazione con  $\text{Et}_2\text{O}$  si ottiene un prodotto solido di colore marrone.

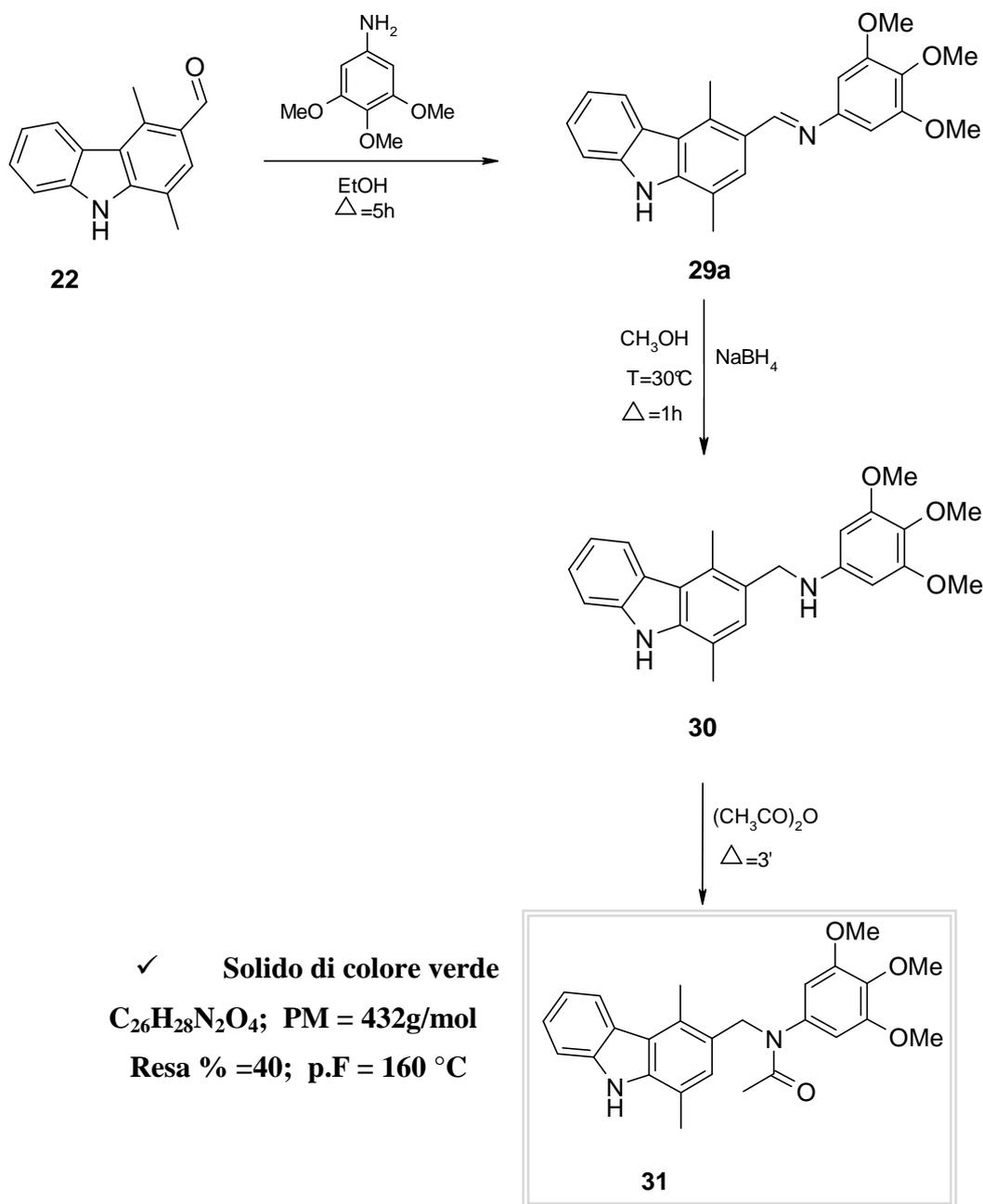
#### Analisi spettroscopica:

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.56 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.66 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.83 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 7.44 (dd,  $J_1=8.79\text{Hz}$ ,  $J_2=1.95\text{Hz}$ , 1H, Ar); 7.57 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 1H, Ar); 8.02 (s, 1H, Ar); 8.21 (d,  $J=1.95\text{Hz}$ , 1H, Ar); 9.03 (s, 1H,  $\text{CH=N}$ ); 11.74 (s, 1H, NH).

**IR** (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3414 (NH); 2936-2834 ( $\text{OCH}_3$ ,  $\text{CH}_3$ ); altre bande 1583; 1502; 1228; 1125; 989.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 15.14; 16.71; 55.37; 55.93; 60.16; 98.61 (2C); 112.78; 121.82; 122.04; 123.60; 124.99; 125.27; 126.14; 128.46; 133.35; 138.64; 141.45; 142.89; 145.09; 148.46; 153.25; 153.33; 158.16.

## 6.24 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: *N*-[(1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)metil]-*N*-(3,4,5-trimetossifenil)acetammide(**31**).



### Procedimento:

In un pallone da 250mL munito di agitatore elettromagnetico, si dissolvono in circa 60mL di EtOH assoluto 0,2g (0.89mmol) di 1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**22**) e 0,163g (0.89mmol) di 3,4,5-trimetossianilina. Dopo 5 ore di riflusso si ottiene la formazione del prodotto **29a** come confermato dall'analisi di spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ . Quindi si evapora a pressione ridotta, si riprende il prodotto con la minima quantità di

CH<sub>3</sub>OH e si aggiungono infine 2eq. di NaBH<sub>4</sub> 0,07g e (1.78mmol). Si lascia sotto agitazione per circa 1 ora alla temperatura di 30°C ottenendo un composto oleoso.

Successivamente si aggiunge la minima quantità di (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub> e si porta a riflusso per 3 minuti. Si concentra a pressione ridotta fino a metà volume e si lascia cristallizzare a temperatura ambiente. Infine si filtra sottovuoto ottenendo un solido di colore verde (**31**).

### **Analisi spettroscopica:**

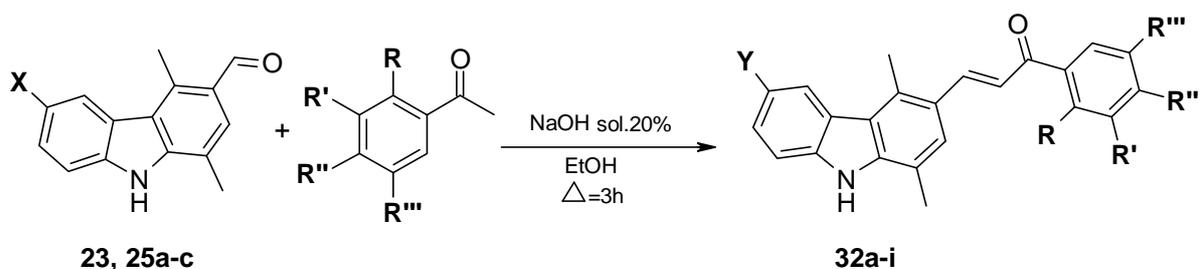
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.31 (s, 3H, NOCH<sub>3</sub>); 3.50 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.33 (s, 2H, Ar); 6.96 (s, 1H, Ar); 7.12 (t, J=7.81Hz, 1H, Ar); 7.34 (t, J=7.31Hz, 1H, Ar); 7.48 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 8.08 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 11.10 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3276 (NH); 2959-2825 (OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>); 1633 (C=O amide); altre bande 1593; 1130; 736.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 433 (M+H)<sup>+</sup>.

## 6.25 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: derivati 1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il-1-fenilprop-2-en-1-oni diversamente sostituiti(32a-o).

*schema 1:*



Starting	X	Prodotti	Y	R	R'	R''	R'''	Resa%
25a	Cl	32a	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	60
25a	Cl	32b	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	58
25a	Cl	32c	Cl	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	60
25b	F	32d	F	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	59
25c	Br	32e	Br	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	64
23	CHO	32f		OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	69
25a	Cl	32g	Cl	H	H	Cl	H	78
25a	Cl	32h	Cl	H	H	F	H	55
25a	Cl	32i	Cl	H	H	CH <sub>3</sub>	H	56

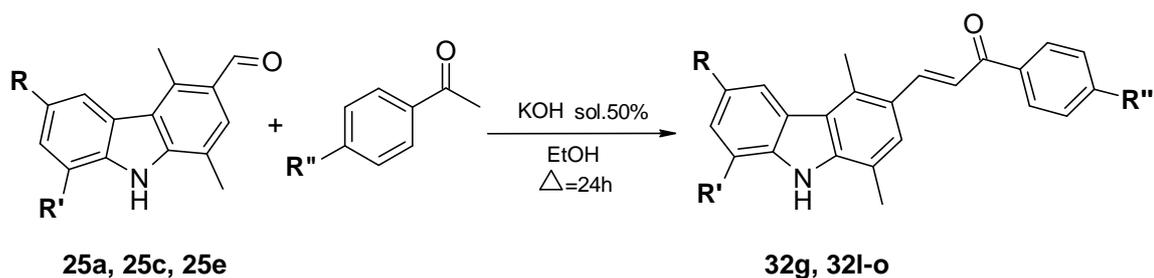
### Procedimento (Schema 1):

In un pallone da 250mL munito di agitatore elettromagnetico, si versano 15mL di sol. al 20% di NaOH e 15mL di EtOH assoluto, successivamente a tale soluzione si aggiungono 0.3g (Xmmol) di 1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**25a-c**) e Xg (Xmmol) di acetofenone opportunamente sostituito (rapp. molari: **25a-c/acetofenone diversamente sostituito**= 1/1.1). Si lascia a riflusso per 3 ore.

Senza raffreddare si filtra sottovuoto, si lava con la minima quantità di H<sub>2</sub>O per eliminare l'ex. di NaOH, quindi si r filtra ed infine si lava con la minima quantità di CH<sub>3</sub>CN e di Et<sub>2</sub>O.

La stessa procedura sintetica viene utilizzata per ottenere il derivato **32f**, a partire dalla 1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3,6-dicarbaldeide (**23**) utilizzando i seguenti rapporti molari: **23/2,5-dimetossi acetofenone**= 1/2.2.

### schema 2:



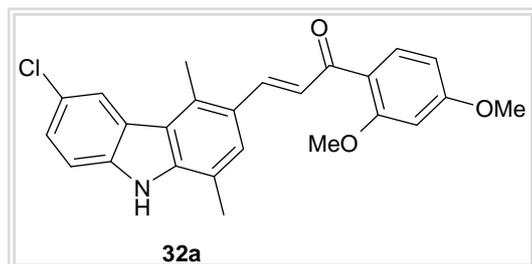
Starting	R	R'	Prodotti	R''	Resa%
25a	Cl	H	32g	Cl	88
25c	Br	H	32l	Cl	81
25c	Br	H	32m	F	74
25c	Br	H	32n	CH <sub>3</sub>	71
25e	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	32o	Cl	45

### Procedimento (Schema 2):

In un pallone da 250mL munito di agitatore elettromagnetico, si versano 2mL di sol. al 50% di KOH e 10mL di EtOH assoluto, successivamente a tale soluzione si aggiungono Xg (Xmmol) di acetofenone opportunamente sostituito in *para* e dopo 10 minuti 0.5g (Xmmol) di derivato aldeidico diversamente sostituito (**25a**, **25c**, **25e**) nei seguenti rapporti molari: (**25a**, **25c**, **25e**)/acetofenone diversamente sostituito= 1/1.1.

Si lascia a riflusso per 24 ore. Si filtra sottovuoto, si lava con la minima quantità di H<sub>2</sub>O per eliminare l'ex. di KOH, quindi si r filtra ed infine si lava con la minima quantità di CH<sub>3</sub>CN e di Et<sub>2</sub>O.

