



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**Sintesi e caratterizzazione di composti di ferrocene
coniugato a peptidi**

Relatore: Prof. Saverio Santi

Laureando: Davide Marinello

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

Abbreviazioni	2
1. Riassunto	3
2. Introduzione	4
2.1 Ferrocene e derivati.....	4
2.2 Potenziale redox del ferrocene coniugato	6
2.3 Aspetti farmacologici	6
3 Parte sperimentale	8
3.1 Strategia di sintesi	8
3.2 Reagenti e solventi	10
3.3 Strumentazione e metodi.....	10
3.4 Sintesi e caratterizzazione	12
4 Risultati e discussioni.....	20
4.1 Analisi ¹ H-NMR e cristallografica dei prodotti con ferrocene.....	20
4.2 Formazione di N-ferrocenilsuccinimide	22
4.3 Diffrazione a raggi X	24
4.4 Voltammetria ciclica.....	26
5. Conclusioni	28
6. Bibliografia	29
7. Materiale di supporto	31
8. Ringraziamenti	33

Abbreviazioni

AA	= Generico amminoacido
ACN	= Acetonitrile
Boc	= Tert-butossicarbonile
Cp	= Ciclopentadienile
DCM	= Diclorometano
DIEA	= N,N-Diisopropilammina
DMSO	= dimetilsolfossido
DNA	= Acido desossiribonucleico
EtOH	= Etanolo
EDC·HCl	= N-Etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloroidrata
Fc	= Ferrocene
Fc ⁺	= Ione ferrocenio
Gly-L-AlaOEt	= Glicina-Alanina estere etilico
HOBt	= 1-idrossi-1,2,3-benzotriazolo
HCl	= Acido cloridrico
HPLC-MS	= Cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiato a spettrometro di massa
KHSO ₄	= Bisolfato di potassio
NaCl	= Cloruro di sodio
NaHCO ₃	= Bicarbonato di sodio
Na ₂ SO ₄	= Solfato di sodio
NMR	= Risonanza Magnetica Nucleare
OH [·]	= Radicale idrossido
RGD	= L-arginina-glicina-L-acido aspartico
ROS	= Specie reattive dell'ossigeno
TLC	= Cromatografia su strato sottile
TFA	= Acido trifluoroacetico
TOF	= Analizzatore a tempo di volo

1. Riassunto

Il presente elaborato fa parte del Progetto di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) “Synthesis and biomedical applications of tumor targeting peptidomimetics and conjugates”, p.i. prof. Fernando Formaggio, e si pone come obiettivi la sintesi e lo studio di peptidi coniugati ad unità di ferrocene con lo scopo di impiegarli come agenti antitumorali.

Le molecole di studio sono descrivibili come somma di tre unità, ognuna con specifiche funzioni: un gruppo ferrocene con proprietà elettroattive, uno spaziatore organico e una porzione peptidica di riconoscimento per la cellula neoplastica. La funzione dello spaziatore, oltre a fungere da saldo collegamento fra il ferrocene e gli amminoacidi è quella di modulare il potenziale redox della coppia ferrocene/ferrocenio e fornire la flessibilità adatta per poter interagire con le integrine tumorali.

Questo studio si concentra sull'impiego dell'acido succinico come spaziatore. È stata messa a punto una via di sintesi efficace per ottenere ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-AlaOEt ($\text{Fc-NH-COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-Gly-L-Ala-OEt}$) a partire da aminoferrocene, anidride succinica e dipeptide. Vengono infine proposte strategie per il futuro di questi composti, come la sostituzione del peptide Gly-L-Ala con L-Arg-Gly-L-Asp (RGD), e test di stabilità in condizioni fisiologiche.

2. Introduzione

2.1 Ferrocene e derivati

Il ferrocene (Fc) è un composto organometallico formato da un atomo di ferro (II) legato da due molecole ciclopentadiene (Cp) con configurazione detta “sandwich”. I due legandi organici contribuiscono al legame col ferro ciascuno con 6 elettroni cosicché il Fe in configurazione elettronica $3d^6$ raggiunga complessivamente 18 elettroni nel guscio esterno. In accordo con la regola empirica dei 18 elettroni si spiega l'estesa stabilità di questo complesso all'aria e in soluzione fino a 400°C .¹ In condizioni ossidanti il ferrocene si ossida passando da Fe(II) a Fe(III) con la cessione di un elettrone a formare lo ione ferrocenio² (Fig.1).

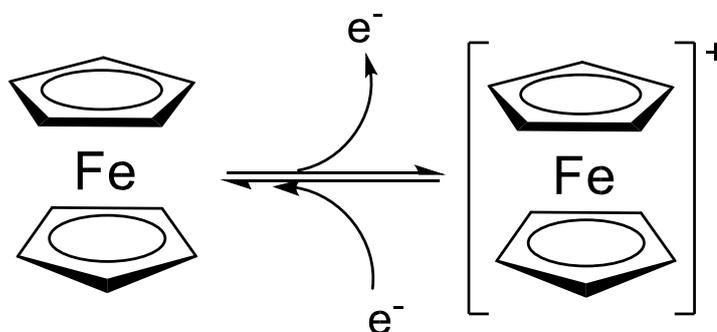


Figura 1. Ossidoriduzione di ferrocene a ferrocenio.

