



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea Magistrale  
In Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

*Sintesi e attività antiproliferativa di complessi indenilici di  
palladio con leganti spettatori biscarbenici-N-eterociclici*

**Relatore**

Ch. Prof. Fabiano Visentin

**Correlatore**

Dottoranda Enrica Bortolamiol

**Laureando**

Rachele

Piccolo

859928

**Anno Accademico**

2021 / 2022

# SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>2</b>
<b>IL CANCRO</b> .....	<b>2</b>
<b>TUMORE DELLE OVAIE</b> .....	<b>4</b>
<b>TRATTAMENTI TERAPEUTICI</b> .....	<b>7</b>
<b>FASI DI SVILUPPO DI UNA NUOVA TERAPIA FARMACOLOGICA</b> .....	<b>9</b>
<b>TEST IN VITRO</b> .....	<b>11</b>
<b>CISPLATINO E I SUOI DERIVATI</b> .....	<b>14</b>
<b>IL PALLADIO E SUOI COMPOSTI ORGANOMETALLICI: STATO DELL'ARTE</b> .....	<b>18</b>
<b>CARBENI <i>N</i>-ETEROCICLICI</b> .....	<b>22</b>
<b>LEGANTE INDENILICO</b> .....	<b>27</b>
<b>SCOPO</b> .....	<b>30</b>
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>31</b>
<b>SINTESI SALI DI IMIDAZOLIO</b> .....	<b>31</b>
<b>SINTESI DEI COMPLESSI CARBENICI DI ARGENTO</b> .....	<b>33</b>
<b>SINTESI DEL PRECURSORE: [Pd(NSPM)(IND)]A</b> .....	<b>35</b>
<b>SINTESI DEI COMPLESSI DI Pd(II) CON DUE LEGANTI CARBENICI MONODENTATI</b> .....	<b>40</b>
<b>SINTESI DEI COMPLESSI DI Pd(II) CON LEGANTI MONOCARBENICI DOTATI DI UNA SECONDA FUNZIONE COORDINANTE</b> .....	<b>46</b>
<b>SINTESI DEI COMPLESSI DI Pd(II) CON LEGANTI BISCARBENICI CHELANTI</b> .....	<b>52</b>
<b>APTICITÀ</b> .....	<b>58</b>
<b>TEST IN VITRO</b> .....	<b>61</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE</b> .....	<b>75</b>
<b>SOLVENTI E REAGENTI UTILIZZATI</b> .....	<b>75</b>
<b>SINTESI PRECURSORI</b> .....	<b>76</b>
<b>SINTESI COMPLESSI DI Pd(II) CON LEGANTI CARBENICI <i>N</i>-ETEROCICLICI</b> .....	<b>82</b>
<b>SINTESI COMPLESSI MONOCARBENICI CHELANTI</b> .....	<b>90</b>
<b>SINTESI COMPLESSI BISCARBENICI CHELANTI MEDIANTE IL PROTOCOLLO SINTETICO DELLA BASE DEBOLE</b> .....	<b>96</b>
<b>TEST IN VITRO</b> .....	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>107</b>

# Introduzione

## Il cancro

Con il termine cancro si intende una crescita incontrollata di cellule che durante il meccanismo di replicazione subiscono delle mutazioni dovute al fatto che il normale meccanismo di controllo messo in atto dall'organismo smette di funzionare. Questo proliferare di cellule anomale porta alla formazione di una massa di tessuto che viene appunto denominata tumore.

La prima testimonianza riportata su questa malattia risale all'incirca al 3000 a.C. in Egitto. È stato trovato infatti un reperto nel quale vengono descritti alcuni casi di tumori e alcuni approcci chirurgici che venivano utilizzati all'epoca. La parola "cancro" è stata invece utilizzata per la prima volta da Ippocrate (460-370 a. C.), filosofo greco considerato il padre della medicina, che la coniò da *karcinos* ("granchio" in greco), per le somiglianze che vi sono tra la massa cellulare tumorale, costituita generalmente da un corpo centrale da cui partono delle diramazioni, e il crostaceo in questione. Successivamente, Celso (28-50 a.C.), medico romano, tradusse il termine greco con *cancro*, parola latina utilizzata sempre per identificare il granchio. Fu invece Galeno (130-200 d.C.), un altro medico romano, che usò per la prima volta il termine *oncos* (gonfiore in greco) per descrivere i tumori e così molti anni dopo il termine oncologia verrà utilizzato per identificare quella branca della medicina che si occupa appunto dello studio dei tumori<sup>1</sup>.

Il cancro non è una malattia unica, ma piuttosto un insieme di diverse patologie, ciascuna delle quali può avere cause e sviluppi differenti a seconda soprattutto dell'organo bersaglio e del tipo di processi di replicazione; questa diversità implica ovviamente differenti approcci diagnostici e diverse soluzioni terapeutiche. Tuttavia, queste differenti manifestazioni patologiche presentano alcune caratteristiche comuni, in primis una crescita incontrollata di cellule. Questa moltiplicazione fuori controllo è dovuta ad alcune mutazioni che si possono verificare a livello del DNA cellulare. La cancerogenesi, ossia la trasformazione di una cellula sana in una cellula tumorale, è un processo lungo e complesso che richiede l'accumulo di più mutazioni del DNA. Queste mutazioni possono essere potenzialmente presenti fin dalla nascita ed essere quindi di tipo ereditario, o presentarsi in seguito a infezioni virali o all'esposizione a certe sostanze chimiche o radiazioni pericolose. Le conseguenze di queste mutazioni possono essere svariate; una prima possibilità è rappresentata da un azzeramento o comunque da un indebolimento dell'azione dei geni oncosoppressori i quali, non essendo più in grado di bloccare la proliferazione incontrollata delle cellule malate, portano alla formazione di una massa tumorale. Un'altra conseguenza è rappresentata dalla disattivazione di quei sistemi cellulari

atti ad identificare e riparare eventuali errori presenti all'interno del DNA stesso. Una mutazione dei geni che presiedono a questa funzione può comportare che alcuni errori non vengano più rilevati, permettendo l'accumulo di differenti mutazioni ed, in ultimo, la comparsa della patologia neoplastica.

Riassumendo i geni che possono essere danneggiati portando così allo sviluppo di tumori sono i seguenti:

- **Proto-oncogeni**, che promuovono la crescita cellulare: essi codificano i fattori di trascrizione per la sintesi delle proteine che regolano la crescita, la sopravvivenza cellulare e le interazioni tra cellule e cellula-matrice.
- **Geni oncosoppressori** che normalmente impediscono la crescita incontrollata e, quando mutati o persi da una cellula, permettono al fenotipo trasformato di svilupparsi.
- **Geni che regolano l'apoptosi**, ovvero geni che portano alla morte cellulare.
- **Geni coinvolti nella riparazione del DNA**, ovvero i geni che qualora fossero rilevati dei danni sono pronti a entrare in azione innescando il processo per ripararli ed evitare che altre cellule si moltiplichino ampliando il danno.

Nello schema di seguito viene riassunto in modo sintetico lo sviluppo di una neoplasia maligna ovvero di un tumore.

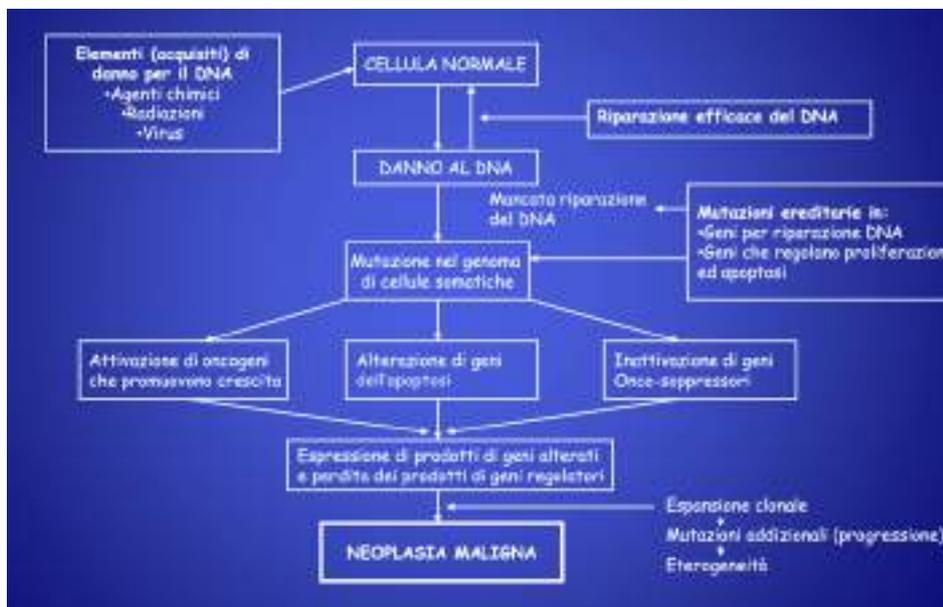


Figura 1. Stadi dello sviluppo di una neoplasia maligna

## Carcinoma e adenocarcinoma

Con il termine carcinoma si intende un tumore maligno originatosi dalle cellule del tessuto epiteliale di un organo; sulla base dell'organo bersaglio si può parlare di carcinoma polmonare, carcinoma della prostata, carcinoma dell'ovaio o dell'utero e così via. Adenocarcinoma invece designa una degenerazione che si sviluppa da cellule che compongono uno specifico tessuto epiteliale dell'organo interessato. Tra questi tessuti vanno annoverati:

- **Epitelio di rivestimento:** il quale ha il compito di rivestire la superficie esterna e le cavità interne e insieme al derma (strato di tessuto connettivo) forma lo strato di protezione esterno chiamato cute. Epiteli di rivestimento sono anche quelli che rivestono le mucose o che ricoprono i vasi sanguigni e i dotti escretori delle ghiandole.
- **Epitelio ghiandolare:** esso riveste interamente le strutture atte alla produzione e secrezione di sostanze utili all'organismo, ovvero ghiandole esocrine (se il secreto fuoriesce sulla superficie esterna del corpo o in una cavità interna collegata con l'esterno attraverso un dotto escretore) o endocrine se riversano il loro secreto nel circolo sanguigno.
- **Epitelio sensoriale** il quale è costituito da cellule disperse negli epiteli di rivestimento, che hanno la funzione di ricevere e trasmettere determinati stimoli esterni alle cellule del tessuto nervoso. Un esempio classico è quello delle papille gustative.
- **Epitelio particolarmente differenziato:** comprende formazioni di tessuto che hanno subito modificazioni particolari finalizzate a funzioni altamente specifiche (ad esempio i denti).

In medicina al termine carcinoma segue talvolta l'aggettivazione "*High Grade Serous*" che si riferisce al tipo di cellule che compongono il tumore stesso che, osservate al microscopio, appaiono altamente anomale rispetto a quelle dei tessuti sani<sup>2, 3</sup>. Tra queste neoplasie particolarmente pericoloso è il carcinoma ovarico noto con l'acronimo HGSO ( *high grade serous ovarian cancer*) dove con *high-grade* ci si riferisce ai carcinomi classificati di grado 3, quindi molto aggressivi, mentre il termine *serous* indica l'allocalazione del tumore sulla membrana sierosa<sup>4</sup>. Tali carcinomi risultano essere difficili da trattare e pertanto con un alto tasso di letalità.

## Tumore delle ovaie

Il cancro ovarico si origina da cellule delle ovaie o delle tube di Falloppio e presenta la più alta mortalità tra i tumori ginecologici, essendo nella maggior parte delle pazienti diagnosticato in fase tardiva a causa della mancanza di strategie di *screening* efficaci e per l'assenza di sintomi specifici associati alla fase iniziale della malattia. Il rischio di sviluppare un carcinoma ovarico aumenta con l'età e la maggior parte dei casi si riscontrano in donne di età superiore ai 50 anni. In Europa la sopravvivenza media a 5 anni dalla diagnosi è di circa il 37% e, nonostante i miglioramenti delle tecniche chirurgiche e farmacologiche, la mortalità non si è ridotta in modo particolarmente significativo.



Figura 2. Sviluppo del carcinoma ovarico

I tumori maligni dell'ovaio sono di tre tipi: epiteliali, germinali e stromali:

- I **tumori epiteliali** si originano da cellule epiteliali le quali rivestono la superficie delle ovaie e costituiscono più del 90% delle neoplasie ovariche maligne. Un esempio è proprio l'adenocarcinoma dell'ovaio, il quale è un tumore epiteliale maligno che porta alla comparsa di una massa di ampie dimensioni, di solito monolaterale, con superficie liscia e aree cistiche e solide distribuite in maniera uniforme.
- I **tumori germinali** si originano invece da cellule germinali, dedicate alla produzione di ovuli e rappresentano il 5% delle neoplasie ovariche maligne. Nel 40-60% dei casi vengono diagnosticati in donne di età inferiore ai 20 anni.
- I **tumori stromali** si originano dallo stroma, il tessuto strutturale dell'ovaio, nel quale vengono prodotti gli ormoni femminili, e rappresentano circa l'1% di tutti i tumori ovarici. Oltre la metà di questi tumori si presenta in donne di età superiore a 50 anni.

In fase primordiale non si ravvisano sintomi particolari che siano in qualche modo riconducibili a questa neoplasia, e ciò rende particolarmente difficile diagnosticarla tempestivamente; quando essi si manifestano (dolore addominale o pelvico, stipsi, diarrea, bisogno frequente di urinare, sangue nelle

urine e stanchezza cronica) la situazione molto spesso è già ampiamente compromessa, di difficile trattamento e talvolta già in fase metastatica.

Il trattamento convenzionale per le fasi tardive dei tumori ovarici è, quando possibile, l'asportazione chirurgica della parte del tessuto contaminato e un successivo trattamento chemioterapico. Questo tipo di approccio risulta efficace in prima battuta ma a distanza di alcuni mesi si verifica spesso una recidiva (con un'incidenza che può toccare il 75% dei casi). I pazienti affetti da carcinoma ovarico il più delle volte, successivamente alla recidiva, sviluppano resistenza alla chemioterapia e come conseguenza la malattia diventa metastatica con esito mortale.

I vari studi svolti negli ultimi anni hanno mostrato che una precisa mutazione del DNA, relativa ai geni BRCA1 e BRCA2, può comportare una predisposizione del soggetto ad ammalarsi di tumore alle ovaie o al seno. Il rischio di sviluppare un tumore ovarico aumenta del 15-45 % circa nelle donne che hanno ereditato una mutazione in BRCA1 e del 10-20 % circa in quelle che hanno ereditato una mutazione di BRCA2. Proprio per tale motivo i medici raccomandano di eseguire una mappatura del genoma a tutte le donne che hanno avuto in famiglia casi di tumore alle ovaie o al seno.

Una prima diagnosi può essere fatta con una visita ginecologica ed un esame pelvico per verificare la presenza di una qualche tipologia di massa. Solitamente si esegue un'ecografia interna (addominale e/o transvaginale) per valutare forma e dimensione delle ovaie, e rilevare eventuali anomalie. Può essere eseguita anche una radiografia tridimensionale, in particolare la tomografia computerizzata (TC), la quale consente un'analisi più accurata dell'apparato e permette anche di pianificare con più facilità un ipotetico intervento chirurgico. Anche la risonanza magnetica (RM) può essere un valido strumento per valutare eventuali malformazioni o anomalie a livello ovarico. A questi esami strumentali viene spesso associato anche uno studio del marcatore CA-125. Il CA-125 è un marcatore serico che presenta valori elevati in circa il 90% dei tumori ovarici ed è correlato al volume della massa tumorale e alla sua stadiazione. Tuttavia tale test presenta delle limitazioni in quanto risulta positivo solo nel 50-60% delle forme precoci del tumore; inoltre può segnalare alti valori del marcatore in altre condizioni patologiche non tumorali specialmente nelle donne in pre-menopausa o affette da endometriosi. Negli ultimi anni è stato sviluppato un nuovo marcatore, l'HE4 (*Human epididymal protein 4*), che è una glicoproteina avente un'espressione molto bassa nell'epitelio dei tessuti respiratori e riproduttivi, comprese le ovaie, ma viene sovraespressa nei casi di carcinoma ovarico. I tumori ovarici normali presentano livelli minimi di espressione genica e produzione di HE4. Un'analisi ancora più accurata la si ha quando si combinano i risultati dei due marcatori, seguendo le indicazioni del ROMA (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) un algoritmo messo a punto per ottenere dei dati molto più sensibili e specifici<sup>5</sup>.

Dopo aver eseguito la diagnosi e raccolti tutti i dati necessari si procede con la determinazione dello stadio della malattia e sulla base di esso è possibile approntare un piano terapeutico adatto per la cura della specifica neoplasia. Per la stadiazione dei tumori ovarici la FIGO, Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia<sup>6</sup>, ha definito 4 stadi della malattia, le cui caratteristiche vengono riassunte in Tabella 1.

<b>STADIAZIONE DEI TUMORI OVARICI SECONDO LA FIGO</b>	
<b>Primo Stadio</b>	
Tumore limitato alle ovaie o alle tube di Falloppio	
<i>Stadio IA</i>	Tumore limitato a un'ovaia e non vi è la presenza di asciti.
<i>Stadio IB</i>	Tumore limitato a entrambe le ovaie e non vi è la presenza di asciti.
<i>Stadio IC</i>	Stadio IA o IB con presenza di asciti.
<b>Secondo stadio</b>	
Il tumore ha intaccato una o entrambe le ovaie e le tube di Falloppio con coinvolgimento di altri tessuti.	
<i>Stadio IIA</i>	Estensione della malattia fino all'utero o alle tube di Falloppio senza però lo sviluppo di ascite.
<i>Stadio IIB</i>	Estensione della malattia in altri tessuti pelvici senza la presenza di asciti.
<i>Stadio IIC</i>	Stadio IIA o IIB con presenza di asciti.
<b>Terzo Stadio</b>	
Il tumore ha invaso una o entrambe le ovaie con metastasi peritoneali esterne al tessuto pelvico o linfadenopatica retroperitoneale	
<i>Stadio IIIA</i>	Tumore limitato alle pareti pelviche con dimensioni inferiori ai 2 cm.
<i>Stadio IIIB</i>	Metastasi peritoneale al di fuori del bacino o linfadenopatica retroperitoneale con dimensioni superiori ai 2 cm.
<i>Stadio IIIC</i>	Masse addominali maggiori di 2 cm e/o presenza di metastasi linfadenopatica retroperitoneale.
<b>Quarto Stadio</b>	
Presenza di metastasi esterne all'utero, compreso il parenchima epatico.	

Tabella 1. Stadiazione dei tumori ovarici secondo la FIGO, Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia<sup>6</sup>

## Trattamenti terapeutici

La corretta strategia di trattamento del tumore ovarico dipende dallo stadio al quale si trova e dal particolare tessuto che ha dato origine alla patologia. Oltre a ciò è importante conoscere lo stile di

vita ed eventuali altre patologie del paziente per poter sviluppare un piano terapeutico personalizzato. Di seguito vengono descritti alcuni dei trattamenti più comuni che possono essere eseguiti singolarmente o in combinazione.

### ***Approccio chirurgico***

La chirurgia rappresenta la principale opzione di trattamento per il cancro dell'ovaio in stadio precoce e dunque tale approccio è possibile solo se si riesce ad identificare la malattia ancora prima che siano insorti i primi sintomi. Genericamente viene esportata la parte intaccata, come un'ovaia o entrambe, le tube di Falloppio, eventuali linfonodi o in casi estesi l'intero utero; successivamente dalla massa estratta si esegue una biopsia in modo da valutare il livello di stadiazione effettivo e l'origine della malformazione. Per donne giovani in età riproduttiva e affette da malattia allo stadio iniziale, è possibile eseguire un intervento conservativo, preservando almeno un ovaio con la sua tuba e l'utero; ovviamente tale scelta viene ponderata dal medico valutando opportunamente il rapporto rischi/benefici. L'asportazione dell'intero utero o di entrambe le ovaie è un'opzione che si rende talora necessaria per evitare che alcune cellule maligne rimangano nell'apparato e possano portare a una nuova insorgenza della malattia, spesso in modo molto più aggressivo rispetto al caso iniziale. Proprio per tale motivo, dopo il trattamento chirurgico vengono eseguiti cicli di radio/chemioterapia.

### ***Radioterapia***

La radioterapia è una terapia localizzata e, diversamente da quella chirurgica, non invasiva. Viene eseguita principalmente in ambulatorio utilizzando radiazioni ad alta energia generalmente ionizzanti. Il più delle volte tale trattamento precede o segue l'intervento chirurgico o/e chemioterapico e permette o di ridurre preventivamente la massa tumorale o di eliminare eventuali cellule tumorali ancora presenti nell'organismo. Generalmente vengono utilizzati degli acceleratori lineari, linac, i quali generano raggi X, usati anche per scopi diagnostici. Le radiazioni, che vengono indirizzate con precisione dove è presente la massa tumorale, danneggiano i meccanismi di replicazione cellulare e portano così la morte delle cellule malate. Solitamente tale approccio terapeutico prevede numerosi cicli, (di solito un trattamento al giorno per un mese); la soppressione delle cellule tumorali avviene progressivamente ottenendo così la diminuzione della massa neoplastica fino alla sua scomparsa. Sebbene la radioterapia stia diventando negli anni sempre più precisa, può capitare che oltre alle cellule cancerose, siano intaccati anche alcuni tessuti limitrofi. Tuttavia le cellule non tumorali hanno una capacità di rigenerazione molto più efficiente rispetto a quelle tumorali, dunque gli effetti collaterali che si verificano con questo trattamento sono solitamente contenuti.

## ***Chemioterapia***

Tale trattamento consiste nella somministrazione endovenosa di farmaci antitumorali in grado di aggredire le cellule tumorali. Le sostanze chemioterapiche impediscono la proliferazione delle cellule mutate interferendo nei meccanismi legati alla riproduzione cellulare, provocandone così l'apoptosi. Il bersaglio di tali farmaci sono principalmente le cellule tumorali, proprio per la loro veloce proliferazione, ma purtroppo nella maggior parte dei casi si verifica un danno anche su cellule sane, soprattutto quelle caratterizzate da una rapida crescita, come per esempio i globuli rossi, bulbi peliferi o le cellule di rivestimento dell'apparato digerente. È questa la causa dei numerosi effetti collaterali del trattamento chemioterapico, come appunto la caduta dei capelli, l'abbassamento, spesso critico, dei globuli bianchi, l'anemia, vomito, diarrea ecc.

Spesso il trattamento chemioterapico viene eseguito dopo quello chirurgico, in modo da eliminare eventuali cellule tumorali rimaste nell'organismo. La chirurgia citoreducente seguita da una combinazione platino-taxano è stato il trattamento più comune per i tumori dell'ovaio per più di 15 anni<sup>7</sup>. Dopo qualche anno dalla guarigione però, il 25% delle persone presentava una ricomparsa della malattia, questa volta resistente ai trattamenti chemioterapici; proprio per tale motivo, e per la scarsa selettività dei farmaci attualmente utilizzati, numerose sperimentazioni sono in corso per la ricerca di nuovi chemioterapici più efficaci di quelli attualmente in uso ma che consentano al contempo di ridurre gli indesiderati effetti collaterali.

## ***Terapia a bersaglio molecolare***

Molti pazienti trattati con farmaci chemioterapici, dopo qualche mese dalla guarigione mostrano la ricomparsa della patologia che però si è evoluta diventando resistente ad ulteriori trattamenti. Ecco che quindi negli ultimi anni ha preso piede la terapia "a bersaglio molecolare"; con essa si cerca infatti di attaccare in modo specifico un bersaglio presente solo nelle cellule tumorali, solitamente un preciso recettore che in esse è maggiormente espresso. Anche in questo caso lo scopo è intaccare uno degli stadi di proliferazione cellulare per indurre la cellula tumorale all'apoptosi. Questo approccio necessita però di numerosi studi preliminari ed è essenziale conoscere il tipo di tumore che si sta andando a trattare, per studiare il target specifico da colpire.

## **Fasi di sviluppo di una nuova terapia farmacologica**

Come spiegato in precedenza, vista la frequente recidiva di molti pazienti trattati con chemioterapia a base di farmaci tradizionali, negli ultimi anni si sta cercando di ampliare sempre di più il panorama dei farmaci antitumorali. Una delle strade battute, come verrà spiegato successivamente, è quella di preparare e testare nuovi composti a base metallica (*metal-drugs*) sperando di ottenere un successo pari a quello del cisplatino e dei suoi derivati.

L'utilizzo di composti di questo tipo richiede tuttavia uno studio chimico molto dettagliato, che permetta di conoscerne esattamente le proprietà ed il comportamento in ambiente fisiologico. In particolare vanno definiti il livello di assorbimento e di accumulo nei tessuti del *metal-drug*, la sua farmacocinetica, il suo destino metabolico nel sangue e nelle cellule, i meccanismi di azione, ecc. Dunque prima che un certo farmaco venga approvato deve affrontare un processo molto lungo e costoso che si può dividere in due fasi principali, pre-clinica e clinica. Quest'ultima è più complessa ed è composta da 4 sottofasi:



Figura 3. Come nasce un farmaco

**Fase pre-clinica:** in questo primo stadio si va a valutare la citotossicità che può avere un ipotetico nuovo farmaco attraverso degli studi preliminari *in vitro*. In particolare si va a verificare l'efficacia e la sicurezza della molecola in esame testandola su sistemi campione; in prima battuta si cerca di definire il dosaggio corretto del farmaco, mediante la valutazione dell' $IC_{50}$  *in vitro* (concentrazione minima della sostanza che induce la morte del 50% delle cellule trattate) quindi testando delle colture cellulari. Successivamente test analoghi vengono condotti su cavie animali, topi per esempio, per verificare se l'efficacia del composto *in vitro* venga mantenuta anche *in vivo*, senza compromettere la salute dell'organismo. Dunque questa fase pre-clinica viene eseguita esclusivamente in laboratorio e su sistemi campione e solo con i dati desumibili da essa è possibile proseguire con la fase clinica ed eseguire i primi test sull'uomo.

**Fase clinica:** in questa seconda parte il potenziale farmaco inizia ad essere testato *in vivo* sull'uomo. La normativa italiana divide la fase clinica in ulteriori 4 fasi:

- **Studi di fase 1:** la prima valutazione viene fatta sulla sicurezza che caratterizza la molecola in esame, quindi nuovamente si verifica il dosaggio corretto in rapporto alla sua tossicità. Essendo sempre una fase preliminare i pazienti ammessi alla sperimentazione sono di solito 10-15 i quali vengono selezionati secondo criteri di legge molto rigorosi.
- **Studi di fase 2:** in questo secondo stadio si valuta l'attività del farmaco, quindi la sua capacità di contrastare la malattia, (per esempio si determina se e di quanto riduce le dimensioni della massa tumorale). I soggetti che partecipano a questa fase di sperimentazione sono tra i 10 e i 1000.
- **Studi di fase 3:** a questo punto viene valutata l'efficacia del trattamento, quindi si osservano gli effettivi benefici che può portare l'ipotetico nuovo farmaco, tra i principali ci saranno sicuramente la sopravvivenza e la qualità di vita che garantiscono.
- **Studi di fase 4:** una volta superate le fasi precedenti si entra negli studi post-registrativi, principalmente richiesti dagli enti regolatori dei farmaci, i quali si concentrano sull'ampliare la conoscenza del farmaco in analisi, in particolare vengono fatti ulteriori studi sulla sua efficacia e sicurezza. In media la fase 4 coinvolge più di 1000 pazienti ed ha una durata di 2-3 anni.
- **Farmacovigilanza:** il farmaco dopo aver superato tutte le fasi cliniche dev'essere costantemente controllato, in particolare deve essere monitorato il rapporto rischi/benefici che lo caratterizza. Quindi una volta entrato in commercio ogni farmaco viene costantemente mantenuto sotto controllo per confermarne l'efficacia.

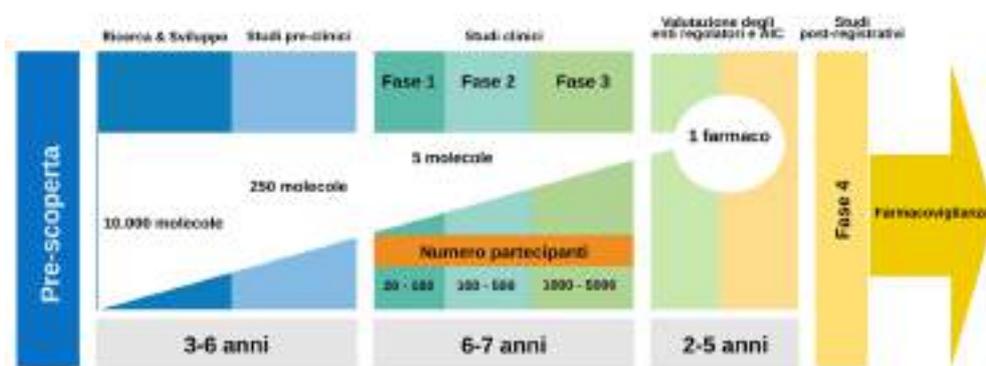


Figura 4. Sequenza temporale per l'approvazione di un farmaco

## Test in vitro

Generalmente le prime sperimentazioni per valutare la citotossicità di una nuova molecola vengono eseguite su linee cellulari originate dal tumore stesso. Le colture cellulari sono gruppi di cellule eucariotiche in grado di crescere e proliferare *in vitro*, simulando all'incirca lo stesso comportamento

che avevano nell'ambiente di origine. Tali cellule, una volta ottenuta la linea di coltura primaria in seguito a un processo di immortalizzazione, sono in grado di replicarsi per un numero illimitato di passaggi; ciò le rende un ottimo strumento per valutare efficacia, sicurezza e attività di un ipotetico nuovo farmaco antitumorale. Le cellule immortalizzate sono generalmente derivate da tessuti tumorali e sono manipolate geneticamente per proliferare indefinitamente e possono quindi essere coltivate per lunghi periodi di tempo.

Tutte le diverse linee cellulari possono essere classificate sulla base del loro comportamento e su quanto questo sia simile a quello del tumore da cui sono state originate. In particolare è stata fatta una specifica classificazione per quanto riguarda le cellule di tumore ovarico, che saranno utilizzate anche in questo lavoro di tesi. Uno studio del 2013<sup>4</sup> sull'*high grade serous ovarian cancer* (HGSOC) cerca di identificare le linee cellulari di cancro ovarico più adatte ad essere utilizzate come modelli *in vitro*, stilando una sorta di classifica riassunta in Figura 5. In particolare sono riportate, nella parte bassa della tabella, le linee cellulari che mimano peggio il comportamento reale di un tumore ovarico caratterizzato da *high grade serous*, (queste saranno solitamente utilizzate per fare dei test preliminari), mentre nella parte alta troviamo linee cellulari derivanti dalle cellule di tumori più aggressivi, il cui il sistema proliferante risulta generalmente più complesso e quindi in grado di simulare meglio il comportamento all'interno dell'organismo. Questi ultimi sistemi, sono più difficili da controllare e presentano pertanto un livello di riproducibilità dei dati minore.

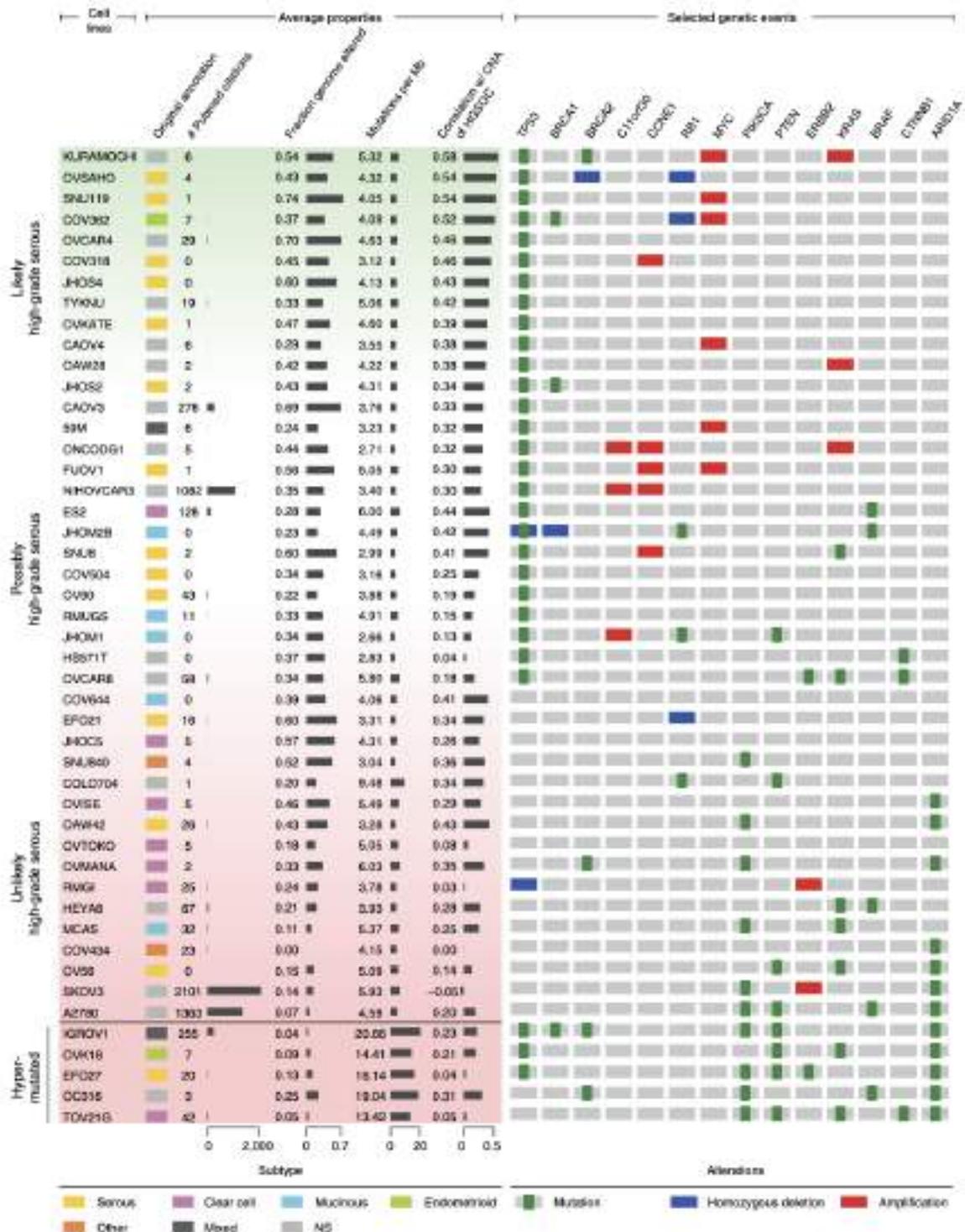


Figura 5. Classificazione delle diverse linee cellulari sulla base dell'high-grade serous ovarian cancer<sup>4</sup>

Volendo rendere ulteriormente realistico il sistema e conferire un maggior valore ai test *in vitro*, oltre alle linee cellulari è possibile testare il potenziale farmaco anche su sistemi tridimensionali più complessi, chiamati tumoroidi. Questi aggregati cellulari sono caratterizzati da un elevato grado di staminalità che consente di mimare più verosimilmente il tumore vero e proprio. Gli organoidi tumorali

vengono preparati prelevando una porzione della massa tumorale, solitamente di ascite, e vengono poi fatti opportunamente proliferare in un ambiente controllato. Come per le linee cellulari è possibile farli proliferare più e più volte, ma in questo modo si va a perdere il vantaggio che portano tali aggregati cellulari. In particolare, meno passaggi di proliferazione vengono eseguiti, più il microambiente tumorale rimane inalterato e quindi la risposta che daranno i tumoroidi a seguito del trattamento col farmaco in esame sarà più simile a quella della massa tumorale originale. Un ulteriore vantaggio deriva anche dal fatto che tali aggregati cellulari non vengono immortalizzati, a differenza delle linee cellulari tradizionali, quindi anche questo permetterà di avere un responso più aderente a quello che si avrebbe su un sistema reale.

Ovviamente la controindicazione è rappresentata dal fatto che i tumoroidi sono molto costosi da realizzare e molto difficili da trattare ed il grado di variabilità dei dati di citotossicità ad essi riferibili è abbastanza marcato.

## Cisplatino e i suoi derivati

Salvarsan, un composto di organoarsenico(III), fu uno dei primi derivati a base metallica che dimostrò di avere delle interessanti proprietà terapeutiche; preparato da Paul Ehrlich nel 1912 venne utilizzato per la cura della sifilide ed è stato considerato l'approccio standard per la cura di questa patologia fino a quando, dopo la seconda guerra mondiale, è stato sostituito dalla penicillina. Il suo avvento ha storicamente sancito la nascita della chemioterapia moderna e l'inizio dello sviluppo dei *metallo-drugs*. L'applicazione di complessi metallici per il trattamento delle malattie oncologiche, ha invece il suo capostipite nel cisplatino che è stato somministrato per la prima volta a un paziente oncologico nel 1971 e approvato per l'uso clinico nel 1978<sup>8</sup>.

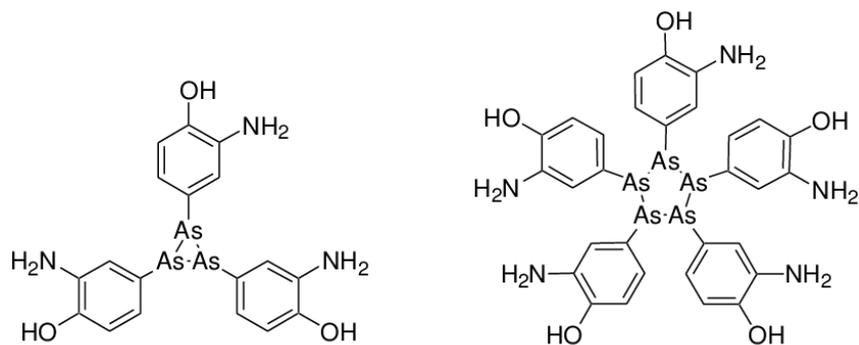


Figura 6. Struttura chimica del Salvarsan, prima miscela chemioterapica.