**6.25.1 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(2,4-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32a).**



✓ Solido di colore giallo

$C_{25}H_{22}ClNO_3$ ; PM = 419g/mol

Resa % =60; p.F = 260°C

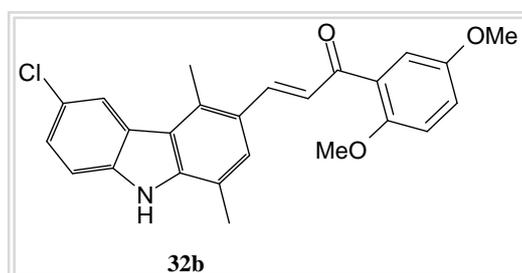
**Analisi spettroscopica:**

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.54 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.84 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.85 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3.90 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 6.64 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 6.69 (s, 1H, Ar); 7.37-7.43 (m, 1H, Ar; 1H,  $CH=CHCO$ ); 7.55 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, Ar); 7.60 (d,  $J=8.75$ Hz, 1H, Ar); 7.67 (s, 1H, Ar); 8.09 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ), 8.16 (s, 1H, Ar).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3436 (NH); 3000 ( $CH=CH$ ); 2926-2830 ( $OCH_3$ ,  $CH_3$ ); 1643 ( $C=O$ ); altre bande 1546; 1489; 1230; 972; 728.

MS (ESI $^+$ ): 420 (M+H) $^+$ .

**6.25.2 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(2,5-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32b).**



✓ Solido di colore giallo

$C_{25}H_{22}ClNO_3$ ; PM = 419g/mol

Resa % =58; p.F = 198°C

**Analisi spettroscopica:**

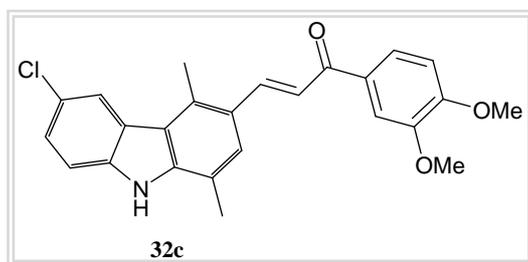
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.50 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.77 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.74 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3.79 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 7.03-7.23 (m, 3H, Ar; 1H,  $CH=CHCO$ ); 7.40 (s, 1H, Ar); 7.52 (s, 1H, Ar); 7.67 (s, 1H, Ar); 8.03-8.11 (m, 1H,  $CH=CHCO$ ; 1H, Ar).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3289 (*NH*); 3003 (*CH=CH*); 2945-2832 (*OCH<sub>3</sub>*, *CH<sub>3</sub>*); 1649 (*C=O*);  
altre bande 1548; 1489; 1230; 1036; 807.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 420 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.75; 16.65; 55.56; 56.35; 112.72; 113.75; 113.99; 117.90;  
118.84; 120.37; 121.75; 123.57; 123.86; 124.48; 124.94; 125.03; 125.35; 130.01; 132.24;  
138.57; 141.13; 141.25; 151.57; 153.04, 191.72.

### 6.25.3 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(3,4-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32c).



✓ **Solido di colore giallo-arancio**

**C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>3</sub>; PM = 419g/mol**

**Resa % =60; p.F >260°C**

#### Analisi spettroscopica:

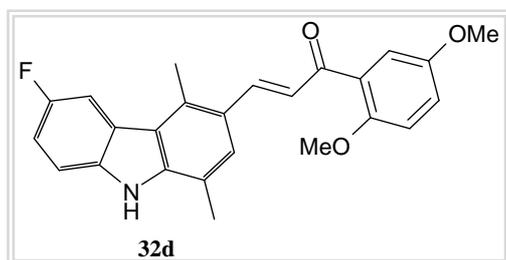
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  2.58 (s, 3H, *CH<sub>3</sub>*); 2.89 (s, 3H, *CH<sub>3</sub>*); 3.86 (s, 6H, *OCH<sub>3</sub>*); 7.10 (d, J=8.79Hz, 1H, *Ar*); 7.43 (d, J=9.79Hz, 1H, *Ar*); 7.56 (d, J=8.79Hz, 1H, *Ar*); 7.62 (s, 1H, *Ar*); 7.81 (d, J=15.62Hz, 1H, *CH=CHCO*); 7.93 (d, J=8.79Hz, 1H, *Ar*); 8.00 (s, 1H, *Ar*); 8.18 (s, 1H, *Ar*), 8.29 (d, J=15.62Hz, 1H, *CH=CHCO*).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3269 (*NH*); 3006 (*CH=CH*); 2962-2862 (*OCH<sub>3</sub>*, *CH<sub>3</sub>*); 1644 (*C=O*);  
altre bande 1555; 1271; 1024; 798.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 420 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.65; 16.81; 55.64; 56.78; 110.75; 110.85; 113.26; 118.87;  
119.26; 120.57; 121.63; 123.03; 123.44; 124.64; 124.90; 125.25; 125.84; 131.12; 132.51;  
138.97; 141.23; 148.77; 149.24; 152.90, 187.19.

### 6.25.4 Sintesi di: 1-(2,5-dimetossifenil)-3-(6-fluoro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)prop-2-en-1-one(32d).



✓ Solido di colore giallo

$C_{25}H_{22}FNO_3$ ; PM = 403g/mol

Resa % =59; p.F = 206°C

#### Analisi spettroscopica:

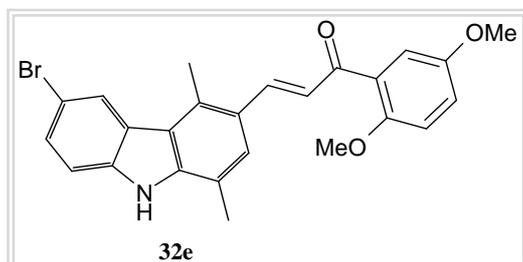
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.53 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.79 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.75 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 7.04 (s, 1H, Ar); 7.08-7.15 (m, 1H, Ar; 1H,  $CH=CHCO$ ); 7.23-7.29 (m, 2H, Ar); 7.52-7.55 (m, 1H, Ar); 7.69 (s, 1H, Ar); 7.92 (d,  $J=10.71$ Hz, 1H, Ar); 8.05 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 11.60 (br, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3233 (NH); 3003 ( $CH=CH$ ); 2947-2862 ( $OCH_3$ ,  $CH_3$ ); 1646 ( $C=O$ ); altre bande 1544; 1493; 1226; 1040; 809.

MS (ESI $^+$ ): 404 (M+H) $^+$ .

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 15.46; 16.67; 55.57; 56.37; 108.06 (d,  $J=23.95$ Hz); 112.14 (d,  $J=9.91$ Hz); 112.91 (d,  $J=25.60$ Hz); 113.77; 113.98; 117.86; 118.85; 120.94 (d,  $J=4.12$ Hz); 123.46; 123.58 (d,  $J=9.91$ Hz); 124.74; 125.16; 130.07; 132.31, 136.61; 141.41; 141.63; 151.56; 153.05; 156.66 (d,  $J=232.10$ Hz); 191.81.

### 6.25.5 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(2,5-dimetossifenil)prop-2-en-1-one(32e).



✓ Solido di colore giallo

$C_{25}H_{22}BrNO_3$ ; PM = 463g/mol

Resa % =64; p.F = 218°C

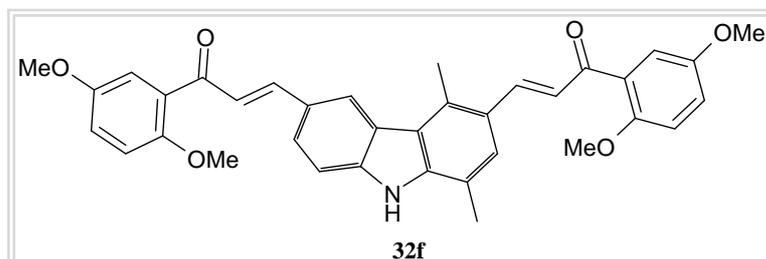
#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.53 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.80 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.75 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 7.04 (s, 1H, Ar); 7.10-7.15 (m, 2H, Ar); 7.25 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 7.50-7.56 (m, 2H, Ar); 7.70 (s, 1H, Ar); 8.04 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 8.28 (s, 1H, Ar); 11.72 (br, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3298 (NH); 3000 ( $CH=CH$ ); 2950-2829 ( $OCH_3$ ,  $CH_3$ ); 1646 ( $C=O$ ); altre bande 1557; 1491; 1224; 1040; 802.

MS (ESI $^+$ ): 464 e 466 (M+H) $^+$ .

### 6.25.6 Sintesi di: 1-(2,5-dimetossifenil)-3-{6-[3-(2,5-dimetossifenil)-3-oxo-1-propenil]-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il}-2-propen-1-one(32f).



✓ Solido di colore arancio

$C_{36}H_{33}NO_6$ ;

PM = 575g/mol

Resa % =69; p.F >260°C

#### Analisi spettroscopica:

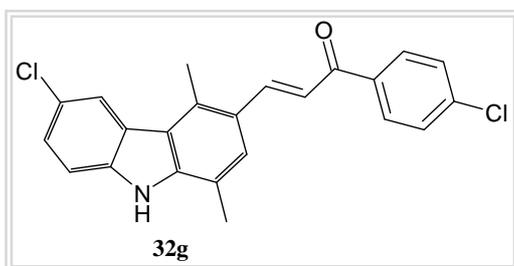
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.53 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.86 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.75 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 3.82 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 7.00-7.18 (m, 6H, Ar); 7.26 (d,  $J=14.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 7.37 (d,  $J=14.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 7.56 (s, 1H, Ar); 7.66-7.82 (m, 2H, Ar; 1H,  $CH=CHCO$ ); 8.07 (d,  $J=14.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 8.46 (s, 1H, Ar).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3321 (*NH*); 3003 (*CH=CH*); 2939-2832 (*OCH<sub>3</sub>*, *CH<sub>3</sub>*); 1648 (*C=O*); altre bande 1562; 1493; 1222; 1038; 972.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 576 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.75; 16.72; 55.56 (2C); 56.36 (2C); 112.31; 113.78; 113.91 (2C); 114.01; 117.87 (2C); 119.26 (2C); 121.36; 123.76; 123.98; 124.02; 124.69; 124.94 (2C); 125.09; 125.73; 129.96; 130.10; 132.38; 141.45; 145.41; 148.60, 151.63 (2C); 153.05 (2C), 191.73 (2C).

### 6.25.7 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one(32g).



✓ **Solido di colore giallo-arancio**

**C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO; PM = 393g/mol**

**p.F>260°C**

#### Procedimento (Schema 1):

Il 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one (**32g**) è stato ottenuto seguendo la stessa procedura di sintesi di (**32a-i**) utilizzando 15mL di sol. al 20% di NaOH e 15mL di EtOH assoluto, 0.2g (0.78mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**25a**) e 0,12mL (0.145g, 0.94mmol) di 4-cloro-acetofenone (d=1.190g/mL).

**Resa %= 78;**

#### Procedimento (Schema 2):

Il 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one (**32g**) è stato ottenuto utilizzando 2mL di sol. al 50% di KOH e 10mL di EtOH assoluto, e 0,32mL (0.39g, 2.25mmol) di 4-cloro-acetofenone (d=1.190g/mL) e 0.6g (2.33mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**25a**).

**Resa %= 88;**

**Analisi spettroscopica:**

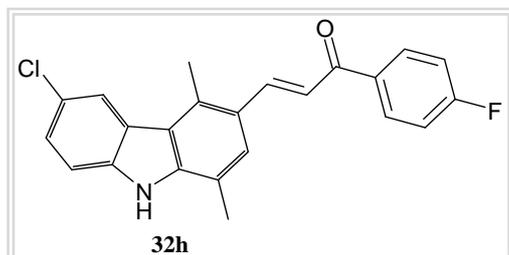
**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  2.56 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.89 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7.40 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 1H, *Ar*); 7.55 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 1H, *Ar*); 7.63 (d,  $J=8.79\text{Hz}$ , 2H, *Ar*); 7.77 (d,  $J=14.62\text{Hz}$ , 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}$ ); 7.99 (s, 1H, *Ar*); 8.15 (s, 1H, *Ar*); 8.19 (d,  $J=7.79\text{Hz}$ , 2H, *Ar*); 8.35 (d,  $J=14.62\text{Hz}$ , 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}$ ).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3303 (*NH*); 1641 ( $\text{C}=\text{O}$ ); altre bande 1589; 1544; 1483; 1229; 821.