Il ferrocene e i suoi derivati sono da anni oggetto di studio, dimostrandosi molecole versatili e con numerosi campi di applicazione. In ambito medico si possono ritrovare in farmaci antitumorali, antiproliferativi, antimicotici e antibatterici, antidepressivi e antinfiammatori. Tra le applicazioni non sanitarie esistono prototipi di catalizzatori in sintesi organica, sensori elettrochimici e biosensori³ (Fig.2).

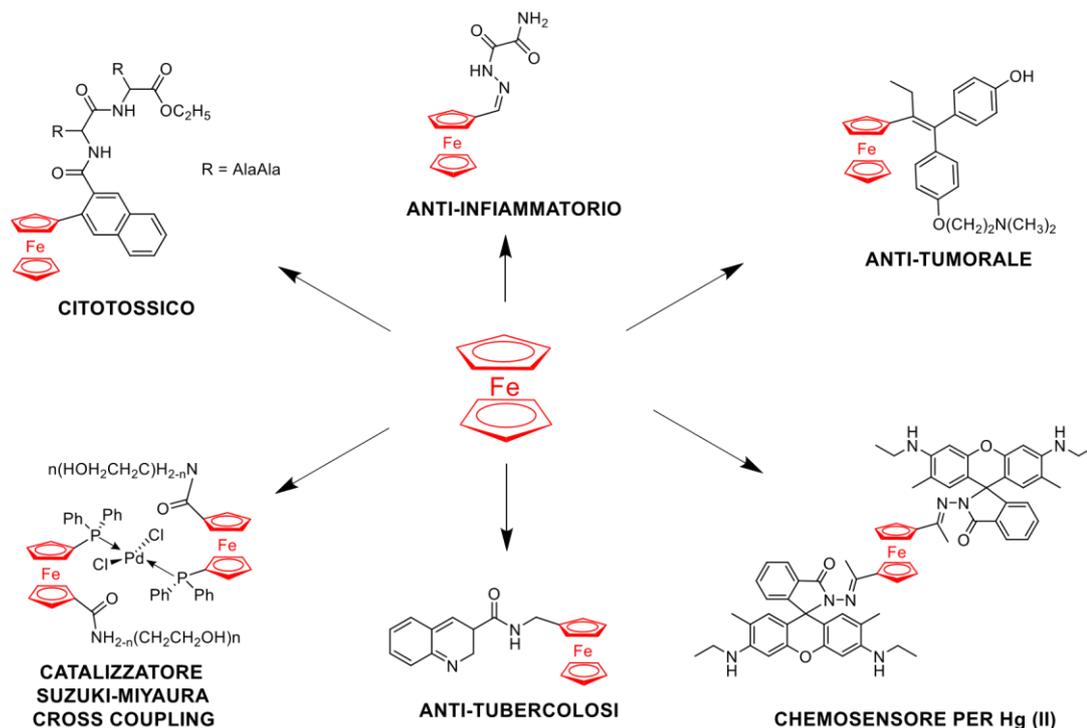


Figura 2. Derivati del ferrocene e relativi esempi di applicazioni.

I composti ferrocenilici esaminati in questo studio sono quelli contenenti una porzione peptidica coniugata al ferrocene tramite uno spaziatore alifatico (Fig. 3).

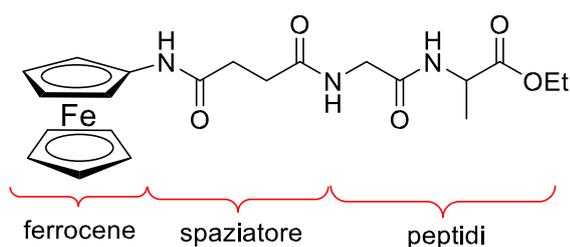


Figura 3. Struttura ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt

Questa classe di composti ancora in fase di sviluppo possiede le potenzialità per diventare in futuro un farmaco antitumorale: il ferrocene esprime il suo effetto citotossico inducendo la formazione di specie radicaliche in loco; la sezione peptidica può essere facilmente modificata per il riconoscimento delle proteine tumorali mentre lo spaziatore modula l'attività redox del Fc e contribuisce alla selettività del farmaco.⁴

2.2 Potenziale redox del ferrocene coniugato

Il ferrocene in ambiente acquoso ha un potenziale di ossidazione monoelettronico di +0.4 vs SCE, compatibile dunque con l'ambiente intracellulare (-0.40 e +0.44 V).⁵ Il processo di ossidazione è fortemente influenzato dai sostituenti legati al Cp che ne modificano la distribuzione elettronica. In letteratura, ad esempio, si riscontra un $E_{1/2}$ per il composto N-(ferrocenil)AlaAlaOEt pari a 0.68 mV vs SCE,⁶ stando a indicare che la presenza del dipeptide sfavorisce l'ossidazione del ferro. Quest'effetto è dovuto all'azione elettroneattrattrice del gruppo carbonile che depaupera parte della densità elettronica del ferrocene. In queste condizioni l'ossidazione del ferro è sfavorita perché porterebbe un'ulteriore carica positiva che andrebbe a sommarsi all'effetto precedente, destabilizzando il complesso. Per il composto 6-ferrocenil-2-naftoil-Ala-Ala-OEt il potenziale di ossidazione è nettamente minore (42 mV vs Fc/Fc+)⁶ grazie allo spaziatore naftoile che riesce ad allontanare il gruppo Fc dal carbonio carbonilico (effetto induttivo ridotto) e fornisce densità elettronica sufficiente da mitigare l'effetto del carbonile.