Il cisplatino, la cui denominazione convenzionale è *cis*-diamminodichloroplatino(II), è un composto di coordinazione di color giallo paglierino avente geometria planare quadrata; esso fu sintetizzato per

la prima volta da Michele Peyrone nel 1844, mentre la sua struttura chimica venne risolta per la prima

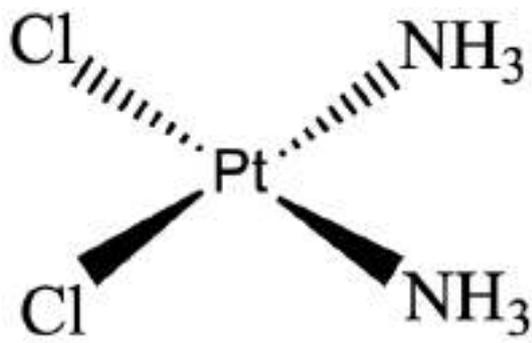


Figura 7. Formula di struttura del *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]

volta da Alfred Werner nel 1893<sup>9</sup>. Solo agli inizi del 1960 si iniziò a studiare in dettaglio il suo comportamento in ambiente biologico, allorché Rosenberg scoprì che alcuni prodotti di elettrolisi condotta con elettrodi a base di platino, immersi in una soluzione di ammoniaca, erano in grado di inibire la divisione cellulare in una coltura di *Escherichia coli*; da qui nacque l'idea di utilizzare il cisplatino come possibile farmaco antitumorale. Il cisplatino è stato il primo composto a base di platino

approvato dalla FDA per il trattamento del cancro nel 1978 (Kelland, 2007). Attualmente viene utilizzato per il trattamento di molte patologie tumorali, tra cui cancro alla vescica, testa e collo, cancro ai polmoni, alle ovaie e ai testicoli. Il suo meccanismo d'azione è legato alla possibilità di ancorarsi alle basi puriniche del DNA, causandone quindi delle deformazioni che successivamente spingono le cellule tumorali ad avviare un processo di apoptosi, ovvero di morte cellulare programmata.

Solitamente questo farmaco viene somministrato per via endovenosa e veicolato dal sangue. Qui, dove la concentrazione di cloruri è piuttosto elevata, il cisplatino rimane inalterato e può pertanto arrivare integro al bersaglio terapeutico. Il complesso penetra quindi nelle cellule (sia tumorali che sane) tal quale generalmente attraverso un processo conosciuto come diffusione passiva. All'interno delle cellule, la concentrazione dei cloruri è molto inferiore ed è pertanto facilitato il processo di idrolisi con il rilascio di uno o entrambi i clori coordinati al centro metallico. In questo modo si vengono a creare delle acquo-specie le quali sono molto più reattive rispetto alla specie neutra originaria, e possono legarsi più facilmente alle basi puriniche del DNA.

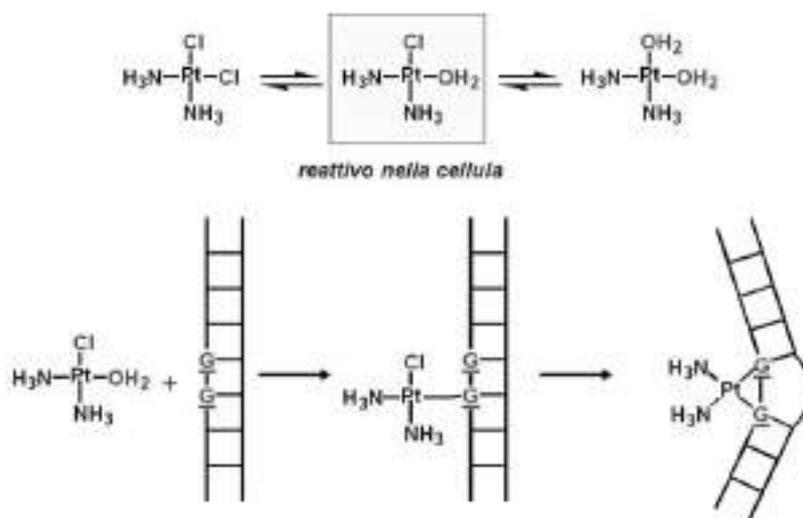


Figura 8. Meccanismo d'azione del cisplatino

Uno dei problemi del cisplatino è rappresentato dai fenomeni di resistenza indotta, ovvero l'adattamento delle cellule tumorali che riescono ad elaborare delle strategie di difesa che neutralizzano gli effetti del farmaco. Inoltre il cisplatino presenta anche effetti collaterali piuttosto significativi come la neuro e la nefrotossicità e, proprio per tale motivo, nel corso degli anni i ricercatori hanno iniziato a cercare nuove soluzioni, modificando inizialmente in maniera minimale il composto pioniere. Un primo importante risultato di questo approccio è stata l'introduzione ed approvazione a livello mondiale del carboplatino e dell'ossaliplatino, definiti chemioterapici di seconda e terza generazione<sup>8</sup>.

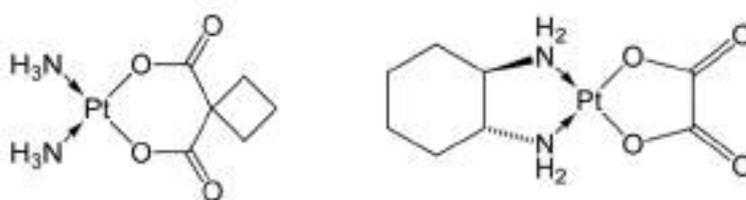


Figura 9. Struttura del carboplatino e dell'ossaliplatino

I più grandi benefici del carboplatino sono relativi agli effetti collaterali, infatti, diversamente dal cisplatino, non causa danni a livello renale.

Lo standard clinico di dosaggio del carboplatino è di solito un rapporto di 4:1 rispetto al cisplatino, quindi è necessario quadruplicare la dose del farmaco per raggiungere la stessa efficacia. Fortunatamente il carboplatino rimane nell'organismo per un breve periodo, venendo velocemente espulso in misura del 90% con le urine.

Mantenendo inalterata la struttura del farmaco si può lavorare cercando di migliorare il *drug delivery*, inteso come il rilascio controllato del farmaco, pertanto recentemente sono state messe a punto e commercializzate nuove formulazioni liposomiali del cisplatino<sup>10</sup>, note come lipolatin<sup>11</sup> e nanoplatin<sup>12</sup>.

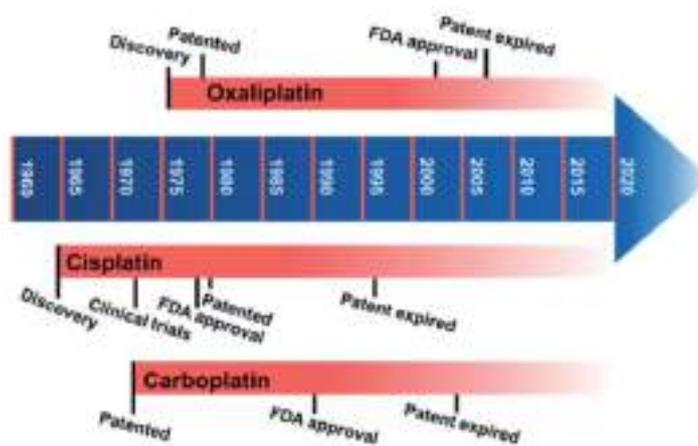


Figura 10. Sviluppo storico dei principali farmaci chemioterapici a base di platino

La ricerca tuttavia è indirizzata non soltanto sulla tipologia di leganti da ancorare al centro metallico di Pt(II), ma anche su derivati contenenti metalli diversi.

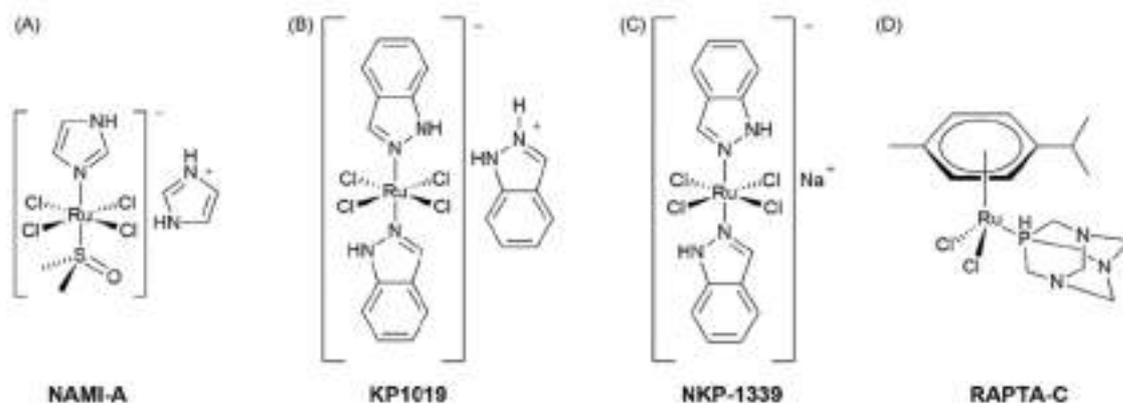


Figura 11. Alcuni composti di Rutenio che sono entrati in fase clinica

Nel corso degli anni sono stati studiati complessi di oro, arsenico, rutenio e alcuni di questi, dopo aver dato responsi incoraggianti negli studi *in vitro*, hanno superato anche la fase clinica (Figura 11). La tabella seguente, riassume alcuni di questi farmaci e la loro posizione nei *trial* clinici aggiornati all'anno 2020<sup>8</sup>.

Generalmente i composti a base metallica vengono compresi in due distinte categorie in relazione alla possibilità che possano subire o meno delle modificazioni in ambiente biologico. Si parla a questo proposito, di composti funzionali o strutturali; i primi si modificano prima di arrivare al target, i secondi invece esprimono la loro attività antiproliferativa senza alterare la loro struttura in ambiente biologico<sup>13</sup>.

Drug name	Industry/sponsor	Use	Stage
Cisplatin (Pt)	Pfizer	Sarcoma, small cell lung cancer, ovarian cancer, lymphoma, etc.	Approved
Carboplatin (Pt)	Teva	Ovarian cancer, cervical cancer, etc.	Approved
Oxaliplatin (Pt)	Sanofi Aventis	Colon cancer	Approved
Procarbazine (Pt)	Parand Pharmaceuticals	Small cell lung cancer, etc.	Phase III
Saraplatin (Pt)	Agenix	Harcore refractory prostate cancer	Phase III completed
Nedaplatin (Pt)	Shionogi & Co., Ltd. Pharmaceutical Co., Ltd	Non-small cell lung cancer, small cell lung cancer, etc.	Approved in Japan
Lobaplatin (Pt)	Chang'an International Pharmaceutical	Hepatocellular carcinoma	Approved in China
Lipoplatin (Pt)	Center Hospitalier Universitaire Vaudois	Pleural effusion, malignant	Under phase I
Irinotecan (Pt)	EDORTC	Osteogenic sarcoma	Phase II completed
Ormaplatin (Pt)	Fox Chase Cancer Center	Disiplatin-resistant tumor	Phase I completed
BBR3464 (Pt)	Theradex	Lung cancer	Under phase II
NAMI-A (Ru)	Sigee	Anti-metastatic agent	Phase I completed
NKP-1330 (Ru)	MINPHARMA	Various cancers	Phase I completed
KP1019 (Ru)	Deutsches Krebsforschungszentrum	Colon carcinoma	Phase I
ATD (As)	Cephalon	Acute promyeloid leukemia	Approved
Reitgar (As)	South China Children's Leukemia Group	Childhood acute promyeloid leukemia	Under phase IV
Melarsoprol (As)	Epiocenter	Trypanosomiasis	Under phase III
Darunaparsin (Au)	Ziopharm	Multiple myeloma	Phase II completed
GSAO (Au)	Cancer Research UK	Solid tumors	Phase I
PENAO (Au)	Cytosine Pty Ltd.	Glioblastoma	Phase I completed
Gantel (Ga)	Genta Incorporated	Hypercalcemia	Approved
Gallix (Ga)	Tilan Pharmaceuticals	Various Refractory Malignancies	Phase II
KP46 (Ga)	Nikopharma and Intezyme Technologies	Renal cell carcinoma	Phase I completed
NKP2235 (Ga)	Niki pharma	Breast and prostate cancers, multiple myeloma, etc.	Phase I
Auritinofin (Au)	GlaxoSmithKline, Mayo Clinic, National Cancer Institute (NCI), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	Glioblastoma, Small Cell Lung Carcinoma, Lung Adenocarcinoma, Non-Small Cell Lung Carcinoma, Etc.	Phase I
		Amoebic Dysentery, Giardiasis, Tuberculosis	Phase II
		Amoebiasis	Completed Phase I
		Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), small Lymphocytic Lymphoma	Completed Phase II
		Leukemia, Prolymphocytic, pain rheumatoid arthritis	Approved
Sodium aurothiomalate (Au)	Mayo Clinic, Hoffmann-La Roche, Sanofi Aventis, Sanofi Canada Incorporated, Akorn	Lung Cancer	Completed Phase I
		Rheumatoid arthritis	Approved
Gold sodium thiosulfate (Au)	Smart Practice Denmark ApS, Alkermid, Hoffmann-La Roche	Contact dermatitis	Completed Phase III
		Rheumatoid arthritis	Approved

Figura 12. Farmaci chemioterapici attualmente approvati o in fase sperimentale

Sulla scorta dei risultati ottenuti fino ad ora, recentemente sono stati approfonditi anche composti organometallici di palladio il cui stato dell'arte verrà discusso nel paragrafo successivo.

## Il palladio e suoi composti organometallici: stato dell'arte

Il palladio venne scoperto per la prima volta nel 1803 da un chimico inglese, William Hyde Wollaston, durante l'analisi di campioni di minerali a base di platino originari del Sud America. È un metallo raro appartenente alla seconda serie di transizione; la sua configurazione elettronica è  $[\text{Kr}]4d^{10}$  e i principali stati di ossidazione che si possono osservare, nei suoi complessi organometallici, sono 0 e +2. I principali utilizzi si hanno in campo catalitico, in modo particolare impiegando i suoi complessi nelle reazioni di *cross-coupling* (es. catalisi di Stille, di Heck). Sempre in tale ambito, il palladio viene molto utilizzato, insieme ad altri metalli per allestire marmitte catalitiche per automobili grazie alla sua buona resistenza alla corrosione. I principali esportatori di

questo metallo sono Australia, Canada, Etiopia, Russia e Sud Africa; il processo di estrazione è molto complesso e costoso; infatti, il valore sul mercato del metallo è particolarmente elevato, circa 65 euro/g.

Il palladio fa parte del gruppo del platino quindi, sulla base delle proprietà chimiche potrebbe anch'esso fungere da potenziale centro metallico per farmaci chemioterapici. Ad oggi, non si conoscono farmaci antitumorali a base di palladio, ed il suo impiego ha trovato una limitazione nel fatto che essendo un metallo della seconda serie di transizione, i suoi complessi mostrano una minor stabilità cinetica e termodinamica rispetto agli analoghi di platino. Tale instabilità rende difficile il raggiungimento del target desiderato da parte della molecola integra. Una strategia per eludere il problema è quella di coordinare degli opportuni leganti in grado di stabilizzare il complesso di palladio, in modo da permettergli di resistere meglio in ambiente fisiologico. Inizialmente si è tentato di raggiungere lo scopo utilizzando leganti molto ingombrati e con più siti coordinativi (Figura 13). Un numero significativo di questi composti ha inoltre mostrato una promettente attività antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*<sup>14</sup> verso diversi tumori sensibili e resistenti al cisplatino mostrando di avere non solo il DNA come target primario<sup>15, 16</sup>.

Sono stati inoltre studiati diversi gruppi funzionali e tra questi le specie palladacicliche svolgono un ruolo di primo piano. Questi composti sono caratterizzati dalla presenza di leganti multidentati e di almeno un legame palladio-carbonio; questo conferisce loro una notevole stabilità sia in solventi organici comuni che in ambiente fisiologico (Figura 13).

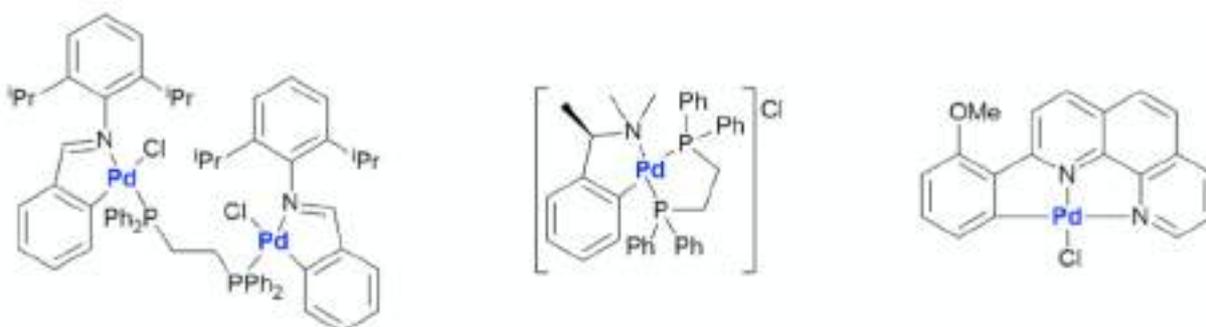


Figura 13. Esempi dei primi complessi organometallici di palladio con proprietà antimicrobiche e antiproliferative

Degni di essere menzionati sono anche quei complessi che presentano come leganti spettatori carbeni *N*-eterociclici (NHC), la cui attività antitumorale è stata esaminata per la prima volta da Ghosh e Panda nel 2007<sup>17</sup> con risultati molto promettenti.

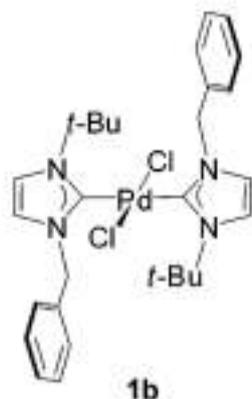


Figura 14. Struttura del complesso biscarbenico di palladio studiato da Ghosh e Panda

In particolare, il complesso in Figura 14 ha mostrato una forte attività antiproliferativa contro tre tipi di cellule tumorali umane: cancro del collo dell'utero (HeLa), cancro al seno (MCF-7), e adenocarcinoma del colon (HCT 116), in coltura. L'attività antiproliferativa di tale complesso è risultata notevolmente più forte di quella del cisplatino, essendo in grado di arrestare la progressione del ciclo cellulare inibendo così la proliferazione delle cellule tumorali.

L'approfondimento dell'attività antiproliferativa dei composti palladio-NHC è proseguito tenendo come punto fermo la presenza di almeno un legante carbenico e cambiando quella che è presumibilmente la parte attiva del complesso, ovvero il frammento organometallico. In particolare il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di tesi, si è dedicato allo studio dei composti di palladaciclopentadienile<sup>18</sup>,  $\eta^2$ -olefinici<sup>19</sup> e di palladio-allile<sup>20</sup> (Figura 15 e Figura 16).

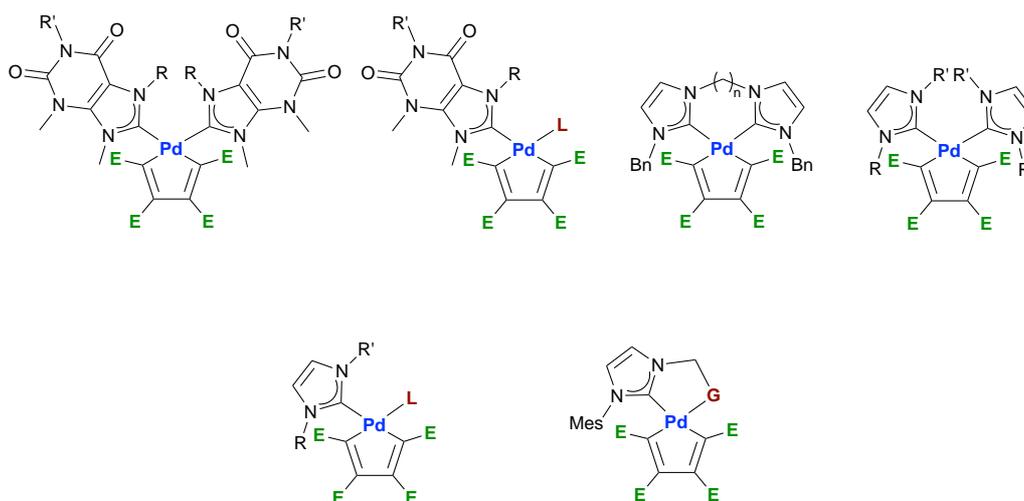


Figura 15. Esempi di complessi palladio-ciclopentadienilici testati su linee cellulari tumorali

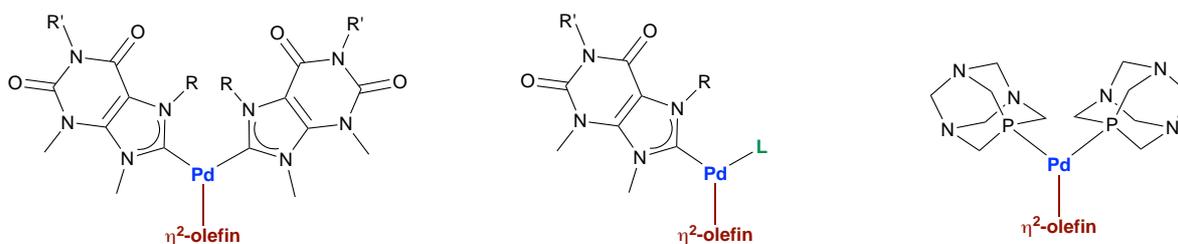


Figura 16. Esempi di complessi palladio- $\eta^2$ -olefinici testati su linee cellulari tumorali

Il frammento che ha dato i migliori risultati dal punto di vista dell'attività antiproliferativa di cellule tumorali è stato quello palladio-allilico (Figura 17).

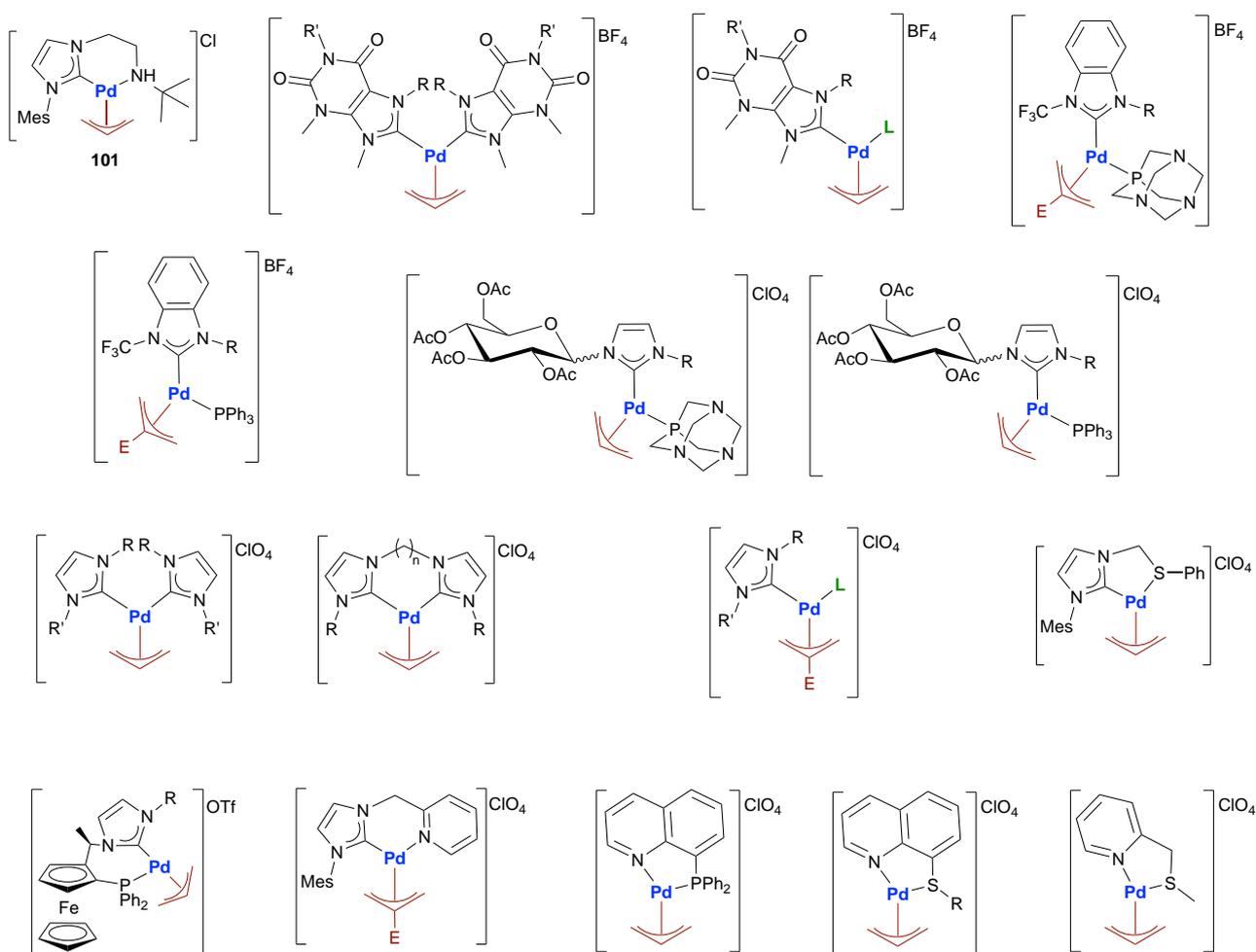


Figura 17. Riassunto di tutti i complessi palladio-allilici sintetizzati e testati dal gruppo di ricerca del prof. Fabiano Visentin

## Carbeni *N*-Eterociclici

I carbeni *N*-Eterociclici hanno avuto uno sviluppo notevole nell'ultimo quarto di secolo come leganti versatili per preparare complessi metallici con numerose applicazioni soprattutto in catalisi omogenea. Questi composti, presentando sempre almeno un eteroatomo legato al carbonio carbenico, sono una sottocategoria di carbeni di Fisher, che vennero isolati per la prima volta da Arduengo agli inizi degli anni '90<sup>21</sup>.

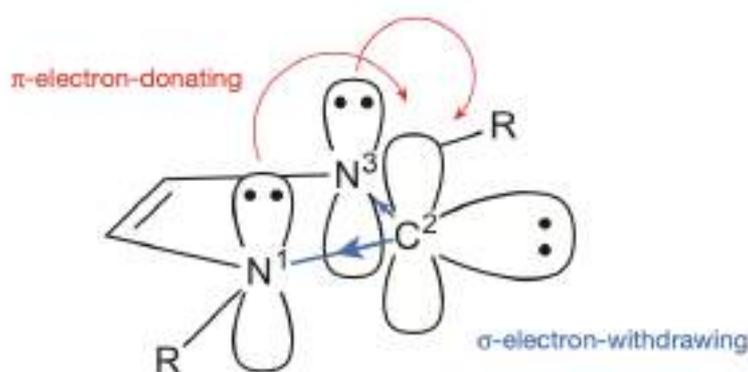


Figura 18. Struttura carbene *N*-eterociclico con esplicitati gli orbitali atomici

Rispetto ai carbeni tradizionali, i carbeni *N*-eterociclici sono più stabili sia per fattori sterici sia per fattori elettronici. Il contributo maggiore sembra essere proprio quello elettronico che si manifesta grazie alla  $\pi$ -donazione del doppietto presente sull'azoto il quale va a donare una parte della sua densità elettronica all'orbitale  $p_z$  del carbonio centrale riuscendo a sopperire parzialmente alla sua insaturazione.

La coppia solitaria situata sul carbonio carbenico rende questi composti dei buoni nucleofili; la principale conseguenza di questa caratteristica è la loro propensione ad agire come  $\sigma$ -donatori e quindi a legarsi piuttosto fortemente a una vasta gamma di centri metallici. Vengono così frequentemente usati come leganti di supporto per preparare complessi metallici particolarmente stabili da usarsi come catalizzatori o pre-catalizzatori.

Esistono numerosi parametri che permettono di quantificare le proprietà elettroniche e le proprietà steriche dei carbeni *N*-eterociclici. Le prime sono comunemente valutate usando il parametro elettronico di Tolman (TEP), originariamente sviluppato per le fosfine, il quale correla la capacità di un legante di donare elettroni misurando all'infrarosso le frequenze di *stretching* dei leganti carbonilici nei complessi metallo-carbonile  $[\text{Ni}(\text{CO})_3(\text{L})]$ . La difficoltà però di preparare molti complessi del tipo  $[\text{Ni}(\text{CO})_3(\text{NHC})]$  per ricavare direttamente il TEP, ha indotto ad estrapolare questi valori a partire dal valore medio di  $\nu_{\text{CO}}$ , del complesso  $[\text{Ir}(\text{CO})_2(\text{NHC})\text{Cl}]$ . (Figura 19).



La particolare stabilità dei complessi metallo-carbeni e la possibilità di modellare le loro proprietà steriche ed elettroniche andando a variare i sostituenti R sono caratteristiche interessanti per lo sviluppo di nuovi composti organometallici.

Posti ad interagire con un metallo *soft*, come il palladio, i carbeni generano un legame particolarmente forte caratterizzato principalmente dalla  $\sigma$ -donazione ma in taluni casi anche da un certo contributo di  $\pi$ -retrodonazione; proprio per tale motivo vengono considerati dei leganti ottimali per la realizzazione di composti chemioterapici, in quanto permettono di stabilizzare il composto finale in modo efficace.

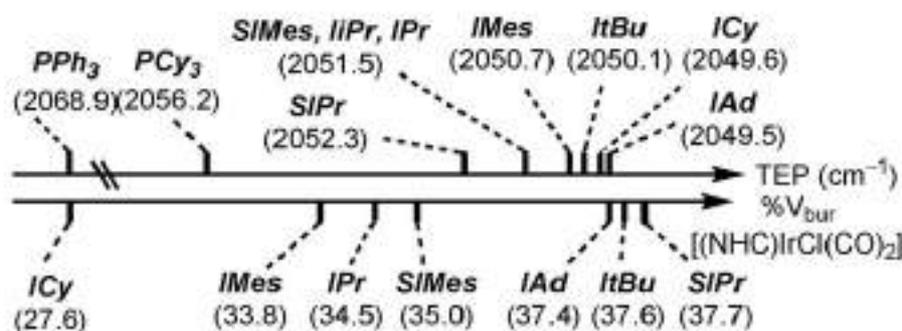


Figura 21. Confronto valori TEP e %V<sub>bur</sub> tra leganti fosfinici e carbenici

### Strategie sintetiche dei composti carbenici

Storicamente esistono tre differenti strategie sintetiche per la sintesi composti organometallici dotati di leganti carbenici *N*-eterociclici. Esse verranno di seguito brevemente illustrate:

#### La via del carbene libero

Il primo passaggio di questa via sintetica prevede l'aggiunta di una base forte, come NaH o *n*-BuLi, in una soluzione di sale di imidazolio ed in presenza dell'opportuno precursore metallico. In questo modo ha luogo la deprotonazione del sale e la conseguente coordinazione del legante carbenico formatosi al centro metallico. È importante far avvenire la deprotonazione in presenza del precursore metallico altrimenti si assisterà alla dimerizzazione del carbene libero (equilibrio di Wanzlick)<sup>23</sup>.

Le condizioni di reazione non sono particolarmente agevoli, in quanto l'utilizzo di una base forte comporta l'esigenza di operare in ambiente anidro e in atmosfera inerte. Questa via risulta essere particolarmente efficiente per gli *early transition-* e per alcuni *middle transition-* *metals*<sup>23</sup>.

### *Transmetallazione*

Il primo step sintetico prevede la reazione tra un sale di imidazolio e ossido di argento o di rame ( $\text{Ag}_2\text{O}$  o  $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Questo reattivo agisce sia da agente deprotonante (con la funzione ossido che così genera acqua) che da agente complessante (utilizzando il centro metallico *soft* di  $\text{Ag(I)}$  che lega immediatamente il carbene liberatosi). In alcuni casi particolari è necessario stare attenti all'acqua perché i composti risultanti sono sensibili all'umidità e quindi la reazione va condotta sotto setacci molecolari, dunque non sempre l'acqua come sottoprodotto può essere considerata un vantaggio<sup>24</sup>. La successiva reazione di transmetallazione, la cui *driving-force* principale è rappresentata dalla precipitazione di un alogenuro di argento, consente di trasferire il legante carbenico sul centro metallico prescelto.

### *Built-in base route*

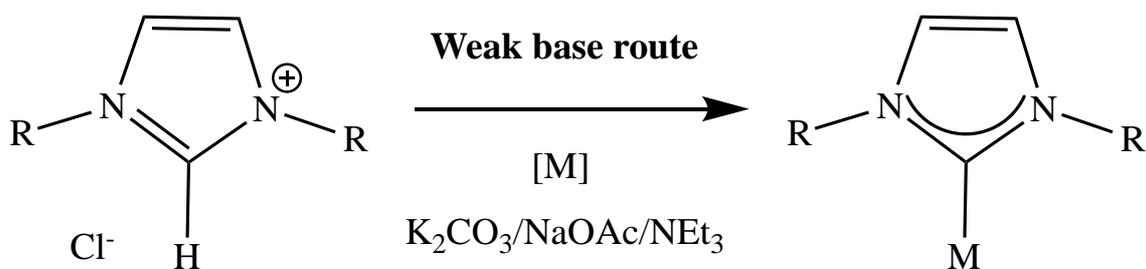
La reazione in questione è meno utilizzata rispetto alle precedenti e prevede di fare reagire un precursore del centro metallico prescelto dotato di un legante labile basico (es. un acetato) con un sale di imidazolio, ponendo il tutto a refluxo per 24h, trascorse le quali si ottiene direttamente il composto desiderato.

Nell'ultimo decennio il gruppo di ricerca di Steve Nolan ha sviluppato una nuova strategia sintetica che permette di realizzare composti carbenici in modo molto più efficiente ed economico e prende il nome di "Via della Base Debole"<sup>25</sup>. Questo approccio sintetico, che verrà anche da noi utilizzato per la sintesi di una delle categorie di complessi di questo lavoro di tesi, prevede l'impiego di una base debole, come il  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , del sale di imidazolio e dell'opportuno precursore metallico. Questa modalità di sintesi permette di condurre la reazione in condizioni aerobiche utilizzando solventi che possono essere definiti *green*, come l'acetone, etanolo o l'acetato di etile, e l'uso di basi deboli, meno tossiche e meno costose rispetto ai reagenti utilizzati per le sintesi descritte in precedenza. Anche le rese che si ottengono seguendo l'innovativa via sintetica sono elevate.

Il meccanismo è stato ampiamente studiato e, nonostante non sia stato ancora completamente chiarito, sono stati comunque messi in chiaro alcuni punti cruciali. Lo stadio iniziale prevede la formazione di un intermedio metallato ottenuto dalla combinazione del sale d'imidazolio e del precursore metallico impiegato. Maggiore è l'ingombro sterico del sale d'imidazolio e più sarà agevolata la formazione di tale specie intermedia all'interno della quale è stata osservata, grazie al suo isolamento e alla risoluzione della sua struttura ai raggi X, un'interazione tra il protone del sale d'imidazolio e l'alogenuro presente nel precursore metallico. Questo intermedio si è rivelato piuttosto stabile e solo

la successiva aggiunta della base permette di rompere il legame alogeno-idrogeno, favorendo così la coordinazione del legante carbenico risultante sul centro metallico d'interesse.

La strategia sintetica è versatile in quanto, impiegando le opportune condizioni di reazione, è applicabile per diversi metalli sia lavorando in presenza di solvente, sia avvalendosi della *mechanochemistry*.



Schema 1. Schema di sintesi per la sintesi di complessi carbenici attraverso la "Via Base Debole"

## Legante indenilico

Il legante indenilico (Ind) è formalmente il prodotto di deprotonazione dell'indene.



Figura 22. Struttura dell'indene e del corrispettivo legante indenilico

Esso risulta quindi formato da un ciclopentadienile condensato con un benzene ed è perciò naturale che la sua chimica sia in qualche modo riconducibile a quella del legante ciclopentadienilico (Cp), anche se con alcune significative differenze. Il frammento indenilico si lega a centri metallici di transizione con un'interazione piuttosto forte. Le modalità coordinative possibili sono schematicamente 3:

- Modo di coordinazione  $\eta^1$  prevede che soltanto uno degli atomi di carbonio dell'anello a 5 termini si leghi al centro metallico (legante X).
- Modo di coordinazione  $\eta^3$  prevede un'interazione con tre atomi di carbonio dell'anello a 5 termini. (legante LX)
- Modo di coordinazione  $\eta^5$  prevede l'interazione di tutti e cinque gli atomi di carbonio dell'anello a 5 termini (legante  $L_2X$ ).

In generale, i complessi indenilici sono caratterizzati da un più rapido scambio di leganti coordinati rispetto agli analoghi complessi ciclopentadienilici; questo fenomeno viene chiamato "effetto indenilico"<sup>26</sup> e tale comportamento è stato osservato principalmente con complessi di metalli appartenenti ai gruppi 6, 8 e 9. In particolare, le reazioni di sostituzione che avvengono con meccanismo dissociativo, possono usufruire, nel caso dei complessi indenilici, di una stabilizzazione da parte dell'anello benzenico della specie intermedia insatura non ovviamente possibile per gli omologhi complessi ciclopentadienilici.

Le reazioni di sostituzione che prevedono invece un meccanismo associativo, sembrano favorite in presenza dell'indenile per la sua maggior propensione rispetto al ciclopentadienile, a ridurre la sua

apertività e favorire così l'entrata del nuovo legante nella sfera di coordinazione; questa attitudine è promossa dal mantenimento dell'aromaticità del sistema sull'anello benzenico.

Generalmente i modi di coordinazione del legante indenilico variano tra l' $\eta^3$  e l' $\eta^5$  e nel corso degli anni sono stati studiati diversi approcci che permettono di valutare, attraverso parametri strutturali e/o spettroscopici il valore dell'apertività.



Figura 23. Variazione dell'apertività del legante indenilico

Baker e Tulip<sup>27</sup> hanno descritto un metodo basato su alcuni dati spettroscopici ricavati dagli spettri  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR di un'ampia varietà di complessi indenilici in soluzione, concludendo che i *chemical shift* del  $\text{C}^{3a}$  e del  $\text{C}^{7a}$  fornissero informazioni sul modo di coordinazione del legante indenilico; in particolare hanno proposto una formula che permette di ottenere un valore indicativo dell'apertività:

$$\Delta\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{\delta\text{C}_{3a} + \delta\text{C}_{7a}}{2} \text{ del complesso} - \text{Ind} \right) - \left( \frac{\delta\text{C}_{3a} + \delta\text{C}_{7a}}{2} \text{ di NaInd} \right)$$

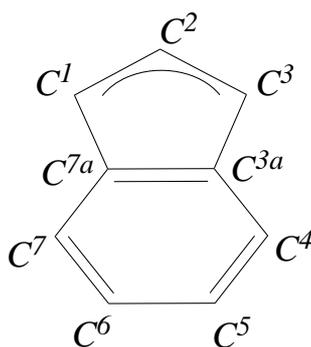


Figura 24. Struttura legante indenilico con esplicitati i Carboni

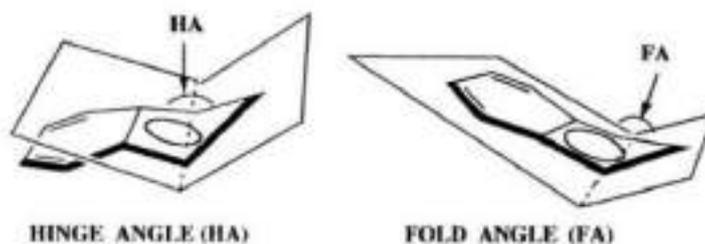
La formula considera i valori di *chemical shift* dei carboni di giunzione tra i due anelli del frammento indenilico del complesso esaminato e di un composto di riferimento rappresentato dal sodio indenile. In base ai valori di  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  si possono dividere i modi di coordinazione in 3 categorie:

- $-20 < \Delta\delta^{13}\text{C} < -40$  : L' indenile è totalmente planare e coordinato con modalità  $\eta^5$

- $-10 < \Delta\delta^{13}\text{C} < -20$  : in questa seconda situazione si ha sempre una preferenza al modo di coordinazione  $\eta^5$  ma si comincerà ad osservare un certo discostamento del frammento dalla planarità.
- $-10 < \Delta\delta^{13}\text{C} < +5$  : valori indicativi di un'apcticità intermedia tra  $\eta^5$  e  $\eta^3$ .
- $+5 < \Delta\delta^{13}\text{C} < +30$ : in quest'ultima situazione si avrà preferenzialmente un modo di coordinazione  $\eta^3$ .