**MS (ESI $^+$ ):** 394 (M+H) $^+$ .

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):** 15.25; 16.50; 113.33; 117.94; 119.41; 120.61; 121.26; 122.51; 122.63; 124.08; 124.66; 124.94; 128.45 (2C); 129.84 (2C); 132.68; 136.94; 137.19; 140.82; 142.59; 143.73; 187.42.

### 6.25.8 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-one(32h).



✓ Solido di colore giallo-arancio

$\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClFNO}$ ; PM = 377g/mol

Resa % =55; p.F>260°C

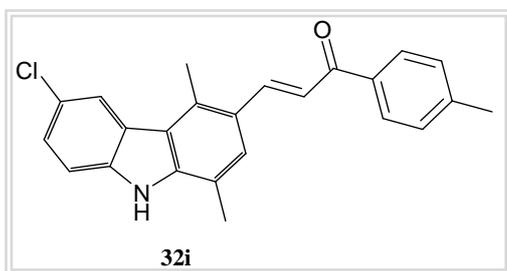
**Analisi spettroscopica:**

**$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  2.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7.25 (d,  $J=8.75\text{Hz}$ , 1H, *Ar*); 7.37 (t,  $J=8.79\text{Hz}$ , 2H, *Ar*); 7.48 (d,  $J=8.75\text{Hz}$ , 1H, *Ar*); 7.67 (d,  $J=14.62\text{Hz}$ , 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}$ ); 7.86 (s, 1H, *Ar*); 8.07 (s, 1H, *Ar*); 8.21-8.26 (m, 2H, *Ar*); 8.37 (d,  $J=14.62\text{Hz}$ , 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}$ ).

**IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3283 (*NH*); 3006 ( $\text{CH}=\text{CH}$ ); 1646 ( $\text{C}=\text{O}$ ); altre bande 1553; 1489; 1231; 1031; 827.

**MS (ESI $^+$ ):** 378 (M+H) $^+$ .

**6.25.9 Sintesi di: 3-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-p-tolilprop-2-en-1-one(32i).**



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>ClNO; PM = 373g/mol**

**Resa % =56; p.F=264°C**

**Analisi spettroscopica:**

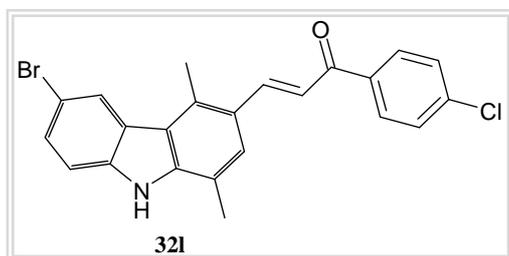
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.19 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.35 (d, J=7.79Hz, 2H, Ar); 7.46 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 7.61 (d, J=14.62Hz, 1H, CH=CHCO); 7.80 (s, 1H, Ar); 8.02-8.07 (m, 3H, Ar); 8.36 (d, J=14.62Hz, 1H, CH=CHCO).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3275 (NH); 3003 (CH=CH); 1638 (C=O); altre bande 1542; 1487; 1232; 1043; 815.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 378 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.34; 16.28; 20.89; 112.51; 118.54; 119.78; 120.26; 121.40; 123.33; 123.95; 124.46; 124.65; 125.31; 128.15 (2C); 128.95 (2C); 132.06; 135.51; 138.61; 141.18; 141.34; 142.73; 188.32.

### 6.25.10 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-one(32l).



✓ Solido di colore arancio

$C_{23}H_{17}BrClNO$ ; PM = 438g/mol

Resa % =81; p.F=265°C

#### Analisi spettroscopica:

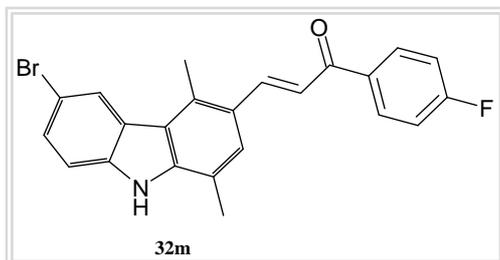
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.57 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.89 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.52 (s, 2H, Ar); 7.63 (d,  $J=7.79$ Hz, 2H, Ar); 7.80 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ); 8.01 (s, 1H, Ar); 8.20 (d,  $J=7.83$ Hz, 2H, Ar); 8.29 (s, 1H, Ar); 8.35 (d,  $J=15.62$ Hz, 1H,  $CH=CHCO$ ).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3304 (NH); 1642 (C=O); altre bande 1589; 1546; 1483; 1010; 822.

MS (ESI $^+$ ): 438 e 440 (M+H) $^+$ .

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 15.31; 16.33; 110.90; 113.21; 118.76; 118.84; 120.21; 123.46; 124.22; 124.28; 125.22; 127.10; 128.43; 129.85; 132.45; 136.73; 137.30; 139.45; 141.77; 142.28; 187.51.

**6.25.11 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-one(32m).**

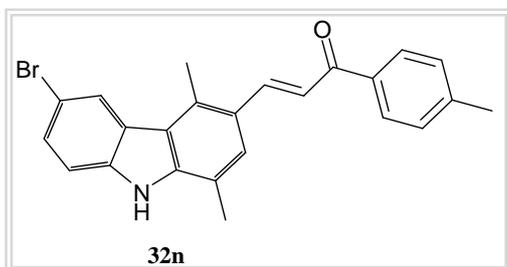


✓ Solido di colore arancio  
 $C_{23}H_{17}BrFNO$ ; PM = 422g/mol  
 Resa % =74; p.F=265°C

**Analisi spettroscopica:**

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.57 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.88 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.06 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 7.50 (s, 2H, Ar); 7.77 (d, J=14.66Hz, 1H, CH=CHCO); 7.98 (s, 1H, Ar); 8.16 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 8.27-8.32 (m, 1H, Ar; 1H, CH=CHCO).

**6.25.12 Sintesi di: 3-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-1-p-tolilprop-2-en-1-one(32n).**



✓ Solido di colore arancio  
 $C_{24}H_{20}BrNO$ ; PM = 418g/mol  
 Resa % =71; p.F=265°C

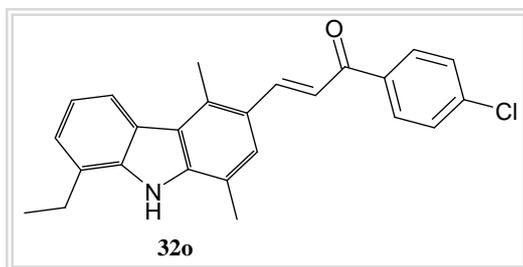
**Analisi spettroscopica:**

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.40 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.57 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.88 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.37 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 7.49-7.57 (m, 2H, Ar); 7.80 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 8.01 (s, 1H, Ar); 8.26-8.34 (m, 1H, Ar; 1H, CH=CHCO).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3277 (NH); 3002 (CH=CH); 1643 (C=O); altre bande 1543; 1486; 1230; 1042; 797.

MS (ESI $^+$ ): 418 e 420 (M+H) $^+$ .

### 6.25.13 Sintesi di: 1-(4-clorofenil)-3-(8-etil-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)prop-2-en-1-one(32o).



✓ **Solido di colore arancio**

**C<sub>25</sub>H<sub>17</sub>BrClNO; PM = 387g/mol**

**Resa % =45; p.F=220°C**

La stessa procedura sintetica relativa allo schema 2 viene utilizzata per l'ottenimento del derivato **32o**, ma in questo caso si ottiene un olio che viene cristallizzato in CH<sub>3</sub>CN ottenendo infine un solido di colore arancio.

#### Analisi spettroscopica:

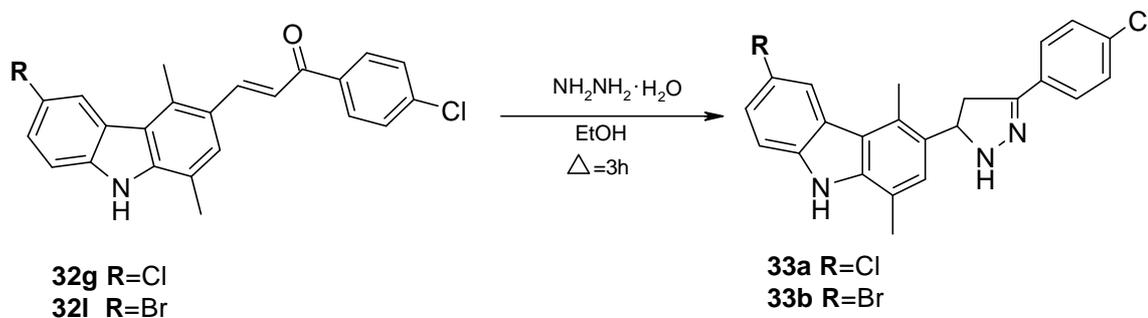
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.32 (t, J=7.31Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.04 (q, J=7.32Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.14 (t, J=7.79Hz, 1H, Ar), 7.23 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar), 7.63 (d, J=7.79Hz, 2H, Ar); 7.77 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO); 7.95 (s, 1H, Ar); 8.04 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.20 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 8.37 (d, J=15.62Hz, 1H, CH=CHCO).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3350 (NH); 1621 (C=O); altre bande 1577; 1233; 1011; 835.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 388 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 14.61; 15.64; 17.19; 23.67; 118.58; 118.95; 119.80; 120.07; 121.70; 123.48; 124.13; 125.07; 127.15; 128.82 (2C); 130.30 (2C); 132.54; 136.85; 137.67; 138.70; 139.70; 141.01; 142.75; 187.66.

**6.26 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-5-il]-1,4-dimetil-9*H*-carbazoli diversamente sostituiti(33a-b).**

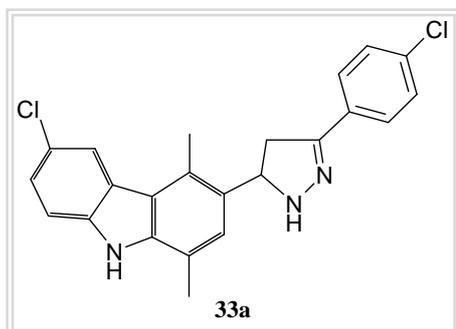


**Procedimento:**

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano in circa 20mL di EtOH assoluto Xg (Xmmol) di derivato 1,4-dimetil-9*H*-carbazolico (**32g**; **32l**). Successivamente si aggiungono Xg (Xmmol) di idrazina idrata [rapp. molari (**32g**; **32l**)/ $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  = 1/2.5]. Si lascia a riflusso per 3 ore.

Si filtra sottovuoto e si lava con la minima quantità di  $\text{Et}_2\text{O}$  ottenendo un prodotto solido puro.

### 6.26.1 Sintesi di: 6-cloro-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidro-1H-pirazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazolo(33a).



✓ Solido di colore giallo

$C_{23}H_{19}Cl_2N_3$ ; PM = 407 g/mol

Resa % = 65; p.F = 243°C

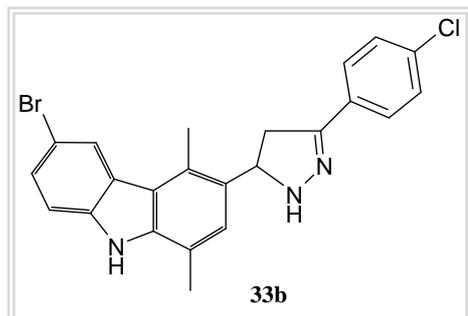
#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.48 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.70-2.76 (m, 3H,  $CH_3$ ; 1H,  $CH_2$ ); 3.49-3.56 (m, 1H,  $CH_2$ ); 5.25-5.32 (m, 1H,  $CH$ ); 7.37 (s, 1H, *Ar*); 7.39-7.44 (m, 1H, -NH-N=; 2H, *Ar*); 7.51 (d,  $J=8.79$ Hz, 1H, *Ar*); 7.62-7.65 (m, 3H, *Ar*); 8.14 (s, 1H, *Ar*); 11.35 (br, 1H, NH).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3397-3282 (NH); altre bande 1593; 1493; 1444; 1297; 1090; 827.