Sono state svolte ulteriori misure elettrochimiche testando spaziatori diversi (aromatici e alifatici) concludendo che la presenza di questi è necessaria per conferire potenziali più bassi alla molecola. Qui nasce l'intuizione di legare il ferrocene ad un gruppo elettrondonatore che mantenga il potenziale redox a circa +0.4 V e permetta una sintesi più semplice ed efficace.

Si ipotizza che il potenziale non subisca forti alterazioni nel caso in cui il ferrocene sia legato direttamente all'azoto ammidico dello spaziatore. Questo è oggetto di verifica nel presente lavoro di tesi.

2.3 Aspetti farmacologici

L'attività citotossica del ferrocene è, tra altri meccanismi, mediata dalla sua capacità di provocare la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), in base al suo potenziale redox (+0,40 V), compatibile con quello intracellulare che va da +0,40V a -0,44 V. Pertanto, Fc subisce reazioni di trasferimento di elettroni e cicli redox all'interno della cellula.⁷ Fc(II) reagisce attraverso l'ossidazione reversibile di un elettrone tramite una reazione di tipo Fenton a catione ferrocenio $Fc^+(III)$, generando

così $\cdot\text{OH}$ e concomitaneamente ROS⁸ i quali inducono la scissione del DNA⁹ e la morte cellulare.² L'attività antitumorale del ferrocene è tuttavia bassa¹⁰ a causa della traslocazione intracellulare ostacolata e della scarsa solubilità in acqua.¹¹

L'espressione dell'effetto citotossico del Fc non distingue le cellule neoplastiche da quelle sane, perciò, per evitare danni collaterali, occorre integrare al ferrocene una porzione peptidica in grado di riconoscere le proteine tumorali. Tra i potenziali *target* selettivi ci sono le "integrine", recettori di membrana coinvolte in numerosi processi nello sviluppo e progressione del cancro (migrazione, adesione, proliferazione). Dei 24 diversi sottotipi di integrine conosciuti nei mammiferi, otto legano i loro specifici legandi tramite un tripeptide di riconoscimento RGD; questi includono le proteine $\alpha\beta3$, $\alpha\beta6$ e $\alpha5\beta1$ che sono sovraesprese in vari tipi di cancro.

Un primo tentativo per misurare l'attività di una molecola ferrocene-spaziatore-RGD è stato con Fc-6-Ahx-RGD e Fc-6-Ahx-(RGDfk)⁵ (Fig. 4):

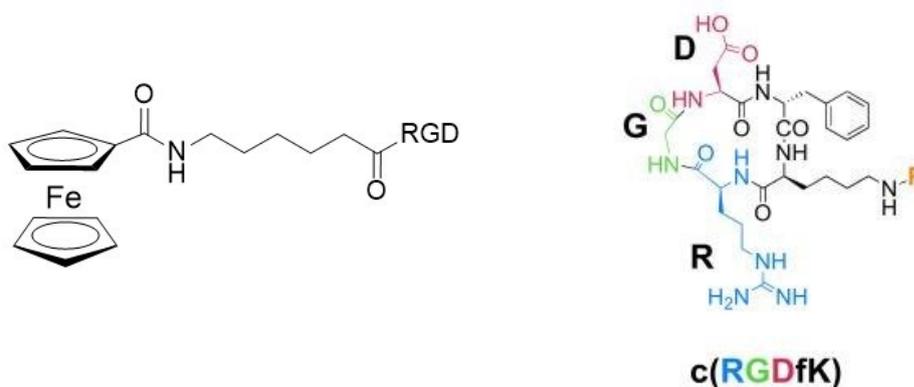


Figura 4. Strutture di Fc-6-Ahx-RGD (destra) e Fc-6-Ahx-(RGDfk). R = Fc-6-Ahx (sinistra)

Le due molecole possiedono la porzione peptidica in grado di interagire con l'integrina $\alpha\beta3$. Entrambi hanno mostrato una discreta attività citotossica e il secondo composto risulta selettivo per $\alpha\beta3$.

Utilizzare dunque RGD o suoi derivati all'interno di un ipotetico principio attivo può rivelarsi una strategia vincente per aumentare l'efficacia del farmaco antitumorale.

3 Parte sperimentale

3.1 Strategia di sintesi

La sintesi prevede l'utilizzo di amminoferrocene, amminoacidi distinti e anidride succinica per ottenere il gruppo succinile legato a un'unità ferrocene e al dipeptide/tripeptide.