Un modo alternativo per valutare l'apcticità del frammento indenilico è stato proposto da Marder e Taylor ed è basato su dati cristallografici desunti dalla struttura ai raggi X del composto in esame<sup>28</sup>. Questo metodo prevede la valutazione di determinati angoli presenti nella molecola e della distanza tra alcuni carboni dell'indenile dal centro metallico. Tali parametri sono rappresentati in *Figura 25* e sono così definiti:

- HA (*Hinge Angle*): angolo di giunzione tra i piani identificati da  $\text{C}^1, \text{C}^2, \text{C}^3$  e da  $\text{C}^1, \text{C}^3, \text{C}^{3a}, \text{C}^{7a}$
- FA (*Fold Angle*): angolo definito tra i piani indentificati da  $\text{C}^1, \text{C}^2, \text{C}^3$  e da  $\text{C}^{3a}, \text{C}^4, \text{C}^5, \text{C}^6, \text{C}^7$  e  $\text{C}^{7a}$ .
- $\Delta\text{M-C} = 0.5\{(\text{M-C}(3a) + (\text{M-C}7a) - 0.5(\text{M-C}1) + (\text{M-C}3))\}$ .



*Figura 25. Angoli HA e FA relativi al legante indenilico*

Genericamente quando il legante indenilico presenta un'apcticità pari a 5 i valori degli angoli FA e HA risultano inferiori a  $1^\circ$ , mentre il valore di  $\Delta\text{M-C}$  inferiore a  $0.25 \text{ \AA}$ , invece con un'apcticità più tendente all' $\eta^3$  si avranno valori di FA e HA che si assestano intorno ai  $28^\circ$  con un valore di  $\Delta\text{M-C}$  di circa  $0.7 \text{ \AA}$ . In definitiva maggiori sono i valori di HA e FA e  $\Delta\text{M-C}$ , maggiore sarà la distorsione del legante indenilico.

## Scopo

Nel corso degli ultimi decenni si è dedicata sempre maggior attenzione allo studio di nuovi complessi metallici potenzialmente impiegabili come agenti antitumorali. In particolare, il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di tesi, ha sviluppato le sintesi e valutato l'attività citotossica di nuovi composti di palladio, negli stati di ossidazione 0 e +2, caratterizzati dalla presenza di frammenti organometallici allilici, palladaciclopentadienilici, olefinici e butadienilici e dotati di svariati tipi di leganti spettatori fosfinici e/o carbenici. Tra questi i risultati più incoraggianti sono stati ottenuti con i composti cationici di Pd- $\eta^3$ -allile e questo ci ha indirizzato a preparare una nuova classe di derivati caratterizzata dalla presenza del gruppo funzionale organometallico Pd-indenilico che presenta alcune caratteristiche assimilabili a quello Pd-allilico, ma contestualmente anche alcune differenze significative (come la possibilità di assumere parzialmente l'apticità 5), che potrebbero conferirgli delle interessanti proprietà in ambiente biologico. A questo proposito va segnalato che, a fronte della presenza in letteratura di alcune interessanti pubblicazioni sull'attività catalitica di complessi indenilici di palladio, non è invece al momento reperibile alcuno studio sulla loro attività biologica.

Nel seguente lavoro di tesi si propone pertanto la preparazione di tre differenti tipologie di composti cationici Pd-indenilici equipaggiati con leganti spettatori carbenici *N*-eterociclici, mediante i protocolli sintetici alternativi della transmetallazione e della base debole; a seguire verrà valutata la loro attività citotossica su cellule tumorali e confrontata con quella degli omologhi derivati allilici. Ci si ripromette inoltre di valutare anche l'eventuale effetto su tale attività dovuta al tipo di controione utilizzato.

Ciascun composto verrà esaustivamente caratterizzato mediante spettroscopia  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e, dove necessario,  $^{19}\text{F}$  NMR e dove possibile con analisi diffrattometrica ai raggi X.

La tipologia di cellule tumorali su cui i nuovi composti saranno testati appartengono tutte alla categoria del carcinoma ovarico, (A2780, OVCAR5, OVCAR3, KURAMOCHI, A2780*cis*). Per comparazione verrà poi valutato l'effetto su cellule sane (fibroblasti di tessuto polmonare MRC5.) I composti con maggior attività verranno poi selezionati per essere testati anche su tumoroidi ottenuti da ascite di paziente reale.

## Risultati e discussione

### Sintesi sali di imidazolio

Le due strategie sintetiche messe a punto in questo lavoro di tesi per preparare i complessi indenilici di palladio(II) prevedono entrambe l'impiego dei sali d'imidazolio come precursori dei leganti carbenici *N*-eterociclici. In particolare, i sali di imidazolio sintetizzati e utilizzati nel seguente studio presentano un ciclo a 5 termini caratterizzato da un doppio legame tra i carboni 5 e 4 e da 2 eteroatomi, per la precisione due azoti, i quali possono essere dotati di sostituenti R o R' uguali o diversi tra loro. Esistono una grande varietà di sali di imidazolio in quanto è possibile diversificare con facilità la natura dei sostituenti R ed R' direttamente legati agli azoti e il numero di funzionalità imidazoliche.

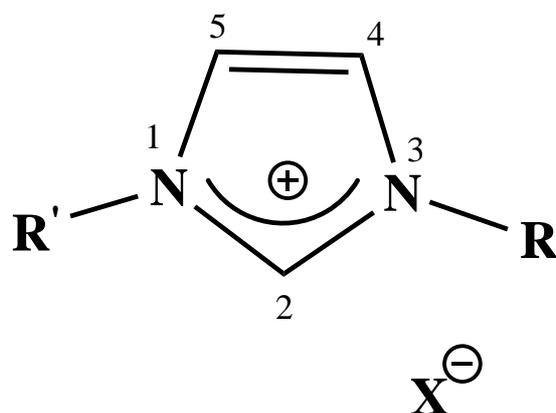
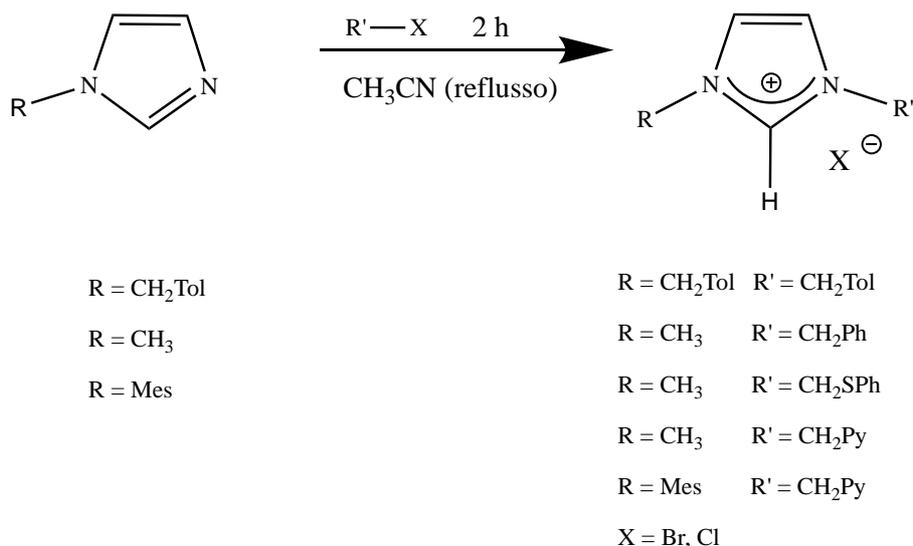


Figura 26. Struttura generica del sale di imidazolio

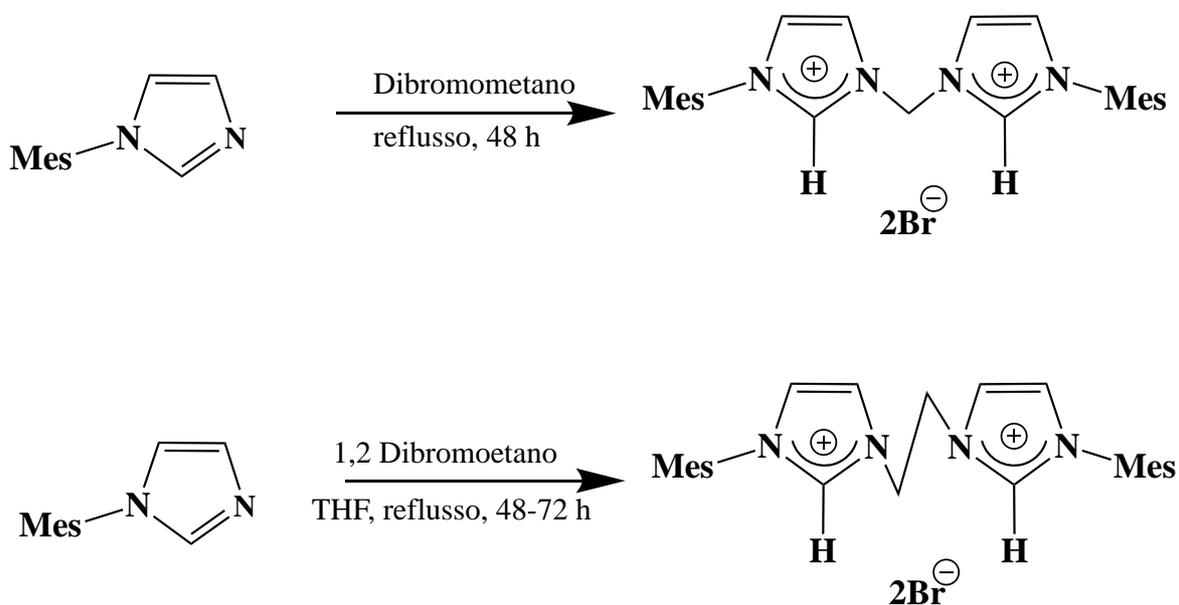
Per quanto riguarda il seguente lavoro di tesi sono stati sintetizzati sia sali con una funzionalità imidazolica che con due.

Nel caso dei sali che presentano una sola funzionalità imidazolica, nello Schema 2 è riportata la sintesi, ampiamente collaudata dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto il lavoro di tesi, che prevede la reazione tra un imidazolo e un alogenuro alchilico in rapporto stechiometrico 1:1. Si tratta di una reazione di sostituzione nucleofila, la cui velocità ed il buon esito è favorito dalla scelta di un solvente polare come l'acetonitrile.



*Schema 2. Reazione di sintesi dei sali di imidazolio.*

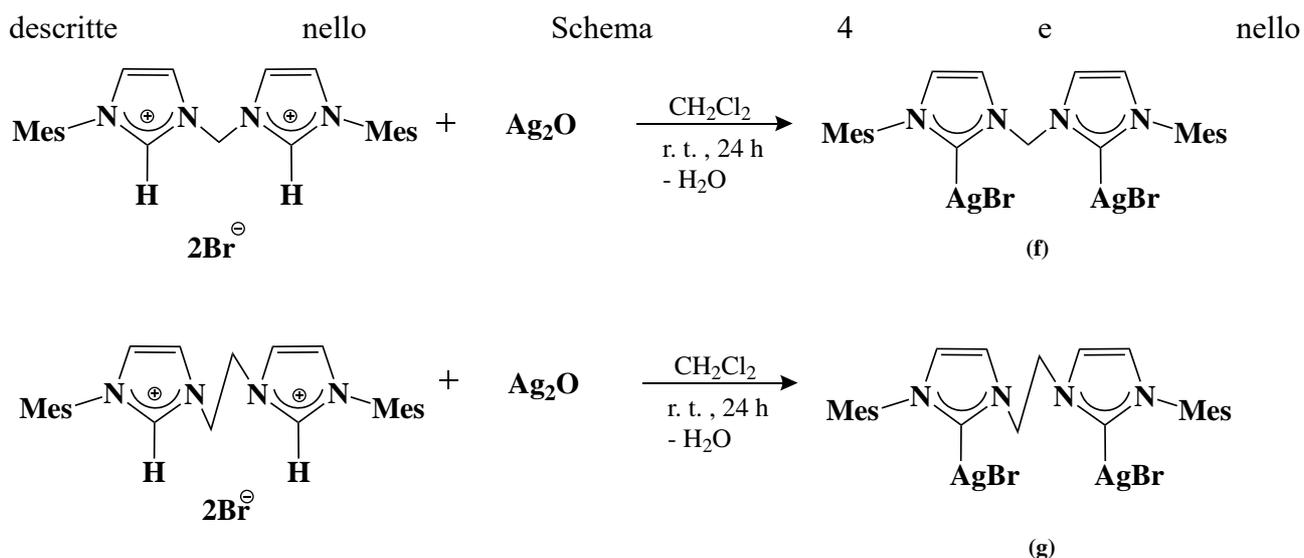
I composti invece caratterizzati da due funzionalità imidazoliche, sono stati ottenuti mettendo a reagire l'imidazolo con il dibromometano o l'1,2 dibromoetano, riuscendo in questa maniera nell'intento di inserire un ponte rispettivamente metilenico o etilenico tra i due anelli imidazolici (Schema 3).



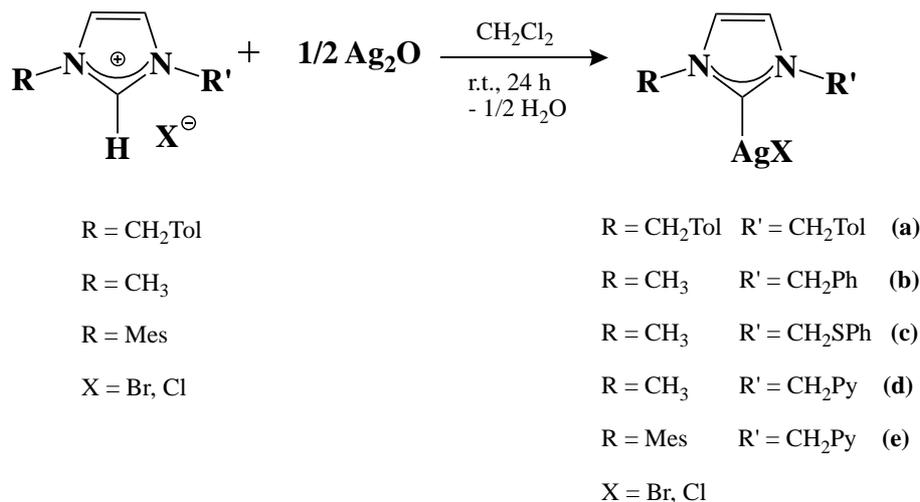
*Schema 3. Reazione di sintesi sali di bisimidazolio*

## Sintesi dei complessi carbenici di argento

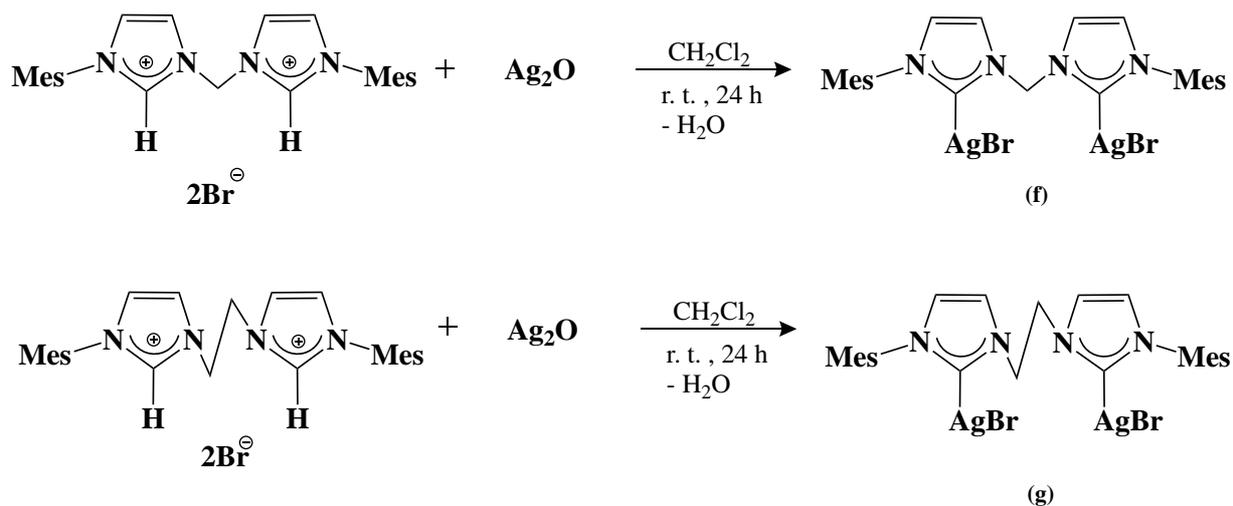
La sintesi dei complessi carbenici di argento(I) viene eseguita partendo dai sali di imidazolio descritti in precedenza e rappresenta il secondo passaggio del protocollo sintetico della “transmetallazione” finalizzato a generare il legante carbenico *N*-eterociclico da coordinare ai complessi finali di Pd(II). La procedura operativa per ottenere la seguente categoria di composti prevede la reazione tra due equivalenti di sale di imidazolio con uno di ossido di argento (Ag<sub>2</sub>O), seguendo il protocollo descritto da Lin e dal suo gruppo di ricerca<sup>24</sup>. I complessi di Ag(I) impiegati in questo lavoro di tesi sono stati pertanto sintetizzati seguendo queste consolidate metodiche ed adottando le condizioni operative descritte



Schema 5.



Schema 4. Reazione di sintesi dei complessi di argento monocarbenici.



Schema 5. Reazione di sintesi dei complessi di argento biscalcarbenici

La reazione prevede l'impiego dell'ossido di argento che fungendo da base è in grado di deprotonare il sale d'imidazolio, permettendo la coordinazione del carbene liberatosi sull'atomo di argento. Generalmente i sali d'argento si presentano come solidi bianchi e sono conservabili per molto tempo senza dover ricorrere a particolari accorgimenti in virtù soprattutto della buona stabilità del legame Ag-carbene. L'atteso esito della reazione viene facilmente confermato dall'analisi degli spettri  $^1\text{H}$  NMR dei prodotti isolati, nei quali va in particolare evidenziata la scomparsa del segnale del protone imidazolico generalmente localizzato sopra i 10 ppm. Si riportano a titolo esemplificativo gli spettri protonici di un sale di imidazolio e del corrispondente complesso di Ag(I) (Figura 27).

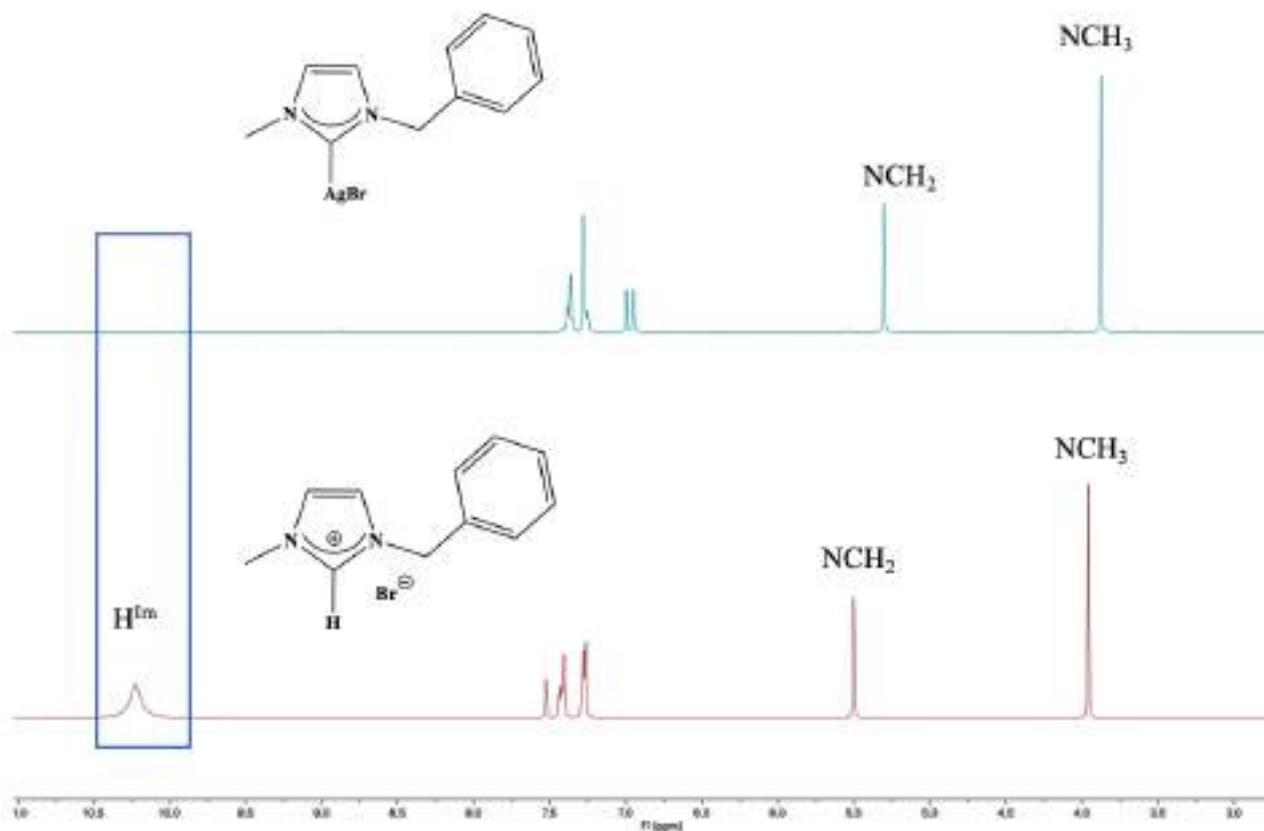


Figura 27. Confronto spettri <sup>1</sup>H NMR del complesso d'argento e del sale di imidazolio

### Sintesi del precursore: [Pd(NSPM)(Ind)]A

Il precursore di Pd(II) impiegato per la sintesi di tutti i complessi ottenuti nel seguente lavoro è quello riportato in Figura 28, sintetizzato con i tre differenti controioni (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, OTf<sup>-</sup>).

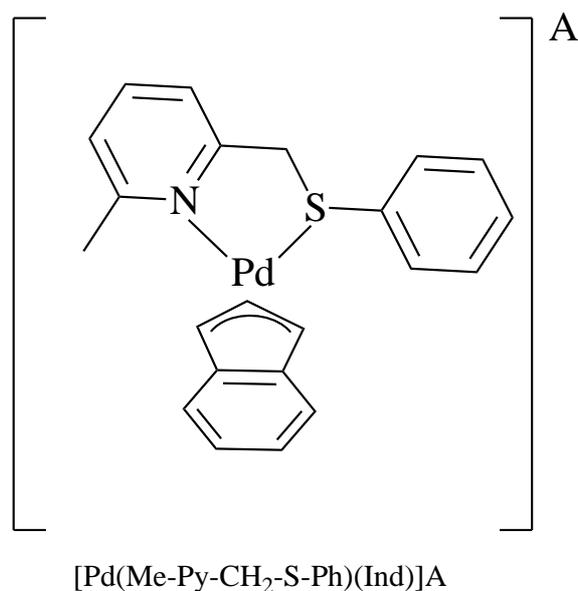
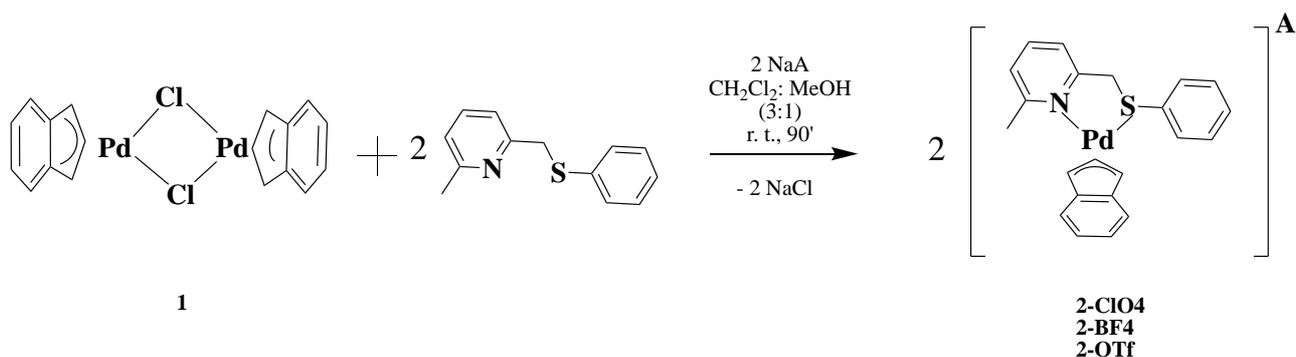
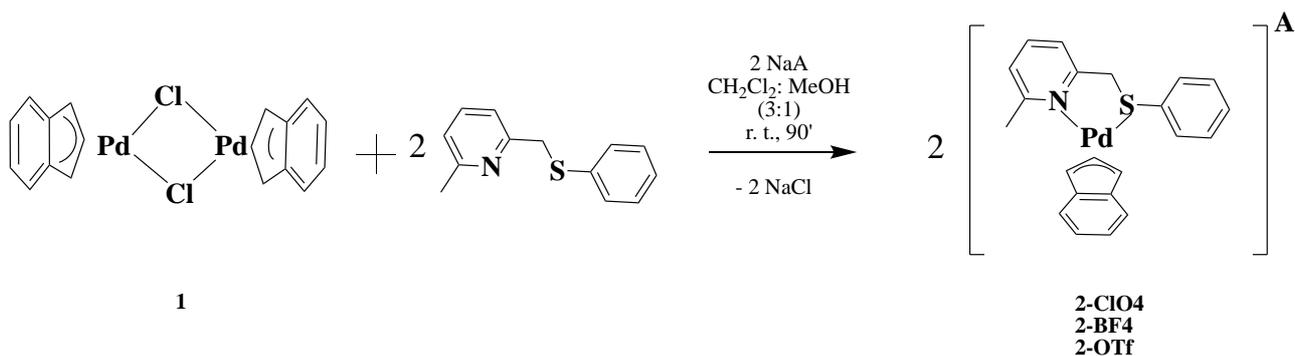


Figura 28. Struttura del precursore Piridil-Tioetero, [Pd(NSPM)(Ind)]A, con A=ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, OTf<sup>-</sup>

La scelta di questo particolare composto è legata alla volontà di utilizzare uno stesso precursore per entrambe le vie sintetiche impiegate per la sintesi dei complessi carbenici di Pd(II). La caratteristica principale che lo rende così versatile è la presenza del legante ancillare 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina (siglato come NSPM), ampiamente studiato dal gruppo di ricerca del Prof. Visentin<sup>22</sup>. In questo chelante, infatti, sono presenti come atomi donatori un azoto ed uno zolfo, i quali permettono l'ancoraggio al centro metallico di palladio formando un ciclo a 5 termini. Pur garantendo questi leganti una sufficiente stabilità ai propri complessi, che possono essere agevolmente conservati e manipolati senza particolari precauzioni, essi sono tuttavia abbastanza labili da poter essere facilmente rimossi da leganti fortemente coordinanti quali sono i carbeni *N*-eterociclici in questione. Tale labilità è dovuta alla distorsione dell'anello chelato causata principalmente dall'interferenza sterica del sostituito metilico in *orto* all'atomo di azoto piridinico<sup>30</sup>. La sintesi di questi precursori prevede la reazione tra il dimero [Pd( $\mu$ -Cl)(Ind)]<sub>2</sub> e il legante 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina,



Schema 6.



Schema 6. Reazione di sintesi del precursore [Pd(NSPM)(Ind)]A

Va sottolineato che l'introduzione di un sale sodico (nello specifico NaClO<sub>4</sub>, NaBF<sub>4</sub> e NaOTf) promuove in questo ambiente di reazione (in cui il solvente è una miscela 3:1 di diclorometano/metanolo), la precipitazione di cloruro di sodio, e la conseguente formazione dei desiderati complessi cationici aventi come controioni rispettivamente il perclorato, il tetrafluoroborato e il triflato (Figura 29). Questo consentirà di disporre di complessi che si differenziano unicamente per l'anione, di cui si potrà pertanto valutare selettivamente l'effetto sull'attività biologica.

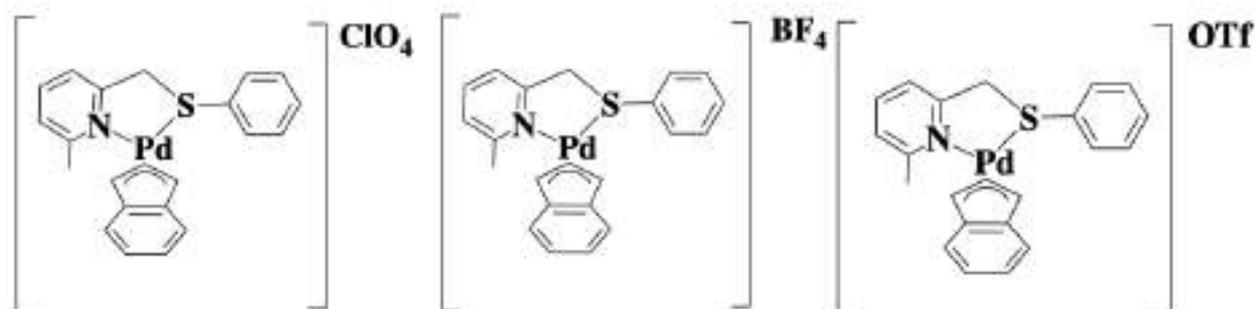


Figura 29. Formule di struttura dei precursori, rispettivamente: 2-ClO<sub>4</sub>; 2-BF<sub>4</sub>; 2-OTf

La corretta identità dei composti ottenuti è accertata principalmente mediante spettroscopia NMR. Nel dettaglio si può notare come gli spettri protonici registrati a temperatura ambiente segnalino una certa flussionalità del sistema, come si evince da molti picchi sensibilmente allargati. Tuttavia, sono facilmente identificabili e particolarmente diagnostici quelli del sostituente metilico dell'anello piridinico (a circa 2.7 ppm) e quelli diastereotopici del gruppo metilenico CH<sub>2</sub>S (che nel caso del complesso con il perclorato assumono la struttura di un sistema AB). Come prevedibile la natura del controione non altera significativamente la forma dello spettro se non per diverso grado di allargamento dei segnali, che sottintende un modo leggermente diverso di promuovere la flussionalità del sistema (data presumibilmente dallo scambio dei doppietti utilizzati dall'atomo di zolfo per coordinarsi sul centro metallico di palladio e dall'apparente rotazione del frammento indenilico)<sup>31</sup>.

Nel caso dei complessi con il tetrafluoroborato od il triflato, la presenza di questi controioni è confermata dai picchi che compaiono (a -152.6 e -78.1 ppm) nei rispettivi spettri  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (Figura 31).

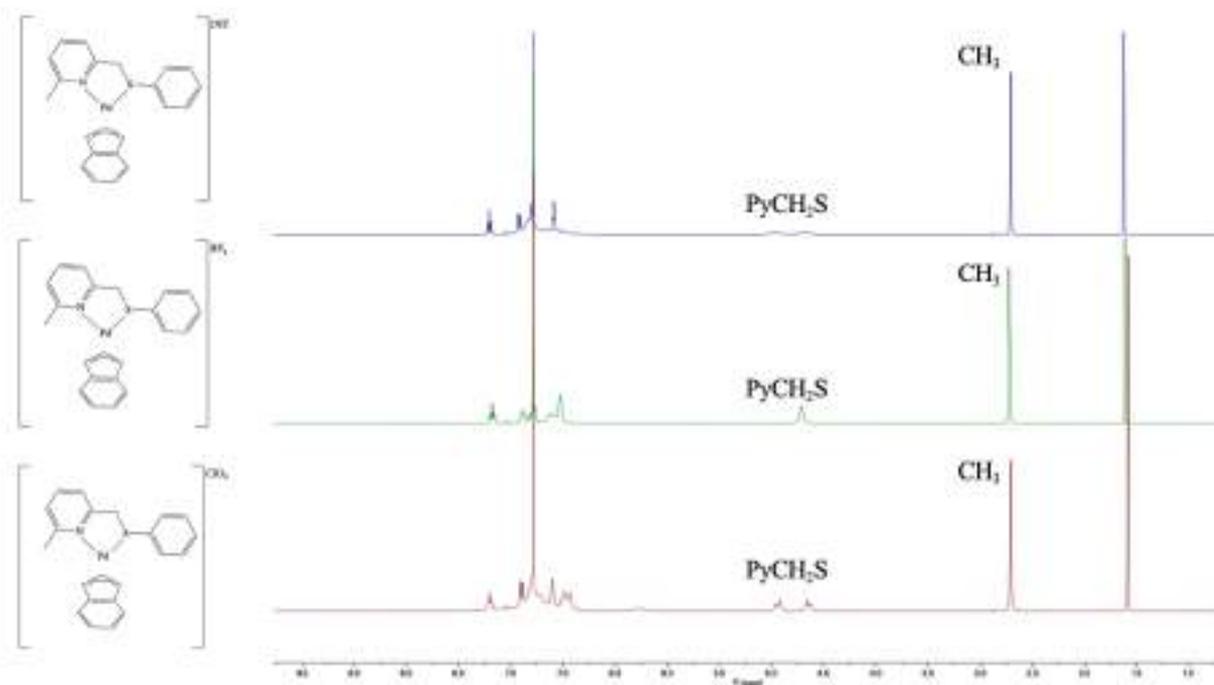


Figura 30. Spettri  $^1\text{H}$  NMR dei tre precursori in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$

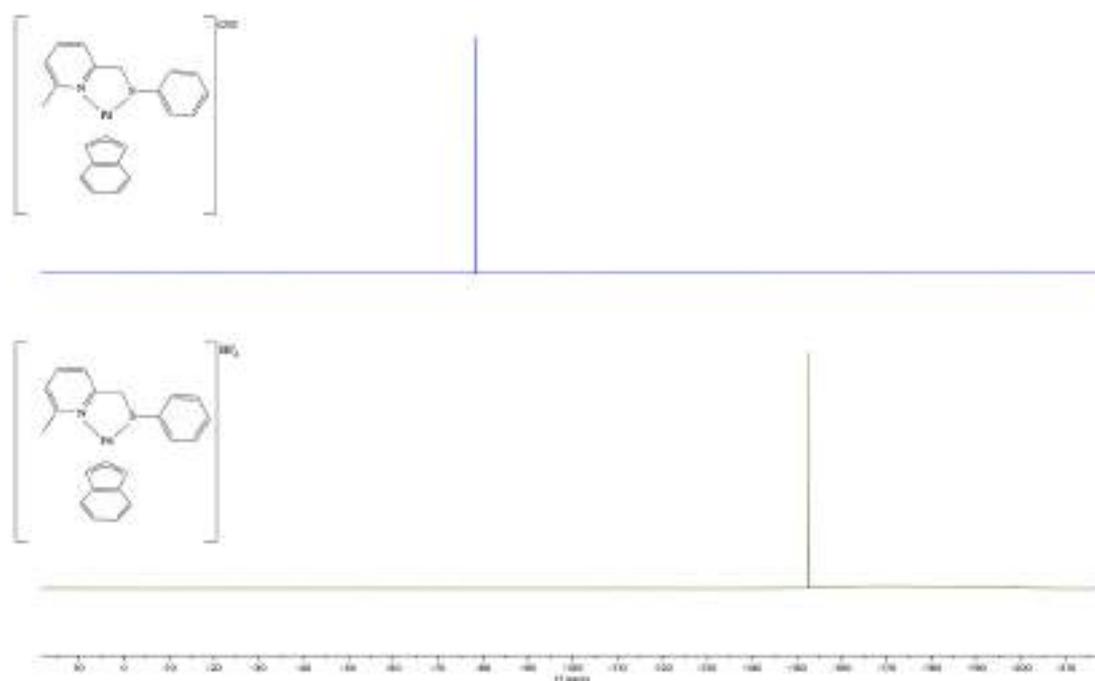


Figura 31. Spettri  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR di **2-BF<sub>4</sub>** e **2-OTf** in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$

A prova ulteriore e definitiva della natura dei prodotti ottenuti possiamo portare la struttura, determinata con diffrazione ai raggi X, dei cristalli ottenuti per il complesso con il perclorato, precipitati per lenta diffusione a 5°C di etere dietilico su una soluzione del composto sciolto in  $\text{CDCl}_3$  (Figura 32).