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 15.59, 16.88; 40.26, 60.57; 79.17; 112.31; 117.45; 120.21; 121.51; 122.65; 124.49; 125.26; 126.96; 127.48; 128.51; 131.06; 132.21; 132.45; 138.64; 138.85; 146.97.

### 6.26.2 Sintesi di: 6-bromo-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidro-1H-pirazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazolo(33b).



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>BrClN<sub>3</sub>; PM = 452 g/mol**

**Resa % = 55; p.F = 254°C**

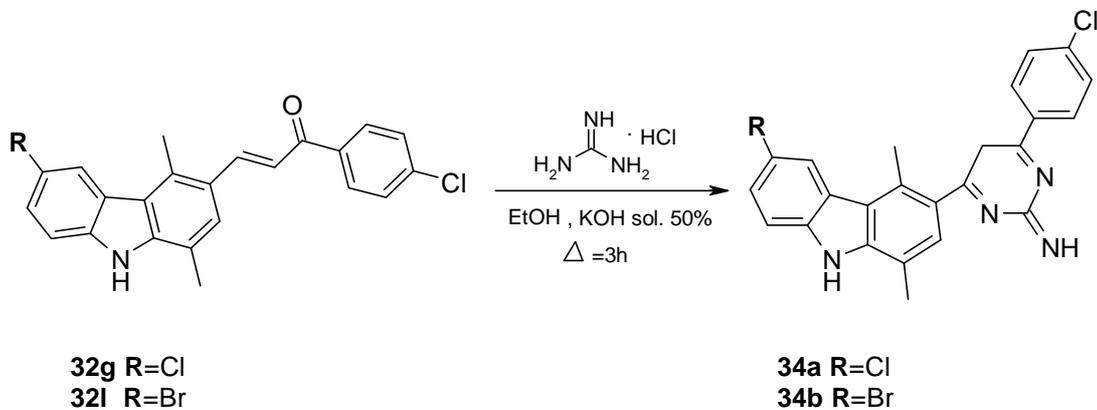
#### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.70-2.76 (m, 3H, CH<sub>3</sub>; 1H, CH<sub>2</sub>); 3.49-3.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 5.26-5.32 (m, 1H, CH); 7.38 (s, 1H, Ar); 7.42 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 7.46-7.50 (m, 1H, -NH-N=; 1H, Ar); 7.62-7.66 (m, 3H, Ar); 8.27 (s, 1H, Ar); 11.36 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3389-3243 (NH); altre bande 1594; 1494; 1441; 1341; 1092; 831.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.60; 16.88; 40.25; 60.56; 110.49; 112.80; 117.43; 120.09; 124.38; 125.18; 125.29; 126.95; 127.07; 127.48; 128.50; 131.11; 132.20; 132.44; 138.66; 138.87; 146.95.

**6.27 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 4-(4-clorofenil)-6-(1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)pirimidin-2(5H)-immine diversamente sostituite(34a-b)**

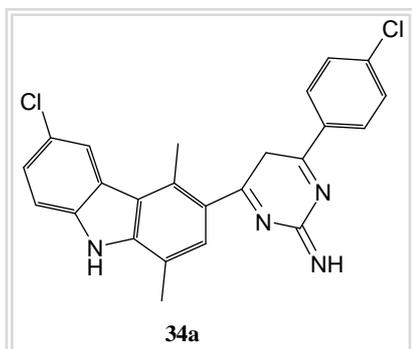


**Procedimento:**

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano in 20mL di soluzione EtOH assoluto/4 gocce di KOH (sol. al 50%) Xg (Xmmol) di derivato 1,4-dimetil-9H-carbazolico (**32g**; **32l**). Successivamente si aggiungono Xg (Xmmol) di guanidina cloridrata nei seguenti rapporti molari (**32g**; **32l**)/guanidina cloridrata= 1/2.5 Si lascia a riflusso per 3 ore.

Si filtra sottovuoto e si lava con la minima quantità di H<sub>2</sub>O, ed infine con Et<sub>2</sub>O ottenendo un prodotto solido puro.

**6.27.1 Sintesi di: 4-(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-6-(4-clorofenil)pirimidin-2(5H)-immine(34a).**



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>; PM = 432 g/mol**

**Resa % = 58; p.F = 260°C**

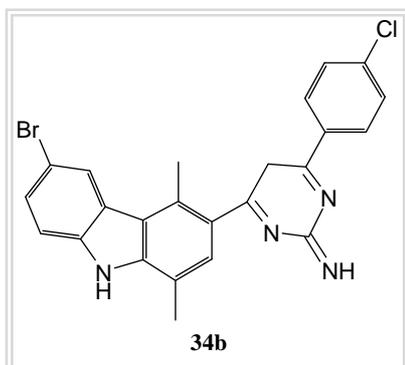
**Analisi spettroscopica:**

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 5.29 e 5.64 (d, J=3.91Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 5.40 e 6.47 (br, 1H, C=NH); 7.26 (s, 1H, Ar); 7.30 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 7.38 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.51 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.75 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 8.14 (s, 1H, Ar).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3409-3325 (NH); altre bande 1656; 1584; 1246; 1153; 798; 503.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.20; 16.97; 50.76; 97.64; 112.35; 117.72; 120.75; 121.54; 122.70; 124.50; 124.68; 126.57; 126.67; 126.76 (2C); 127.64 (2C); 128.72; 131.22; 134.77; 138.59; 138.68; 138.86; 154.25.

### 6.27.2 Sintesi di: 4-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)-6-(4-clorofenil)pirimidin-2(5H)-immine(34b).



✓ **Solido di colore giallo**

**C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>BrClN<sub>4</sub>; PM = 477 g/mol**

**Resa % = 32; p.F = 206°C**

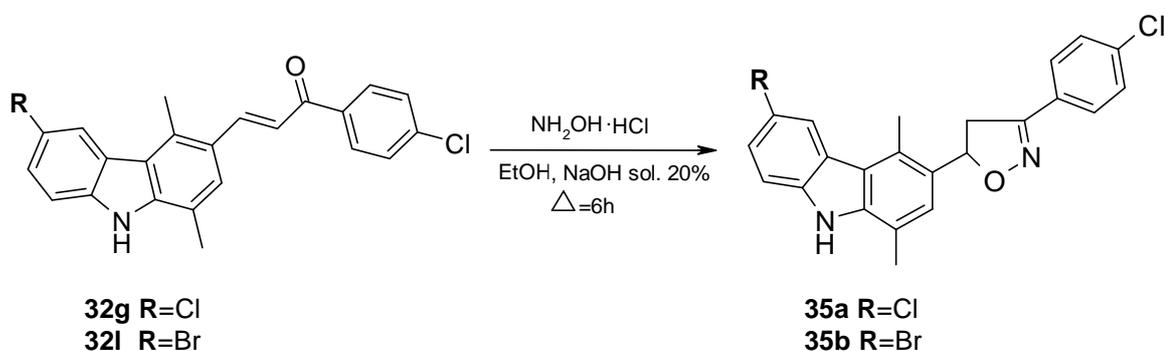
#### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 5.29 e 5.64 (d, J=3.91Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 5.43 e 6.48 (br, 1H, C=NH); 7.26 (s, 1H, Ar); 7.30 (d, J= 8.75Hz, 2H, Ar); 7.50-7.47 (m, 2H, Ar); 7.75 (d, J=7.83Hz, 2H, Ar); 8.28 (s, 1H, Ar); 11.39 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3409-3323 (NH); altre bande 1656; 1584; 1490; 1300; 798; 536.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.23; 16.98; 50.75; 97.69; 110.55; 112.87; 117.72; 120.06; 124.41; 125.36; 126.57; 126.69; 126.76 (2C); 127.11; 127.64 (2C); 131.23; 134.80; 138.52; 138.68; 138.94; 141.67; 154.22.

**6.28 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DI: 3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidroisossazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazoli diversamente sostituiti(35a-b).**

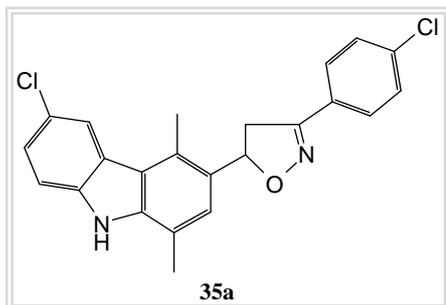


**Procedimento:**

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano Xg (Xmmol) di derivato 1,4-dimetil-9H-carbazolico (**32g**; **32l**) in 25mL di soluzione EtOH assoluto/8 gocce di NaOH (sol. al 20%). Successivamente si aggiungono Xg (Xmmol) di idrossilammina cloridrata nei seguenti rapporti molari (**32g**; **32l**)/NH<sub>2</sub>OH·HCl= 1/2.1. Si lascia a riflusso per 6 ore.

Si filtra sottovuoto e si lava con la minima quantità di H<sub>2</sub>O. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante semplici lavaggi prima con CH<sub>3</sub>CN e poi con Et<sub>2</sub>O ottenendo un prodotto solido.

### 6.28.1 Sintesi di: 6-cloro-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidroisossazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazolo(35a).



✓ Solido di colore crema

$C_{23}H_{18}Cl_2N_2O$ ; PM = 408 g/mol

Resa % = 30; p.F >260°C

#### Analisi spettroscopica:

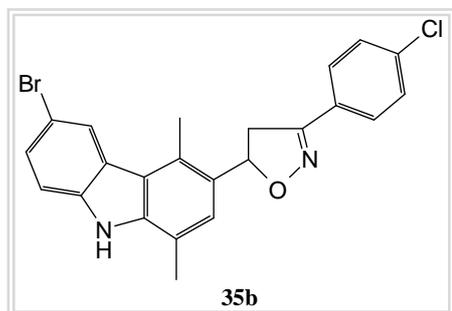
$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.48 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.76 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.34-3.37 (m, 1H,  $CH_2$ ); 3.88-3.97 (m, 1H,  $CH_2$ ); 6.13-6.19 (m, 1H,  $CH$ ); 7.25 (s, 1H,  $Ar$ ); 7.40 (d,  $J=8.79$ Hz; 1H,  $Ar$ ); 7.49-7.56 (m, 3H,  $Ar$ ); 7.73 (d,  $J=7.79$ Hz, 2H,  $Ar$ ); 8.15 (s, 1H,  $Ar$ ); 11.44 (s, 1H,  $NH$ ).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3346 ( $NH$ ); altre bande 1599; 1446; 1093; 903.

MS (ESI $^+$ ): 409 (M+H) $^+$ .

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 15.64; 16.77; 41.91; 80.50; 111.58; 112.40; 113.38; 117.86; 120.19; 121.59; 122.86; 124.55; 124.71; 127.83; 128.34 (2C); 128.91 (2C); 129.99; 134.59; 138.66; 139.34; 155.79.

### 6.28.2 Sintesi di: 6-bromo-3-[3-(4-clorofenil)-4,5-diidroisossazol-5-il]-1,4-dimetil-9H-carbazolo(35b).



✓ **Solido di colore giallo chiaro**

**C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>BrClN<sub>2</sub>O; PM = 453 g/mol**

**Resa % = 37; p.F>260°C**

#### Analisi spettroscopica:

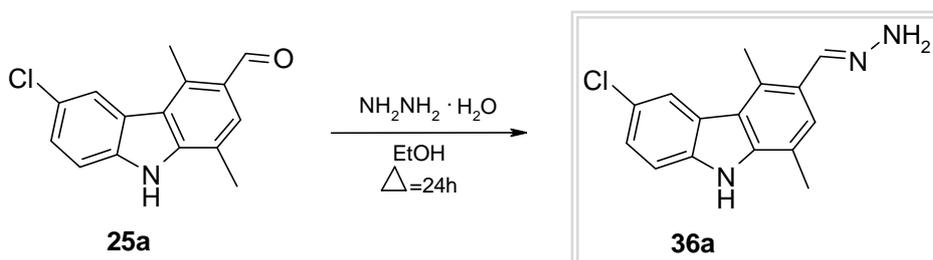
**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.35 (dd, J<sub>1</sub>=17.54Hz, J<sub>2</sub>=9.75Hz, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.92 (dd, J<sub>1</sub>=17.54Hz, J<sub>2</sub>=11.2Hz, 1H, CH<sub>2</sub>); 6.15 (t, J=10.75Hz, 1H, CH); 7.26 (s, 1H, Ar); 7.48-7.54 (m, 4H, Ar); 7.74 (d, J=8.79Hz, 2H, Ar); 8.27 (s, 1H, Ar); 11.50 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3347 (NH); altre bande 1598; 1440; 896.