Lo schema seguito per la sintesi di ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt è riportato in Figura 5:

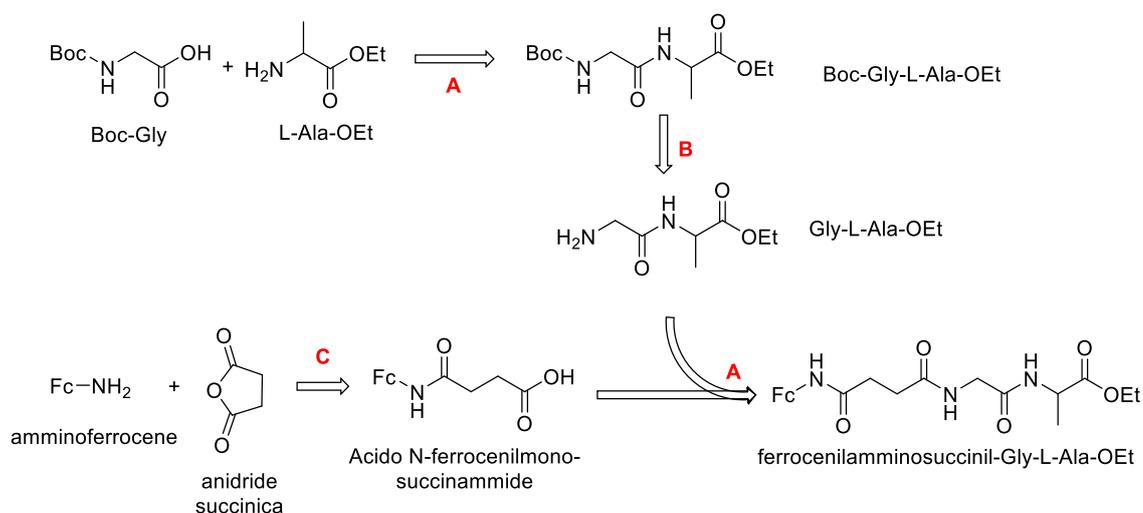


Figura 5. Schema riassuntivo sintesi ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt.

A: EDC + HOBt + DIEA;

B: TFA/DCM;

C: DIEA;

L'accoppiamento degli amminoacidi avviene per "coupling" con formazione del legame peptidico previa attivazione del gruppo carbossilico. La condensazione diretta tra gruppi -NH₂ e -COOH richiederebbe temperature non compatibili con l'ambiente di reazione (160-180°C), per cui si utilizza idrossibenzotriazolo (HOBt) e N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide (EDC)¹³ allo scopo di convertire il gruppo carbossilico a estere attivato e velocizzare la reazione (Fig. 6). La reazione che lega l'amminoferrocene e l'anidride succinica non richiede l'attivazione del carbonile e avviene spontaneamente in ambiente basico.

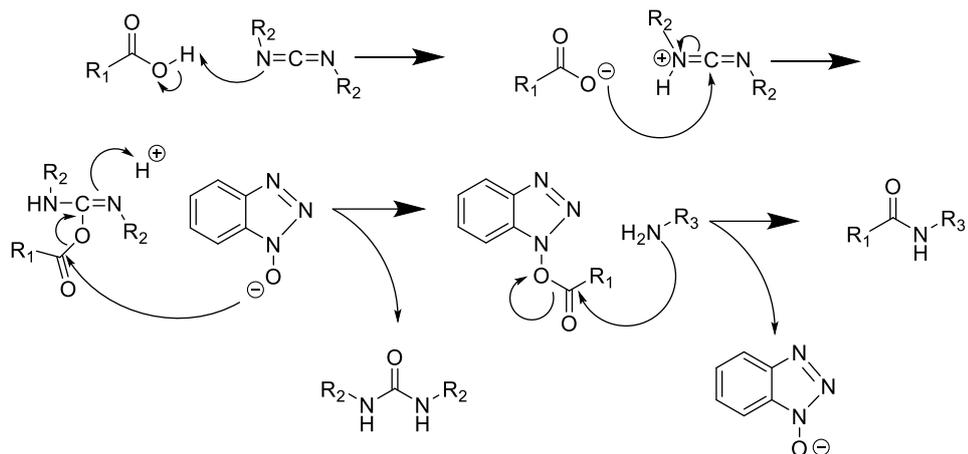


Figura 6. Meccanismo di coupling con EDC e HOBT.

Nei reagenti Boc-Gly-OH e Boc-L-Arg(NO₂)-OH il gruppo amminico non è direttamente disponibile ma si trova legato al gruppo protettore ter-butilossicarbonile (Boc) il quale aiuta la conservazione del composto. Prima di una qualunque reazione che interessi il gruppo -NH₂ è necessario dissociare il Boc con un acido forte (Fig. 7). Nel seguente lavoro si è utilizzato l'acido trifluoroacetico (TFA), un acido organico che ben si adatta all'ambiente idrofobico e che garantisce il completo distacco del gruppo protettore.