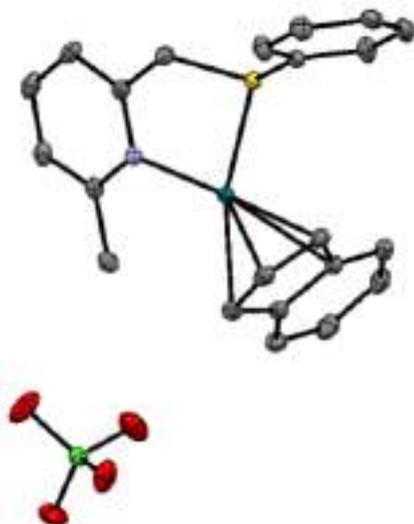
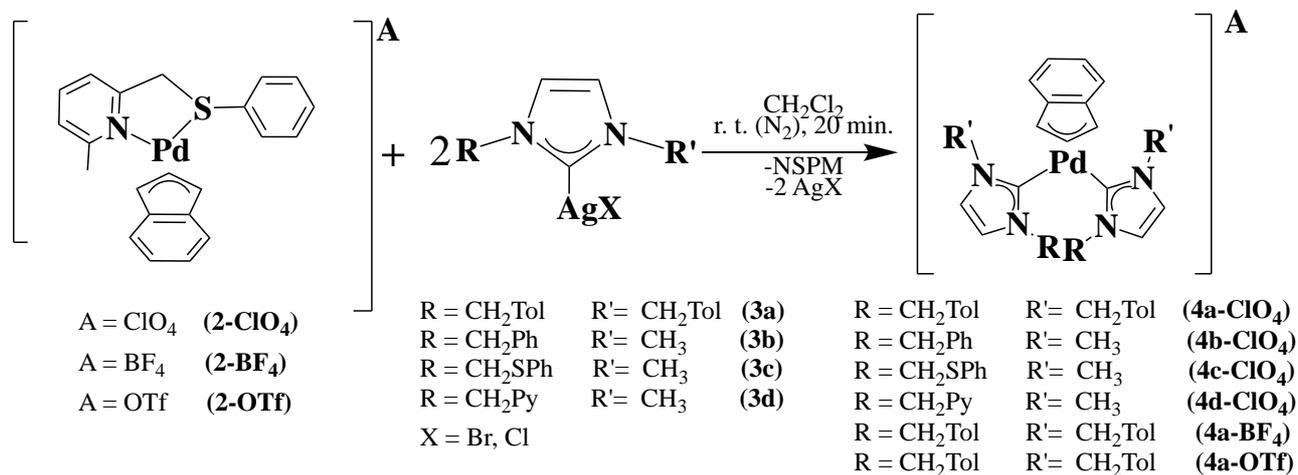


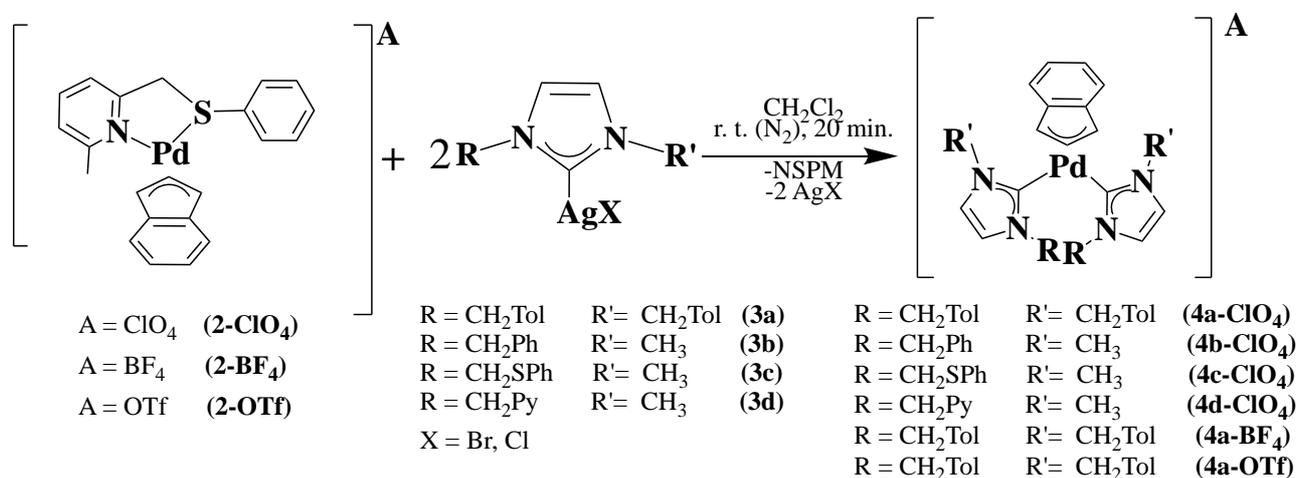
Figura 32. Struttura ai Raggi X di  $[\text{Pd}(\text{NSPM})(\text{Ind})]\text{ClO}_4$

## Sintesi dei complessi di Pd(II) con due leganti carbenici monodentati

La prima categoria di complessi indenilici di palladio sintetizzata è quella caratterizzata dalla presenza di due leganti spettatori carbenici *N*-eterociclici. La via sintetica adottata per questa classe di composti è quella della transmetallazione riportata nello



Schema 7. Un equivalente di precursore di Pd-Indenile, descritto nel paragrafo precedente, viene posto a reagire in condizioni blande con 2 equivalenti di complesso carbenico di argento portando alla formazione del desiderato composto finale di Pd(II).

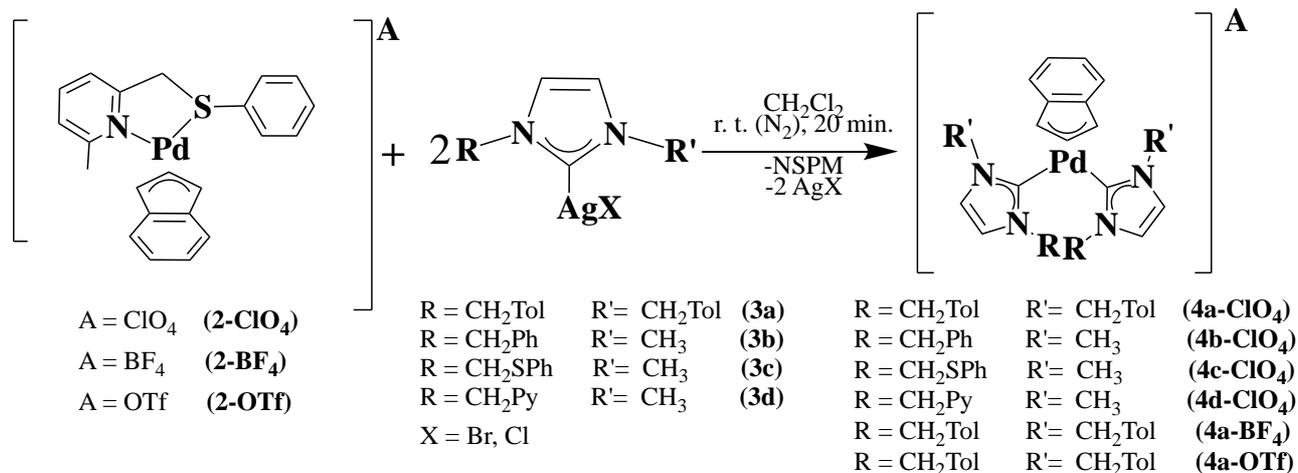


Schema 7. Reazione di sintesi dei complessi biscalchenici monodentati di Pd(II)-indenile via transmetallazione

È possibile accertarsi anche visivamente dell'attivarsi del processo in quanto già con l'aggiunta delle prime gocce della soluzione contenente il complesso d'argento è possibile osservare un repentino viraggio di colore della miscela di reazione. Ad esso è associata una progressiva precipitazione dell'alogenuro di argento che unitamente alla forza del nuovo legame Pd-Carbene formatosi, costituisce la *driving-force* termodinamica del processo.

Questa metodica è stata adottata per preparare i nuovi complessi biscarbenici di Pd(II)-Indenile, riportati

nello



Schema 7. Tra essi i composti **4c** e **4d** sono caratterizzati anche dalla presenza di un eteroatomo su uno dei sostituenti degli atomi di azoto imidazolici, mentre quelli siglati **4a** si differenziano tra loro per la diversa natura del controione. Cinque dei sei composti in oggetto sono stati facilmente isolati con buone rese dalla miscela di reazione utilizzando opportuni agenti precipitanti; risultano stabili allo stato solido e nelle soluzioni dei più comuni solventi organici.

Il complesso **4d-ClO<sub>4</sub>**, contrariamente all'omologo composto dotato del frammento allilico sintetizzato in precedenza dal gruppo di ricerca, non risulta invece sufficientemente stabile e si decompone velocemente a dare una miscela di sottoprodotti di non agevole identificazione. Va sottolineato che anche modificando le condizioni e gli approcci di sintesi non si ottengono risultati migliori, indizio questo che sembra indicare un'instabilità intrinseca del composto.

Un'analisi accurata degli spettri NMR ha consentito invece la precisa identificazione dei complessi isolati. Per quanto riguarda gli spettri <sup>1</sup>H NMR, si possono in tutti i casi individuare i segnali ascrivibili al frammento indenilico vale a dire un doppietto relativo ai protoni H<sup>1</sup> e H<sup>3</sup> localizzato nell'intervallo 5.70-5.82 ppm, un tripletto identificativo del protone H<sup>2</sup> che risuona tra 6.47 e 6.59 ppm, mentre i segnali dei protoni benzenoidi assumono la forma di multipletti rinvenibili in un intervallo generalmente compreso tra 6.9 e 7 ppm. Si possono inoltre identificare in tutti i casi, i segnali attribuibili ai due leganti carbenici i quali risuonano, ognuno con la sua specificità, a *chemical shift* sempre sensibilmente differenti rispetto a quelli del corrispondente complesso d'argento precursore. A seguire viene riportato uno spettro protonico esemplificativo (Figura 33).

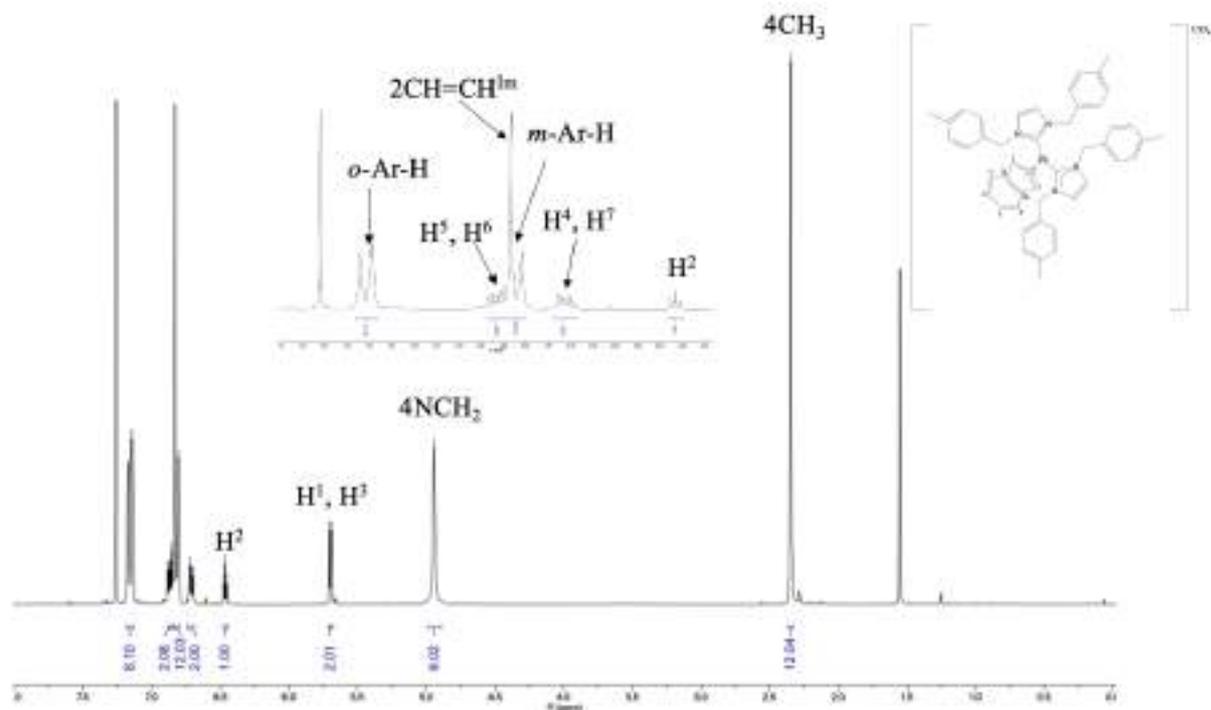


Figura 33. Spettro  $^1\text{H}$  NMR di **4a-CIO<sub>4</sub>** in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$

Coerentemente, anche negli spettri  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR possono essere rintracciati i carboni relativi al frammento indenilico;  $\text{C}^1$  e  $\text{C}^3$  risuonano tipicamente intorno a 79 ppm,  $\text{C}^2$  a circa 112 ppm, i carboni aromatici invece in un intervallo che va da 112 a 135 ppm. I segnali relativi ai carboni quaternari  $\text{C}^{3a}$  e  $\text{C}^{7a}$ , coinvolti nella giunzione tra l'anello ciclopentadienilico e quello benzenico, sono localizzati intorno a 134 ppm.

Per quanto riguarda i segnali relativi ai carboni dei leganti spettatori carbenici *N*-eterociclici, essi possono essere tutti agevolmente individuati avvalendosi per l'assegnazione degli spettri bidimensionali (HSQC e HMBC). Tra essi particolarmente diagnostico è quello del carbonio carbenico legato al centro metallico (Figura 34). La corretta attribuzione di quest'ultimo è possibile per il caratteristico valore di *chemical shift* tra i 160 e 170 ppm e per l'accoppiamento con i protoni imidazolici, confermato dal *cross peak* visibile nello spettro bidimensionale HMBC (

Figura 35).

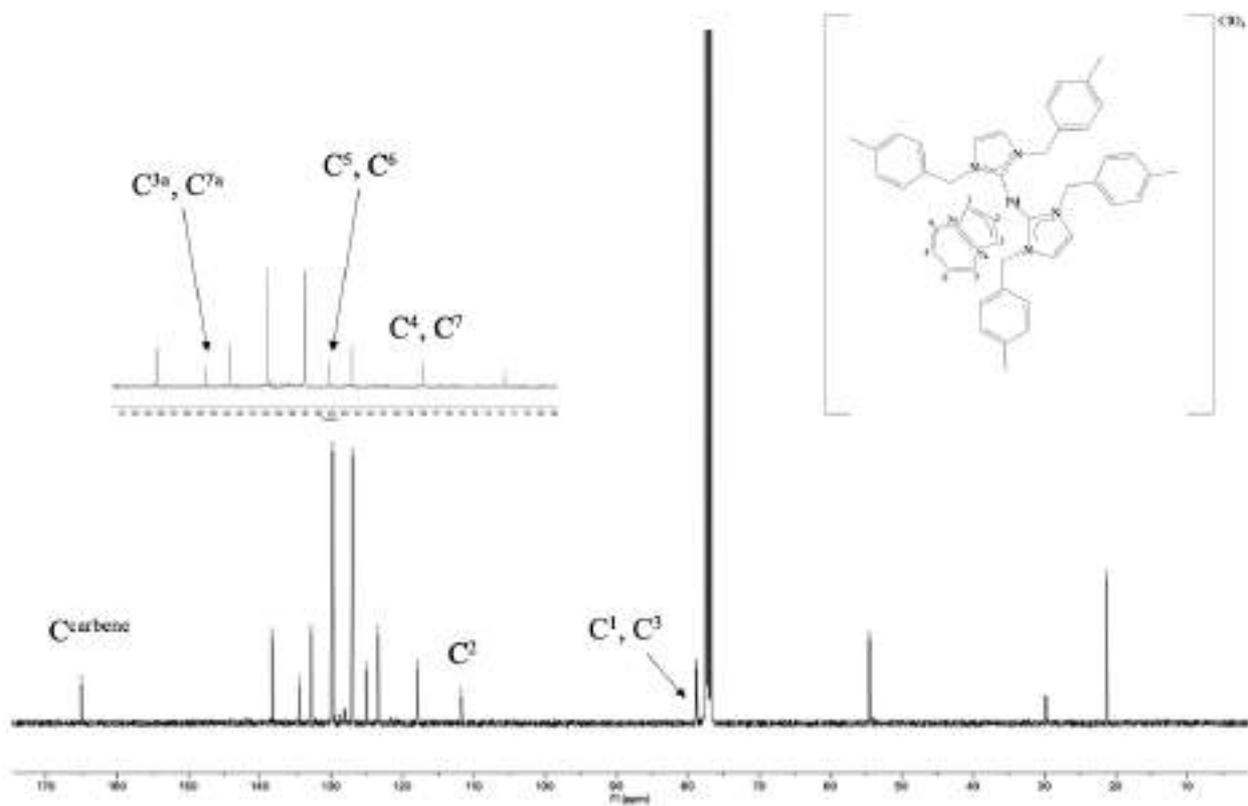


Figura 34. Spettro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR di **4a-C104** in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$

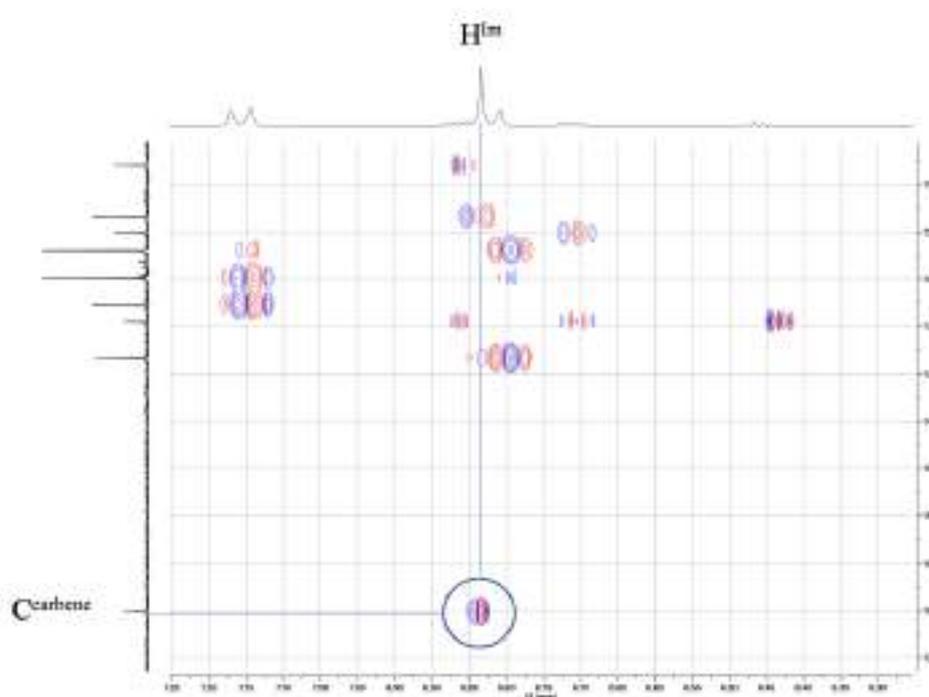


Figura 35. Spettro HMBC di **4a-CIO<sub>4</sub>** in CDCl<sub>3</sub> a T=298 K

Va messo in evidenza che nel caso del complesso **4b-CIO<sub>4</sub>**, caratterizzato dalla presenza di due differenti sostituenti sugli atomi di azoto, potremmo avere potenzialmente tre differenti atropoisomeri, determinati dal diverso posizionamento che possono assumere i due sostituenti rispetto al frammento indenilico. Il fatto che nello spettro <sup>1</sup>H NMR registrato a temperatura ambiente sia presente un solo set di segnali, sta ad indicare che in queste condizioni è operativa una libera rotazione attorno ai legami Pd-carbene che porta ad una veloce interconversione tra le specie isomeriche.

Peculiare è il comportamento del complesso **4c-CIO<sub>4</sub>** il quale a temperatura ambiente mostra una flussionalità operativa con tempi dell'ordine di grandezza dei tempi NMR. Questo si può facilmente evincere dallo spettro protonico nel quale si osservano dei segnali allargati la cui molteplicità non è di facile identificazione. Alzando la temperatura a 333 K, alcuni di questi segnali si restringono agevolando la caratterizzazione. Per esempio, è stato possibile così assegnare tutti i picchi relativi al frammento indenilico e quelli caratteristici dei protoni dell'anello imidazolico. Purtroppo, l'incipiente decomposizione del complesso a questa temperatura non ha consentito la registrazione dello spettro <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR, che per sua natura richiede tempi di acquisizione molto più lunghi.

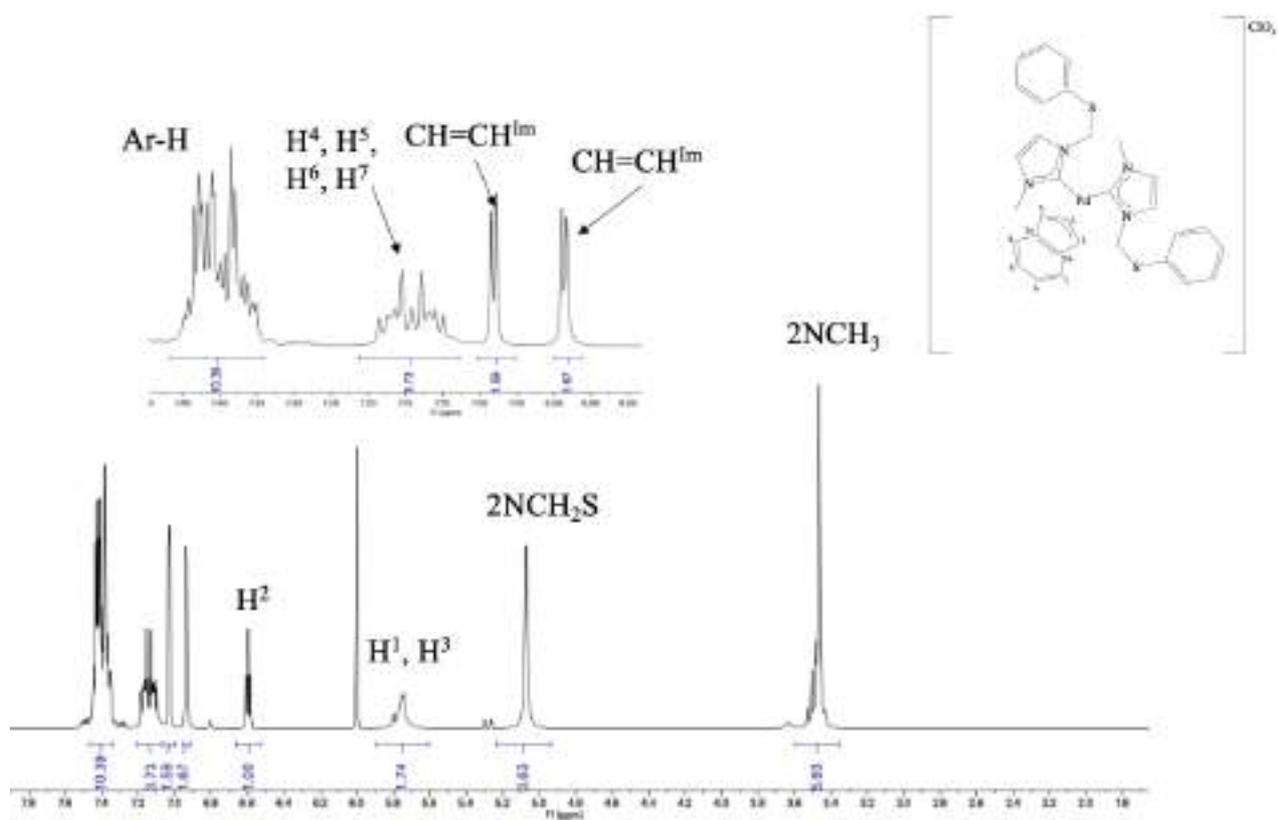
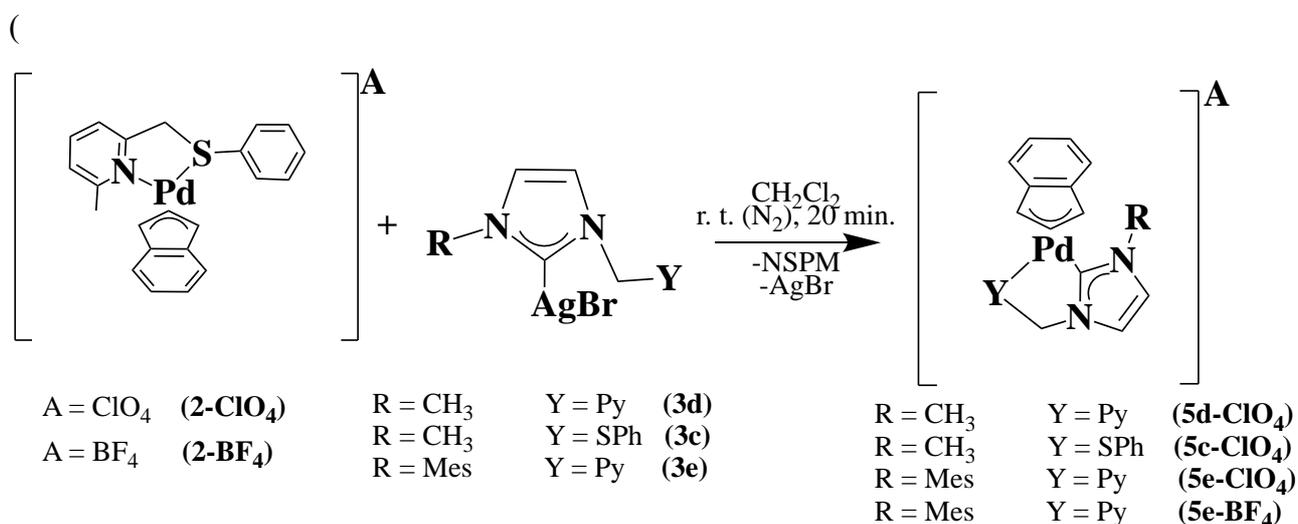


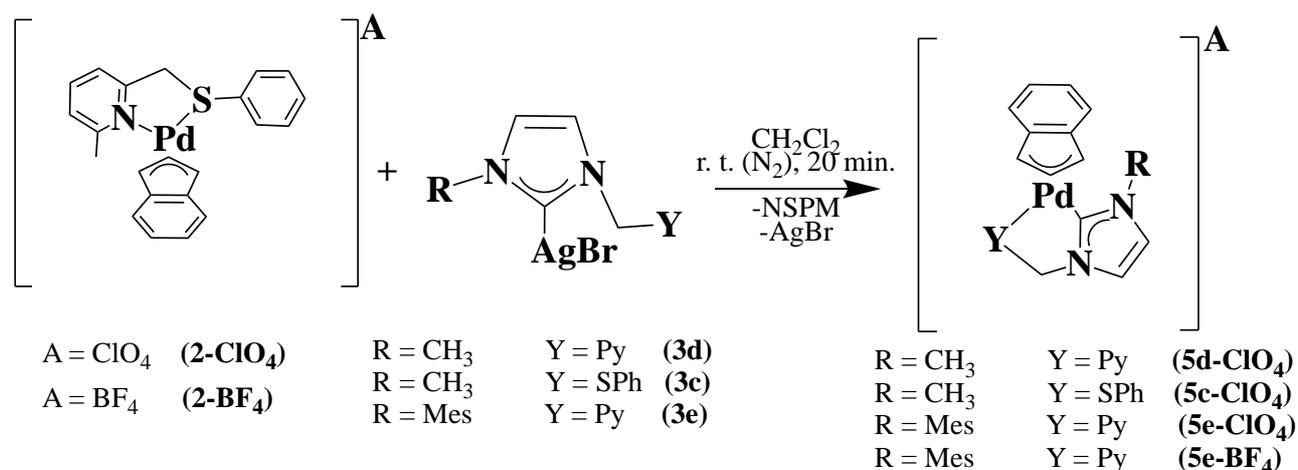
Figura 36. Spettro  $^1\text{H}$  NMR di  $4c\text{-ClO}_4$  in  $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$  a  $T=333\text{ K}$ .

## Sintesi dei complessi di Pd(II) con leganti monocarbenici dotati di una seconda funzione coordinante

Questa seconda categoria di complessi indenilici di palladio è caratterizzata dalla presenza un di solo legante carbenico *N*-eterociclico, il quale però porta su un suo sostituito all'azoto una seconda funzione coordinante. Nel caso specifico si tratta di una piridina e di un tioetere. La via sintetica adottata per questa nuova classe di composti è la stessa descritta nel paragrafo precedente, vale a dire quella della transmetallazione. Ovviamente, volendo sfruttare per la coordinazione anche il secondo dente coordinante ed ottenere così il prodotto finale chelato, il corretto rapporto stechiometrico da utilizzare tra il precursore di palladio ed il complesso di argento sarà 1:1



Schema 8).



Schema 8. Reazione di sintesi dei complessi monocarbenici bidentati via transmetallazione

Anche in questo caso è stato possibile constatare visivamente l'evolversi della reazione, potendo osservare già dalle prime aggiunte del reattivo di argento, un repentino cambiamento del colore della miscela di reazione dal marrone cupo, tipico del precursore di palladio, ad un più tenue giallo senape; il tutto accompagnato dalla progressiva e copiosa precipitazione di bromuro di argento.

Con questa via sintetica è stato possibile sintetizzare 4 nuovi complessi carbenici i quali sono stati ottenuti puri e con una buona resa, utilizzando degli agenti precipitanti opportuni.

La loro natura è stata confermata in maniera chiara sfruttando le informazioni desumibili dalla spettroscopia NMR.

Per quello che riguarda i complessi con i due leganti piridinici è possibile rintracciare negli spettri  $^1\text{H}$  NMR il set di segnali caratteristici del frammento Pd-Indenile che in questo caso, considerata la ditopicità del legante spettatore, sono 7; in particolare si possono distinguere i protoni  $\text{H}^1$  e  $\text{H}^3$ , con il primo (legato al carbonio in *trans* al dente carbenico) che giace a *chemical shift* sensibilmente più alti del secondo (in *trans* al dente piridinico) e quest'effetto risulta enfatizzato quando il secondo sostituente sull'anello imidazolico è il mesitile, (per effetto probabilmente della corrente di anello su  $\text{H}^3$ ). Il protone centrale  $\text{H}^2$  assume sempre una struttura di tripletto ed è localizzato attorno ai 6.7-6.8 ppm. Infine, i picchi relativi ai protoni indenilici benzenoidi si presentano come dei multipletti situati tra i 7.5 e 8 ppm anche se sono talvolta sovrapposti ai segnali aromatici del legante spettatore. È possibile altresì accertarsi della coordinazione del legante rintracciando negli stessi spettri alcuni loro segnali caratteristici. Tra essi i protoni imidazolici, presenti come due doppietti intorno 6.9 e 7.5 ppm, mentre i protoni diastereotopici del ponte metilenico di raccordo tra l'anello imidazolico e quello piridinico, originano un sistema AB localizzabile nell'intervallo 5-5.8 ppm. Vanno poi citati i protoni dell'anello piridinico, tra i quali si distinguono sempre dal resto dei protoni aromatici quelli in *para* ed in *orto* all'azoto piridico perché giacciono immancabilmente a campi più bassi.

Nel caso infine dei complessi recanti il legante dotato di sostituente mesitilico, sono presenti, in un intervallo compreso tra 1.5 e 2.5 ppm, i 3 singoletti relativi ai gruppi metilici. Il fatto che siano distinti indica che a temperatura ambiente risulta bloccata la rotazione attorno al legame N-Mesitile.

In Figura 37 si riporta a titolo esemplificativo lo spettro relativo al composto **5e-ClO<sub>4</sub>**.

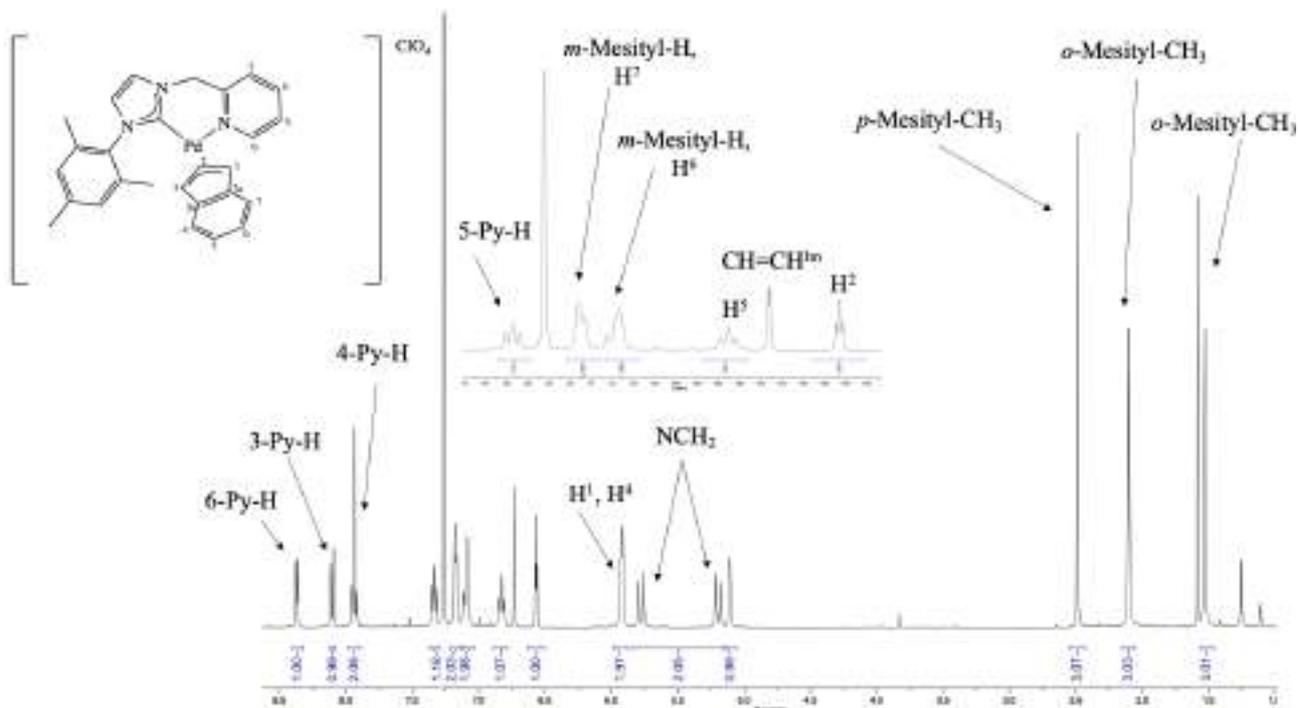


Figura 37. Spettro  $^1\text{H}$  NMR di  $5e\text{-C}_{104}$  in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$ .

In perfetto accordo con quanto dedotto dagli spettri protonici, anche in quelli  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR è possibile identificare i carboni caratteristici del frammento indenilico; in particolare il  $\text{C}^3$  (in *trans* al dente piridinico) può essere rivenuto intorno a 70 ppm, mentre il  $\text{C}^1$  (in *trans* al dente carbenico) a ppm significativamente più elevati, (tra 88 e 89). Questa evidenza trova la sua spiegazione nella maggior *trans*-influenza del carbene, che desimmetrizza la struttura indenilica conferendo maggior carattere  $\text{sp}^2$  al carbonio  $\text{C}^1$  e maggior carattere  $\text{sp}^2$  al carbonio  $\text{C}^3$ . Infine, sempre tra quelli maggiormente implicati nell'interazione con il centro metallico è opportuno ricordare il carbonio  $\text{C}^2$ , situato intorno ai 111-113 ppm.

I carboni quaternari,  $\text{C}^{3a}$  e  $\text{C}^{7a}$ , coinvolti nella giunzione tra gli anelli a 5 e 6 termini, si possono identificare nei due segnali a *chemical shift* a cavallo tra 133 e 134 ppm.

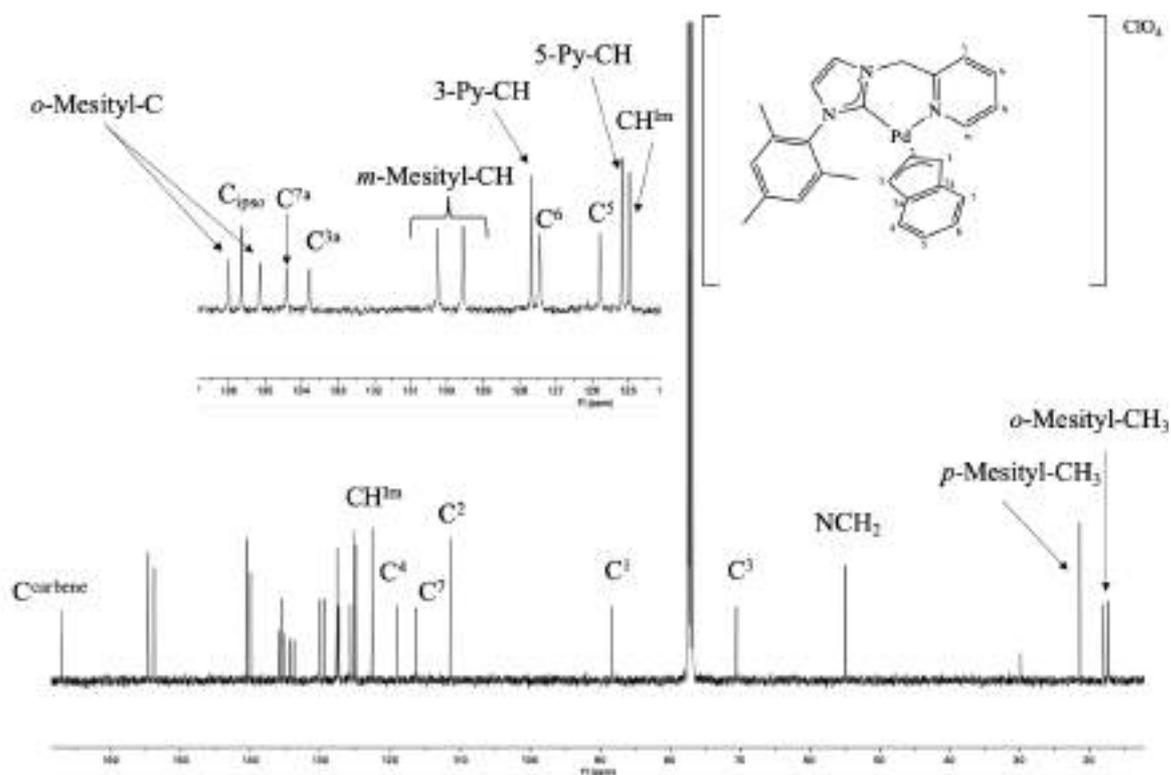


Figura 38. Spettro  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR di **5e-CIO<sub>4</sub>** in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$ .

Per ciò che concerne i segnali ascrivibili al legante spettatore, particolarmente diagnostico risulta quello relativo al carbonio carbenico coordinato sul centro metallico di palladio individuabile attorno a 167 ppm; per la sua assegnazione si è ricorso allo spettro bidimensionale HMBC, in cui tale carbonio mostra un intenso *cross-peak* con i due protoni dell'anello imidazolico.