**MS (ESI<sup>+</sup>):** 453 e 455 (M+H)<sup>+</sup>.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.34; 16.53; 41.61; 80.37; 110.37; 112.74; 117.65; 119.96; 124.08; 124.31; 124.90; 126.92; 127.54; 128.07 (2C); 128.30 (2C); 128.53; 128.58; 134.32; 138.86; 139.06; 155.48.

## 6.29 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide idrazone(36a).



✓ **Solido di colore marrone**  
**C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>; PM = 271 g/mol**  
**Resa % =30; p.F>260°C**

### Procedimento:

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, si versano 30mL di EtOH assoluto e poi in successione 0.194g (3.89mmol) di idrazina idrata, e 0.5g (1.94mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide (**25a**). Si lascia a riflusso per 24 ore .

Si filtra sottovuoto senza far raffreddare. La fase organica viene successivamente lasciata cristallizzare a temperatura ambiente ed infine filtrata sottovuoto. Il prodotto ottenuto viene ulteriormente purificato mediante semplici lavaggi prima con CH<sub>3</sub>CN e poi con Et<sub>2</sub>O.

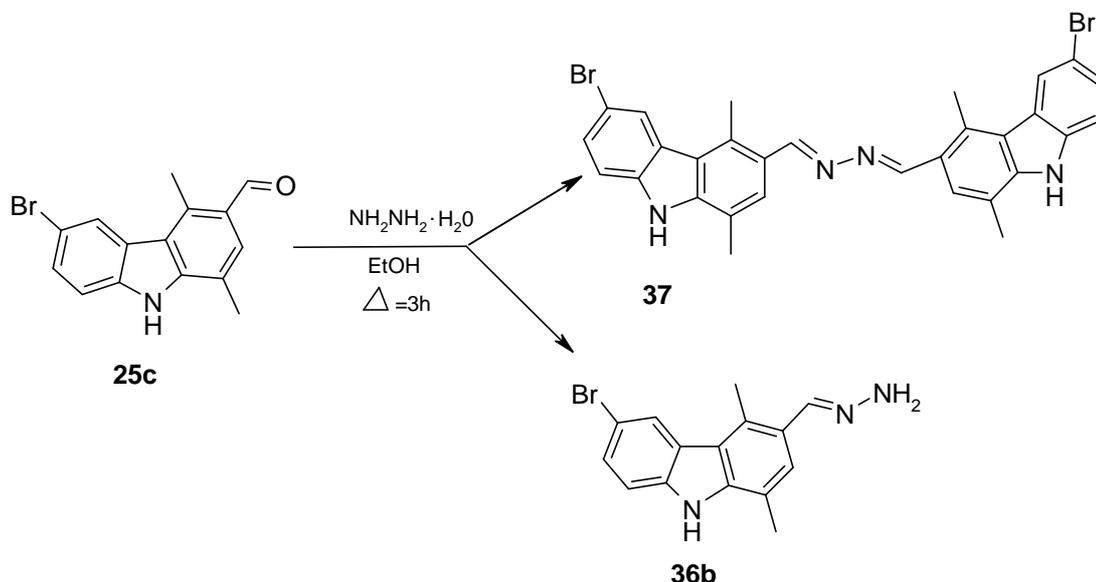
### Analisi spettroscopica:

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.51 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.38 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.52 (d, J=8.79Hz, 1H, Ar); 7.61 (s, 1H, Ar); 8.13 (s, 1H, CH=N-NH<sub>2</sub>); 8.23 (s, 1H, Ar); 11.46 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3399-3353 (NH<sub>2</sub>); 3167 (NH); 1616 (CH=N); altre bande 1589; 1446; 857.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.11; 16.81; 112.49; 117.97; 119.99; 121.50; 122.86; 124.29; 124.43; 124.62; 125.33; 127.46; 138.47; 138.53; 139.33.

**6.30 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide idrazone(36b); 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide-N-[(E)-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metildene]idrazone (37).**



**Procedimento:**

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano in 25mL di EtOH assoluto 0.2g (4.00mmol) di idrazina idrata, e 0.3g (1.00mmol) di 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide. Si lascia a riflusso per 3 ore.

Si evapora a pressione ridotta e si riprende il grezzo di reazione con Et<sub>2</sub>O, quindi si filtra sottovuoto. Sul filtro resta il prodotto 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide-N[(E)-(6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-il)metildene]idrazone (37), solido di colore verde.

**Resa %=30; p.F >260°C.**

Il filtrato viene invece concentrato sotto pressione ridotta fino a metà volume; successivamente si lascia cristallizzare a temperatura ambiente, quindi viene filtrato sottovuoto e purificato mediante un semplice lavaggio con Et<sub>2</sub>O. Si ottiene un solido di colore bianco 6-bromo-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-carbaldeide idrazone (36b).

**Resa%= 35; p.F=210°C.**

**Analisi spettroscopica del derivato 37:**

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.55 (s, 2H, Ar); 8.01 (s, 1H, Ar); 8.34 (s, 1H, Ar); 9.18 (s, 1H, CH=N-); 11.52 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3419 (NH); 1614 (CH=N); altre bande 1589; 1436; 1246; 797.

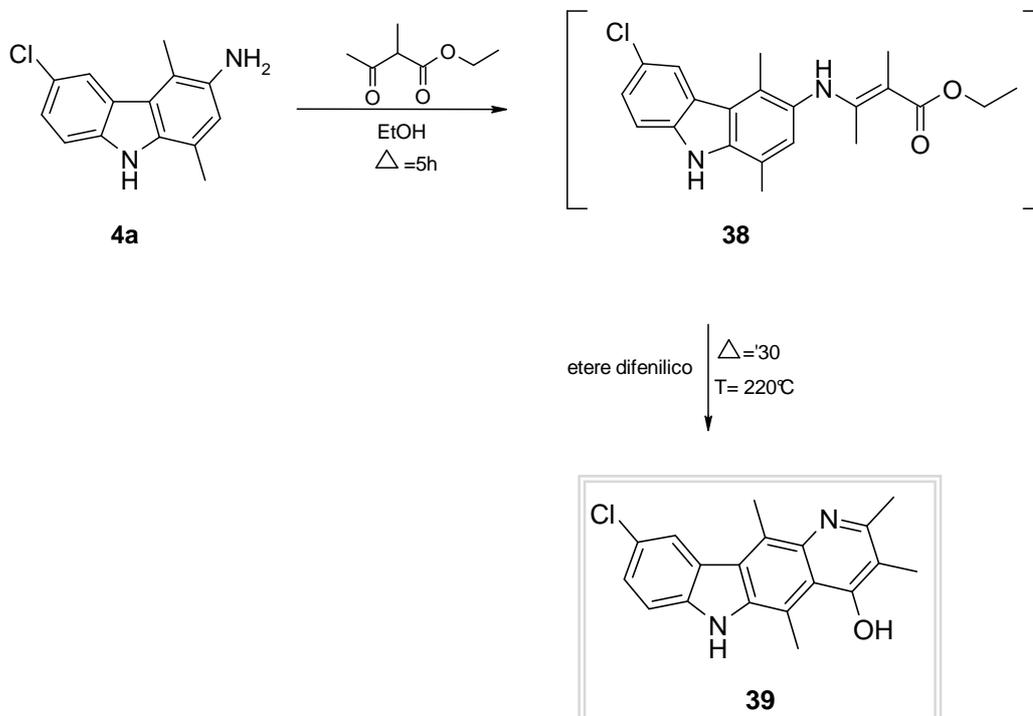
**Analisi spettroscopica del derivato 36b:**

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.51 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.45-7.49 (m, 2H, Ar); 7.61 (s, 1H, Ar); 8.22 (s, 1H, CH=N-NH<sub>2</sub>); 8.26 (s, 1H, Ar); 11.47 (s, 1H, NH).

**IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>):** 3398-3354 (NH<sub>2</sub>); 3169 (NH); 1613 (CH=N); altre bande 1589; 1442; 857.

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 15.12; 16.77; 110.73; 112.95; 117.92; 119.87; 124.32; 124.39; 125.30; 125.38; 127.04; 127.45; 138.48; 138.68; 139.11.

### 6.31 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 9-cloro-2,3,5,11-tetrametil-6H-pirido[3,2-b]carbazol-4-olo(39).



#### Procedimento:

In un pallone da 100mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano 1.14g (4.67mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazol-3-ammino (**4a**) in 30mL di EtOH assoluto. Successivamente si aggiungono 0.72mL (0.73g; 5.1mmol) di etil-2-metil-acetoacetato ( $d=1.019g/mL$ ). Si lascia a riflusso per 5 ore.

Si evapora a pressione ridotta, si riprende con  $Et_2O$  e si filtra sottovuoto. Sul filtro restano le impurezze mentre dalla cristallizzazione in difeniletere della fase organica si ottiene il derivato **38**.

Successivamente si effettua la ciclizzazione di tale derivato in circa 20mL di difeniletere (30 minuti alla temperatura di  $220^\circ C$ ).

Dopo raffreddamento la miscela di reazione è versata in circa 500mL di etere di petrolio e lasciata agitare a temperatura ambiente per 15 minuti. Il precipitato formato si filtra sottovuoto e si lava con la minima quantità di  $Et_2O$  ottenendo un solido di colore marrone (**39**).

**Resa % = 66; pF  $>260^\circ C$ .**

**Analisi spettroscopica del derivato 38:**

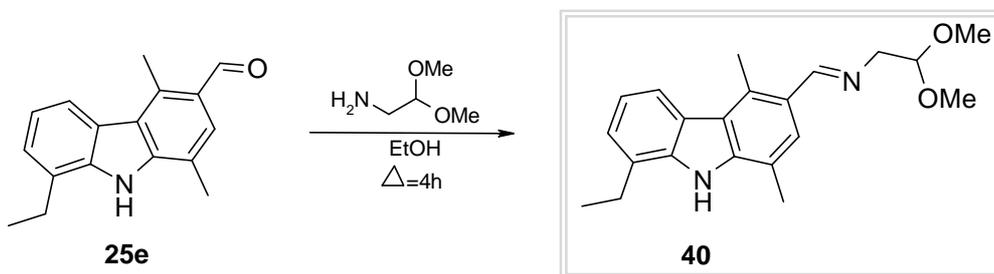
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.07 (t, J=6.83Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.10 (q, J=7.31Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 7.01 (s, 1H, Ar), 7.40 (d, J=8.79Hz, 1H Ar); 7.53 (d, J=8.79Hz, 1H Ar); 8.09 (s, 1H, Ar); 10.70 (s, 1H, NH); 11.47 (s, 1H, NH).

**Analisi spettroscopica del derivato 39:**

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.44-7.52 (m, 2H, Ar); 8.24 (s, 1H, Ar); 9.77 (s, 1H, OH); 11.79 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 10.75; 13.86; 15.99; 17.84; 112.05; 112.47; 115.86; 116.29; 120.43; 122.25; 122.56; 122.64; 123.66; 126.28; 132.49; 136.52; 140.75; 144.57; 179.46.

### 6.32 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: *N*-[(8-etil-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)metilene]-2,2-dimetossietanammina(40).



✓ Solido di colore rosato

$C_{21}H_{26}N_2O_2$ ; PM = 338 g/mol

Resa % = 50; p.F = 128°C

#### Procedimento:

In un pallone da 250mL munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano in 70mL di EtOH assoluto, 0.6g (2.39mmol) di 8-etil-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-carbaldeide (**25e**) e 0.96g (9.1mmol) di 2,2-dimetossi-etanammina. Si lascia a riflusso per 4 ore.

Si evapora a pressione ridotta e si riprende con Et<sub>2</sub>O. Si filtra sottovuoto; sul filtro restano le impurezze, la fase organica viene invece evaporata a pressione ridotta ottenendo un composto oleoso. Dalla cristallizzazione in cicloesano di tale olio otteniamo un solido di colore rosato.