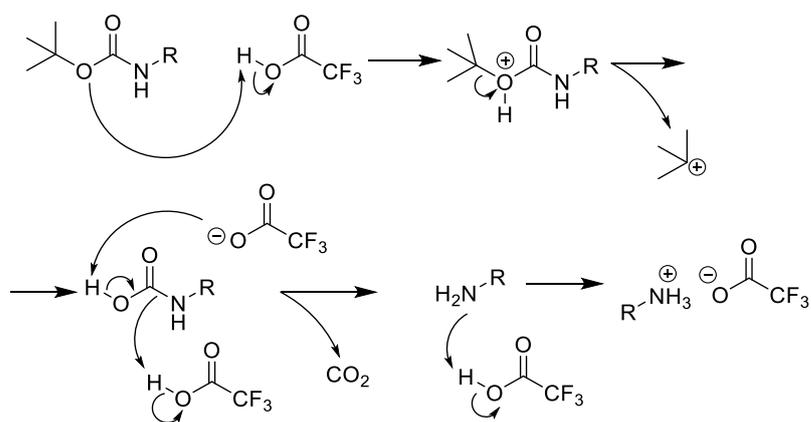


Figura 7: meccanismo di dissociazione Boc con TFA/DCM

È descritto in seguito anche un primo approccio sintetico di ferrocenilamminosuccinil-RGD per verificare se la procedura che ha condotto a N-ferrocenilmonosuccinamide-Gly-L-Ala-OEt è adatta anche diversificando la catena peptidica.

3.2 Reagenti e solventi

Carlo Erba: diclorometano, acido trifluoroacetico, etanolo, *n*-esano, acetato di etile, etere etilico.

Sigma Aldrich: anidride succinica, amminoferrocene, idrossibenzotriazolo idrato (HOBt·H₂O), N,N-diisopropilammina (DIEA).

Eurisotop: cloroformio deuterato, DMSO-d₆

Iris Biotech: N-etil-N'-(3-dimetilammino)propil-carbodiimmide cloridrato (EDC · HCl), Boc-L-Arg(NO₂)-OH, Boc-Gly-OH, H₂N-L-Ala-OEt, OH-L-Asp(OBzl)Bzl.

3.3 Strumentazione e metodi

Cromatografia su strato sottile TLC

Il decorso delle reazioni è stato seguito attraverso Cromatografia su strato sottile usando lastre di gel di silice 60 F₂₅₄. I composti ottenuti, contenenti ferrocene, sono stati osservati con lampada UV (λ : 254 nm). Gli eluenti utilizzati sono:

- Diclorometano : etanolo (9:1) con aggiunte 3/4 gocce di acido acetico facoltative;
- *n*-esano : acetato di etile (1:1)

Cromatografia Flash

Si utilizza lo strumento Biotage TM Isolera One abbinato a colonne in gel di silice SNAP KP-SIL di varie capacità come fase stazionaria. Il campione è fatto adsorbire su una piccola quantità di gel di silice per poi essere caricato in colonna.

HPLC accoppiato a spettrometro di massa

Si utilizza un cromatografo “Agilent Technologies 1260 Infinity II” con rivelatore UV ed eluenti A (H₂O milli-Q + 0.1% TFA) e B (ACN + 0.1% TFA). Il sistema è accoppiato allo spettrometro di massa a tempo di volo TOF “Agilent Technologies 6130 quadrupole LC/MS” con ionizzatore ESI (electrospray ionization). Il campione è solubilizzato in metanolo prima dell'analisi HPLC.

Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

Si utilizza lo strumento “Bruker Avance III HD” operante a 400.13 MHz e 298 K. Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parti per milione (ppm) rispetto al segnale del tetrametilsilano. I campioni analizzati sono in soluzione di cloroformio deuterato o DMSO- d_6 . Le molteplicità dei picchi sono espresse come s (singoletto), d (doppio), t (tripletto), m (multipletto), b (allargato).

Diffrazione a raggi X

Si utilizza il diffrattometro per cristallo singolo a quattro cerchi “Xcalibur, Atlas, Gemini”. Il cristallo è ottenuto solubilizzando il campione in un solvente (cloroformio oppure metanolo) e facendo evaporare lentamente il solvente.

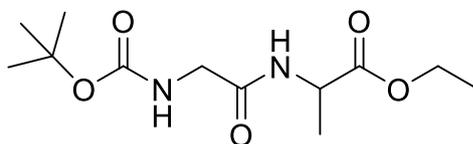
Voltammetria ciclica

È stata eseguita un'analisi di voltammetria ciclica impiegando un elettrodo di lavoro in oro del diametro di 0.125 mm e 0.5 mm, un contro elettrodo costituito da un filo di platino e un elettrodo di riferimento a calomelano saturo ($\text{Hg} / \text{Hg}_2\text{Cl}_2 / \text{KCl}$). È stato utilizzato un generatore di funzioni modello EG&G PAR-175 e un potenziostato costruito nel laboratorio di ricerca per la compensazione della caduta ohmica. Corrente e potenziali sono stati registrati con un oscilloscopio Lecroy 9310L.

3.4 Sintesi e caratterizzazione

Tutte le reazioni sono state eseguite in soluzione ed atmosfera inerte.

Sintesi di Boc-Gly-L-Ala-OEt



In un pallone si inseriscono Boc-Gly-OH (1.5058 g = 8.59 mmol), diclorometano anidro (30 mL), HOBt·H₂O (1.4658 g = 9.57 mmol) e EDC·HCl (1.8394 g = 9.60 mmol). In un secondo pallone si scioglie H₂N-L-Ala-OEt (1.3372 g = 8.07 mmol) in 30 mL di diclorometano anidro per poi essere aggiunta alla prima soluzione. Si aggiunge DIEA (3.1 mL = 0.1780 mol) verificando con una cartina tornasole che il pH sia tra 7-8 e si lascia sotto agitazione con un'ancoretta magnetica, a temperatura ambiente e atmosfera inerte. Trascorse 3 ore dall'aggiunta della base, la soluzione viene seccata in evaporatore rotante e poi sciolta in 100 mL di acetato di etile. Si esegue una serie di estrazioni in imbuto separatore con soluzioni acquose di NaHCO₃ 5% (3x30 mL), KHSO₄ 10% (3x30 mL) e NaCl satura (3x30 mL). La fase organica residua è anidrificata con Na₂SO₄ per 1 ora, per poi essere filtrata e tirata a secco in rotavapor. Il residuo appare oleoso.