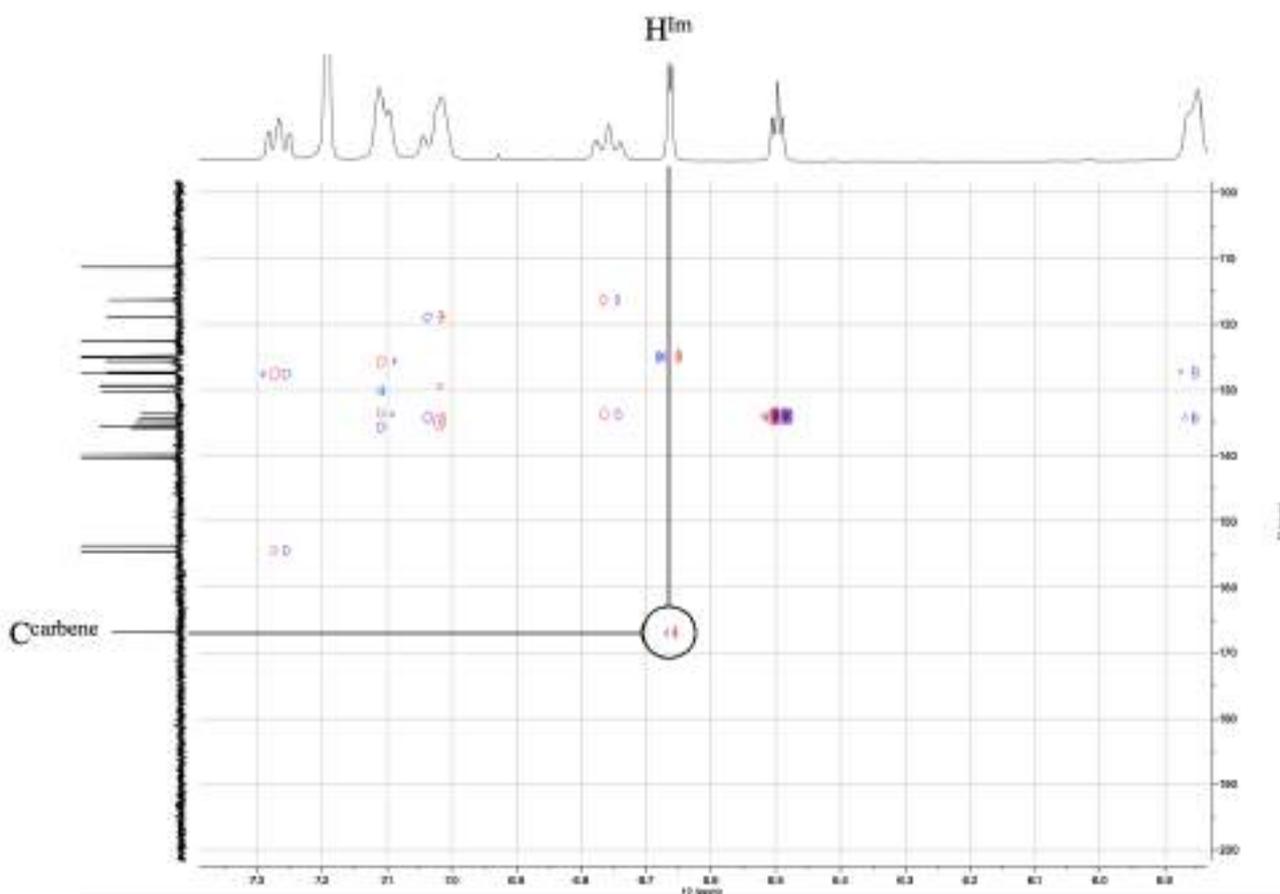


Figura 39. Spettro HMBC di **5e-ClO<sub>4</sub>** in CDCl<sub>3</sub> a T=298 K.

Da ultima, va evidenziata un'informazione di tipo strutturale riguardante i complessi **5d-ClO<sub>4</sub>**, **5e-ClO<sub>4</sub>** e **5e-BF<sub>4</sub>**, desumibile dai loro spettri NMR registrati a temperatura ambiente. Essi, infatti, mostrano immancabilmente la presenza di un solo set di segnali, quando si potrebbe aspettarsene due da attribuirsi ai due differenti possibili diastereoisomeri determinati dal reciproco posizionamento del frammento indenilico e del legante spettatore. Si potrebbe ipotizzare che a temperatura ambiente sia operativa una rapida interconversione tra i due isomeri (Figura 40).

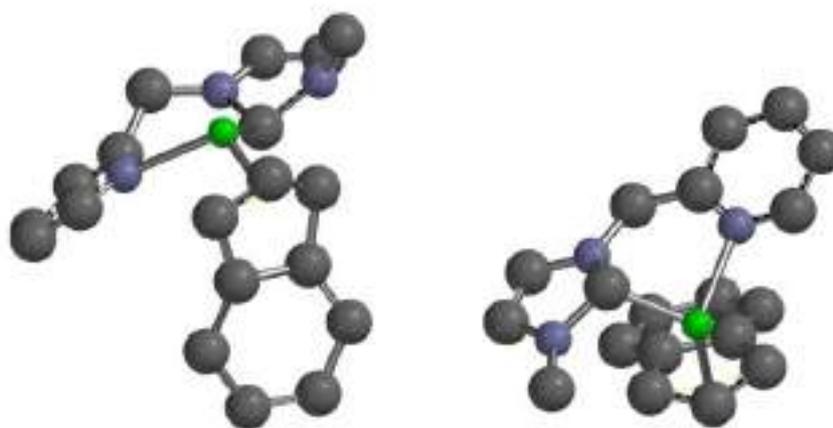


Figura 40. Strutture dei due isomeri endo e eso del complesso **5d-ClO<sub>4</sub>**

Per accertarsene abbiamo deciso di abbassare la temperatura fino 203 K (registrando lo spettro in diclorometano deuterato), per vedere se fosse possibile “congelare” questo movimento. Tale approccio ha lasciato lo spettro inalterato a significare che anche a questa temperatura il sistema permane flussionale oppure che uno solo dei due diastereoisomeri è presente in soluzione. Se valesse questa seconda ipotesi, da calcoli DFT l’isomero più stabile dovrebbe risultare quello *endo* (caratterizzato dal ponte metilenico e dalla punta del legante indenilico rivolti dalla stessa parte), che curiosamente è anche quello della struttura risolta con la diffrazione ai raggi x, dai cristalli ottenuti per il complesso **5d-ClO<sub>4</sub>** (Figura 41).

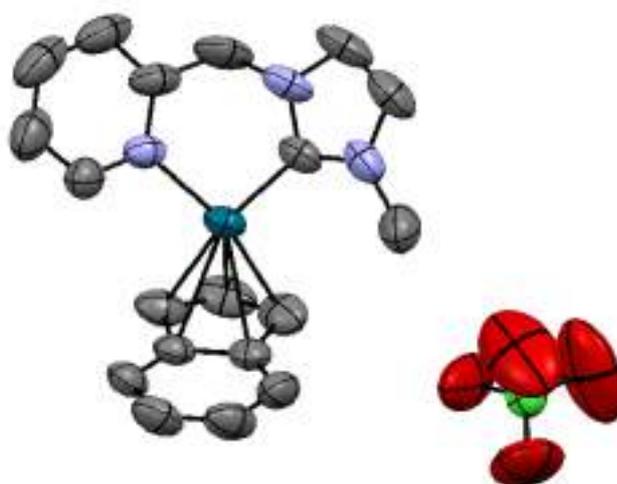


Figura 41. Struttura ai raggi X del complesso **5d-ClO<sub>4</sub>**

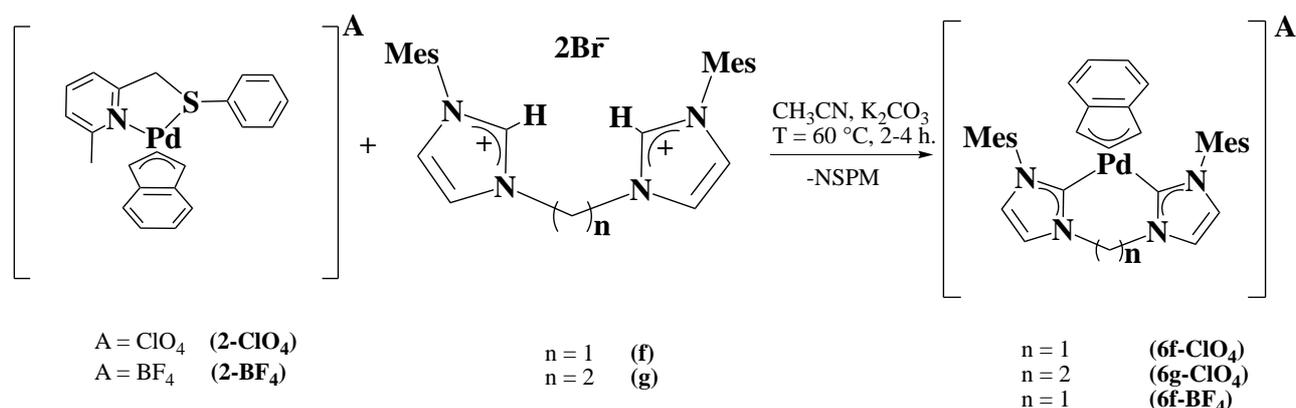
Per quanto riguarda il complesso **5c-ClO<sub>4</sub>**, in cui il legante spettatore chelante è di tipo tio-carbenico, lo spettro protonico registrato a temperatura ambiente è caratterizzato da una serie di segnali molto larghi a segnalare una flussionalità generalizzata del sistema. Va a tal proposito rilevato che, rispetto a quelli precedenti coordinanti i leganti piridil-carbenici, questo complesso presenta un’ulteriore opzione di movimento derivata dalla possibilità dell’atomo coordinante di zolfo di scambiare il doppietto con cui si lega al centro metallico.

Alzando la temperatura a 348 e 353 K (spettro registrato in 1,1-2,2-tetracloetano deuterato) si osserva una parziale semplificazione dello spettro <sup>1</sup>H NMR e si possono individuare alcuni picchi attribuibili al composto desiderato ma un’assegnazione completa non è ancora possibile.

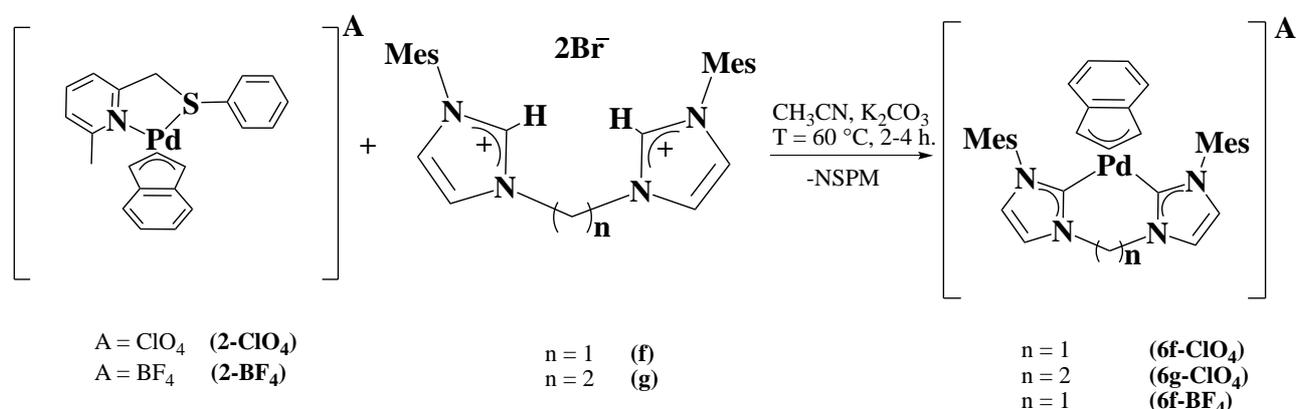
## Sintesi dei complessi di Pd(II) con leganti biscarbenici chelanti

Per quest'ultima categoria di complessi è stata utilizzata una procedura alternativa che prende il nome di "via della base debole", studiata ampiamente dal gruppo di Nolan<sup>25</sup>; questo protocollo di sintesi prevede l'utilizzo appunto di una base debole, nel nostro caso  $K_2CO_3$ , del sale di imidazolio come fonte carbenica (che deve però essere necessariamente piuttosto ingombrato) e del precursore metallico precedentemente sintetizzato. Le condizioni di reazione sono molto vantaggiose, in quanto è possibile lavorare all'aria e quindi non è indispensabile utilizzare un solvente anidro (nello specifico acetonitrile), come invece è opportuno fare con il metodo della transmetallazione. Diverse prove preliminari hanno permesso di definire quali fossero le condizioni di reazione migliori per la sintesi dei tre complessi Pd-indenilici con sostituenti mesitilici: il tempo di reazione ottimizzato è risultato di circa 2-4 ore e come eccesso di base sono sufficienti 6 equivalenti di potassio carbonato.

Il dettaglio del protocollo sintetico è compendiato nello



Schema 9.



Schema 9. Sintesi dei complessi biscarbenici bidentati via base debole

Va messo in evidenza che la metodica alternativa della transmetallazione non si è rivelata, in questo contesto, altrettanto selettiva. Bisogna ricordare a questo proposito che il gruppo di ricerca, presso

cui ho lavorato, aveva precedentemente sintetizzato analoghi composti con frammenti allilici anziché indenilici. In quel caso, utilizzando inizialmente la via della transmetallazione e con un precursore dotato del residuo 1,1-dimetil allilico, si era ottenuto oltre al prodotto desiderato anche un interessante ed inedito dimero di palladio in stato di ossidazione +1. Quest'ultimo è stato in seguito isolato e ampiamente caratterizzato (in Figura 42 è riprodotta la sua struttura ai raggi X)<sup>32</sup>.

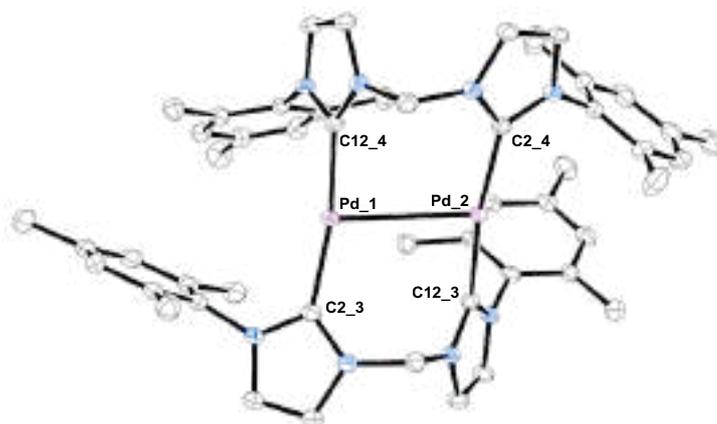
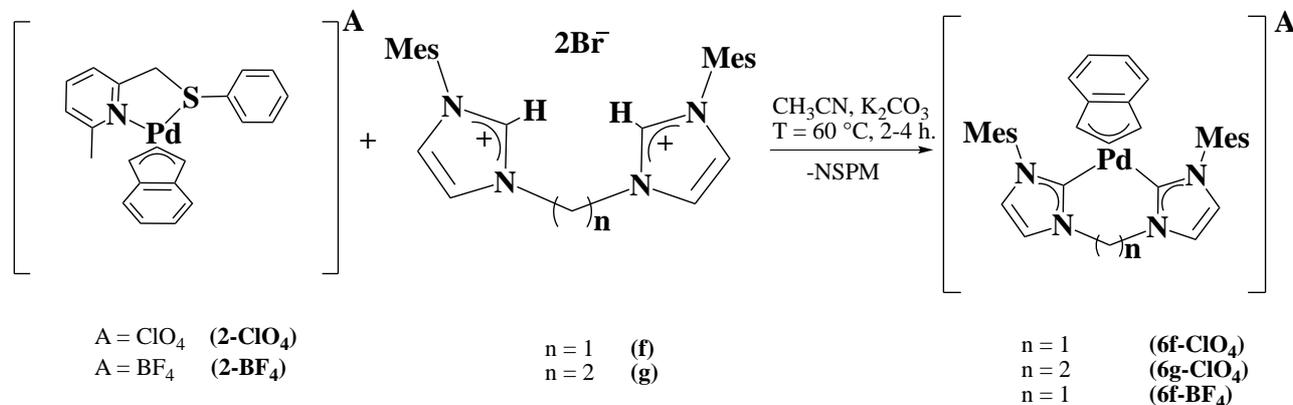


Figura 42. Struttura ai raggi X del dimero di palladio(I)

In quel caso l'adozione invece della strategia della base debole, aveva avuto come esito la produzione selettiva del complesso allilico di Pd(II)

Questa conoscenza pregressa, ci ha aiutato ad interpretare i risultati ottenuti quando abbiamo tentato di preparare, in prima battuta, i derivati indenilici con il metodo della transmetallazione. Infatti, usando nello specifico il precursore di argento **3f**, si è potuto osservare anche in questo caso la formazione di una cospicua quantità del succitato dimero di palladio(I).

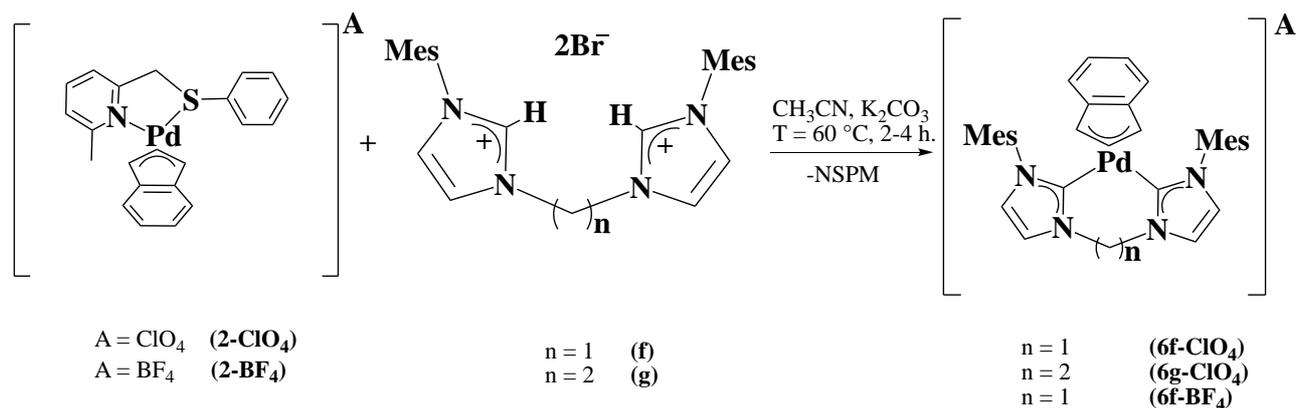
Viceversa, ottimizzando le condizioni di reazione della via della base debole è stato possibile ottenere selettivamente il complesso indenilico di Pd(II) desiderato (



Schema 9). Tuttavia, una serie di prove preliminari ha messo in evidenza come, anche con questo metodo, la buona riuscita dell'esperimento è garantita solo da un certo livello di ingombro sterico dei

sostituenti degli azoti imidazolici. Infatti, l'impiego di sostituenti metilici o benzilici porta o a decomposizione veloce o all'isolamento di prodotti difficilmente purificabili. Molto probabilmente il congestionamento sterico è necessario per stabilizzare la specie intermedia palladata che viene poi convertita nel prodotto finale dopo l'aggiunta della base<sup>25</sup>.

Al solito, l'analisi degli spettri NMR è risolutiva per la caratterizzazione dei complessi biscarbenici chelati



Schema 9; in essi infatti possono essere rintracciati tutti i segnali che ci attendiamo sia per il frammento indenilico che per il legante carbenico *N*-eterociclico.

Ovviamente, per questi composti la simmetria del legante spettatore semplifica significativamente gli spettri. Nel dettaglio, negli spettri <sup>1</sup>H NMR, i protoni H<sup>1</sup> e H<sup>3</sup> sono indistinguibili e danno vita ad un doppietto localizzato attorno a 4.8 ppm; per quanto riguarda invece il protone centrale, H<sup>2</sup>, lo si può identificare sotto forma di tripletto all'incirca a 5.5 ppm. I protoni dell'anello benzenoide invece generano due multipletti in due intervalli distinti, ripetitivamente a 6.2 e 6.8 ppm.

I segnali invece che permettono di confermare la coordinazione del legante carbenico sul centro di palladio sono, tra gli altri, i due doppietti relativi ai protoni imidazolici, osservabili uno a 6.8 ppm e l'altro tra i 7.5 e gli 8 ppm. Negli spettri sono anche facilmente identificabili i protoni dei ponti congiungenti i due anelli imidazolici, metilenico o etilenico. Essi assumono nel primo caso la struttura di un sistema AB, e nel secondo caso di due multipletti, in entrambe le circostanze localizzati ad un *chemical shift* compreso nell'intervallo 4.9-6.5 ppm. Infine, per quello che riguarda i sostituenti mesitilici, è possibile identificare tra 1.8 e 2.5 ppm i segnali relativi ai tre gruppi metilici, a sancire, anche in questo caso, una rotazione impedita attorno al legame N-Mesitile.

A titolo esemplificativo viene riportato lo spettro protonico relativo al complesso **6f-ClO<sub>4</sub>**.

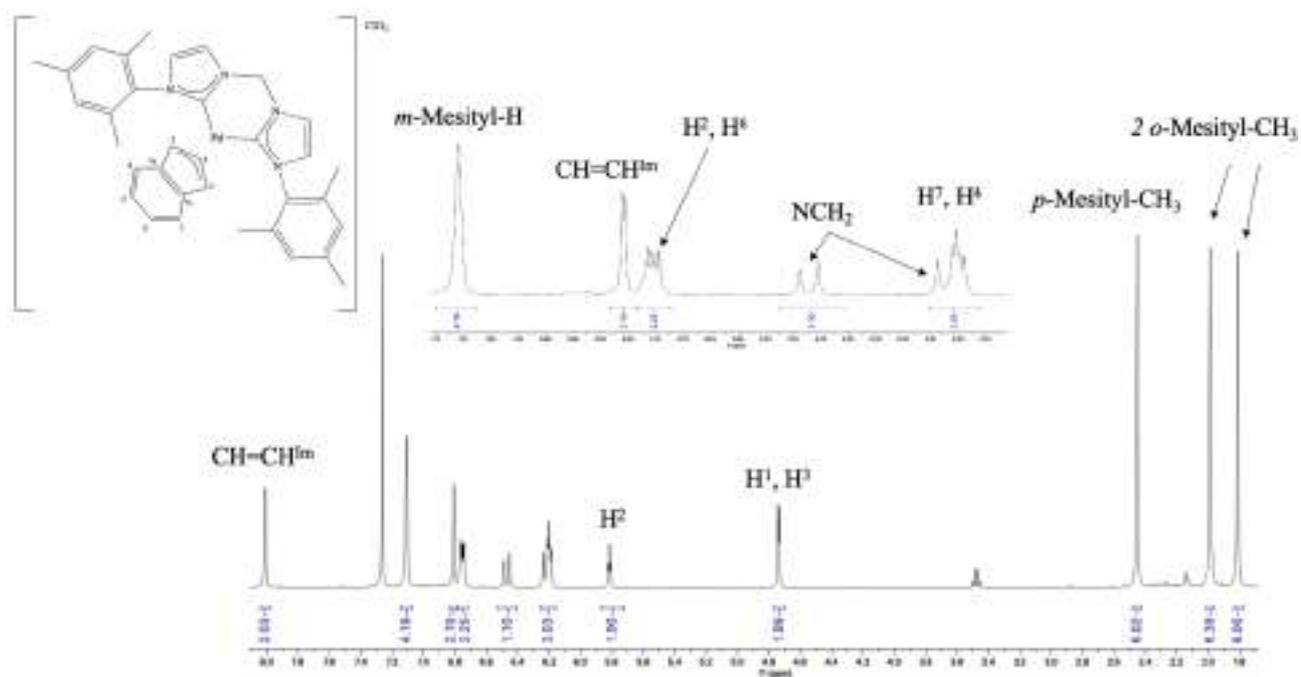


Figura 43. Spettro  $^1\text{H}$  NMR di **6f-C1O<sub>4</sub>** in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$ .

Per completare la caratterizzazione dei complessi in esame sono stati eseguiti anche gli spettri  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR, nei quali è sempre possibile identificare chiaramente i segnali appartenenti al legante indenilico. In particolare, il segnale relativo ai carboni  $\text{C}^1$  e  $\text{C}^3$ , come già detto chimicamente e magneticamente equivalenti, è rinvenibile a circa 78 ppm. Il carbonio centrale  $\text{C}^2$  è individuabile invece a *chemical shift* più elevati, vale a dire a circa 109 ppm. I carboni quaternari,  $\text{C}^{3a}$  e  $\text{C}^{7a}$ , responsabili della giunzione tra i due anelli indenilici, invece sono localizzati attorno a 132 ppm. Tra i segnali attribuibili al legante spettatore biscarbenico, tutti puntualmente definibili, risulta al solito particolarmente degno di menzione quello relativo ai carboni carbenici legati al centro metallico, localizzato tra i 163 e 167 ppm.

In Figura 44 si riporta lo spettro relativo al complesso **6f-C1O<sub>4</sub>**.

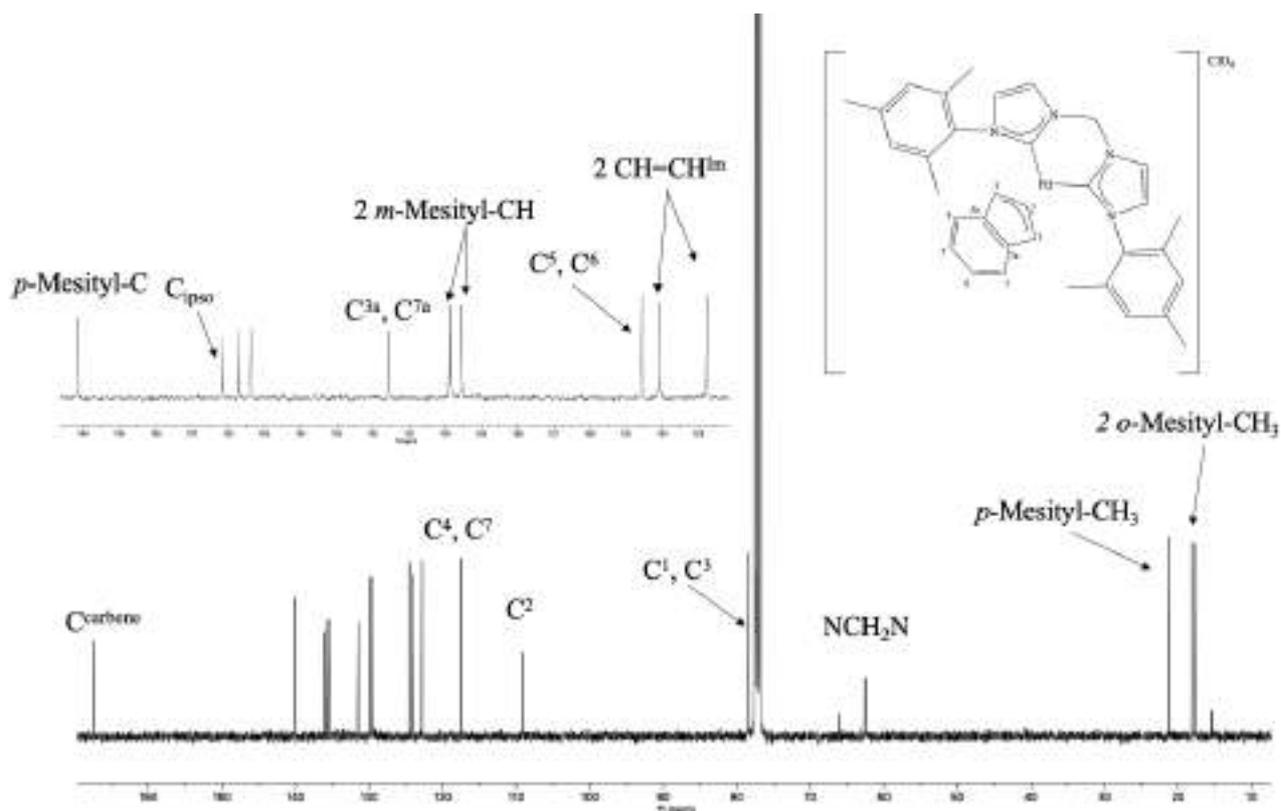


Figura 44. Spettro  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$  NMR di **6f-C104** in  $\text{CDCl}_3$  a  $T=298\text{ K}$

Confrontando gli spettri dei complessi in esame con gli analoghi allilici, sintetizzati in precedenza dal gruppo di ricerca, va messa in evidenza una differenza sostanziale. Allora gli spettri NMR erano caratterizzati, quando registrati a temperatura ambiente, da due set di segnali riconducibili a due differenti diastereoisomeri (*endo* ed *exo*) determinati ancora una volta dal diverso mutuo posizionamento del frammento indenilico e del legante spettatore. Questo non è invece osservato per i complessi indenilici qui descritti, e l'unico set di segnali rintracciabile non si sdoppia nemmeno abbassando la temperatura a 203 K (operazione fatta per i complessi **6f-C104** e **6g-C104**). Questo può significare, ancora una volta, che l'interconversione tra i due possibili isomeri è operativa anche a bassa temperatura o che solo uno dei due è presente in soluzione. Se valesse questa seconda ipotesi risulta probabile che questa specie sia quella termodinamicamente più stabile, che da calcoli DFT è, per circa 0.5 kcal/mol, quella *endo* (distinguibile per avere la punta del frammento indenilico ed il ponte tra i due anelli imidazolici del legante spettatore dalla stessa parte). La struttura dell'isomero *endo* è anche quella ottenuta allo stato solido mediante analisi ai raggi X (Figura 45).

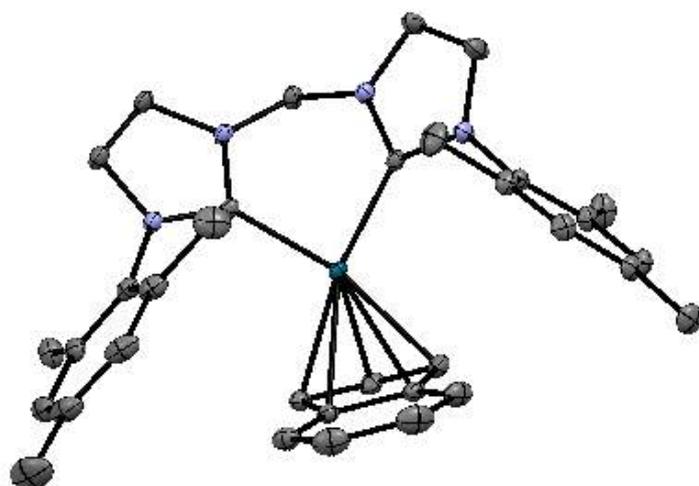


Figura 45. Struttura ai raggi X di **6f-ClO<sub>4</sub>**, il controione è stato omissso per chiarezza

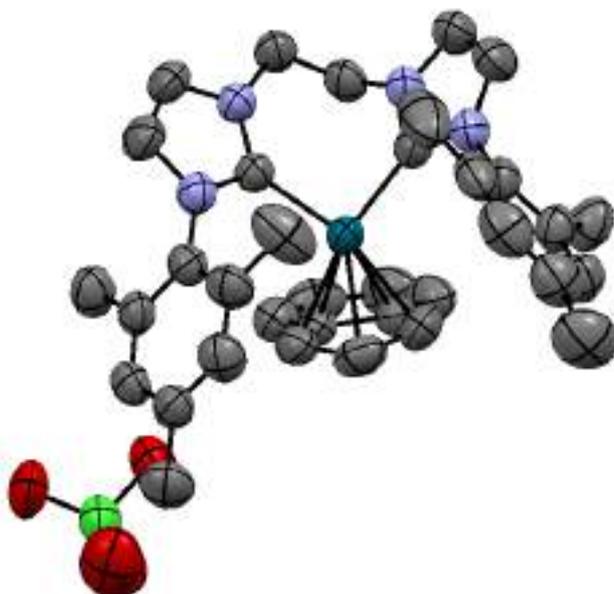


Figura 46. Struttura ai raggi X di **6g-ClO<sub>4</sub>**

## Apticità

Una caratteristica strutturale molto importante dei composti indenilici dei metalli di transizione riguarda l'apticità, vale a dire il numero di atomi di carbonio coinvolti nell'interazione con il centro metallico. Questa, infatti, può influire significativamente sulla stabilità e sulla reattività di questi substrati. Come già accennato nel capitolo introduttivo, sono stati messi a punto due differenti approcci per affrontare il problema. Il primo, proposto originariamente da Baker e Tulip, è basato sui *chemical shift* dei carboni di giunzione C<sup>3a</sup> e C<sup>7a</sup>, osservati dagli spettri <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR ed è pertanto in grado di descrivere meglio il sistema in soluzione<sup>27</sup>.

I valori di C<sup>3a</sup> e C<sup>7a</sup>, unitamente al parametro chiave  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  (che ricordiamo essere  $\Delta\delta_{\text{AV}}(^{13}\text{C}) = \delta_{\text{AV}}(\text{C}^{3a/7a} \text{ of M-Ind}) - \delta_{\text{AV}}(\text{C}^{3a/7a} \text{ of Na}^+\text{Ind}^-)$ ), per i complessi aventi come controione il perclorato sono riassunti in Tabella 2. Va comunque evidenziato che, come si poteva ragionevolmente prevedere, i valori relativi ai complessi con i differenti controioni, BF<sub>4</sub><sup>-</sup> e OTf, risultano identici agli analoghi col ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

Complesso	C <sup>3a</sup> (ppm)	C <sup>7a</sup> (ppm)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
<b>4a - ClO<sub>4</sub></b>	134.5	134.5	3.8
<b>4b - ClO<sub>4</sub></b>	134.3	134.3	3.6
<b>5e- ClO<sub>4</sub></b>	133.8	134.4	3.4
<b>5d- ClO<sub>4</sub></b>	135.4	136.1	2.5
<b>6f- ClO<sub>4</sub></b>	131.6	131.6	0.9
<b>6g-ClO<sub>4</sub></b>	132.8	132.8	2.1

Tabella 2. Calcolo  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  per la valutazione dell'apticità dell'Indenile

Da questi valori, si può desumere che nei complessi di palladio sintetizzati in questo lavoro di tesi il residuo indenilico si lega al centro metallico con un'apticità intermedia tra 3 e 5, il che significa che gli atomi di carbonio C<sup>1</sup>, C<sup>2</sup> e C<sup>3</sup> sono quelli che maggiormente contribuiscono ad ancorarlo al centro metallico ma anche i carboni C<sup>3a</sup> e C<sup>7a</sup> sono in qualche modo coinvolti nell'interazione.

Il secondo metodo di valutazione dell'apticità è basato su parametri strutturali desunti dalle strutture ai raggi X, ed è pertanto più adatto a descrivere la situazione dei complessi allo stato solido. Questi parametri, che riguardano angoli e distanze di legame (come visualizzato nelle Figura 47 e Figura 48), vengono compendati in Tabella 3, e sono riferiti a tutti quei complessi indenilici da noi sintetizzati per i quali è stato possibile risolvere la struttura ai raggi X.

Complesso	HA (°)	FA (°)	$\Delta M - C$ (Å)
<b>5d - ClO<sub>4</sub></b>	14.43	12.93	0.34
<b>6g - ClO<sub>4</sub></b>	13.87	11.79	0.32
<b>6f - ClO<sub>4</sub></b>	13.69	14.44	0.35
<b>2-ClO<sub>4</sub></b>	16.91	14.83	0.42

Tabella 3. Angoli e distanze necessari per la valutazione dell'apticità; rispettivamente  
 - HA: angolo tra il piano C<sup>1</sup> C<sup>2</sup> e C<sup>3</sup> e il piano C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>, C<sup>3a</sup> e C<sup>7a</sup>  
 - FA: angolo tra il piano C<sup>1</sup> C<sup>2</sup> e C<sup>3</sup> e il piano C<sup>3a</sup>, C<sup>4</sup>, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>, C<sup>7</sup> e C<sup>7a</sup>  
 -  $\Delta M - C$  : distanza media tra il metallo e ogni carbonio dell'anello ciclopentadienilico

Anche da questi dati è possibile che l'apticità del frammento indenilico nei nostri complessi sia intermedia tra 3 e 5. Il fatto, tuttavia, che tutti e tre i parametri (HA, FA e  $\Delta M-C$ ) relativi al precursore tiopiridinico **2-ClO<sub>4</sub>** siano sensibilmente maggiori di quelli dei complessi carbenici, indica una maggior propensione del primo per la tri-apticità.

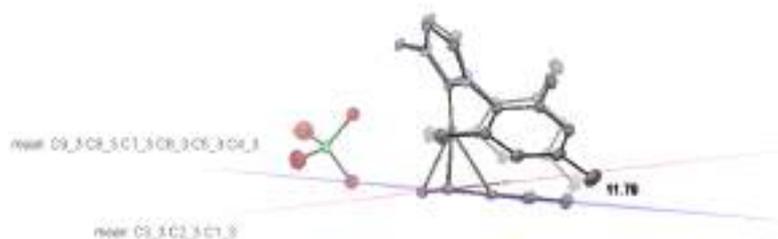


Figura 47. Struttura ai raggi X del complesso **6f - ClO<sub>4</sub>** con esplicitato l'angolo FA

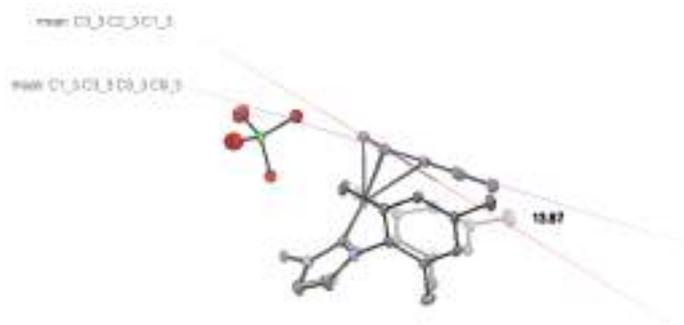


Figura 48. Struttura ai raggi X del complesso **6f - ClO<sub>4</sub>** con esplicitato l'angolo FA



## Test in vitro

La seconda parte del lavoro di tesi è incentrata sulla valutazione dell'attività antitumorale dei composti sintetizzati e ampiamente discussi nel capitolo precedente. Prima di eseguire i test biologici, si è accertata, mediante un monitoraggio con spettroscopia NMR, la stabilità dei complessi nella miscela di solventi DMSO/D<sub>2</sub>O. Questo tipo di soluzioni riproducono quelle da cui verranno prelevate le aliquote di campioni da immettere nelle colture cellulari.

Questa parte del lavoro è stata svolta in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Rizzolio. In particolare, i test sono stati eseguiti su 4 linee cellulari di adenocarcinoma ovarico cisplatino sensibili (A2780, OVCAR5, OVCAR3 e KURAMOCHI), su una linea cellulare cisplatino resistente (A2780cis) ed infine per comparazione, su una linea di cellule normali derivate da fibroblasti polmonari (MRC5).

Tutte le linee cellulari, prima di poter essere utilizzate, sono state preparate per permetterne il trattamento con i complessi e la successiva lettura dei dati ottenuti. Il protocollo prevede un primo stadio di scongelamento delle cellule, che sono tipicamente conservate in azoto liquido all'interno di *cryovials*. Ogni linea necessita quindi per la proliferazione ottimale di trattamenti e di un terreno di coltura specifici; nel dettaglio si utilizza RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) per le cellule tumorali e MEM (*Minimum Essential Medium*) per le cellule normali, terreni che si differenziano nella composizione in quanto le due categorie di cellule hanno un fabbisogno energetico diverso. Va menzionato inoltre che per le A2780cis al terreno di coltura è stato aggiunto anche il cisplatino così da mantenere la resistenza indotta da questo farmaco a base metallica. Le colture poste in piastre Petri vengono mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> e controllate costantemente per verificarne lo stato di salute e la corretta proliferazione.