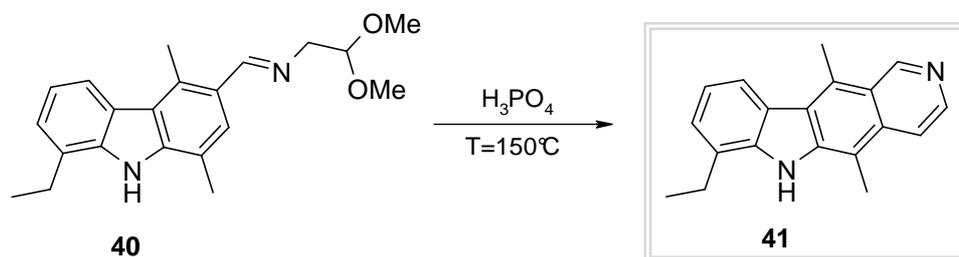
#### Analisi spettroscopica:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.30 (t, J=7.81Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.03 (q, J=7.81Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.30 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.70-3.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 4.64 (t, J=4.87Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH); 7.14 (t, J=7.81Hz, 1H, Ar); 7.23 (d, J=6.83Hz, 1H, Ar); 7.74 (s, 1H, Ar); 8.03 (d, J=7.79Hz, 1H, Ar); 8.80 (s, 1H, CH=N); 10.91 (s, 1H, NH).

IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 3275 (NH); 2881 (OCH<sub>3</sub>); altre bande 1624; 1581; 1236; 1053; 915; 752.

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 14.58; 14.95; 17.19; 23.67; 53.19 (2C); 62.94; 103.56; 118.13; 119.49; 120.01; 121.31; 123.54; 123.85; 124.87; 125.26; 126.89; 131.14; 138.54; 140.30; 161.49.

### 6.33 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 7-etil-5,11-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazolo(41).



✓ Solido di colore rosato  
 $C_{19}H_{18}N_2$ ; PM = 274 g/mol  
 Resa % = 34; p.F = 129°C

#### Procedimento:

In un pallone da 100mL munito di agitatore elettromagnetico, alla temperatura di 150°C si depositano 20g di  $H_3PO_4$ . Dopo 10 minuti si aggiungono 1.0g (2.95mmol) di *N*-[(8-etil-1,4-dimetil-9*H*-carbazol-3-il)metilene]-2,2-dimetossietanamina (**40**) e si lascia reagire per circa 20 minuti ( $T=150^\circ C$ ).

Dopo raffreddamento la miscela di reazione è versata in una beuta contenente acqua e ghiaccio ed alcalinizzata con una sol. di NaOH al 10% (pH=9).

Il precipitato formato di seguito all'idrolisi alcalina viene filtrato sottovuoto e lavato più volte con  $CH_3CN$ .

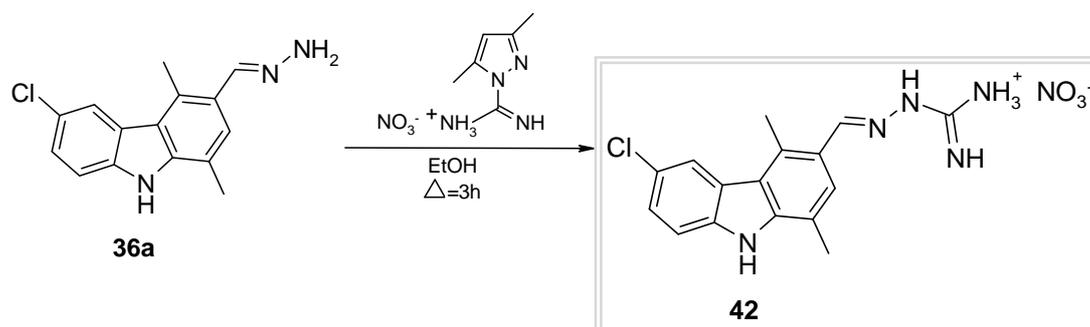
La fase organica viene anidrificata, filtrata su carta, evaporata a pressione ridotta, ed infine ripresa con la minima quantità di  $H_2O$ . Dopo acidificazione con HCl si effettua un'estrazione con AcOEt. La soluzione acquosa acida viene neutralizzata con una sol. di NaOH al 10%. Il precipitato formato viene filtrato sottovuoto e cristallizzato mediante  $CH_3CN$ .

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.58 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.92 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.70-3.74 (m, 2H,  $CH_2$ ); 4.64 (t,  $J=4.87Hz$ , 1H,  $CH_2CH$ ); 7.14 (t,  $J=7.81Hz$ , 1H, *Ar*); 7.23 (d,  $J=6.83Hz$ , 1H, *Ar*); 7.74 (s, 1H, *Ar*); 8.03 (d,  $J=7.79Hz$ , 1H, *Ar*); 8.80 (s, 1H,  $CH=N$ ); 10.91 (s, 1H, *NH*).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3144( $CH=N$ ); 2963 ( $CH_2CH_3$ ); 1597 (CN); altre bande 1404; 1234; 809.

### 6.34 PROCEDURA PER LA SINTESI DI: 2-[(6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo-3-il)metilindene]idrazino(immino)metanammino nitrato(42).



✓ **Solido di colore giallo**

$C_{16}H_{17}N_6ClO_3$ ; PM = 376 g/mol

Resa % = 40; p.F >260°C

#### Procedimento:

In un pallone da 100mL munito di agitatore elettromagnetico, dopo aver solubilizzato 0.122g (0.45mmol) di 6-cloro-1,4-dimetil-9H-carbazolo-3-carbaldeide idrazone (**36a**) in 20mL di EtOH assoluto si aggiungono 0.11g (0.54mmol) di 3,5-dimetilpirazolo-1-carbossiammide nitrato. Si lascia a riflusso per 3 ore.

Il precipitato formato viene filtrato sottovuoto e purificato mediante semplici lavaggi con  $CH_3CN$  ed  $Et_2O$ .

#### Analisi spettroscopica:

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.58 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.99 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.43 (d,  $J=9.75Hz$ , 1H, Ar); 7.55-7.60 (m, 1H, Ar); 8.01 (s, 1H, Ar); 8.22 (s, 1H, Ar); 9.18 (s, 1H,  $CH=N$ ).

IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3237 ( $NH$ ,  $CH=N-NH$ ); 2971 ( $NH_3^+$ ); 2918 ( $NO_3^-$ ); 1583 ( $CN$ ); altre bande 1483; 1310; 803.

# Bibliografia

---

---

## BIBLIOGRAFIA

- R. L. P. Adams, J. T. Knowler, D. P. Leader. In the biochemistry of the nucleic acids, (1992).
- Allemand, et al. Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases. *PNAS*, 24, (1998), 14152-14157.
- W. K. Anderson, A. Gopalsamy, P. S. Reddy. *J. Med. Chem.*, 37, (1994), 1955-1963.
- J. P. Armand, M. Ducreux, M. Mahjoubi, D. Abigeres, R. Bugat, G. Chabot, P. Herait, M. de Forni, P. Rougier, *Eur. J. Cancer*, 31A, (1995), 1283-1287.
- P. Bhattacharyye, A. Chakraborty. *Phytochemistry*, 23, (1984), 471.
- P. Bhattacharyye, B. K. Chowdhury. *Indian J. Chem.*, 24b, (1985), 452.
- M. Bakker, J. Renes, A. Groenhuijzen, et al. Mechanisms for high methoxymorpholino doxorubicin cytotoxicity in doxorubicin-resistant tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, 73, (1997), 362-6.
- H. Basu, B. Feuerstein, D. Zarling, R. Shafer, L. Marton. Recognition of Z-RNA and Z-DNA determinants by polyamines in solution: experimental and theoretical studies. *J Biomol Struct Dyn*, 6, (2), (1988), 299-309.
- J. M. Berger. Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400, (1998), 3-18.
- J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry*, (2002). W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6.
- J. M. Bishop, R. A. Weinberg. *Molecular Oncology Scientific American*, (1996).
- M. H. Block, S. Boyer, W. Brailsford, D. R. Brittain, D. Carroll, S. Chapma, D. S. Clarke, C. S. Donald, K. M. Foote, L. Michael, R. O'Donovan, J. Elizabeth Pease, A. G. Pickup, J. W. Rayner, A. Roberts, P. Schofield, A. Suleman, and A. V. Turnbull. Discovery and Optimization of a Series of Carbazole Ureas as NPY5 Antagonists for the Treatment of Obesity. *J. Med. Chem.*, 45, (2002), 3509-3523.
- L. Bolognanini, N. Volpi. *Tavole metaboliche-Google-libri*, (1998), 166.
- M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa, A. Ramos. *Curr. Pharm. Des.*, 7, (2001), 1745.

- J. M. Butler. Forensic DNA Typing. *Elsevier*, (2001), 14-15. ISBN 978-0-12-147951-0.
- M. L. Cameron, W. A. Schell, S. Bruch, J. A. Bartlett, H. A. Waskin, and J. R. Perfect. Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother*, 37, (1993), 2449–2453.
- G. Capranico, M. Binaschi. DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 185-94.
- A. Caruso. Synthesis of novel dimethylcarbazole, dimethylpyrimidocarbazole, benzofuro quinazolinone, benzothienoquinazolinone derivatives with potential anticancer activity. Ph.D. Thesis, (17.12.2008), University of Calabria-Italy.
- A. Caruso, A. S. Voisin-Chiret, J. C. Lancelot, M. S. Sinicropi, A. Garofalo, S. Rault. Efficient and simple synthesis of 6-Aryl-1,4-dimethyl-9H-carbazoles. *Molecules*, 13, (2008), 1312-1320.
- A. Caruso, A. S. Voisin-Chiret, J. C. Lancelot, M. S. Sinicropi, A. Garofalo, S. Rault. Novel and efficient synthesis of 5,8-dimethyl-9H-carbazol-3-ol via a hydroxydeboronation reaction. *Heterocycles*, 71, (2007), 2203-2210.
- T. Caulfield, M. P. Cherrier, C. Combeau, P. Mailliet. (2002), EP 1 253 141 A1.
- D. P. Chakraborty, B. K. Barmann, P. K. Bosc. *Tetrahedron*, 21, (1965), 681.
- D. P. Chakraborty, P. K. Bosc. *Experientia*, 21, (1965), 340.
- A. Chakraborty, C. Saha, G. Padder, B. K. Chowdhury. Carbazole Alkaloid with antimicrobial activity from *Clausena Heptaphylla*. *Elsevier Scienze*, 3, (1995), 787-789.
- T. Chalikian, J. Völker, G. Plum, K. Breslauer. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetric and volumetric techniques. 14, (1999), 7853-8.
- K. C. Chow, T. L. MacDonald, W. E. Ross. *Mol. Pharmacol.*, 34, (1988), 467-473.
- T. Conroy. Principes et indications de la chimiothérapie anti-cancéreuse.
- A. Cranwell, J. E. Saxton. Synthesis of ellipticine. *J. Chem. Soc. III*, (1962), 3482-3487.