Massa prodotto = 2.11 g

RESA = 90%

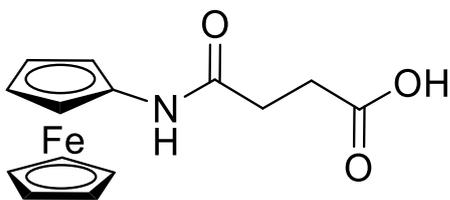
R_f Boc-Gly-L-Ala-OEt (DCM:EtOH 9:1 + 3 gocce acido acetico) = 0.87

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{calc}=274.316 ;

[M-Boc+H]⁺_{sper}= 175.1

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 6.63 (d, 1H, NH Ala), 5.14 (s, 1H, NH Gly), 4.58 (m, 1H, CH Ala), 4.21 (q, 2H, CH₂ OEt), 3.82 (m, 2H, CH₂ Gly), 1.46 (s, 9H, Boc), 1.42 (d, 3H, CH₃ Ala), 1.29 (t, 3H, CH₃ OEt).

Acido N-ferrocenilmonosuccinammide



In un pallone si inserisce Fc-NH₂ (0.4995 g = 2.48 mmol) sciolto in 10 mL diclorometano anidro e si basifica con DIEA (0.43 mL = 2.47 mmol). Si aggiunge poi anidride succinica con un eccesso del 10% (0.2735 g = 2.73 mmol) e si porta il pH tra 7-8 aggiungendo altri 0.10 mL (= 0.57 mmol) di DIEA e controllando con la cartina tornasole. Si lascia la miscela di reazione in agitazione con un'ancoretta magnetica a temperatura ambiente e in atmosfera di Ar.

Trascorse 24 ore dall'aggiunta della base, la soluzione appare di colore giallo intenso e viene seccata e poi disciolta in 120 mL acetato di etile. Si effettua una serie di estrazioni in imbuto separatore lavando con soluzioni acquose di KHSO₄ 10% (4x30 mL) e acqua (4x30 mL). La soluzione organica restante viene anidrificata con Na₂SO₄ per 1 ora, filtrata e tirata a secco in rotavapor. Il prodotto è una polvere gialla.

Si esegue una TLC del prodotto ottenuto usando Fc-NH₂ come riferimento. La lastra mostra una singola macchia. Una quota di N-ferrocenilmonosuccinammide è utilizzata per ottenere un cristallo per analisi diffrattometrica a raggi X.

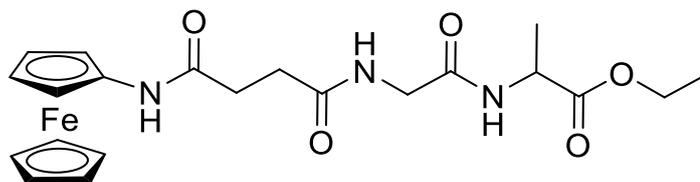
Massa prodotto = 0.71 g

RESA = 95 %

Rf acido N-ferrocenilmonosuccinammide (DCM : EtOH 9:1 + 4 gocce acido acetico) = 0.52

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 12.12 (s, 1H, OH), 9.31 (s, 1H, NH Fc), 4.56 (t, 2H, Fc), 4.09 (s, 5H, Fc), 3.92 (t, 2H, Fc), 2.49 (m, 2H, CH₂), 2.38 (m, 2H, CH₂).

Ferrocenilamminosuccinil -Gly-L-Ala-OEt



La prima parte della reazione prevede la rimozione del gruppo protettore Boc per trattamento con una miscela 1:1 di TFA e DCM.

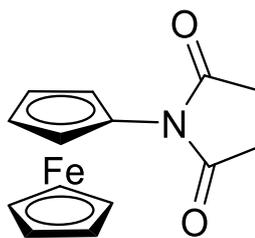
In un pallone si scioglie Boc-Gly-L-Ala-OEt (0.18g = 0.6607 mmol) in 1 mL di DCM e si aggiunge 1 mL di TFA. Si lascia sotto agitazione con un'ancoretta magnetica in atmosfera inerte. Dopo 2h la soluzione viene seccata in rotavapor e ripresa per cinque volte con 5 mL etere etilico.

Si scioglie quindi H-Gly-L-Ala-OEt in 10 mL di diclorometano anidro e si aggiunge DIEA fino a pH 7-8 (0.10 ml = 0.5742 mmol). Successivamente in un altro pallone si introducono Fc-NHCOCH₂CH₂COOH (0.18 g = 0.5978 mmol), 24 mL diclorometano anidro, HOBT · H₂O (0.1013 g = 0.6615 mmol) e EDC·HCl (0.1270 g = 0.6625 mmol) a cui si aggiunge la soluzione di H-Gly-L-Ala-OEt e DIEA in diclorometano. Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione mediante ancoretta magnetica a temperatura ambiente e in battente di argon.