I test di attività antiproliferativa veri e propri si sono articolati in più passaggi. Il primo ha previsto il piastramento di un numero noto di cellule in *multiwell* da 96 pozzetti i quali sono poi posti nuovamente in incubatore, a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, per 24 ore. Nello specifico, si è deciso di utilizzare all'incirca 1500 cellule per pozzetto per le cellule tumorali, mentre per le cellule sane (MRC5) si è optato per 8000 cellule per pozzetto dovendo tener conto che i fibroblasti hanno una maggior difficoltà a proliferare, ed è quindi necessario partire già con un numero elevato di cellule per poter poi rendere più affidabile la successiva lettura del dato. Per il trattamento è stata preparata per ciascuno dei complessi sintetizzati, una soluzione madre a concentrazione 10 mM in DMSO e da questa, diluita opportunamente con l'adatto terreno di coltura, sono state ricavate le 6 concentrazioni

finali (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ,  $10^{-1}$   $\mu\text{M}$ ,  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$  e  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ ) che serviranno per costruire i punti della curva per l'estrapolazione dell' $\text{IC}_{50}$ .

Al termine delle 24 ore richieste per la proliferazione, le cellule sono state trattate in triplicato aggiungendo un'opportuna quantità di complesso in ciascun pozzetto (100  $\mu\text{L}$ ) in modo da riprodurre la scala di concentrazioni sopra riportata. Le piastre *multiwell* sono quindi state riposte nuovamente in incubatore a  $37^\circ\text{C}$  in atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$  per 96 ore. Trascorso il tempo opportuno, il protocollo di lettura ha previsto la rimozione del terreno da ciascun pozzetto e l'aggiunta di una soluzione di PBS (tampone fosfato salino) e "Cell titer Glo" (in rapporto 1:1), il quale promuove la lisi cellulare permettendo quindi di quantificare le cellule ancora in vita sulla base della quantità di ATP che queste ultime sono in grado di sviluppare.

Mediante l'utilizzo del *software* GraphPad Prism, i valori di luminescenza osservati dallo strumento Synergy™ H1, sono stati plottati in funzione del logaritmo della concentrazione ed è stato così possibile ottenere il valore di  $\text{IC}_{50}$  attraverso una regressione non lineare, della quale in seguito si riporta la formula dove con Y è indicata la luminescenza e con X il logaritmo della concentrazione.

$$Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \cdot \text{Hillslope})}}$$

Nel caso in cui un composto risulti molto attivo si osserverà un andamento sigmoidale della curva, mentre quando l'attività citotossica è minimale, nelle condizioni di lavoro utilizzate, il *fitting* restituisce un andamento più tendente al lineare. Le due situazioni sono illustrate nelle figure sottostanti.

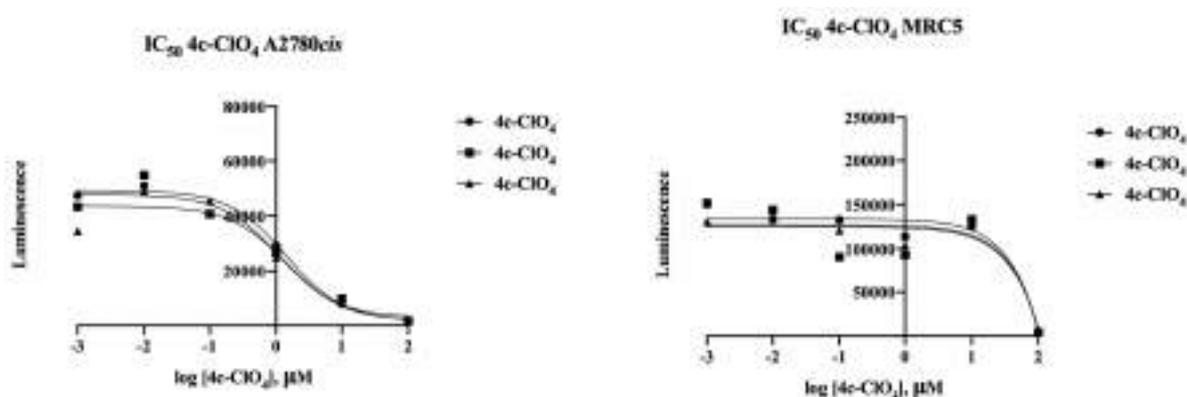


Figura 49. Confronto grafici relativi al calcolo dell' $\text{IC}_{50}$  del complesso  $4c\text{-ClO}_4$  in una linea di carcinoma ovarico e in una linea normale.

Di seguito si riportano le strutture generali delle 3 classi di complessi sintetizzate (Figura 50).

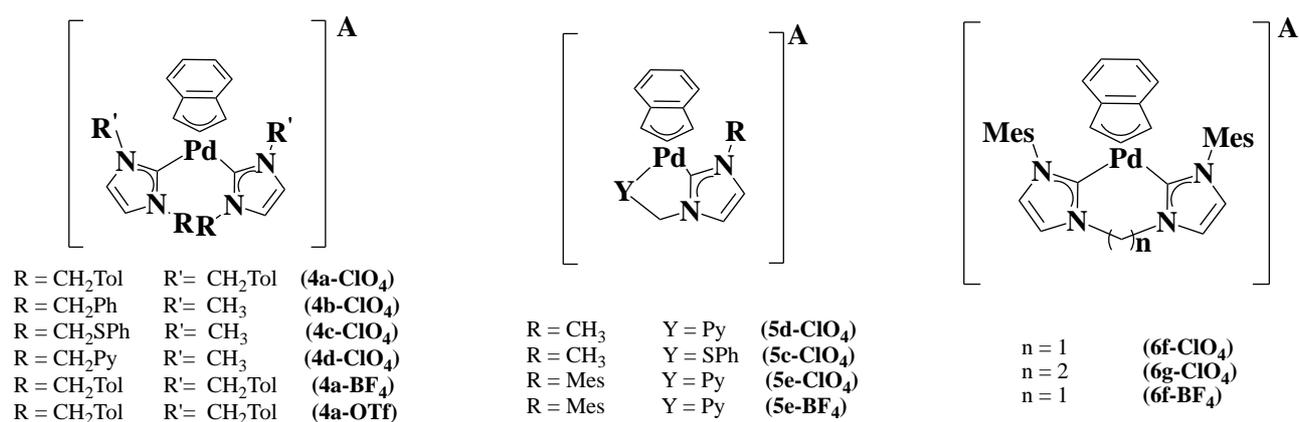


Figura 50. Struttura generale delle 3 classi di complessi Palladio-indenilici

Tutti i valori ottenuti di IC<sub>50</sub> relativi alle diverse linee cellulari utilizzate sono riassunti nella Tabella 4.

Complessi	IC <sub>50</sub> (μM)					
	A2780	A2780cis	OVCAR5	KURAMOCHI	OVCAR3	MRC5
<b>cisplatino</b>	0.58 ± 0.06	9.3 ± 0.4	1.6 ± 0.1	0.60 ± 0.05	0.14 ± 0.01	2.3 ± 0.1
<b>4a-ClO<sub>4</sub></b>	0.29 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.2 ± 0.1	0.59 ± 0.04
<b>4b-ClO<sub>4</sub></b>	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.6	1.4 ± 0.2	5 ± 1	8 ± 2	>100
<b>4c-ClO<sub>4</sub></b>	3.15 ± 0.06	3.6 ± 0.4	4 ± 1	10 ± 1	27 ± 22	>100
<b>5c- ClO<sub>4</sub></b>	11.7 ± 0.7	>100	>100	>100	>100	>100
<b>5d-ClO<sub>4</sub></b>	11.9 ± 0.9	9 ± 1	>100	56 ± 6	64 ± 15	37 ± 14
<b>5e-ClO<sub>4</sub></b>	3.5 ± 0.3	1.7 ± 0.4	3.2 ± 0.7	3.9 ± 0.4	0.6 ± 0.3	9 ± 1
<b>6f- ClO<sub>4</sub></b>	0.0803 ± 0.0008	0.019 ± 0.004	0.045 ± 0.001	0.12 ± 0.04	0.013 ± 0.003	0.49 ± 0.05
<b>6g- ClO<sub>4</sub></b>	0.089 ± 0.005	0.10 ± 0.05	0.036 ± 0.009	0.06 ± 0.02	0.011 ± 0.002	0.6 ± 0.2
<b>4a-BF<sub>4</sub></b>	0.28 ± 0.06	0.25 ± 0.09	0.27 ± 0.08	0.29 ± 0.04	0.2 ± 0.1	1.8 ± 0.3
<b>5e- BF<sub>4</sub></b>	0.20 ± 0.02	1.86 ± 0.08	1.35 ± 0.029	3.40 ± 0.44	0.6 ± 0.2	>100
<b>6f- BF<sub>4</sub></b>	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.016 ± 0.003	0.79 ± 0.06
<b>4a-OTf</b>	0.25 ± 0.01	0.29 ± 0.06	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.2 ± 0.1	0.51 ± 0.04

Tabella 4. Valori IC<sub>50</sub> relativi alle diverse linee di carcinoma ovarico con i relativi confronti col cisplatino

Dall'analisi dei dati riportati Tabella 4 è possibile proporre alcune considerazioni generali, riguardanti l'attività dei complessi preparati su ciascuna delle linee cellulari testate, tenendo sempre come punto di riferimento l'attività inibitoria promossa dal cisplatino. L'ordine di discussione segue l'ordine crescente di aggressività delle linee tumorali di carcinoma ovarico, come discusso nella parte introduttiva<sup>4, 3</sup>.

- A2780: si può concludere che tutti i complessi in esame risultano citotossici verso questa linea cellulare, con un'attività nella maggior parte dei casi assolutamente comparabile a quella del cisplatino. Scendendo un po' più nel dettaglio si può osservare che risultano più performanti i derivati biscarbenici chelati, e meno citotossici quelli dotati di legante eteroditopico con una funzione carbenica e una piridinica o tioeterea.
- A2780cis: per questa linea cisplatino resistente, i complessi da noi sintetizzati conservano una citotossicità paragonabile all'omologa cisplatino sensibile A2780. Questo fatto ovviamente rende i nostri composti più attivi su queste cellule di almeno un ordine di grandezza rispetto al cisplatino. L'unica notevole eccezione è rappresentata dal complesso piridil-carbenico **5c-CIO<sub>4</sub>**, il quale sembra non essere attivo. Di seguito si riportano due fotografie, le quali illustrano nel primo caso le cellule ancora in vita, nel secondo invece, in seguito al trattamento, si vede chiaramente la loro diminuzione.

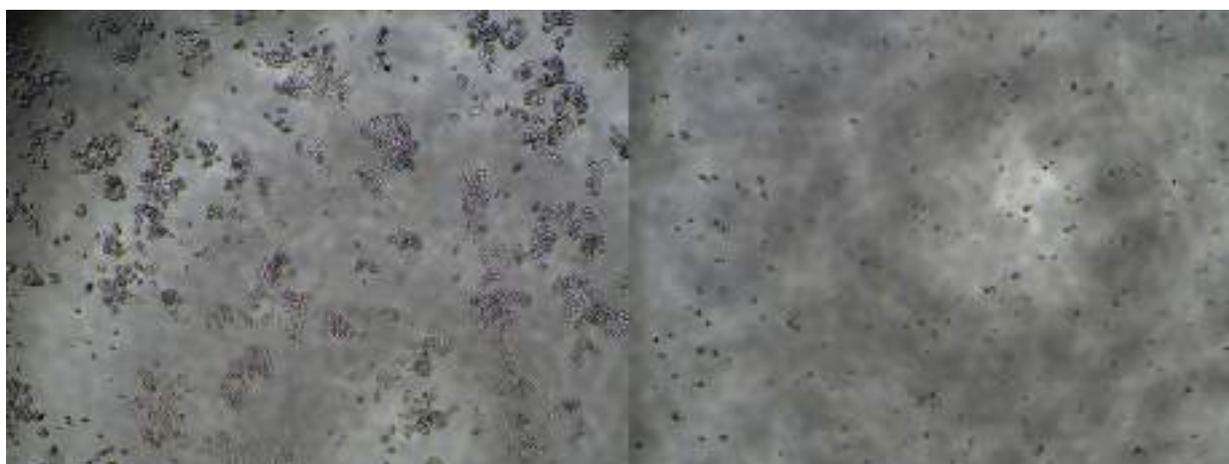
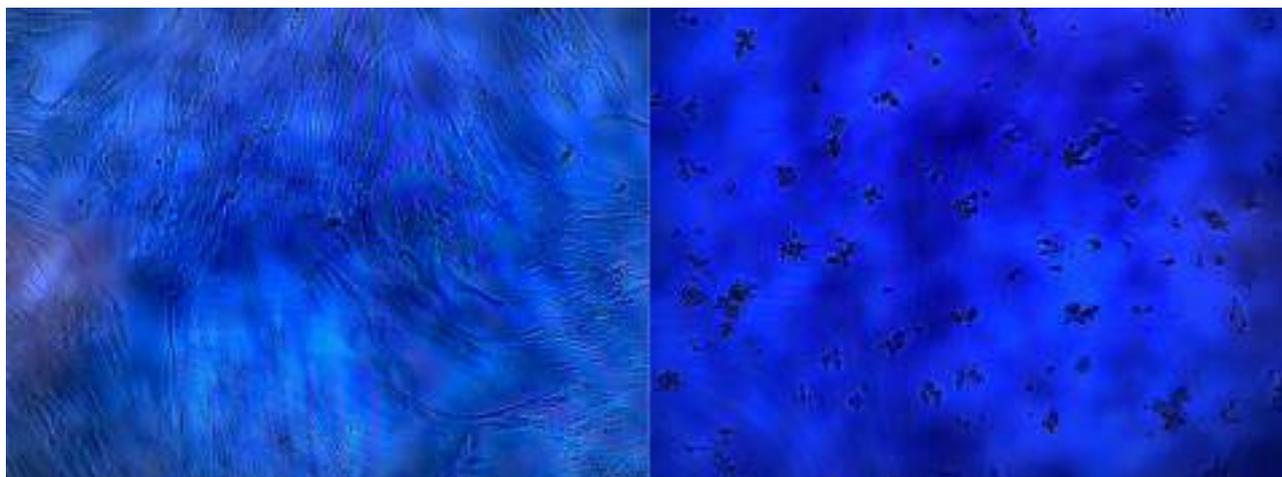


Figura 51. A2780cis, prima del trattamento con **4a-CIO<sub>4</sub>** e dopo il trattamento.

- OVCAR5: per questa linea cellulare i valori di IC<sub>50</sub> iniziano a mostrare una maggior variabilità ed alcune diversificazioni tra le classi di composti già osservate per le due linee precedenti vengono qui enfatizzate. Così i derivati dotati di due leganti carbenici monodentati mostrano un'attività citotossica paragonabile a quella del cisplatino, a fronte di quelli con leganti biscarbenici chelanti per i quali si osservano valori di IC<sub>50</sub> nettamente inferiori (di

quasi due ordini di grandezza). Scarsamente citotossici si rivelano invece i derivati con il legante piridil-carbenico **5d-CIO<sub>4</sub>** e con quello tioetero-carbenico **5c-CIO<sub>4</sub>**.

- KURAMOCHI: i valori osservati per la linea cellulare in esame non sembrano significativamente diversi rispetto a quella analizzata in precedenza, confermando il differente comportamento tra i tre gruppi di complessi precedentemente individuati.
- OVCAR3: Nonostante l'aumento del livello di complessità e sensibilità della linea cellulare comporti una maggior variabilità dei valori di citotossicità vengono sostanzialmente confermate le tendenze individuate per le OVCAR5 e le KURAMOCHI.
- MRC5: la citotossicità dei nostri composti sulla linea di cellule non tumorali sembra essere quasi sempre proporzionalmente minore che sulle cellule tumorali, riproponendo però gli stessi andamenti. In seguito si riportano due immagini dove è possibile osservare chiaramente la morte cellulare in seguito al trattamento con uno dei complessi in esame.



*Figura 52. MRC5 prima e dopo il trattamento con 4a-CIO<sub>4</sub>*

Dopo questa prima carrellata di considerazioni, in cui sono state analizzate le attività dei nuovi complessi indenilici di palladio per ogni linea cellulare esaminata, proponiamo alcune comparazioni finalizzate ad evidenziarne la selettività (intendendo con questo termine la capacità di un potenziale farmaco antitumorale di essere attivo preferibilmente su cellule tumorali e non su cellule normali come le MRC5), e contestualmente le differenze con gli omologhi complessi recanti il frammento allilico al posto di quello indenilico, che come già detto sono stati studiati in precedenza dal nostro gruppo di ricerca. Per rendere più agevole questo ultimo compito riportiamo a seguire in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**, in maniera comparata i dati disponibili relativi alle due classi di composti (Figura 53).

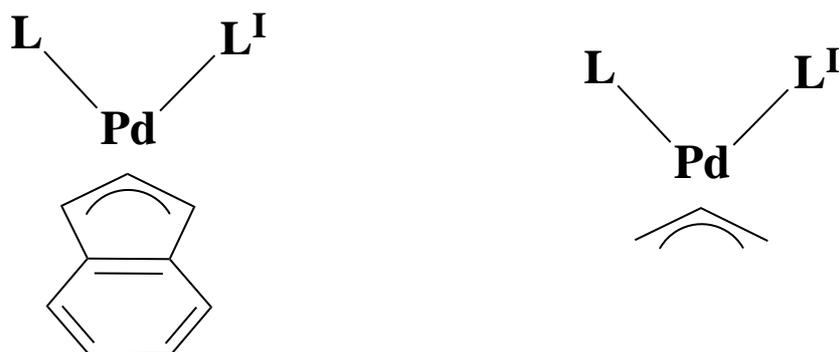


Figura 53. Struttura generale di un complesso palladio-indenile e palladio-allile

sigla	IC <sub>50</sub> (μM)					
	A2780	A2780cis	OVCAR5	KURAMOCHI	OVCAR3	MRC5
4c-ClO <sub>4</sub>	3.15 ± 0.06	3.6 ± 0.4	4 ± 1	10 ± 1	27 ± 22	>100
Analogo allilico	0.031 ± 0.004	0.8 ± 0.2	2.9 ± 0.7	/	/	>100
5c-ClO <sub>4</sub>	11.73 ± 0.66	>100	>100	>100	>100	>100
Analogo allilico	0.44 ± 0.05	2.9 ± 0.6	6 ± 2	3.6 ± 0.4	0.2 ± 0.1	45 ± 12
5d-ClO <sub>4</sub>	11.92 ± 0.94	34 ± 6	>100	56 ± 6	64 ± 15	37 ± 14
Analogo allilico	1.0 ± 0.2	0.18 ± 0.05	16 ± 4	2.5 ± 0.6	1.6 ± 0.5	15 ± 3
5e-ClO <sub>4</sub>	3.5 ± 0.3	1.7 ± 0.4	3.2 ± 0.7	3.9 ± 0.4	0.6 ± 0.3	>100
Analogo allilico	0.0333 ± 0.0003	0.022 ± 0.007	0.052 ± 0.006	0.07 ± 0.02	0.013 ± 0.002	0.30 ± 0.09
6f-ClO <sub>4</sub>	0.0803 ± 0.0008	0.019 ± 0.004	0.045 ± 0.001	0.12 ± 0.04	0.013 ± 0.003	0.49 ± 0.05
Analogo allilico	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.43 ± 0.03	/	/	0.28 ± 0.03
6g-ClO <sub>4</sub>	0.089 ± 0.005	0.10 ± 0.05	0.036 ± 0.009	0.06 ± 0.02	0.011 ± 0.002	0.6 ± 0.2
Analogo Allilico	0.12 ± 0.04	0.13 ± 0.06	0.2 ± 0.1	/	/	0.3 ± 0.1

Tabella 5. Confronto valori IC<sub>50</sub> di complessi allilici e indenilici

Suddivideremo la trattazione in tre paragrafi, il primo dedicato ai complessi dotati di leganti biscarbenici monodentati, la seconda ai complessi con leganti eteroditopici con una funzione carbenica e una piridinica o tioeterea, il terzo a quelli con leganti biscarbenici chelanti.

### Complessi con leganti carbenici monodentati

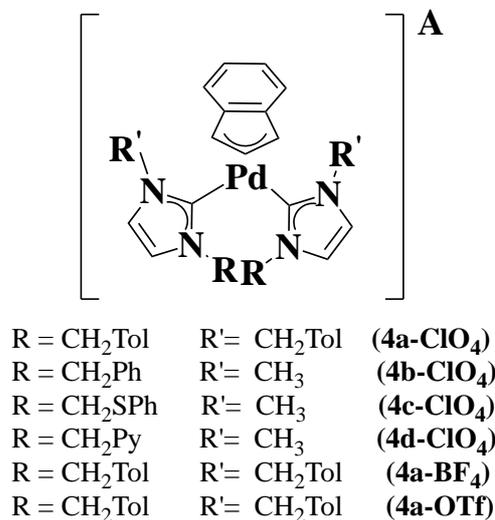


Figura 54. Struttura generica dei complessi biscarbenici monodentati con i rispettivi sostituenti R legati agli azoti imidazolici

- Il complesso **4a-ClO<sub>4</sub>** mostra dei valori di IC<sub>50</sub> molto simili su tutte le linee cellulari e in quasi tutti i casi sensibilmente più bassi di quelli del cisplatino. Purtroppo, esso risulta tossico anche sulle cellule normali MRC5, dunque non è possibile parlare di selettività, in quanto una data concentrazione di complesso blocca la proliferazione sia delle cellule tumorali sia di quelle normali.
- Il complesso **4b-ClO<sub>4</sub>** può invece essere considerato selettivo, infatti pur mostrando valori sempre leggermente più alti del complesso **4a-ClO<sub>4</sub>** e anche del cisplatino (con la notevole eccezione della linea A2780*cis*) non sembra però essere attivo sulle MRC5.
- Un comportamento molto simile è riscontrato per il complesso **4c-ClO<sub>4</sub>**, sensibilmente meno attivo del complesso **4a-ClO<sub>4</sub>** e anche del cisplatino, ma sostanzialmente inattivo sulla linea MRC5. Per questo composto sono disponibili alcuni dati dell'omologo derivato allilico (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**), che risulta essere, nei casi in cui il confronto è possibile, sensibilmente più attivo sulle cellule tumorali.

## Complessi con leganti monocarbenici dotati di una seconda funzione coordinante

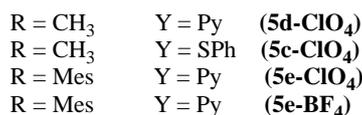
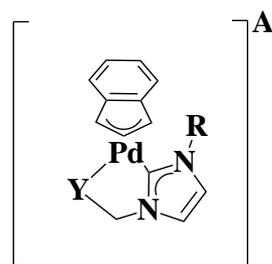


Figura 55. Struttura generica dei complessi monocarbenici bidentati con i rispettivi sostituenti R legati agli azoti imidazolici

- Il complesso **5c-ClO<sub>4</sub>** è praticamente inattivo su tutte le linee cellulari, ad esclusione delle A2780 dove comunque mostra un IC<sub>50</sub> di 2 ordini di grandezza maggiori rispetto al cisplatino. Tale comportamento è in qualche modo inatteso, considerata la citotossicità del suo omologo con il frammento allilico (Tabella 5), e anche del corrispondente derivato biscarbenico (**4c-ClO<sub>4</sub>**).
- Per quanto riguarda invece il complesso **5d-ClO<sub>4</sub>** si osservano su tutte le linee tumorali valori di IC<sub>50</sub> più elevati rispetto al cisplatino, almeno di un ordine di grandezza (addirittura maggiore di 100 micromolare per le OVCAR5). Anche in questo caso è possibile fare il confronto con l'analogo complesso allilico, il quale mostrava un andamento simile con però valori di IC<sub>50</sub> più piccoli di un ordine di grandezza. Inoltre, tale composto, a differenza dell'omologo indenilico di questo lavoro, mostrava una certa selettività verso le cellule tumorali.
- Il complesso **5e-ClO<sub>4</sub>** mostra dei valori di IC<sub>50</sub> comparabili su tutte le linee cellulari testate compresa la MRC5, e non può pertanto essere considerato selettivo. È inoltre, in tutti i casi, meno attivo del cisplatino ad esclusione che per la linea A2780*cis*. Tale comportamento è stato osservato anche per l'analogo complesso allilico. Il confronto con il complesso strutturalmente simile **5d-ClO<sub>4</sub>** induce a pensare che la presenza del sostituito mesitilico al posto di quello metilico sia in grado di conferire al composto una maggior attività antiproliferativa nei confronti delle cellule tumorali, anche se questo sembra andare a scapito della sua selettività.

## Complessi con leganti biscarbenici chelanti

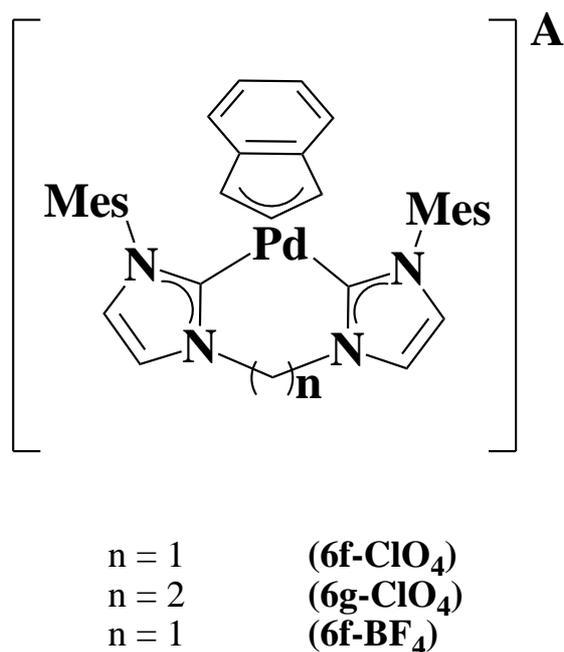


Figura 56. Formula di struttura dei complessi biscarbenici bidentati chelanti.

I due complessi **6f-ClO<sub>4</sub>** e **6g-ClO<sub>4</sub>**, appartenenti a questa categoria hanno mostrato un'attività antiproliferativa molto più elevata rispetto al cisplatino, con valori di IC<sub>50</sub> che risultano essere più piccoli di almeno uno/due ordini di grandezza. Anche per gli analoghi complessi allilici si era osservato un comportamento molto simile, facendo supporre che l'elevata citotossicità di questi composti sia in qualche modo influenzata dalla struttura biscarbenica chelante e dai sostituenti mesitilici.

L'ultima considerazione è incentrata sulla natura del controione impiegato; in particolare si è voluto testare se esso fosse in grado di influenzare il comportamento in ambiente biologico dei nuovi complessi indenilici, modificando ad esempio il processo di *uptake* cellulare e in definitiva la loro citotossicità. In Tabella 6, sono confrontati i valori ottenuti per alcuni complessi che differivano unicamente per il tipo di controione: oltre al perclorato la scelta è ricaduta sul tetrafluoroborato, uno degli anioni più diffusamente usati in questo ambito considerata la sua particolare inerzia anche coordinativa, e nel caso del complesso **4a**, anche il triflato. I dati sembrano inequivocabilmente escludere un effetto significativo della natura del controione sull'attività antiproliferativa dei complessi, anche al netto del livello di riproducibilità di questo tipo di test.

<i>Complessi</i>	<i>IC50 (μM)</i>					
	<i>A2780</i>	<i>A2780cis</i>	<i>OVCAR5</i>	<i>KURAMOCHI</i>	<i>OVCAR3</i>	<i>MRC5</i>
<b>cisplatino</b>	0.58 ± 0.06	2.8 ± 0.4	1.6 ± 0.1	0.60 ± 0.05	0.14 ± 0.01	2.3 ± 0.1
<b>4a-ClO<sub>4</sub></b>	0.29 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.2 ± 0.1	0.59 ± 0.04
<b>4a-BF<sub>4</sub></b>	0.28 ± 0.06	0.25 ± 0.09	0.27 ± 0.08	0.29 ± 0.04	0.2 ± 0.1	1.8 ± 0.3
<b>4a-OTf</b>	0.25 ± 0.01	0.29 ± 0.06	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.2 ± 0.1	0.51 ± 0.04
<b>5e-ClO<sub>4</sub></b>	3.5 ± 0.3	1.7 ± 0.4	3.2 ± 0.7	3.9 ± 0.4	0.6 ± 0.3	9 ± 1
<b>5e- BF<sub>4</sub></b>	0.20 ± 0.02	1.86 ± 0.08	1.35 ± 0.029	3.40 ± 0.44	0.6 ± 0.2	>100
<b>6f- ClO<sub>4</sub></b>	0.0803 ± 0.0008	0.019 ± 0.004	0.045 ± 0.001	0.12 ± 0.04	0.013 ± 0.003	0.49 ± 0.05
<b>6f- BF<sub>4</sub></b>	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.016 ± 0.003	0.79 ± 0.06

Tabella 6. Confronto valori  $IC_{50}$  dei complessi con diversi controioni

Un riscontro più affidabile sulle potenzialità dei nostri complessi come agenti antitumorali, è ricavabile da esperimenti condotti sulla loro attività antiproliferativa nei confronti di sistemi tumorali più complessi delle semplici culture cellulari, vale a dire gli organoidi. Come già descritto nell'introduzione, essi sono aggregati tridimensionali di cellule tumorali ricavati da tessuti malati di pazienti reali. Per queste due caratteristiche essi costituiscono delle strutture in grado di simulare meglio quello che può essere l'esito della somministrazione del *metallodrug* su un tessuto neoplastico. A questo scopo sono stati selezionati tre complessi tra quelli sintetizzati (**4c-ClO<sub>4</sub>**, **5e-ClO<sub>4</sub>** e **6f-ClO<sub>4</sub>**), dei quali, per comodità, si riportano le strutture in Figura 57.

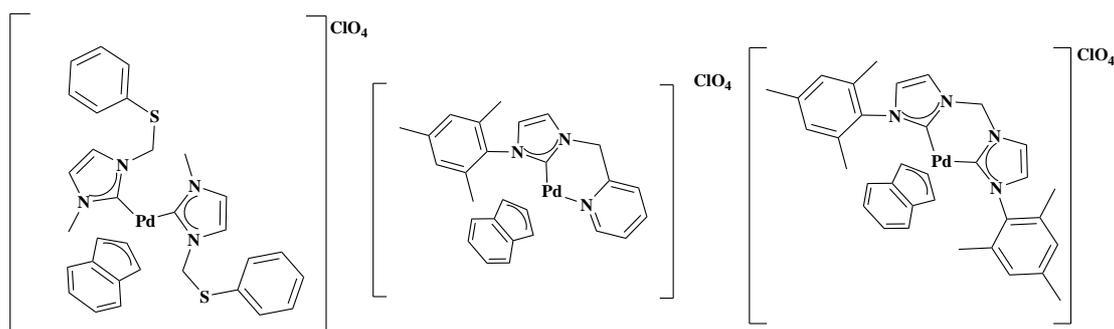


Figura 57. Formule di struttura complessi **4c-ClO<sub>4</sub>**, **5e-ClO<sub>4</sub>** e **6f-ClO<sub>4</sub>**.

La scelta è stata fatta in modo che fosse rappresentata ognuna delle tre categorie, strutturalmente diverse, descritte in precedenza; ricordiamo inoltre che il complesso **4c-ClO<sub>4</sub>** risultava selettivamente tossico per le cellule tumorali, mentre i complessi **5e-ClO<sub>4</sub>** e **6f-ClO<sub>4</sub>** mostravano rispettivamente una blanda e una fortissima attività antiproliferativa senza però distinzione tra cellule tumorali e normali.

Per quello che concerne la linea di organoidi prescelti per i test, la scelta è ricaduta su una ricavata da ascite di tumore ovarico, denominata 70865, e che è stata in precedenza esaustivamente caratterizzata<sup>33</sup>. Da un punto di vista sperimentale sono state preparate le *multiwell* con 5 pozzetti per ogni concentrazione di trattamento; il numero di pozzetti è aumentato rispetto alle prove fatte in precedenza con le semplici linee cellulari perché trattando sistemi più complessi la variabilità del dato ottenuto è inevitabilmente più elevata. Le concentrazioni scelte sono le stesse utilizzate anche per le diverse linee cellulari, quindi: 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ,  $10^{-1}$   $\mu\text{M}$ ,  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$  e  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ . In parallelo, il tumoroido è stato trattato con le medesime concentrazioni di carboplatino, preso come *metallodrug* di riferimento.

In Tabella 7 vengono riportati i valori ottenuti per i complessi in esame.

Sigla	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
<b>Carboplatino</b>	27 $\pm$ 2
4c-ClO <sub>4</sub>	>100
5e-ClO <sub>4</sub>	16.8 $\pm$ 0.5
6f-ClO <sub>4</sub>	16 $\pm$ 3

Tabella 7. Valori IC<sub>50</sub> relativi ai complessi testati su organoidi

Si può constatare che il complesso **4c-ClO<sub>4</sub>**, già poco tossico sulle culture cellulari tumorali, veda ridotta ulteriormente la sua efficacia sui tumoroidi, presentando un valore di IC<sub>50</sub> maggiore di 100 micromolare, e divenendo pertanto praticamente inattivo. Al contrario, i complessi **5e-ClO<sub>4</sub>** e **6f-ClO<sub>4</sub>**, sembrano mantenere un'attività antiproliferativa anche su queste strutture più complesse, con IC<sub>50</sub> che si attestano su valori più bassi anche di quelli del carboplatino. Di seguito possono essere osservati i tumoroidi in esame, prima e dopo il trattamento con **5e-ClO<sub>4</sub>**.

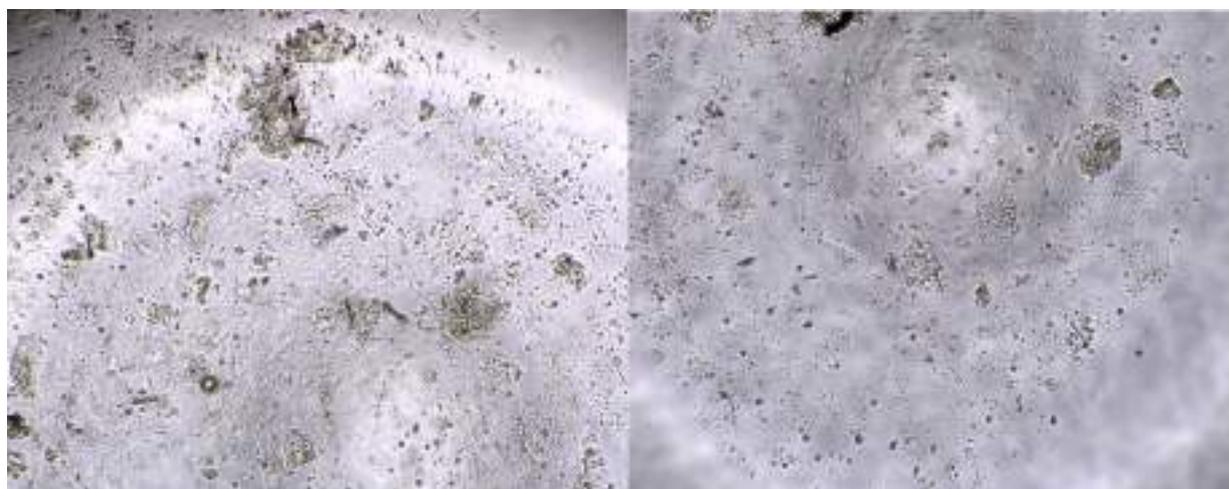


Figura 58. Tumoroidi prima e dopo il trattamento con **5e-ClO<sub>4</sub>**



## Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati 12 nuovi complessi cationici di palladio(II)-indenile, caratterizzati tutti dalla presenza di leganti spettatori carbenici *N*-eterociclici.

I nuovi composti possono essere divisi in tre differenti categorie sulla base della tipologia di legante carbenico: complessi biscarbenici monodentati, complessi chelati con un dente carbenico e uno piridinico o tioeterico e complessi biscarbenici chelati.

Il precursore indenilico usato in tutti i casi è l'innovativo complesso [(2-metil-6-(feniltio)metil)piridina]Pd-indenile)]A (A=CIO<sub>4</sub>, BF<sub>4</sub>, OTf), del quale si può agevolmente sfruttare la labilità del legante piridil-tioeterico per introdurre nella sfera di coordinazione i differenti leganti a base carbenica.

Per la prima e la seconda classe di complessi è stato adottato il classico protocollo di sintesi incentrato sulla reazione di transmetallazione, che consente di trasferire il legante carbenico dal suo complesso di argento al palladio del precursore. Tra l'altro, cambiando il controione di quest'ultimo è stato possibile ottenere alcuni complessi finali che si differenziavano soltanto per il tipo di anione.

Per la terza categoria di complessi, si è invece dovuti ricorrere all'approccio alternativo rappresentato dalla cosiddetta via della base debole, liberando *in situ*, con l'ausilio di carbonato di potassio, il carbene che deve legarsi al centro metallico di palladio. Le rese e la selettività di questo processo sono risultate ottimali.

Tutti i composti sintetizzati sono stati esaustivamente caratterizzati mediante spettroscopia NMR protonica, eteronucleare, e bidimensionale. Per quattro di essi inoltre è stato possibile risolverne la strutture mediante diffrazione ai raggi X.

Sia i dati strutturali che quelli spettroscopici sono concordi nel definire intermedia tra 3 e 5 l'apicita con cui il frammento indenilico si lega al centro metallico in tutti questi derivati di palladio(II).

Tutti i nuovi complessi sono stati poi testati su linee tumorali di adenocarcinoma ovarico e per comparazione anche su una linea di cellule normali (fibroblasti polmonari).

I valori di IC<sub>50</sub> ottenuti rivelano che tutti i composti sintetizzati manifestano un'attività antiproliferativa nei confronti delle cellule tumorali che è comparabile se non migliore di quella del cisplatino preso come *metallodrug* di riferimento. In maggior dettaglio i complessi coordinanti due carbeni *N*-eterociclici monodentati **4b-CIO<sub>4</sub>** e **4c-CIO<sub>4</sub>** si sono rivelati particolarmente promettenti, perché a fronte di una citotossicità equiparabile a quella del cisplatino, si sono dimostrati, a differenza di quest'ultimo, scarsamente attivi sulle cellule normali MRC5.

Interessanti anche i dati relativi ai complessi equipaggiati con leganti biscarbenici chelati, i quali presentano un'attività antiproliferativa sulle cellule di tumore ovarico di circa un ordine di grandezza

superiore a quella del cisplatino, quantunque questa elevata citotossicità venga pagata in termini di selettività.

Non sembra invece avere alcun effetto significativo, la natura del controione impiegato.

Inoltre, avendo osservato un'attività sostanzialmente equivalente su cellule cisplatino sensibili (A2780) e cisplatino resistenti (A2780*cis*), si può ragionevolmente supporre questi composti indenilici agiscano con un meccanismo d'azione differente da quello del cisplatino, caratteristica questa che li rende dei potenziali candidati per il trattamento di forme tumorali con resistenza indotta dai farmaci a base di platino.

Dove possibile, il confronto con gli omologhi derivati allilici, ci dice invece che questi ultimi sembrano essere sensibilmente più citotossici, ad eccezione del caso dei complessi biscarbenici chelanti.

Ulteriormente incoraggiante risulta infine l'efficacia dimostrata dai complessi **5e-ClO<sub>4</sub>** e **6f-ClO<sub>4</sub>** su sistemi in grado di simulare meglio la risposta di un reale tessuto neoplastico quali sono i tumoroidi di carcinoma ovarico derivati da pazienti reali. Il responso, in questo caso è addirittura leggermente migliore di quello registrato con il carboplatino.