- A. H. Corbett, N. Osheroff. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem Res Toxicol.*, 6, (1993), 585-97.
- K. L. Dalton, S. Demerac, B. C. Elmes, W. J. Loder, J. M. Swan, T. Tsutomu. *Australian Journal of Chemistry*, 20 (12), (1967), 2715-27.
- M. Damelin, T. H. Bestor. The decatenation checkpoint. *Br. J. Cancer*, 96 (2), (2007), 201-205.
- J. Dancey, E. A. Eisenhauer, *Br. J. Cancer*, 74, (1996), 327-338.
- R. Danesi, C. Agen, M. Grandi, V. Nardini, G. Bevilacqua, M. Del Tacca. 3V-Deamino-3V-(2-methoxy-4-morpholinyl)-doxorubicin (FCE 23762): a new anthracycline derivative with enhanced cytotoxicity and reduced cardiotoxicity. *Eur. J. Cancer*, 11, (1993), 1560-5.
- F. Degrassi, M. Fiore, F. Palitti. Chromosomal Aberrations and Genomic Instability Induced by Topoisomerase-Targeted Antitumour Drugs. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 4, (2004), 317-325.
- M. Del Poeta, W. A. Schell, C. C. Dykstra, S. K. Jones, R. R. Tidwell, A. Kumar, D. W. Boykin and J. R. Perfect. In Vitro Antifungal Activities of a Series of Dication-Substituted Carbazoles, Furans and Benzimidazoles, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (1998), 2503–2510.
- G. De Martino, M.C. Edler, G. La Regina, A. Coluccia, New Arylthioindoles: Potent Inhibitors of Tubulin Polymerization Structure-Activity Relationships and Molecular Modeling Studies. *J. Med. Chem.*, 49, (2006), 947-954.
- P. B. Dervan, A.T. Poulin-Kerstien, E.J. Fechter, B.S. Edelson. Regulation of gene expression by synthetic DNA-binding ligands. In *DNA Binders and Related Subjects*, Springer: Berlin, Heidelberg, German, 253, (2005), 1-31.
- G. F. Di Bona. Neuropeptide Y. *Am. J. Physio*, (2002).
- A. Doherty, S. Suh. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. *Nucleic Acids Res*, 28 (21), (2000), 4051-8.
- W. O. Foye, D. A. Williams, T. L. Lemke. “*Foye’s principi di Chimica Farmaceutica*”, Piccin (2005).
- E. Frei, C. A. Bieler, V. M. Arlt, M. Wiessler, M. Stiborova. Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA in V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 64, (2002), 289-295.

- C. Friedel, J. M. Crafts. *Compt. Rend.*, 84, (1877), 1392-1450.
- S. J. Froelich-Ammon, M. W. Patchan, N. Osheroff, R. B. Thompson. Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 270, (1995), 14998-5004.
- S. Gasser, D. Raulet. The DNA damage response, immunity and cancer. *Seminars in Cancer Biology, Natural killer cells in cancer*, 16, (2006), 344-347.
- A. Ghosh, M. Bansal. A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59 (2003), 620-6.
- B. C. Giovanella, J. S. Stehlin, M. E. Wall, M. C. Wani, A. W. Nicholas. L. F. Liu, R. Silber, M. Potmesil. *Science*, 246, (1989), 1046-1048.
- C. Gobert, L. Bracco, F. Rossi, M. Olivier, J. Tazi, F. Lavelle, A. K. Larsen, J. F. Riou. Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry*, 35 (18), (1996), 5778-86.
- Goodman & Gilman. “*Le Basi Farmacologiche della Terapia*”, IX Ed. Italiana, McGraw-Hill, Libri Italia Srl.
- S. Goodwin, A. F. Smith, E. C. Horning. Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, (1959), 1903-1908.
- D. E. Graves, L. M. Velea. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Curr. Org. Chem.*, 4, (2000), 915-929.
- I. Greguric, J. R. AldrichWright, J. G. Collins. A H-1 NMR study of the binding of Delta-[Ru(phen)(2)DPQ](2+) to the hexanucleotide d(GTCGAC)(2). Evidence for intercalation from the minor groove. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, (1997), 3621-3622.
- C. Greider, E. Blackburn. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell.*, 43, (1985), 405-13.
- P. Groundwater, R. Lewis, *J. Chem. Res., Synopses*, 6, (1995), 215.
- J. Gurnos, S. P. Stanforth. The Vilsmeier reaction of fully conjugated carbocycles and heterocycles. *Organic Reactions* (Hoboken, NJ, United States), 49, (1997).
- R. W. Guthrie, A. Brossi, F. A. Mennona, J. G. Mullin, R. W. Kierstead. Ellipticine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 1975, 755-759.
- M. Hagg, M. Berndtsson, A. Mandic, R. Zhou, M. C. Shoshou e S. Linder. Induction of endoplasmatic reticulum stress by Ellipticine plant alkaloids. *Mol. Cancer. Ther*, 3, (2004), 485-489.

- N. Haider, R. Jbara, J. Käferböck, U. Traar. Synthesis of tetra- and pentacyclic carbazole-fused imides as potential antitumor agents. *Arkivoc*, (2009), 38-47.
- K. R. Hande. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1–3), (1998), 173-184.
- G. Hayashi, M. Hagihara, K. Nakatani. Application of L-DNA as a molecular tag. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)* 49, (2005), 261-262.
- T. Heikkilä, C. Ramsey, M. Davies, C. Galtier, A. M. W. Stead, A. Peter Johnson, Colin W. G. Fishwick, A. N. Boa, and G. A. McConkey. Design and Synthesis of Potent Inhibitors of the Malaria Parasite Dihydroorotate Dehydrogenase. *J. Med. Chem.*, 50, (2007), 186-191.
- M. O. Hengartner. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, (2000), 770-776.
- J. G. Hengstler, C. K. Heimerdinger, I. B. Schiffer, S. Gebhard, J. Sagemüller, B. Tanner, H. M. Bolt, F. Oesch. Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? *EXCLI Journal*, 1, (2002), 8-14, ISSN 1611-2156.
- C. Holm, J. M. Covey, D. Kerrigan, Y. Pommier. *Cancer Res.*, 49, (1989), 6365-6368.
- L. Hsueh-Yun et al. Efficient microwave-assisted synthesis of ellipticine through N-(1,4-dimethyl-9H-carbazol-3-ylmethyl)-N-tosylaminoacetaldehyde diethyl acetal. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 47 (2), (2010), 454-458.
- Y. H. Hsiang, M. G. Lihou, L. F. Liu. *Cancer Res.*, 49, (1989), 5077-5082.
- Y. H. Hsiang, L. F. Liu, M. E. Wall, M. C. Wani, A. W. Nicholas, G. Manikumar, S. Kirschenbaum, R. Silber, M. Potmesil. *Cancer Res.*, 49, (1989), 4385-4389.
- U. Hubscher, G. Maga, S. Spadari. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev. Biochem.*, 71, (2002), 133-63.
- L. Hu, Z. R. Li, Y. M. Wang, Y. Wu, J. D. Jiang, D. W. Boykin. Novel pyridinyl and pyrimidinylcarbazole sulphonamides as antiproliferative agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, (2007), 1193-6.
- L. Hu, Z. R. Li, Y. Li, J. Qu, Y. H. Ling, J. D. Jiang e D. W. Boykin. Carbazoles Sulfonamides as a novel class of antimetabolic agents against solid tumor. *J. Med. Chem.*, 49, (2006), 6273-6282.
- L. H. Hurley. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2, (2002), 188-200.

- H. Ihmels, K. Faulhaber, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, G. Viola Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA. Part 2: The annelated quinolizinium ion as a structural motif in DNA intercalators. *Photochem. Photobiol.*, 81, (2005), 1107-1115.
- H. Ihmels, D. Otto. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. *Top. Curr. Chem.*, 258, (2005), 161-204.
- R. Jaszold-Howorko. Synthesis of 5,6-Dimethyl-9-methoxy-1-phenyl-6H-phirido (4-3b) Carbazole derivatives and their Cytotoxic Activity, *Wiley Inter Science*, 338, (2005), 556-561.
- C. Jaxel, K. W. Kohn, M. C. Wani, M. E. Wall, Y. Pommier. *Cancer Res.*, 49, (1989), 1465-1469.
- A. Jordan, J. A. Hadfield. Tubulin as a Target for Anticancer Drugs: Agents which Interact with the Mitotic Spindle. *Med. Res. Rev.*, 18, (1998), 259-296.
- M. A. Jordan, L. Wilson. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer*, 4, (2004), 253-265.
- B. S. Joshi, D. H. Geward. *Indian J. Chem.*, 12, (1974), 437.
- C. Joyce, T. Steitz. Polymerase structures and function: variations on a theme?. *J. Bacteriol*, 177 (22), (1995), 6321-9.
- F. Kanzawa, K. Nishio, N. Kubuta, N. Saijo. *Cancer Res.*, 55, (1995), 2806-2813.
- G. Karp, "Biologia cellulare e molecolare", EDISES, (1998).
- B.G. Katsung. "Farmacologia generale e clinica", IV Ed. Piccin (2000).
- S. H. Kaufmann. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biocim. Biophys Acta*, (1998), 195-211.
- S. Z. Kawada, Y. Yamashita, Y. Uosaki, K. Gomi, T. Iwasaki, T. Takiguchi, H. Nakano. *J. Antibiot.*, 45, (1992), 1182-1184.
- W. D. Kingsbury, J. C. Boehm, D. R. Jakas, K. G. Holden, S. M. Hecht, G. Gallagher, M. J. Caranfa, F. L. McCabe, L. F. Faucette, R. K. Johnson & et al. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J. Med. Chem.*, 34 (1), (1991), 98-107.
- N. Kishore, B. B. Mishra, V. Tripathi, V. K. Tiwar. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. *Science Direct*, (2009), 149-163.

- S. J. Klebanoff. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, 77, (2005), 598-615.
- H. J. Knöker, K. R. Reddy. Isolation and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids. *Chem. Rev.*, 102, (2002), 4303-4427.
- D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. J. Bast, T. S. Gansler, J. F. Holland, E. Frei. *Cancer Medicine*, 6, (2003).
- M. Kumar Roy, V. Thalang, G. Trakoontivakorn, K. Nakahara. Mahanine, a carbazole alkaloid from *Micromelum minutum* inhibits cell growth and induces apoptosis in I-J937 cells through a mitochondrial dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, (2005), 145-155.
- P. Kuo, Y. Hsu, C. Chang, C. Lin, The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Letters*, 223, (2005), 293-301.
- Y. Kuo, P. Kuo, Y. Hsu, C. Cho, C. Lin. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sciences*, 78, (2006), 2550-2557.
- A. Kuwabara, K. Nakano, K. Nozaki. Double N-Arylation of Primary Amines: Carbazole Synthesis from 2,2-Biphenyldiols. *Joc. Article*, 70, (2005), 413-419.
- H. Laixing, L. Zhuo-rong. Synthesis and Structures-Activity Relationships of Carbazole Sulfonamides as a Novel Class of Antimitotic Agents Against Solid Tumors. *J. Med. Chem.*, 49, (2006), 6273-6282.
- J.C. Lancelot et al. Efficient synthesis of 6H-pyrido[3,2-b]carbazole. derivatives from 3-amino-1,4-dimethyl-carbazole. *Chem. Pharm. Bull.*, 35 (1), (1987), 425-428.
- J. C. Lancelot, B. Letois, S. Rault, M. Robba. *Heterocycles*, 31, (2), (1990), 241-6.
- J. C. Lancelot, B. Letois, S. Rault, N. H. Dung, C. Saturnino, M. Robba. *Gazzetta Chimica Italiana*, 121, (1991), 301-307.
- A. K. Larsen, A. E. Escargueil, A. Skladanowski. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 99 (2), (2003), 167-181.
- I. N. Lavrik, A. Golks, P. H. Krammer. Caspases: pharmacological manipulation of cells death. *J. Clin. Invest.* 115, (2005), 2665-2672.
- L.S. Lerman. *J. Mol. Biol.* 3, (1961), 18.

- A. G. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekaran, R. L. Ratliff. Polymorphism of DNA double helices. *J. Mol. Biol.* 143 (1), (1980), 49-72.
- B. Letois, J. C. Lancelot, S. Rault, M. Robba, et al. *European-Journal of Medicinal Chemistry*, 25 (9), (1990), 775-84.
- B. Letois. Synthèse et étude physicochimique de nouveaux 5,11-diméthyl-6H-pyrido [3,2-b] carbazoles a visée antitumorale. Ph. D. Thèse, (17.12.1990), Université de Caen, France.
- J. N. Li, D. Q. Song, Y. H. Lin, et al. Inhibition of microtubule polymerization by 3-bromopropionylamino benzoylurea (JIMB01), a new cancericidal tubulin ligand. *Biochem. Pharmacol.*, 65, (2003), 1691-9.
- J. P. Liou, C. Y. Wu. 4- and 5-Aroylindoles as Novel Classes of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.*, 50, (2007), 4548-4552.
- X. J. Lu, Z. Shakked, W. K. Olson. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures. *J. Mol. Biol.*, 300 (4), (2000), 819-40.
- A. Micheli, E. Mugno, V. Krogh, M. J. Quinn, M. Coleman, T. Hakulinen, G. Gatta, F. Berrino, R. Capocaccia. *Cancer Prevalence in European registry areas Annals of Oncology*, 13, (2002), 840-865.
- M. Monnot, O. Mauffret, V. Simon, E. Lescot, B. Psaume, J. M. Sacier, M. Charra, J. Belehradek, Jr. S. Femandjian. *J. Biol. Chem.*, 266, (1991), 1820-1829.
- B. A. D. Neto, A. A. M. Lapis. Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends. *Molecules*, 14, (2009), 1725-1746.
- J.L. Nitiss. *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, (1998), 63-81.
- M. Ohashi, E. Sugikawa, N. Nakanishi. Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *J. Cancer Res.*, 86, (1995), 819-829.
- H. Openshaw, K. Beamon, W. SynoldT, et al. Neurophysiological study of peripheral neuropathy after high-dose paclitaxel: lack of neuroprotective effect of amifostine. *Clin Cancer Res.*, 10, (2004), 461-7.
- E. Palecek. Local supercoil-stabilized DNA structures. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26 (2), (1991), 151-226.
- R. Paletti, S. Nicosia, F. Clementi, G. Fumagalli. "Farmacologia generale e molecolare", II Ed. Italiana, (1999), UTET, Torino.