La reazione procede per 24 ore dopodiché la soluzione viene seccata in rotavapor e solubilizzata in 100 mL acetato di etile. Si esegue una serie di estrazioni in imbuto separatore lavando con soluzioni acquose di NaHCO₃ 5% (4x25 mL), acqua distillata (1x25 mL), KHSO₄ 10% (3x25 mL) infine acqua distillata (3x25 mL). Il residuo organico è anidrificato con Na₂SO₄ per 1 ora per poi essere filtrato e tirato a secco. Il prodotto appare solido e giallo intenso. Si fa una TLC del prodotto utilizzando come eluente DCM:EtOH 9:1. La lastra presenta due macchie distinte.

Parte del prodotto è utilizzato per svolgere un'analisi HPLC-MS e NMR protonico. Si osservano due picchi molecolari: uno a 457 (picco del prodotto desiderato) e uno a 283 (sospetto composto N-ferrocenilsuccinimide).

L'analisi NMR conferma la presenza contemporanea di ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt e di N-ferrocenilsuccinimide.



N-ferrocenilsuccinimide

I due composti sono separati mediante Cromatografia Flash, utilizzando come eluenti diclorometano ed etanolo. Si ottiene una polvere arancio. Una quota di N-ferrocenilsuccinimide è stata utilizzata per ottenere un cristallo per analisi diffrattometrica a raggi X.

Massa Fc-NH-COCH₂CH₂CO-Gly-L-Ala-OEt = 0.08 g

RESA = 30%

R_f Fc-NH-COCH₂CH₂CO-Gly-L-Ala-OEt (DCM:EtOH 9:1) = 0.71

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{calc} = 457.5

[M]⁺_{sper} = 457.1

[M+Na]⁺_{sper} = 480

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.12 (s, 1H, NH Fc), 6.76 (d, 1H, NH Ala), 6.51 (t, 1H, NH Gly), 4.66 (s, 1H, Fc), 4.64 (s, 1H, Fc), 4.55 (m, 1H, CH Ala), 4.21 (s, 5H, Fc), 4.18 (m, 2H, CH₂ OEt), 4.10 (s, 2H, Fc), 3.98 (dd, 2H, CH₂ Gly), 2.60 (m, 4H, CH₂), 1.40 (d, 3H, CH₃ Ala), 1.28 (t, 3H, CH₃ OEt).

Massa N-ferrocenilsuccinimide = 0.01 g

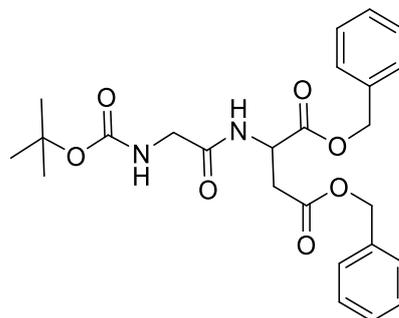
R_f N-ferrocenilsuccinimide (DCM : EtOH 9:1) = 0.95

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{calc} = 283.1

[M]⁺_{sper} = 283

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 4.91 (t, 2H, Fc), 4.19 (s, 5H, Fc), 4.16 (t, 2H, Fc), 2.78 (s, 4H, CH₂).

Boc-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl



In un pallone si scioglie Boc-Gly-OH (0.2503g = 1.428 mmol) in 7 mL diclorometano anidro. Si aggiunge quindi HOBt·H₂O (0.2406g = 1.57 mmol), EDC·HCl (0.3008g = 1.57 mmol), H₂N-L-Asp(OBzl)Bzl in 10 mL diclorometano anidro, DIEA (0.625 mL = 3.589 mmol) fino a pH basico. La miscela di reazione viene posta sotto agitazione con un'ancoretta magnetica, a temperatura ambiente e in battente di argon.

Dopo 24 ore si tira a secco la soluzione e si aggiungono 70 mL acetato di etile e 18 mL diclorometano. Si esegue una serie di estrazioni in imbuto separatore lavando con soluzioni acquose di NaHCO₃ 5% (3x15 mL), acqua (1x15 mL), KHSO₄ 10% (3x15 mL) e NaCl (1x10mL). Il residuo organico è anidrificato con NaSO₄ per 1 ora per poi essere filtrato e tirato a secco. La TLC condotta sul prodotto mostra segni di impurezze per cui il prodotto viene purificato tramite Cromatografia Flash utilizzando come eluente una soluzione di n-esano : acetato di etile 1:1. Si ottiene un olio trasparente.

Massa Boc-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl = 0.60 g

Resa = 90 %

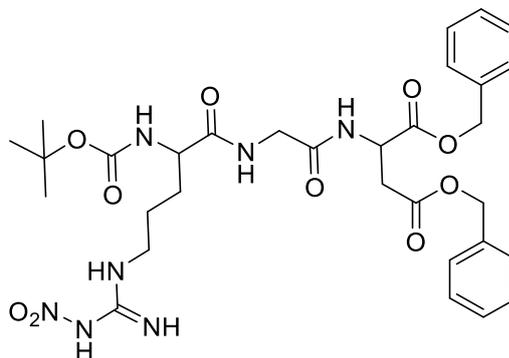
R_f Boc-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl (n-esano:acetato di etile 1:1) = 0.55

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{calc} = 470.52

[M+Na]⁺_{sper} = 493

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.32 (m, 10H, Bzl), 6.96 (d, 1H, NH Asp), 5.14 (m, 2H, CH₂ Bzl), 5.05 (m, 3H, NH Gly, CH₂ Bzl), 4.90 (m, 1H, CH Asp), 3.80 (m, 2H, CH₂ Gly), 2.99 (m, 2H, CH₂ Asp), 1.45 (s, 9H, Boc).