## Parte sperimentale

### Solventi e reagenti utilizzati

I principali solventi utilizzati per le sintesi sono stati: acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), etere dietilico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) e pentano ( $\text{C}_5\text{H}_{12}$ ). Il diclorometano è stato utilizzato come solvente principale per la sintesi dei composti biscarbenici monodentati, seguendo la via sintetica della “trasm metallazione”; l’acetonitrile invece è stato il principale solvente per la sintesi dei composti biscarbenici chelanti sfruttando la via della “base debole”. Entrambi i solventi sono stati impiegati previa anidrifcazione su setacci molecolari 3 Å in accordo con il metodo proposto in letteratura<sup>34</sup>. L’etere e il pentano infine sono stati sfruttati come agenti precipitanti. Le prove di stabilità sono state eseguite in una miscela di  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ .

Sono stati inoltre utilizzati i sali,  $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaBF}_4$  e  $\text{NaOTf}$  i quali sono serviti come fonte di controioni per i composti sintetizzati, mentre il  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anidro è stato sfruttato come base debole.

Quasi tutti i sali d’imidazolio e i sali d’argento impiegati per le diverse sintesi sono stati preparati precedentemente dal gruppo di ricerca.

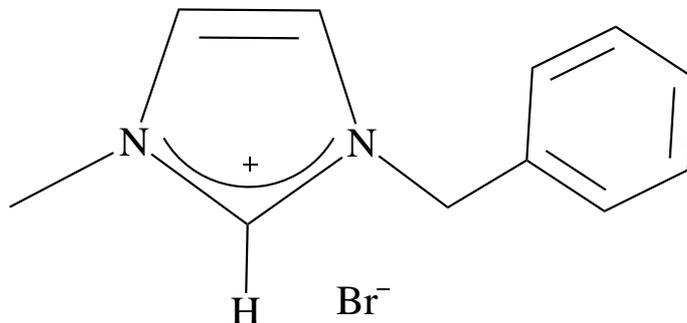
Anche il legante piridiltioetero 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina (siglato come NSPM) utilizzato per la sintesi di tutti i precursori indenilici è stato sintetizzato e caratterizzato in precedenza dal gruppo di ricerca<sup>29</sup>.

La strumentazione utilizzata è stata la seguente:

- Gli spettri  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  NMR e gli spettri bidimensionali COSY, NOESY, HSQC, HMQC, e HMBC sono stati ottenuti con spettrometri NMR Bruker® Advance 400 e NMR Bruker® Advance 300.
- Le strutture ai raggi X sono state risolte presso il Sincrotrone di Trieste dal Dott. Nicola Demetri.

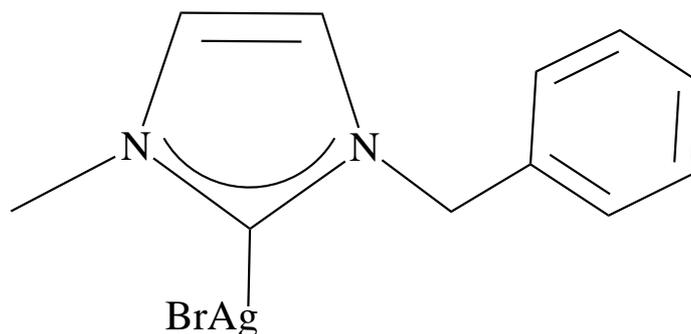
## Sintesi precursori

### Sintesi Sale di Imidazolio [H(CH<sub>3</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Ph)Br]



All'interno di un pallone codato da 50 mL, posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati inseriti rispettivamente 6.6100 g di metilimidazolo (0.0320 mol), 6.6300 g di benzilbromuro (Ph-CH<sub>2</sub>-Br) (0.0320 mol) e 12 mL di CH<sub>3</sub>CN anidro. La miscela è stata posta sotto vigorosa agitazione per un'ora a 60°C. Trascorso il tempo necessario la soluzione ottenuta è stata lasciata a temperatura ambiente per una decina di minuti per permetterne il raffreddamento e successivamente è stata tirata a secco con l'evaporatore rotante. Sono stati ottenuti 7.8900 g di prodotto (pari ad una resa del 97%), che si presenta sotto forma di solido arancione gelatinoso.

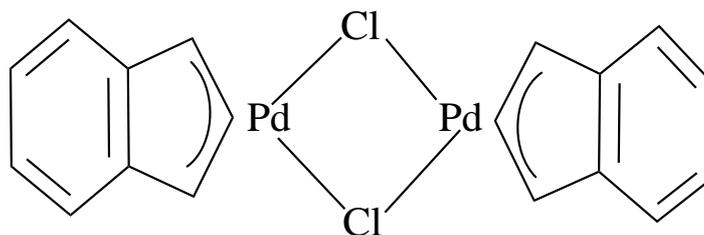
### Sintesi del sale d'Argento [Ag(CH<sub>3</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Ph)Br] (b)



In un pallone da 250 mL, posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) e munito di ancoretta magnetica, sono stati introdotti: 0.4620 g di sale di imidazolio precedentemente sintetizzato (1.8397 mmol), 0.2530 g di Ag<sub>2</sub>O (1.0917 mmol) e 10 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La miscela è quindi stata lasciata sotto agitazione per 24 ore in assenza di luce. Trascorso il tempo necessario, la soluzione ottenuta è stata lavata con 10 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e portata poi a piccolo volume rimuovendo parte del solvente con l'evaporatore rotante. Infine, l'aggiunta di alcune aliquote di etere dietilico ha permesso la precipitazione del composto desiderato sotto forma di solido biancastro, il quale è stato filtrato su gooch ed essiccato sottovuoto.

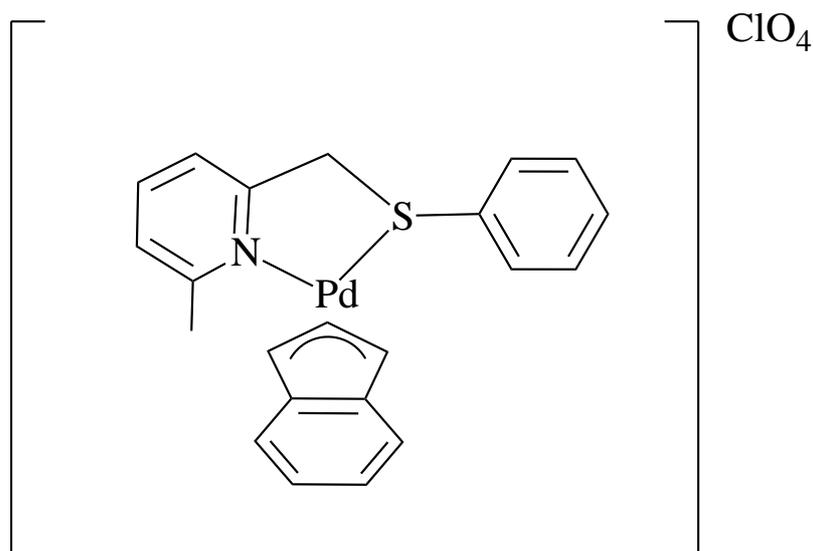
Sono quindi stati ottenuti 0.4560 g di [Ag(CH<sub>3</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Ph)Br], pari ad una resa del 70%.

### Sintesi $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{Ind})_2]$ (1)



All'interno di un pallone da 250 mL sono stati introdotti, nel seguente ordine: 50 mL di MeOH, 0.6700 g di NaCl (11.4648 mmol) e 1.0000 g di PdCl<sub>2</sub> (5.6439 mmol). La soluzione è stata lasciata sotto agitazione a 50°C per 30 minuti. Trascorso questo periodo di tempo sono stati aggiunti goccia a goccia 0.6520 g di Indene (5.6129 mmol) e 0.8900 g di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8.3971 mmol). Successivamente la soluzione è stata lasciata a temperatura ambiente, sempre sotto agitazione, per 3 ore. Il composto è stato poi lavato con qualche aliquota di acqua distillata ed etere; infine, la polvere marrone ottenuta è stata filtrata su gooch. Sono stati ottenuti 1.2100 g di composto, corrispondenti a una resa dell'84%.

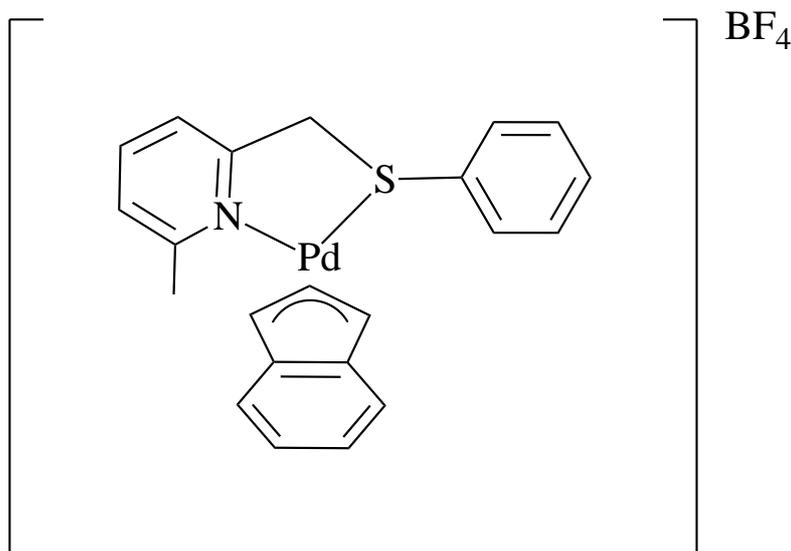
## Sintesi [Pd(NSPM)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (2-ClO<sub>4</sub>)



In un pallone da 50 mL, con all'interno un'ancoretta magnetica, sono stati inseriti 0.1256 g di [Pd( $\mu$ -Cl)(Ind)]<sub>2</sub> (0.2443 mmol), 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 0.1382 g di NaClO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1.1287 mmol) sciolti precedentemente in 7 mL di MeOH. La soluzione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 10 minuti. Trascorso questo periodo di tempo, sono stati aggiunti, goccia a goccia, 0.1054 g di 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina (0.4895 mmol), precedentemente sciolti in 6 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La miscela di reazione è stata tenuta a temperatura ambiente e sotto agitazione per circa un'ora, al termine della quale è stato possibile osservare la precipitazione di cloruro di sodio, favorita dal rapporto 3:1 dei due solventi impiegati. Successivamente la miscela risultante è stata tirata a secco utilizzando l'evaporatore rotante e ripresa con un'aliquota di circa 10 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Dopo la filtrazione su millipore per separare il cloruro di sodio, l'aggiunta di etere dietilico, all'incirca 10 mL, ha permesso la precipitazione del prodotto cationico sotto forma di solido arancione scuro; i 0.2622 g di composto, (corrispondenti ad una resa > 99%) sono stati isolati mediante filtrazione su gooch ed essiccati sottovuoto.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm)  $\delta$ :** 2.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.60-4.93 (*broad AB system*, 2H, PyCH<sub>2</sub>S), 6.25 (*br*, H<sup>Ind</sup>), 6.91-7.70 (*br*, Ar-H, H<sup>Ind</sup>, Py-H).

## Sintesi [Pd(NSPM)(Ind)]BF<sub>4</sub> (2- BF<sub>4</sub>)

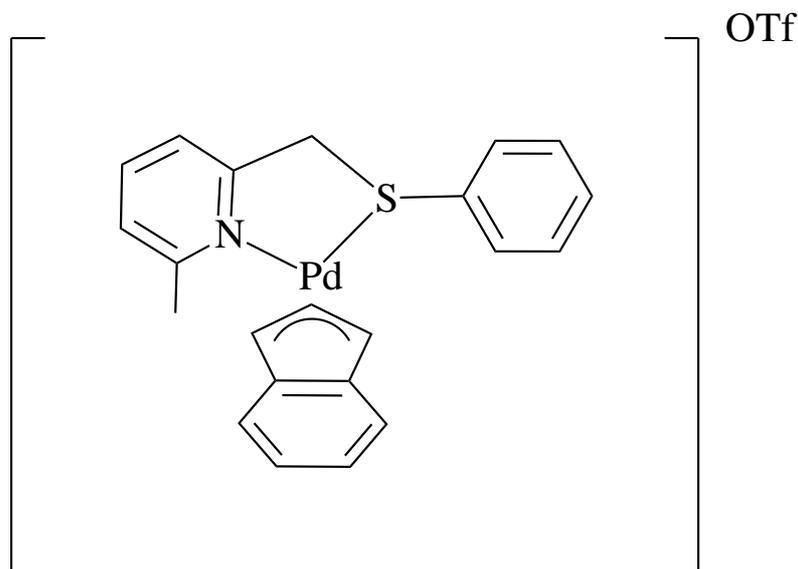


All'interno di un pallone da 50 mL, munito di ancoretta magnetica, sono stati posti 0.1300 g di [Pd( $\mu$ -Cl)(Ind)]<sub>2</sub> (0.2529 mmol), 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 0.1110 g di NaBF<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1.0110 mmol) sciolti in precedenza in 7 mL di MeOH. La soluzione è stata messa quindi sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 10 minuti. Atteso il tempo necessario sono stati aggiunti, goccia a goccia, 0.1090 g di 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina (0.5062 mmol), sciolto in precedenza in 6 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La miscela di reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per circa un'ora osservando la progressiva precipitazione di cloruro di sodio. In seguito, la soluzione è stata portata a secco avvalendosi dell'evaporatore rotante e poi ripresa con 10 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Si è proceduto quindi ad una filtrazione su millipore per allontanare i sali sodici insolubili e un successivo passaggio all'evaporatore rotante per concentrare la soluzione. L'aggiunta di etere dietilico, all'incirca 10 mL, ha permesso infine la precipitazione del prodotto cationico sotto forma di polvere marrone la quale è stata poi filtrata su gooch. Sono stati ottenuti 0.2276 g di prodotto, corrispondenti a una resa dell'86%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm)  $\delta$ :** 2.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.60-4.93 (*broad AB system*, 2H, PyCH<sub>2</sub>S), 6.25 (*br*, H<sup>Ind</sup>), 6.91-7.70 (*br*, Ar-H, H<sup>Ind</sup>, Py-H).

**<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (377.2 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm)  $\delta$ :** -152.62.

## Sintesi [Pd(NSPM)(Ind)]OTf (2- OTf)



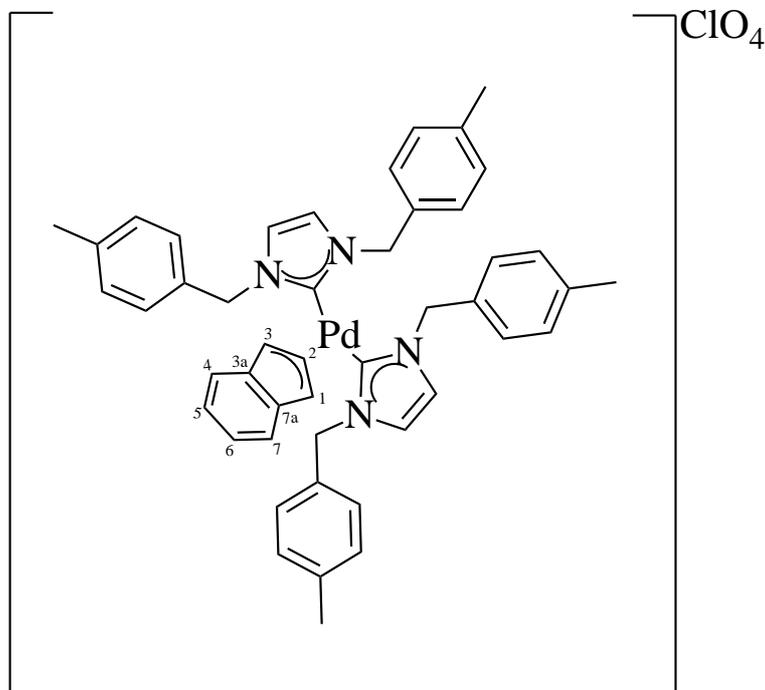
All'interno di un pallone da 50 mL, munito di ancoretta magnetica, sono stati introdotti 0.0270 g di  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{Ind})_2]$  (0.0525 mmol), 6 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 0.0367 g di NaOTf (0.2133 mmol) sciolti in precedenza in 3 mL di MeOH. La soluzione è stata poi posta sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 10 minuti al termine dei quali sono stati aggiunti, goccia a goccia, 0.0226 g di 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina (0.1050 mmol), sciolti precedentemente in 3 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La reazione è stata tenuta a temperatura ambiente e sotto costante agitazione per circa un'ora, durante la quale si è potuto osservare la precipitazione di cloruro di sodio. In seguito, la miscela è stata tirata a secco grazie all'evaporatore rotante e ripresa poi con un'aliquota di circa 2 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A seguire la miscela è stata filtrata su millipore per eliminare i sali presenti. L'aggiunta di etere dietilico, all'incirca 5 mL, ha permesso infine la precipitazione del prodotto cationico sotto forma di solido marroncino, il quale è stato poi filtrato su gooch e lasciato in essiccatore per una notte per eliminare eventuali presenze di solvente. Sono stati ottenuti quindi 0.0515 g di prodotto, corrispondenti a una resa dell'84%.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , T=298 K, ppm)  $\delta$ : 2.68 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.60-4.93 (*broad AB system*, 2H,  $\text{PyCH}_2\text{S}$ ), 6.25 (*br*,  $\text{H}^{\text{Ind}}$ ), 6.91-7.70 (*br*, Ar-H,  $\text{H}^{\text{Ind}}$ , Py-H)

$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (377.2 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , T=298 K, ppm)  $\delta$ : -78.14.

## Sintesi complessi di Pd(II) con leganti carbenici *N*-eterociclici

### Sintesi [Pd(Tol-CH<sub>2</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Tol)<sub>2</sub>(Ind)]ClO<sub>4</sub> (4a- ClO<sub>4</sub>)



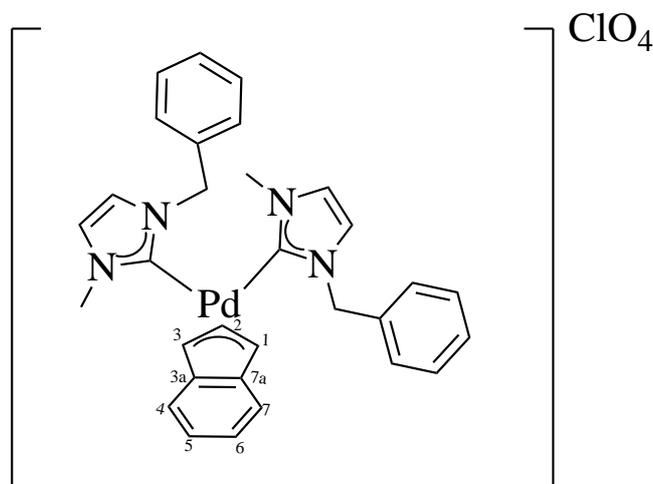
In un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati inseriti 0.0700 g di [Pd(NSPM)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (0.1305 mmol) sciolti in 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Successivamente sono stati aggiunti goccia a goccia 0.1095 g di [Ag(Tol-CH<sub>2</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Tol)Cl] (0.2610 mmol) precedentemente sciolti in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La miscela è stata lasciata reagire per 20 minuti, trascorsi i quali è stata centrifugata e successivamente filtrata su millipore per eliminare il cloruro di argento precipitato. La soluzione ottenuta è stata quindi concentrata con l'utilizzo dell'evaporatore rotante. L'aggiunta di etere dietilico, circa 5 mL, ha favorito la precipitazione del prodotto solido di colore verdino, che è stato poi filtrato su gooch ed essiccato sottovuoto. Sono stati ottenuti 0.0969 g di prodotto, corrispondenti a una resa dell'85%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 2.35 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub><sup>Tol</sup>), 4.94 (s, 8H, 4NCH<sub>2</sub>), 5.70 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 6.47 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.70-6.73 (m, 2H, H<sup>4</sup>, H<sup>7</sup>), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 8H, *m*-Ar-H), 6.83 (s, 4H, 2CH=CH<sup>Im</sup>), 6.85-6.88 (m, 2H, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 8H, *o*-Ar-H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 21.3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub><sup>Tol</sup>), 54.5 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 78.9 (CH, C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>), 111.7 (CH, C<sup>2</sup>), 118.0 (CH, C<sup>4</sup>, C<sup>7</sup>), 123.4 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.1 (CH, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>), 127.0

(CH, *m*-Ar-CH), 129.9 (CH, *o*-Ar-CH), 132.8 (C, *ipso*-Ar-C), 134.5 (C, C<sup>3a</sup>, C<sup>7a</sup>), 138.8 (C, *p*-Ar-C), 165.1 (C, C<sup>carbenc</sup>).

## Sintesi [Pd(CH<sub>3</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>2</sub>(ind)]ClO<sub>4</sub> (4b-ClO<sub>4</sub>)

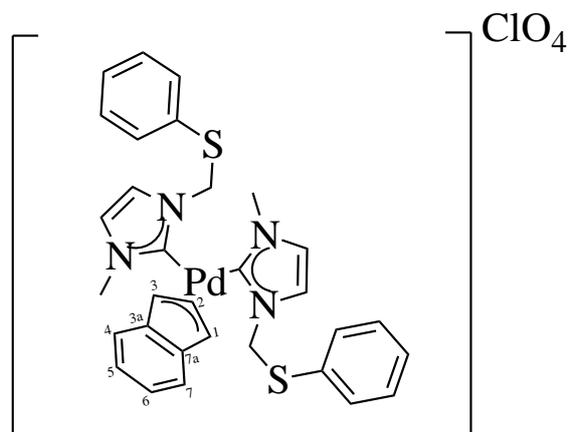


In un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati inseriti 0.0700 g di [Pd(NSPM)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (0.1305 mmol) sciolti con 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Successivamente sono stati aggiunti goccia a goccia 0.0940 g di [Ag(Bn-Im-CH<sub>3</sub>)Br] (0.2610 mmol) sciolto precedentemente in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La miscela di reazione è stata posta sotto moderata agitazione per 20 minuti a temperatura ambiente, fino a quando non si è osservato un cambio di colore dal marrone scuro al giallo sabbia. Trascorso il tempo necessario la miscela è stata centrifugata e poi filtrata su millipore per eliminare l'argento bromuro precipitato. La soluzione risultante è stata portata a piccolo volume con l'utilizzo dell'evaporatore rotante. L'aggiunta di circa 5 mL di etere dietilico ha permesso la precipitazione del prodotto solido di colore giallino, che è stato poi filtrato poi su gooch ed essiccato sottovuoto. Sono stati ottenuti 0.0750 g di prodotto, corrispondenti a una resa dell'86%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 3.54 (s, 6H, 2NCH<sub>3</sub>), 4.82-4.93 (AB system, J = 13.9 Hz, 4H, 2NCH<sub>2</sub>), 5.82 (d, J = 3.1 Hz, 2H, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 6.59 (t, J = 3.2 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.78 (d, J = 1.9 Hz, 2H, CH=CH<sup>Im</sup>), 6.79-6.83 (m, 4H, *o*-Ar-H), 6.92-6.98 (m, 4H, H<sup>4</sup>, H<sup>7</sup>, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>), 7.07 (d, J = 1.9 Hz, 2H, CH=CH<sup>Im</sup>), 6.28-6.33 (m, 6H, *m*, *p*-Ar-H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 38.7 (CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>), 54.4 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 78.6 (CH, C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>), 111.3 (CH, C<sup>2</sup>), 118.2 (CH, C<sup>4</sup>, C<sup>7</sup>), 122.8 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 124.8 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.1 (CH, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>), 126.6 (CH, *o*-Ar-CH), 128.4 (CH, *m*-Ar-CH), 129.2 (CH, *p*-Ar-CH), 134.3 (C, C<sup>3a</sup>, C<sup>7a</sup>), 135.7 (C, *ipso*-Ar-C), 164.9 (C, C<sup>carbene</sup>).

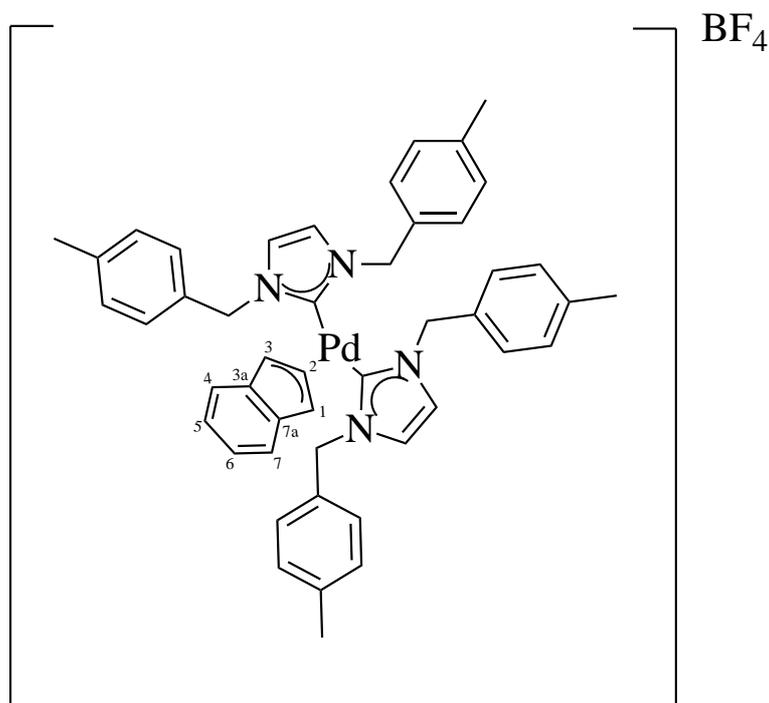
### Sintesi [Pd(CH<sub>3</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-S-Ph)<sub>2</sub>(Ind)]ClO<sub>4</sub> (4c-ClO<sub>4</sub>)



In un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati inseriti 0.0700 g di [Pd(NSPM)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (0.1305 mmol) sciolti in 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Successivamente a tale soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 0.1023 g di [Ag(CH<sub>3</sub>-Im-S-Ph)Br] (0.2610 mmol), precedentemente sciolti in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Si è potuto osservare quasi istantaneamente un rapido viraggio di colore dal marrone al giallo oca. La reazione è stata lasciata procedere a temperatura ambiente per una ventina di minuti, al termine dei quali è stata centrifugata e poi filtrata su millipore per eliminare l'argento bromuro precipitato. Il composto ottenuto è stato portato a piccolo volume con l'utilizzo dell'evaporatore rotante. Successivamente il prodotto è stato precipitato grazie all'aggiunta di circa 5 mL di etere dietilico, quindi filtrato su gooch ed infine lasciato in essiccatore per una notte. Sono stati ottenuti quindi 0.0824 g di prodotto, all'apparenza un solido giallo, con una resa dell'86%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>4</sub>Cl<sub>4</sub>, T=333 K, ppm) δ:** 3.47 (s, 6H, 2NCH<sub>3</sub>), 5.07 (s, 4H, 2NCH<sub>2</sub>S), 5.73 (br, 2H, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 6.60 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.94 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, CH=CH<sup>Im</sup>), 7.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, CH=CH<sup>Im</sup>), 7.20 – 7.08 (m, 4H, H<sup>4</sup>, H<sup>7</sup>, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>), 7.47 – 7.33 (m, 10H, Ar-H).

## Sintesi [Pd(Tol-CH<sub>2</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Tol)<sub>2</sub>(Ind)]BF<sub>4</sub> (4a-BF<sub>4</sub>)



In un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati inseriti 0.0577 g di [Pd(NSPM)(Ind)]BF<sub>4</sub> (0.1102 mmol) sciolti in 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Sono stati poi aggiunti goccia a goccia 0.0925 g di [Ag(Tol-CH<sub>2</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Tol)Cl] (0.2204 mmol) precedentemente sciolti in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La reazione è stata lasciata reagire per 20 minuti, al termine dei quali è possibile osservare la precipitazione cloruro di argento. Successivamente la miscela è stata centrifugata e filtrata su millipore. La soluzione risultante è stata portata poi a piccolo volume con l'utilizzo dell'evaporatore rotante e a seguire l'aggiunta di un'aliquota di una miscela 1:1 di etere dietilico e pentano ha permesso la precipitazione del prodotto finale. Quest'ultimo è stato poi filtrato su gooch e posto in essiccatore, per circa 12 ore, per eliminare eventuali tracce di solvente. Sono stati ottenuti alla fine 0.0552 g di composto, corrispondenti a una resa del 58%.

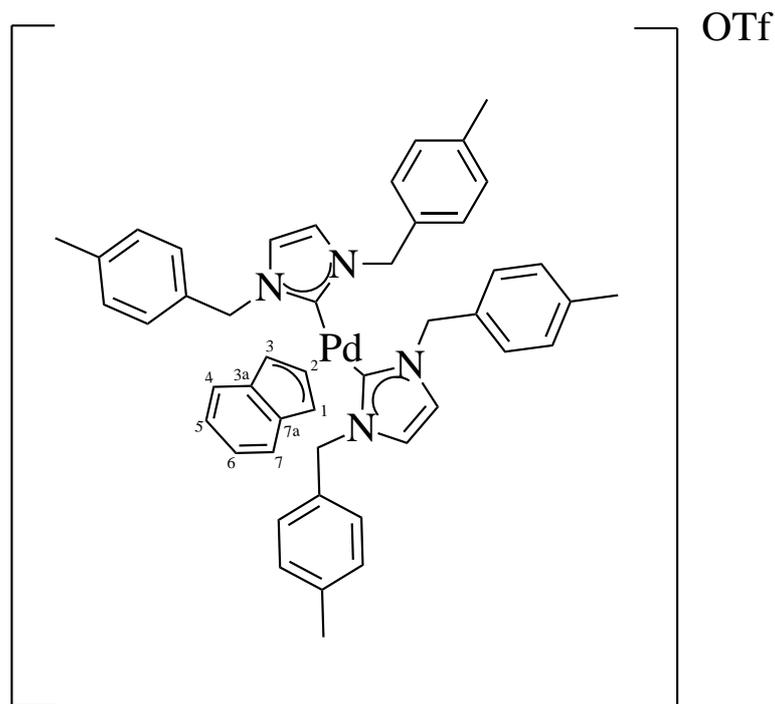
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 2.35 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub><sup>Tol</sup>), 4.94 (s, 8H, 4NCH<sub>2</sub>), 5.70 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 6.47 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.70-6.73 (m, 2H, H<sup>4</sup>, H<sup>7</sup>), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 8H, *m*-Ar-H), 6.83 (s, 4H, 2CH=CH<sup>Im</sup>), 6.85-6.88 (m, 2H, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 8H, *o*-Ar-H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 21.3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub><sup>Tol</sup>), 54.5 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 78.9 (CH, C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>), 111.7 (CH, C<sup>2</sup>), 118.0 (CH, C<sup>4</sup>, C<sup>7</sup>), 123.4 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.1 (CH, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>), 127.0

(CH, *m*-Ar-CH), 129.9 (CH, *o*-Ar-CH), 132.8 (C, *ipso*-Ar-C), 134.5 (C, C<sup>3a</sup>, C<sup>7a</sup>), 138.8 (C, *p*-Ar-C), 165.1 (C, C<sup>carbenc</sup>).

**<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (377.2 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ: -153.19.**

## Sintesi [Pd(Tol-CH<sub>2</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Tol)<sub>2</sub>(Ind)]BF<sub>4</sub> (4a-OTf)



In un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati introdotti 0.0714 g di [Pd(NSPM)(Ind)]OTf (0.1218 mmol) sciolti in 9 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Sono stati poi aggiunti goccia a goccia 0.0102 g di [Ag(Tol-CH<sub>2</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Tol)Cl] (0.2436 mmol) precedentemente sciolti in 4 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La reazione è lasciata procedere per 20 minuti a temperatura ambiente durante i quali è stato possibile osservare l'intorbidimento della miscela con la concomitante precipitazione di cloruro di argento. Sono seguite quindi la centrifugazione e la filtrazione della miscela su millipore al fine di allontanare l'alogenuro di argento formatosi. Il volume della soluzione è stato quindi ridotto mediante evaporatore rotante e trattato con etere dietilico per favorire la precipitazione del composto di palladio cationico e il simultaneo allontanamento della 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina a liberatasi. Il solido verde pallido ottenuto è stato isolato mediante filtrazione su gooch e posto in essiccatore. Sono stati ottenuti 0.0990 g di prodotto puro, pari ad una resa dell'88%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 2.35 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub><sup>Tol</sup>), 4.94 (s, 8H, 4NCH<sub>2</sub>), 5.70 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 6.47 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.70-6.73 (m, 2H, H<sup>4</sup>, H<sup>7</sup>), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 8H, *m*-Ar-H), 6.83 (s, 4H, 2CH=CH<sup>Im</sup>), 6.85-6.88 (m, 2H, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 8H, *o*-Ar-H).

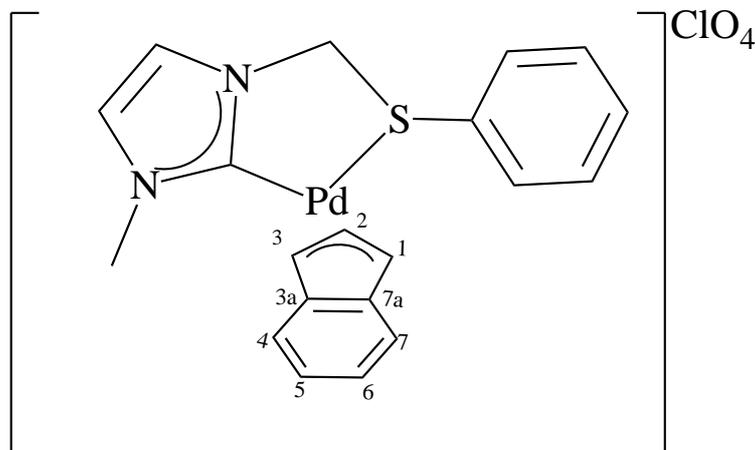
**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 21.3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub><sup>Tol</sup>), 54.5 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 78.9 (CH, C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>), 111.7 (CH, C<sup>2</sup>), 118.0 (CH, C<sup>4</sup>, C<sup>7</sup>), 123.4 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.1 (CH, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>), 127.0

(CH, *m*-Ar-CH), 129.9 (CH, *o*-Ar-CH), 132.8 (C, *ipso*-Ar-C), 134.5 (C, C<sup>3a</sup>, C<sup>7a</sup>), 138.8 (C, *p*-Ar-C), 165.1 (C, C<sup>carbenc</sup>).

**<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (377.2 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ: -78.05.**

## Sintesi complessi monocarbenici chelanti

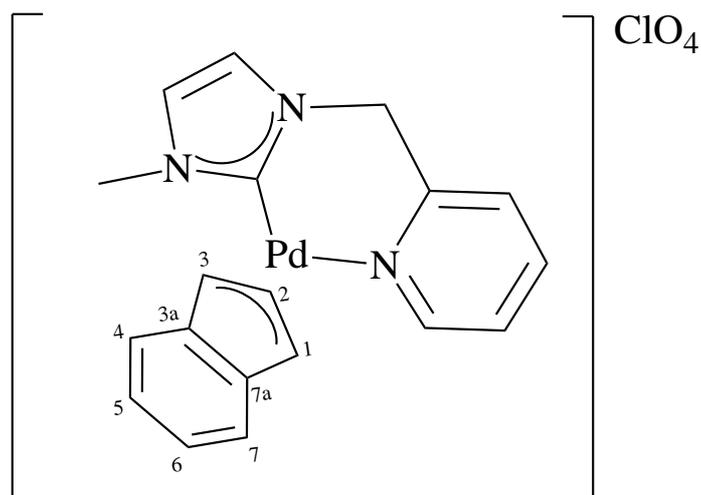
### Sintesi $[\text{Pd}(\text{CH}_3\text{-Im-CH}_2\text{-S-Ph})(\text{Ind})]\text{ClO}_4$ (**5c-ClO<sub>4</sub>**)



All'interno di un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e mantenuto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati aggiunti 0.0700 g di  $[\text{Pd}(\text{Ind})(\text{NSPM})]\text{ClO}_4$  (0.1305 mmol) sciolti in 9 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Successivamente sono stati aggiunti, goccia a goccia, 0.0512 g di  $[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{-Im-CH}_2\text{-S-Ph})\text{Br}]$  (0.1305 mmol) sciolti precedentemente in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La miscela risultante è stata lasciata reagire a temperatura ambiente per 20 minuti, durante i quali si è potuto osservare il cambiamento di colore da marrone scuro a giallo con una progressiva precipitazione del bromuro di argento. La miscela è stata poi centrifugata e successivamente filtrata su millipore per eliminare il sale precipitato. La soluzione è stata portata a piccolo volume con l'utilizzo dell'evaporatore rotante. In seguito all'aggiunta di etere dietilico, circa 5 mL, è stato possibile quindi precipitare il prodotto solido di colore giallo che è stato poi filtrato su gooch e lasciato in essiccatore per una notte. Sono stati ottenuti 0.0600 g di prodotto, corrispondenti a una resa dell'88%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=353 K, selected picks, ppm)  $\delta$ :** 3.34 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.59 (bs, 2H, NCH<sub>2</sub>S), 5.99 (t, 1H,  $J = 3.1$  Hz, H<sup>2</sup>), 6.44 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, CH=CH<sup>Im</sup>), 6.72 (d,  $J = 2.0$  Hz, CH=CH<sup>Im</sup>).