- A. Pandurangan, N. Mathivanan, V.R. Prabavathy, V. Kabilan, V. Murugesan, K. Murugesan. *Indian J. Exp. Biol.*, 33, (1995), 357.
- V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou, E. A. Couladouros, D. Hepworth, K. C. Nicolaou. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. In 1999; 38, 270-301.
- E. Parker, M. Van Heek, A. Stamford. Neuropeptide Y receptors as targets for anti-obesity drug development: perspective and current status. *Eur. J. Pharmacol.*, (2002).
- R. Pink, A. Hudson, M. A. Mouries, M. Bendig. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 4, (2005), 727-740.
- J. F. Pizzolato et. al. The camptothecins. *New Drug Classes*, 361, (2003), 2235-2242.
- Y. Pommier. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature. Rev./Cancer.*, 6 (2006), 789-802.
- Y. Pommier. DNA Topoisomerase I Inhibitors. *Humana Press.*, (1997) 153-174.
- Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 83-106.
- Y. Pommier, O. Sordet, S. Antony, R. L. Hayward, K. W. Kohn. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, 23, (2004), 2934-2949.
- L. Quintieri, C. Geroni, M. Fantin, R. Battaglia, A. Rosato, W. Speed, P. Zanovello, M. Floreani. Formation and Antitumor Activity of PNU-159682, A Major Metabolite of Nemorubicin in Human Liver Microsomes. *Clinical Cancer Research*, 11, (2005), 1608-1617.
- P. Rajakumar, K. Sekar, V. Shanmugaiah and N. Mathivanan. Synthesis of novel carbazole based macrocyclic amides as potential antimicrobial agents. *European J. Med. Chem.*, 44, (2009), 3040-3045.
- I. R. Record, J. L. Broadbent, R. A. King, I. E. Dreosti, R. J. Head, A. L. Tonkin. Genistein inhibits growth of B16 melanoma cells in vivo and in vitro and promotes differentiation in vitro. *Int. J. Cancer*. 72, (1997), 860-4.

- R. Reid, P. Benedetti, M.A. Bjornsti. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 289-300.
- A. Rescifina, A. Corsaro, A. Piperno, D. Iannazzo. Progettazione, docking, sintesi ed attività antitumorale di nuovi intercalanti del DNA a struttura isossazolidinica. *XIII Convegno Nazionale sulle Reazioni Pericicliche*, Pavia 17-18 settembre 2009.
- M. Ripamonti, G. Pezzoni, E. Pesenti, et al. In vivo anti-tumour activity of FCE 23762, a methoxymorpholinyl derivative of doxorubicin active on doxorubicin-resistant tumour cells. *Br. J. Cancer.*, 65, (1992), 703–7.
- Robbins. “Le Basi Patologiche Delle Malattie”, VI Ed. Italiana, (2000).
- M. J. Robinson, B. A. Martin, T. D. Gootz, P. R. McGuirk, M. Moynihan, J. A. Sutcliffe, N. Osheroff. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. *J. Biol. Chem.*, 266, (1991), 14585-92.
- M. Romero, P. Renard, D. H. Caignard, G. Atassi, X. Solans, P. Constance, C. Bailly, M. D. Pujol. *J. Med. Chem.*, 50, (2007), 294-307.
- W. Sajewicz, A. Dlugosz. Cytotoxicity of some Potential DNA Intercalators (Carbazole, Acridine and Anthracene Derivatives) Evaluated through Neutrophil Chemiluminescence. *J. Appl. Toxicol.*, 20, (2000), 305-312.
- A. Schoeffler, J. Berger. Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem. Soc. Trans.*, 33, (2005), 1465-70.
- E. Schroder, C. Rufer, R. Schmiechen. “*Chimica Farmaceutica*”, Società editrice Scientifica, I Ed. Italiana.
- J. Schultz, K. Kaminker. Myeloperoxidase of the Leucocyte of normal human blood. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, (1962), 465-467.
- W. J. Slichenmyer, E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, S. H. Kaufmann. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, (1993), 271-287.
- B. S. Sorensen, J. Sinding, A. H. Andersen, J. Alsner, P. B. Jensen, O. Westergaard. Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *J Mol Biol.*, 228, (1992), 778-86.

- L. Stewart, G. C. Ireton, J. Champoux. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J. Mol. Biol.*, 269, (1997), 355-372.
- M. Stiborova, M. Rupertova, H. Schmeiser, E. Frei. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repu.*, 150 (1), (2006), 13-23.
- T. Suda, T. Takahashi, P. Golstein, S. Nagata. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75, (1993), 1169-1178.
- T. Tabka, L. Bartrand, J. C. Lancelot, et al. *European-Journal of Medicinal Chemistry*, 24, (6), (1989), 605-10.
- Y. Tachibana, H. Kikuzaki. Antioxidative Activity of Carbazole from *Murraya Koenigii* leaves. *J. A. Chem.*, 49, (2001), 5589-5594.
- C.H Takimoto, J. Wright, S. G Arbuck. Clinical applications of the camptothecins. *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), 107-19.
- N. Takahito, U. Makiko. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*, 106 (23), (2002), 2894-2900.
- H. Tamta, A. K. Mukhopadhyay. Biochemical targets for malaria chemotherapy. *CRIPS*, 4, (2003), 6-9.
- K. Tani, Y. Tohda, K. Hisada, M. Yamamoto. *Chem. Lett.*, (1996), 145.
- A. Tanizawa, A. Fujimori, Y. Fujimori, Y. Pommier. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, (1994), 836-842.
- A. Tanizawa, K. W. Kohn, G. Kohlhagen, F. Leteurtre, Y. Pommier. *Biochemistry*, 43, (1995), 7200-7206.
- L. Tarrago-Litvak, M. Andréola, G. Nevinsky, L. Sarih-Cottin, S. Litvak. The reverse transcriptase of HIV-1: from enzymology to therapeutic intervention. *FASEB J.*, 8 (8), (1994), 497-503.
- E. Tian, T. H. Landowoski, O. W. Stephens, S. Yaccoby, B. Barlogic e J. D. Shaughnessy. Ellipticine derivates NSC 338258 (EPD3) represents a potencial new antineoplastic agents for the treatment of multiple myeloma. *Mol. Cancer. Ther.*, 7, (2008), 1158-1164.
- R. B. Tishler, D. M. Lamppu, S. Park, B. D. Price. Microtubule-active drugs Taxol, vinblastine, and nocodazole increase the levels of transcriptionally active p53. *Cancer Res.*, 55, (1995), 6021-5.

- C. Thrash, K. Voelkel, S. DiNardo, R. Sternglanz. *J. Biol.Chem.*, 259, (1984), 1375-1377.
- Z. Topcu. *J. Clin. Pharm. Therap.*, 26, (2001), 405-416.
- N. Tuteja, R. Tuteja. Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *Eur. J. Biochem.*, 271 (10), (2004), 1849-63.
- M. Valenti, W. Nieves-Neira, G. Kohlhagen, K. W. Kohn, M. E. Wall, M .C. Wani, Y. Pommier. *Mol. Pharmacol.*, 52, (1997), 82-87.
- J. M. Vargason, B. F. Eichman, P. S. Ho. The extended and eccentric E-DNA structure induced by cytosine methylation or bromination. *Nature Structural Biology*, 7, (2000), 758-761.
- A. Vazquez, E. E. Bond, A. J. Levine, G. L. Bond. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 7, (2008), 979-987.
- M. Wahl, M. Sundaralingam. Crystal structures of A-DNA duplexes. *Biopolymers*, 44 (1), (1997), 45-63.
- M. E. Wall, M .C. Wani, C. E. Cooke, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G .A. Slim. *J. Am. Chem. Soc.*, 88, (1966), 3888-3890.
- J. C. Wang. DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, (1996), 635-692.
- J. C. Wang. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (6), (2002), 430-40.
- Y. M. Wang, L. X. Hu, Z. M. Liu, X. F. You, S. H. Zhang, J. R. Qu, Z. R. Li, Y. Li, W. J. Kong. N-(2,6-Dimethoxypyridine-3-yl)-9-Methylcarbazole-3-Sulfonamide as a novel tubulin ligand against human cancer. *Clinical Cancer Research*, 14 (19), (2008), 6218-6227.
- G. Wang, K. M. Vasquez Non-B DNA structure-induced genetic instability. *Mutat Res*, 598 (1-2), (2006), 103-119.
- M. Waring. *J. Annu. Rev. Biochem.*, 50, (1981), 159-192.
- K. Wassermann, J. Markovits, C. Jaxel, G. Capranico, K.W. Kohn, Y. Pommier. *Mol. Pharmacol.*, 38, (1990) 38-45.
- J. Watson, F. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 (1953), 737-8.
- Y. Yamada, T. Tamura, N. Yamamoto, T. Shimoyama, Y. Ueda, H. Murakami, H. Kusaba, Y. Kamiya, H. Saka, Y. Tanigawara et al. Phase I and pharmacokinetic

- study of edotecarin, a novel topoisomerase I inhibitor, administered once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 58, (2), (2006), 173-82.
- T. Yoshinari, A. Yamada, D. Uemura, K. Nomura, H. Arakawa, K. Kojiri, E. Yoshida, H. Suda, A. Okura. *Cancer Res.*, 53, (1993), 490-494.
  - S. Zanatta. Sintesi di nuovi inibitori della topoisomerasi II e della proteina chinasi CK2 con potenziale attività antitumorale. Ph. D. Tesi, (31.01.2008), Università degli Studi di Padova.
  - B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. K. Barton. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chem. Commun.* (2007), 4565-4579.
  - Y. Zhang, T. Wade, H. Sasabe. Carbazole photorefractive materials. *J-Mater. Chem.*, 8, (1998), 809-828.

## SITOGRAFIA

- <http://www.aimac.it>.
- <http://www.airc.it>.
- <http://www.alcase.it>.
- <http://www.effective.it/Novuspharma.htm>.
- <http://www.emory.edu>.
- <http://www.fatigue.it/bgdisplay.jhtml>.
- [http://www.iss.it/Rapporti \(ISTISAN 02/16\)](http://www.iss.it/Rapporti%20(ISTISAN%2002/16)).
- [http://www.istitutotumori.mi.it/INT/informazioniINT/pdf/INT\\_informazioni\\_2003\\_3.pdf](http://www.istitutotumori.mi.it/INT/informazioniINT/pdf/INT_informazioni_2003_3.pdf).
- <http://www.med.unifi.it/didonline/corsi.htm>.
- [http://www.mednat.org/Nacci%libro.pdf](http://www.mednat.org/Nacci%20libro.pdf).
- <http://www.nervianoms.com>.
- <http://www.oncologiaitalia.it/chemio.html>.
- <http://www.oncoprof.net>.
- [http://www.seminari di ematologia oncologica\\_3\\_2009\\_low.pdf](http://www.seminari%20di%20ematologia%20oncologica_3_2009_low.pdf).
- <http://www.startoncology.net>.
- <http://it.wikipedia.org/wiki/Chemioterapia>.
- [http://it.wikipedia.org/wiki/Fuso\\_mitotico](http://it.wikipedia.org/wiki/Fuso_mitotico).