## Sintesi [Pd(CH<sub>3</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Pyr)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (5d-ClO<sub>4</sub>)

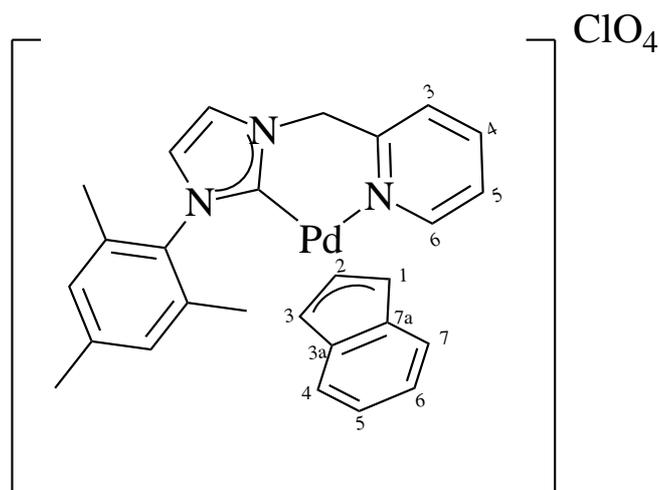


In un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati introdotti 0.0460 g di [Pd(Ind)(NSPM)]ClO<sub>4</sub> (0.0089 mmol) sciolti in 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. In seguito sono stati aggiunti goccia a goccia 0.0320 g di [Ag(CH<sub>3</sub>-Im-CH<sub>2</sub>-Pyr)Br] (0.0089 mmol), precedentemente sciolti in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Si è lasciato il tutto a reagire a temperatura ambiente per circa 20 minuti, durante i quali è stato possibile osservare la progressiva precipitazione di bromuro di argento. Nel passaggio successivo la miscela è stata centrifugata e poi è stata eseguita una filtrazione su millipore per eliminare l'alogenuro d'argento precipitato. La soluzione ottenuta è stata portata a piccolo volume in evaporatore rotante. Aggiungendo quindi un'aliquota di etere dietilico è stato possibile precipitare il prodotto giallo-arancio che è stato poi filtrato su gooch e posto in essiccatore per almeno una notte. I grammi di complesso ottenuto sono pari a 0.0400 g, corrispondenti a una resa dell'85%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, T=298 K, ppm)  $\delta$ :** 3.82 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 5.03-5.35 (AB system,  $J = 15.0$  Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 6.03 (bs, 1H, H<sup>3</sup>), 6.12 (bs, 1H, H<sup>1</sup>), 6.83 (t,  $J = 3.2$  Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.96 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, CH=CH<sup>Im</sup>), 7.13 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H<sup>5</sup>), 7.22 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H<sup>6</sup>), 7.31 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H<sup>4</sup>), 7.34 – 7.39 (m, 2H, H<sup>7</sup>, 5-Py-H), 7.47 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, CH=CH<sup>Im</sup>), 7.80 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 3-Py-H), 7.95 (td,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H, 4-Py-H), 8.46 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, 6-Py-H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, T=298 K, ppm)  $\delta$ :** 38.7 (CH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>), 55.4 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>-Py), 69.7 (CH, C<sup>3</sup>), 89.2 (CH, C<sup>1</sup>), 113.3 (CH, C<sup>2</sup>), 117.9 (CH, C<sup>7</sup>), 119.1 (CH, C<sup>4</sup>), 122.8 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 123.7 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.7 (CH, 5-Py-CH), 127.0 (CH, 3-Py-CH), 127.1 (CH, C<sup>5</sup>), 127.9 (CH, C<sup>6</sup>), 135.4 (C, C<sup>3a</sup>), 136.1 (C, C<sup>7a</sup>), 140.9 (CH, 4-Py-CH), 153.7 (C, 2-Py-C), 155.9 (CH, 6-Py-CH), 166.9 (C, C<sup>carbene</sup>).

## Sintesi [Pd(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Pyr)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (5e-ClO<sub>4</sub>)



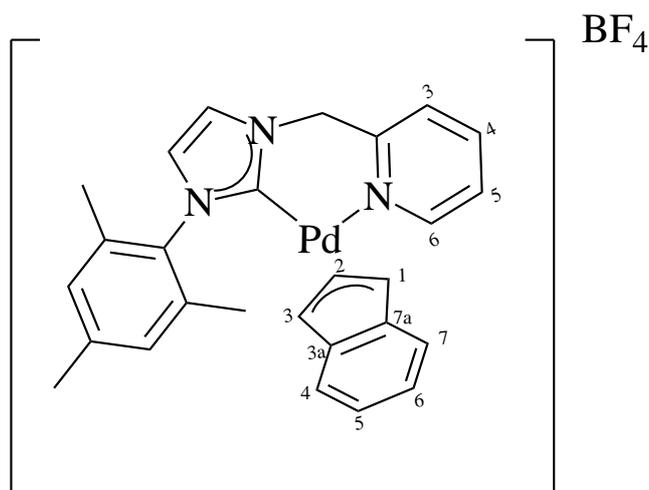
In un pallone codato da 100 mL, munito di ancorotta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati inseriti 0.0700 g di [Pd(NSPM)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (0.1305 mmol) sciolti in 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Successivamente sono stati aggiunti goccia a goccia 0.0607 g di [Ag(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Pyr)Br] (0.1305 mmol), precedentemente sciolti in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La reazione è stata lasciata reagire sotto modesta agitazione a temperatura ambiente per 20 minuti, durante i quali si sono osservati un cambio di colore da marrone a giallo sporco e la precipitazione di argento bromuro. Successivamente è stata eseguita una centrifugazione ed il surnatante è stato poi filtrato su millipore per eliminare i residui del precipitato. La soluzione ottenuta è stata poi portata a piccolo volume con l'utilizzo dell'evaporatore rotante. L'aggiunta di un'aliquota di etere dietilico, all'incirca 5 mL, ha permesso la precipitazione del prodotto finale, il quale è stato poi filtrato su gooch e posto in essiccatore per la notte. Sono stati ottenuti quindi 0.0670 g di prodotto, corrispondenti a una resa dell'86%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 1.53 (s, 3H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.49 (s, 3H, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 5.11 (s, 1H, H<sup>3</sup>), 5.17-5.79 (AB system, *J*=15.1 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5.92 (bs, 1H, H<sup>1</sup>, H<sup>4</sup>), 6.57 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.73 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH=CH<sup>Im</sup>), 6.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sup>5</sup>), 7.06-7.13 (m, 2H, H<sup>6</sup>, *m*-Mesityl-H), 7.16-7.18 (m, 2H, H<sup>7</sup>, *m*-Mesityl-H), 7.34 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, 5-Py-H), 8.00 – 7.87 (td, 2H, *J* = 7.5, 1.5 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>, 4-Py-H), 8.10 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, 3-Py-H), 8.37 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 6-Py-H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 17.4 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 18.0 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 54.9 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>-Py), 70.6 (CH, C<sup>3</sup>), 88.3 (CH, C<sup>1</sup>), 111.4 (CH, C<sup>2</sup>), 116.4 (CH, C<sup>7</sup>), 119.0 (CH, C<sup>4</sup>), 122.7 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.0 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.2 (CH, 5-Py-CH), 125.6 (CH, C<sup>5</sup>), 127.4 (CH, C<sup>6</sup>), 127.7 (CH, 3-Py-CH), 129.6 (C, *m*-Mesityl-CH), 130.2 (C, *m*-Mesityl-CH), 133.8 (C, C<sup>3a</sup>), 134.4 (C, C<sup>7a</sup>), 135.1 (C, *o*-Mesityl-C), 135.7 (C,

$C_{ipso}$ ), 136.0 (C, *o*-Mesityl-C), 140.0 (C, *p*-Mesityl-C) 140.6 (CH, 4-Py-CH), 153.8 (C, 2-Py-C) ,  
154.7 (CH, 6-Py-CH), 167.1 (C, C<sup>carbene</sup>).

## Sintesi [Pd(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Pyr)(Ind)]BF<sub>4</sub> (5e-BF<sub>4</sub>)



In un pallone codato da 100 mL, munito di ancoretta magnetica e posto in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>), sono stati posti 0.0476 g di [Pd(Ind)(NSPM)]BF<sub>4</sub> (0.0091 mmol) sciolti in 15 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. In seguito sono stati aggiunti, goccia a goccia, 0.0490 g di [Ag(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Pyr)Br] (0.0091 mmol), sciolti precedentemente in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La miscela reazione è stata quindi lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 20 minuti, alla fine dei quali è stato possibile osservare la presenza di un copioso precipitato di argento bromuro. A questo punto la miscela è stata centrifugata e filtrata su millipore così da separare il sale precipitato. La soluzione risultante è stata poi portata a piccolo volume con l'evaporatore rotante. Infine, è stato possibile precipitare il prodotto desiderato aggiungendo alla soluzione concentrata un'aliquota (5 mL) di una miscela 1:1 di etere dietilico e pentano. Il composto finale è stato poi filtrato su gooch e posto in essiccatore per una notte. Sono stati ottenuti quindi 0.0480 g di complesso, corrispondenti a una resa del 90%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 1.53 (s, 3H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.49 (s, 3H, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 5.11 (s, 1H, H<sup>3</sup>), 5.17-5.79 (AB system, *J*=15.1 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5.92 (bs, 1H, H<sup>1</sup>, H<sup>4</sup>), 6.57 (t, *J*=3.1 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 6.73 (d, *J*=1.9 Hz, 1H, CH=CH<sup>Im</sup>), 6.83 (t, *J*=7.4 Hz, 1H, H<sup>5</sup>), 7.06-7.13 (m, 2H, H<sup>6</sup>, *m*-Mesityl-H), 7.16-7.18 (m, 2H, H<sup>7</sup>, *m*-Mesityl-H), 7.34 (t, *J*=6.5 Hz, 1H, 5-Py-H), 8.00 – 7.87 (td, 2H, *J*=7.5, 1.5 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>, 4-Py-H), 8.10 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, 3-Py-H), 8.37 (d, *J*=4.9 Hz, 1H, 6-Py-H).

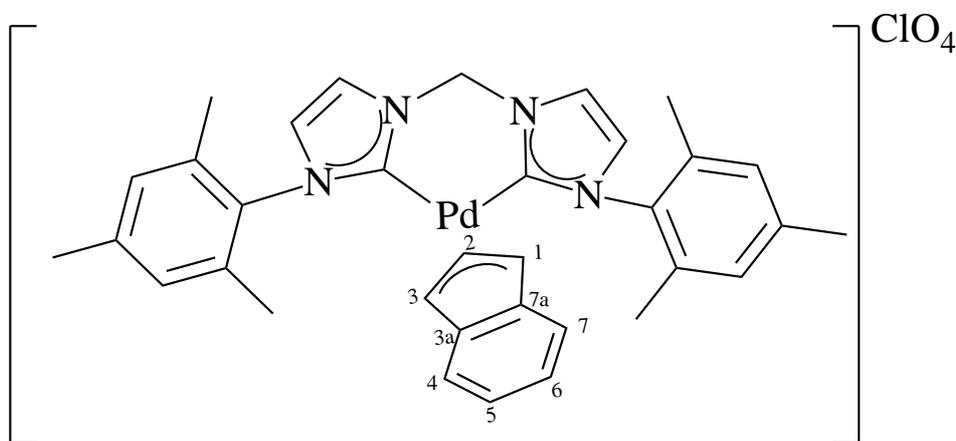
**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 17.4 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 18.0 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 54.9 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>-Py), 70.6 (CH, C<sup>3</sup>), 88.3 (CH, C<sup>1</sup>), 111.4 (CH, C<sup>2</sup>), 116.4 (CH, C<sup>7</sup>), 119.0 (CH, C<sup>4</sup>), 122.7 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.0 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 125.2 (CH, 5-Py-CH), 125.6 (CH, C<sup>5</sup>), 127.4 (CH, C<sup>6</sup>), 127.7 (CH, 3-Py-CH), 129.6 (C, *m*-Mesityl-CH), 130.2 (C, *m*-Mesityl-CH), 133.8 (C, C<sup>3a</sup>), 134.4 (C, C<sup>7a</sup>), 135.1 (C, *o*-Mesityl-C), 135.7 (C,

$C_{ipso}$ ), 136.0 (C, *o*-Mesityl-C), 140.0 (C, *p*-Mesityl-C) 140.6 (CH, 4-Py-CH), 153.8 (C, 2-Py-C) ,  
154.7 (CH, 6-Py-CH), 167.1 (C, C<sup>carbene</sup>).

**$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (377.2 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , T=298 K, ppm)  $\delta$ : -151.83.**

## Sintesi complessi biscarbenici chelanti mediante il protocollo sintetico della base debole

### Sintesi [Pd(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Im-Mes)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (6f-ClO<sub>4</sub>)



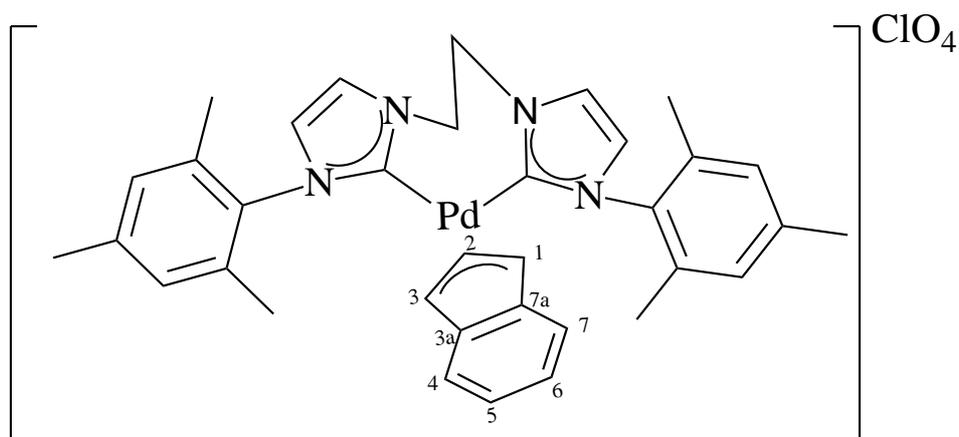
In una vial da 10 mL, dotata di un'ancoretta magnetica e posta in un tamburo riscaldante, portato a 60°C, sono stati introdotti 0.0500 g di [Pd(Ind)(NSPM)]ClO<sub>4</sub> (0.0932 mmol) sciolti in 7 mL di CH<sub>3</sub>CN. Successivamente sono stati aggiunti nell'ordine 0.0509 g di [H<sub>2</sub>(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Im-Mes)Br<sub>2</sub>] (0.0932 mmol) e dopo circa 10 minuti 0.0773 g di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.5592 mmol). La reazione è lasciata procedere per circa 3 ore durante le quali è stato possibile osservare il cambiamento di colore della miscela da rosso mattone a giallo. Trascorso questo periodo di tempo il solvente è stato allontanato all'evaporatore rotante e il solido ripreso con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La miscela è stata quindi trattata con carbone attivo e successivamente filtrata su Celite; la soluzione risultante è stata infine concentrata a piccolo volume. L'aggiunta di etere dietilico ha permesso la precipitazione del composto desiderato sotto forma di solido giallo separandolo così dal legante libero 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina. L'isolamento del prodotto è infine ottenuto mediante filtrazione su gooch ed essiccamento sottovuoto. Sono stati ricavati 0.0482 g del composto puro (resa del 73%), sotto forma di solido giallo.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 1.81 (s, 6H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 6H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 6H, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 4.74 (d, 2H, *J* = 3.2 Hz, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 5.81 (t, 1H, *J* = 3.1 Hz, H<sup>2</sup>), 6.19-6.21, 6.74-6.77 (m, 2H, H<sup>4</sup>, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>, H<sup>7</sup>), 6.47 (AB system, 2H, *J* = 13.0 Hz, 6.47, NCH<sub>2</sub>), 6.81 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>), 7.11 (s, 4H, *m*-Mesityl-H), 8.01 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 17.7 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 18.1 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 62.5 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>N), 78.4 (CH, C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>), 109.1 (CH, C<sup>2</sup>), 117.5 (CH, C<sup>4</sup>, C<sup>7</sup>), 122.8 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 124.1 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 124.6 (CH, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>), 129.5 (CH,

*m*-Mesityl-CH), 129.9 (CH, *m*-Mesityl-CH), 131.6 (C, C<sup>3a</sup>, C<sup>7a</sup>), 135.4 (C, *o*-Mesityl-C), 135.7 (C, *o*-Mesityl-C), 136.1 (C, C<sub>*ipso*</sub>), 140.1 (C, *p*-Mesityl-C), 167.4 (C, C<sup>carbene</sup>).

## Sintesi [Pd(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Im-Mes)(Ind)]ClO<sub>4</sub> (6g-ClO<sub>4</sub>)



In una vial da 10 mL, posta in una tamburo riscaldante (60°C) e con all'interno un'ancoretta magnetica, sono stati inseriti 0.0500 g di [Pd(Ind)(NSPM)]ClO<sub>4</sub> (0.0932 mmol), sciolti in 7 mL di CH<sub>3</sub>CN. Sono stati quindi aggiunti 0.0522 g di [H<sub>2</sub>(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Im-Mes)Br<sub>2</sub>] (0.0932 mmol) e dopo circa 10 minuti 0.0773 g di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.5592 mmol).

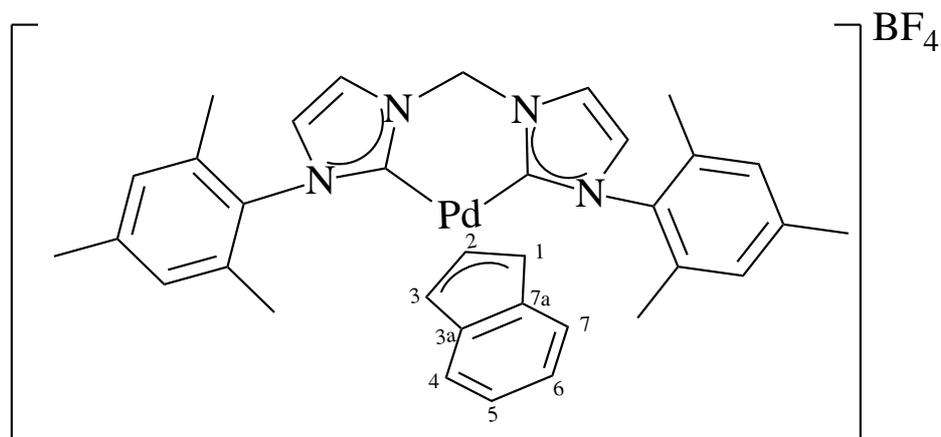
La reazione è stata lasciata procedere sotto agitazione per circa 3 ore durante le quali si è osservato il viraggio del colore della miscela da rosso mattone a giallo. Trascorso il tempo necessario si è portato a secco con l'evaporatore e il residuo risultante è stato ripreso con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La miscela risultante è stata quindi trattata con carbone attivo e successivamente filtrata su Celite; la soluzione ottenuta è stata poi portata a piccolo volume avvalendosi dell'evaporatore rotante. L'aggiunta di etere dietilico ha permesso la precipitazione del composto desiderato sotto forma di solido giallo che è in questo modo separato del legante libero 2-metil-6-((feniltio)metil)piridina. Il prodotto finale è stato quindi isolato mediante filtrazione su gooch e successivamente posto in essiccatore per eliminare eventuali tracce di solvente. Sono stati ottenuti 0.0406 g del composto d'interesse, corrispondenti a una resa del 61%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 1.81 (s, 6H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 6H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.39 (s, 6H, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 4.75 – 4.35 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.97 (d, 2H, *J* = 3.2 Hz, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 5.36 (t, 1H, *J* = 3.2 Hz, H<sup>2</sup>), 6.78-6.81, 6.93 – 6.95 (m, 4H, H<sup>4</sup>, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>, H<sup>7</sup>), 6.89 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>), 6.96 (s, 2H, *m*-Mesityl-H), 7.08 (s, 2H, *m*-Mesityl-H), 7.57 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 18.1 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 49.3 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 78.7 (CH, C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>), 109.4 (CH,

C<sup>2</sup>), 117.0 (CH, C<sup>4</sup>, C<sup>7</sup>), 124.3 (CH, CH=CH<sup>lm</sup>), 124.7 (CH, CH=CH<sup>lm</sup>), 125.0 (CH, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>), 129.4 (CH, *m*-Mesityl-CH), 129.5 (CH, *m*-Mesityl-CH), 132.8 (C, C<sup>3a</sup>, C<sup>7a</sup>), 135.2 (C, *o*-Mesityl-C), 135.5 (C, *o*-Mesityl-C), 136.5 (C, *C<sub>ipso</sub>*), 139.9 (C, *p*-Mesityl-C), 163.8 (C, C<sup>carbene</sup>).

### Sintesi [Pd(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Im-Mes)(Ind)]BF<sub>4</sub> (6g-BF<sub>4</sub>)



In una vial da 10 mL munita di ancoretta magnetica e posta in un tamburo riscaldante sono stati introdotti 0.0500 g di [Pd(Ind)(NSPM)]BF<sub>4</sub> (0.0995 mmol) sciolti in 7 mL di CH<sub>3</sub>CN mantenendo poi il sistema termostato a 60°C. Sono stati in seguito inseriti prima 0.0520 g di [H<sub>2</sub>(Mes-Im-CH<sub>2</sub>-Im-Mes)Br<sub>2</sub>] (0.0995 mmol) e quindi, dopo circa 10 minuti, 0.0820 g di di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.5970 mmol). La reazione è stata lasciata proseguire per circa 3 ore durante le quali si è potuto osservare un progressivo viraggio di colore dal rosso scuro al giallo. Trascorso il tempo necessario si è allontanato il solvente in evaporatore rotante portando a secco la soluzione ed il solido ottenuto è stato quindi ridisciolti in dicolorometano. Alla soluzione risultante è stata aggiunta una punta di spatola di carbone attivo e successivamente si è eseguita una filtrazione su Celite. La soluzione ricavata è stata poi portata a piccolo volume in evaporatore rotante. L'aggiunta di un'aliquota di una miscela 1:1 di etere dietilico e pentano ha permesso quindi la precipitazione del prodotto desiderato, il quale è stato poi filtrato su gooch e posto in essiccatore per una notte. Sono stati ottenuti 0.0480 g del composto desiderato, un solido giallo chiaro, corrispondenti a una resa del 70%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 1.81 (s, 6H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 6H, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 6H, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 4.74 (d, 2H, *J* = 3.2 Hz, H<sup>1</sup>, H<sup>3</sup>), 5.81 (t, 1H, *J* = 3.1 Hz, H<sup>2</sup>), 6.19-6.21, 6.74-6.77 (m, 2H, H<sup>4</sup>, H<sup>5</sup>, H<sup>6</sup>, H<sup>7</sup>), 6.47 (AB system, 2H, *J* = 13.0 Hz, 6.47, NCH<sub>2</sub>), 6.81 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>), 7.11 (s, 4H, *m*-Mesityl-H), 8.01 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz, CH=CH<sup>Im</sup>).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ:** 17.7 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 18.1 (CH<sub>3</sub>, *o*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, *p*-Mesityl-CH<sub>3</sub>), 62.5 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>N), 78.4 (CH, C<sup>1</sup>, C<sup>3</sup>), 109.1 (CH, C<sup>2</sup>), 117.5 (CH, C<sup>4</sup>, C<sup>7</sup>), 122.8 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 124.1 (CH, CH=CH<sup>Im</sup>), 124.6 (CH, C<sup>5</sup>, C<sup>6</sup>), 129.5 (CH,

*m*-Mesityl-CH), 129.9 (CH, *m*-Mesityl-CH), 131.6 (C, C<sup>3a</sup>, C<sup>7a</sup>), 135.4 (C, *o*-Mesityl-C), 135.7 (C, *o*-Mesityl-C), 136.1 (C, C<sub>*ipso*</sub>), 140.1 (C, *p*-Mesityl-C), 167.4 (C, C<sup>carbene</sup>).

**<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (377.2 MHz, CDCl<sub>3</sub>, T=298 K, ppm) δ: -151.44.**

## Test in vitro

La valutazione dell'IC<sub>50</sub>, e quindi dell'attività antiproliferativa dei complessi sintetizzati nel seguente lavoro di tesi è stata eseguita su linee selezionate di adenocarcinoma ovarico: A2780, A2780*cis* (unica linea resistenze al cisplatino), OVCAR5, OVCAR3 e KURAMOCHI. È stata inoltre valutata l'attività citotossica dei complessi anche su una linea cellulare sana, MRC5, fibroblasti di natura polmonare. Come controllo positivo è stato impiegato il cisplatino, farmaco ormai noto e utilizzato per molti trattamenti chemioterapici. I protocolli seguiti per questa parte di ricerca sono quelli messi a punto e ampiamente utilizzati dal gruppo di ricerca del Prof. Rizzolio, prima al Centro Oncologico di Aviano (CRO) e ora anche presso l'Università Ca'Foscari.

Reagenti, materiali e strumentazione per la coltura cellulare:

Tutte le linee cellulari trattate sono state precedentemente scongelate dal gruppo di ricerca del Prof. Flavio Rizzolio e quindi e quindi fornite pronte per le procedure di piastramento e trattamento.

Ciascuna linea cellulare necessita di un opportuno terreno per poter proliferare e crescere; nel seguente studio sono stati utilizzati due terreni differenti, uno per le linee tumorali e l'altro per le cellule normali. Entrambi i terreni appena acquistati vengono mantenuti congelati a -20°C, una volta aperti vengono arricchiti con un 10% di FBS (*Fetal Bovin Serum* inattivato), L-Glutammina e 1% di P/S (penicillina e streptomina) e conservati poi a 4°C. Anche i passaggi da una piastra all'altra richiedono l'ausilio di reagenti specifici per promuovere il distacco delle cellule aderite senza però danneggiarle.

Di seguito vengono riportate nel dettaglio le caratteristiche dei terreni utilizzati e degli additivi:

- L'RPMI 1640 è un terreno liquido di colore rosso ed è adatto per colture di cellule aderenti e/o in sospensione. Il seguente terreno è stato utilizzato per le cellule tumorali, quindi per le linee A2780, A2780*cis*, OVCAR5, OVCAR3 e KURAMOCHI. Per quanto riguarda la linea cellulare di A2780*cis*, al terreno in questione è stata aggiunta una quantità nota di cisplatino (600 ng/mL) così da mantenere in questa linea cellulare la resistenza al farmaco. Nel caso specifico è stato utilizzato il terreno della Gibco, acquistato dalla Thermo Fisher.
- Il MEM (with Earle's Salts) è sempre un terreno in fase liquida e sempre di colore rosso ed è stato utilizzato per la linea di cellule sane (MRC5). Anche in questo caso è stato acquistato dall'azienda produttrice Gibco.
- FBS, ovvero siero fetale bovino, è un liquido che fornisce un'ampia varietà di proteine, ormoni e altri nutrienti necessari alle cellule per crescere.

- P/S 100X, è una miscela di antibiotici, in tal caso penicillina e streptomina, utilizzata per prevenire le infezioni batteriche che spesso rischiano di attaccare le cellule in piastra. La miscela utilizzata è stata quella prodotta della Sigma-Aldrich.
- L-Glutamina è un nutriente necessario alle cellule per poter crescere, nel caso dei terreni utilizzati non è stato necessario aggiungerlo perché era già stato inserito dalla ditta produttrice.
- PBS (*phosphate buffered saline*) è una soluzione salina a pH controllato, utilizzata per il lavaggio delle cellule prima del loro conteggio; per il seguente lavoro di tesi è stata utilizzata quella dell'azienda produttrice Thermo-Fisher.
- Tripsina: è una proteina che viene utilizzata per staccare le cellule dalla piastra sulla quale sono aderite e spesso ad essa viene aggiunta una piccola aliquota di EDTA. Nel caso specifico è stata utilizzata la Tripsina (0.25 %) della Gibco per le linee tumorali, mentre per le MRC5 una Tripsina (0.05%) della Sigma-Aldrich.

Infine la lettura delle piastre è stata resa possibile mediante l'utilizzo di un kit adatto al protocollo,; in particolare è stato utilizzato il CellTiter-Glo®, un additivo che permette di promuovere la luminescenza delle cellule vive, attraverso lo sviluppo di ATP.

Gli strumenti utilizzati invece sono stati i seguenti:

- Microscopio Nikon Eclipse Ts2R, grazie al quale è stato possibile controllare il corretto stato di salute delle cellule.
- Synergy™ H1 della BioTek con la quale si è misurata luminescenza delle diverse linee cellulari così da poter poi valutare l'IC<sub>50</sub>.
- Centrifuga Heraeus Multifuge X1R della Thermo Fisher.
- Tutte le colture sono state eseguite su piastre Petri con diametro 5 o 10 cm mentre per i trattamenti ci si avvale dell'uso di piastre *multiwell* da 96.

In seguito verranno descritti nel dettaglio tutti i protocolli seguiti per il corretto trattamento delle linee cellulari.

Le cellule scongelate e mantenute all'interno dell'incubatore a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, vengono costantemente controllate al microscopio e ogni 2/3 giorni necessitano di un cambio di terreno, ed eventualmente di piastra, qualora la confluenza nella Petri sia troppo elevata. Quando vi è la necessità di preparare una piastra *multiwell* per i trattamenti con eventuali complessi si segue un protocollo noto che è il seguente:

1. Rimuovere dalla piastra Petri il terreno;
2. Lavare le cellule con un'aliquota, 5 mL, di PBS, così da eliminare la presenza di eventuali ioni Calcio e Magnesio;
3. Aggiungere della Tripsina alle cellule così da staccarle dalla piastra Petri e riporle in incubatore per qualche minuto;
4. Aggiungere alle cellule il corretto terreno di coltura, nel nostro caso MEM o RPMI;
5. Spostare le cellule in una Falcon da 15 mL e centrifugarle per 5 minuti a 1000 rpm;
6. Ottenuto il pellet, nel quale si trovano le cellule di interesse, rimuovere il surnatante;
7. Sospendere nuovamente le cellule con il terreno arricchito di P/S 100X e l'FBS così da ottenere la soluzione che consentirà poi la conta cellulare.

Il conteggio cellule viene eseguito utilizzando la Camera di Burker. Vengono depositati 10 µL della soluzione appena preparata ricoperti da un vetrino coprioggetti. Si prosegue contando le cellule in ciascuno dei 4 quadrati in angolo e il risultato finale verrà diviso per 4. Il valore ottenuto viene moltiplicato per 10 000 così da ottenere il numero, approssimato, di cellule presenti nella soluzione appena preparata.

Successivamente si prosegue preparando le soluzioni sulla base del numero di cellule che si decide di piastrare per ogni pozzetto. Per le linee tumorali di carcinoma ovarico sono state piastrate all'incirca 1500 cellule per pozzetto, mentre per le MRC5 circa 8000.

In ciascuna *multiwell* da 96 pozzetti sono stati predisposti 24 pozzetti contenenti 1000 µL di coltura cellulare per ciascun complesso testato, in modo da ottenere un triplicato per ogni concentrazione. In ogni piastra sono stati piastrati tre pozzetti che poi non verranno considerati per il trattamento ma serviranno per verificare che la crescita delle cellule sia avvenuta regolarmente. Conclusa la procedura di piastramento, le cellule sono state lasciate in incubatore per 24 ore. Trascorso il tempo necessario, prima di procedere con il trattamento effettivo, ciascuna piastra viene controllata al microscopio per accertarsi che le cellule siano cresciute a sufficienza.

## TRATTAMENTO

La procedura di trattamento prevede *in pirmis* di preparare, per ciascun complesso di palladio, una soluzione fresca 10 mM in DMSO, dalla quale poi vengono eseguite le opportune diluizioni con il terreno di coltura, per ottenere le diverse concentrazioni che verranno utilizzate per il trattamento. Le concentrazioni utilizzate sono state le seguenti: 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.001  $\mu\text{M}$ . Il cisplatino invece viene fornito dal Cro di Aviano alla concentrazione di 3.33 mM.

Per il trattamento sono stati aggiunti a ogni pozzetto 100  $\mu\text{L}$  della soluzione alla dovuta concentrazione, con un triplicato per ciascuna concentrazione. Ogni *multiwell* ha permesso di testare due complessi, uno nei 24 pozzetti nella parte alta della piastra e uno nella parte bassa. Per quanto riguarda i pozzetti di controllo, essi non vengono trattati, proprio per verificare poi la differenza dei valori di luminescenza tra questi e quelli trattati.

Concluso il trattamento, le piastre vengono lasciate in incubatore a 37°C per 96 ore, al termine delle quali poi sarà possibile valutare l'IC<sub>50</sub>.

#### LETTURA E ELABORAZIONE DATI

Trascorse le ore opportune per permettere al complesso di svolgere la sua azione, le piastre vengono tolte dall'incubatore e controllate al microscopio per verificare lo stato vitale delle cellule; in questo modo è anche possibile fare una prima stima di quale potrebbe essere il valore di citotossicità del complesso in esame.

Successivamente viene tolto il terreno e in ogni pozzetto vengono aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di una soluzione di Cell Titer Glo e PBS in rapporto 1:1. L'aggiunta di questa soluzione determina la lisi cellulare e permette quindi di generare un segnale luminescente proporzionale alla quantità di ATP presente all'interno della cellula<sup>35</sup>.

Una volta aggiunta la soluzione a tutti i pozzetti, attesi 10 minuti per permettere alla reazione di procedere, ciascuna piastra viene inserita all'interno del *Synergy<sup>HI</sup> microplate reader*, per poter ottenere i valori di luminescenza, i quali poi vengono elaborati con il software *Graphpad Prism*. Il seguente programma consente di valutare, sulla base dei valori di luminescenza ottenuti, i valori di citotossicità dei complessi in esame e il relativo IC<sub>50</sub> medio. Il risultato finale lo si osserva grazie a una regressione non lineare.

Successivamente i complessi risultati essere più interessanti sono stati testati anche su tumoroide. In particolare nel seguente lavoro di tesi è stato utilizzato l'organoide tumorale caratterizzato dal gruppo di ricerca del prof. Flavio Rizzolio<sup>33</sup>.

La procedura di piastramento è stata eseguita precedentemente, seguendo metodi ormai noti dal gruppo di ricerca del prof. Flavio Rizzolio, e quindi era già disponibile e pronta all'uso. Sono sempre state utilizzate delle *multiwell* da 96 ma in tal caso per ogni concentrazione sono stati eseguiti adibiti 5 pozzetti, a causa dell'elevata variabilità dei seguenti aggregati cellulari. Come nei trattamenti precedenti sono state utilizzate 6 concentrazioni di ciascun complesso (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.001  $\mu\text{M}$ ), per quanto riguarda il valore di riferimento è stato utilizzato il carpoblatino fornito dal CRO, centro oncologico di Aviano, alla concentrazione di 26.94 mM.

Per quanto riguarda la procedura di lettura ed elaborazione dati è stata seguita la stessa metodica descritta in precedenza per le linee cellulari.

## Bibliografia

- <sup>1</sup>AIRC - Fondazione AIRC per la Ricerca sul Cancro, <https://www.airc.it>
- <sup>2</sup>High-Grade Serous Carcinoma | Ovarian Cancer Research Alliance, <https://ocrahope.org/2021/07/high-grade-serous-carcinoma>
- <sup>3</sup>J. Mei, H. Tian, H. Huang, C. Hsu, Y. Liou, N. Wu, W. Zhang and T. Chu, *Cell Prolif.*
- <sup>4</sup>S. Domcke, R. Sinha, D. A. Levine, C. Sander and N. Schultz, *Nat. Commun.*, 2013, **4**, 2126.
- <sup>5</sup>R. Molina, J. M. Escudero, J. M. Augé, X. Filella, L. Foj, A. Torné, J. Lejarcegui and J. Pahisa, *Tumor Biol.*, 2011, **32**, 1087–1095.
- <sup>6</sup>Homepage | Figo, <https://www.figo.org>
- <sup>7</sup>E. Pujade-Lauraine, I. Ray-Coquard and F. Lécuru, Eds., *Ovarian Cancers*, Springer International Publishing, Cham, 2017.
- <sup>8</sup>Y. Zhou, T. K.-Y. Ip, Q. Zhang, H. Li and H. Sun, in *Comprehensive Coordination Chemistry III*, Elsevier, 2021, pp. 680–705.
- <sup>9</sup>S. Dasari and P. Bernard Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.*, 2014, **740**, 364–378.
- <sup>10</sup>U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni and W. Khan, *Pharmaceutics*, 2017, **9**, 12.
- <sup>11</sup>Lipoplatin Clinical Development, <http://regulon.com/lipoplatin/clinicaldevelopment.php>.
- <sup>12</sup>G. Pillai, 2014, 13.
- <sup>13</sup>T. Gianferrara, I. Bratsos and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2009, 7588.
- <sup>14</sup>T. T.-H. Fong, C.-N. Lok, C. Y.-S. Chung, Y.-M. E. Fung, P.-K. Chow, P.-K. Wan and C.-M. Che, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 11935–11939.
- <sup>15</sup>T. Scattolin, E. Bortolamiol, F. Visentin, S. Palazzolo, I. Caligiuri, T. Perin, V. Canzonieri, N. Demitri, F. Rizzolio and A. Togni, *Chem. – Eur. J.*, 2020, **26**, 11868–11876.
- <sup>16</sup>T. Scattolin, V. A. Voloshkin, F. Visentin and S. P. Nolan, *Cell Rep. Phys. Sci.*, 2021, **2**, 100446.
- <sup>17</sup>S. Ray, R. Mohan, J. K. Singh, M. K. Samantaray, M. M. Shaikh, D. Panda and P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 15042–15053.
- <sup>18</sup>T. Scattolin, I. Caligiuri, N. Mouawad, M. El Boustani, N. Demitri, F. Rizzolio and F. Visentin, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **179**, 325–334.
- <sup>19</sup>T. Scattolin, N. Pangerc, I. Lampronti, C. Tupini, R. Gambari, L. Marvelli, F. Rizzolio, N. Demitri, L. Canovese and F. Visentin, *J. Organomet. Chem.*, 2019, **899**, 120857.

- <sup>20</sup>T. Scattolin, E. Bortolamiol, I. Caligiuri, F. Rizzolio, N. Demitri and F. Visentin, *Polyhedron*, 2020, **186**, 114607.
- <sup>21</sup>A. J. Arduengo, R. L. Harlow and M. Kline, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 361–363.
- <sup>22</sup>A. C. Hillier, W. J. Sommer, B. S. Yong, J. L. Petersen, L. Cavallo and S. P. Nolan, *Organometallics*, 2003, **22**, 4322–4326.
- <sup>23</sup>T. Scattolin and S. P. Nolan, *Trends Chem.*, 2020, **2**, 721–736.
- <sup>24</sup>J. C. Garrison and W. J. Youngs, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 3978–4008.
- <sup>25</sup>E. A. Martynova, N. V. Tzouras, G. Pisanò, C. S. J. Cazin and S. P. Nolan, *Chem. Commun.*, 2021, **57**, 3836–3856.
- <sup>26</sup>D. Zargarian, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **233–234**, 157–176.
- <sup>27</sup>R. T. Baker and T. H. Tulip, *Organometallics*, 1986, **5**, 839–845.
- <sup>28</sup>R. T. Carl, R. P. Hughes, A. L. Rheingold, T. B. Marder and N. J. Taylor, *Organometallics*, 1988, **7**, 1613–1624.
- <sup>29</sup>L. Canovese, F. Visentin, C. Levi, C. Santo and V. Bertolasi, *Inorganica Chim. Acta*, 2012, **390**, 105–118.
- <sup>30</sup>L. Canovese, F. Visentin, G. Chessa, P. Uguagliati and G. Bandoli, *Organometallics*, 2000, **19**, 1461–1463.
- <sup>31</sup>L. Canovese, G. Chessa, F. Visentin and P. Uguagliati, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 945–954.
- <sup>32</sup>T. Scattolin, E. Bortolamiol, S. Palazzolo, I. Caligiuri, T. Perin, V. Canzonieri, N. Demitri, F. Rizzolio, L. Cavallo, B. Dereli, M. V. Mane, S. P. Nolan and F. Visentin, *Chem. Commun.*, 2020, **56**, 12238–12241.
- <sup>33</sup>M. Adeel, S. Parisi, M. Mauceri, K. Asif, M. Bartoletti, F. Puglisi, I. Caligiuri, Md. M. Rahman, V. Canzonieri and F. Rizzolio, *ACS Omega*, 2021, **6**, 28611–28619.
- <sup>34</sup>D. B. G. Williams and M. Lawton, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 8351–8354.
- <sup>35</sup>CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, <https://ita.promega.com>.