Boc-L-Arg(NO₂)-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl



Si rimuove il gruppo protettore Boc da Boc-Gly-L-Asp(OBz)Bzl (0.296g = 0.6291 mmol) come descritto precedentemente.

Si scioglie H-Gly-L-Asp(OBz)Bzl in 10 mL diclorometano anidro e DIEA (0.15 mL = 0.8612 mmol). In un altro pallone si scioglie Boc-L-Arg(NO₂)-OH (0.2012g = 0.6301 mmol) in 15 ml diclorometano e si aggiunge HOBt·H₂O (0.1114g = 0.7275 mmol), EDC·HCl (0.1399g = 0.7298 mmol) e la soluzione di dipeptide e DIEA. Si introduce 10 mL di diclorometano e si pone la miscela di reazione sotto agitazione con un'ancoretta magnetica, a temperatura ambiente e in atmosfera inerte. Dopo 24 ore si aggiunge altro HOBt·H₂O (0.0100 g) e EDC·HCl (0.0122g) in eccesso del 10%.

Trascorsa un'ora la soluzione di reazione è seccata in evaporatore rotante e sciolta in 120 mL di acetato di etile. Si esegue una serie di estrazioni in imbuto separatore lavando con soluzioni acquose di NaHCO₃ 5% (4x20 mL), acqua (1x20mL), KHSO₄ 10% (4x20mL) e acqua (3x20mL). Il residuo organico è anidrificato con NaSO₄ per 1 ora per poi essere filtrato e tirato a secco in evaporatore rotante. La TLC del prodotto mostra tracce di impurezze. Si procede purificando il prodotto con Cromatografia Flash utilizzando come eluente DCM : EtOH 9:1. Si ottiene una polvere bianca.

Massa RGD = 0.14 g

Resa = 33.3%

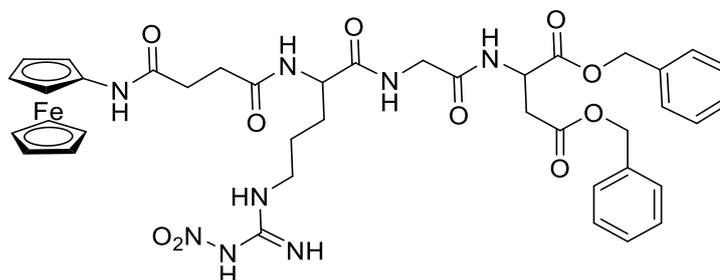
R_f RGD (DCM:EtOH 9:1) = 0.61

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{calc} = 671.71

[M - (CH₃)₃C]⁺_{sper} = 616

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 8.47 (s, 1H, NH Arg), 8.43 (d, 1H, NH Asp), 8.06 (t, 1H, NH Gly), 7.81 (s 1H, NH Arg), 7.34 (m, 10H, Bzl), 6.95 (d, 1H, NH Arg), 5.09 (s, 2H, CH_2 Bzl), 5.06 (s, 2H, CH_2 Bzl), 4.76 (m, 1H, CH Asp), 3.93 (m, 1H, CH Arg), 3.73 (m, 2H, CH_2 Gly), 3.11 (m, 2H, CH_2 Arg), 2.85 (m, 2H, CH_2 Asp), 1.65 (m, 1H, CH_2 Arg), 1.49 (m, 3H, CH_2 Arg), 1.37 (s, 9H, Boc).

ferrocenilmonosuccinammide-L-Arg(NO₂)-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl



Si rimuove il gruppo protettore Boc da Boc-L-Arg(NO₂)-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl trattando il tripeptide (0.14 g = 0.208 mmol) sciolto in 2 mL diclorometano anidro con TFA (0.8 mL = 0.0108 mol). Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione e in atmosfera inerte per circa due ore; quindi, si evapora il solvente e si riprende per sei volte con 5 mL di etere etilico.

Si scioglie quindi in diclorometano e si aggiunge DIEA fino a raggiungere pH basico (0.16 mL = 0.9186 mmol). La soluzione così ottenuta viene aggiunta a un pallone contenente Fc-NHCOCH₂CH₂COOH (0.0626 g = 0.207 mmol), 10 mL diclorometano anidro, HOBt·H₂O (0.0351 g = 0.2296 mmol) e EDC·HCl (0.0440 g = 0.2295 mmol). Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione con un'ancoretta magnetica, a temperatura ambiente e in atmosfera inerte.

La reazione procede per 24 ore e successivamente si aggiunge un 10% di HOBt·H₂O (0.0031g = 0.0202 mmol) e di EDC·HCl (0.0040 g = 0.0209 mmol) insieme a 5 mL diclorometano anidro per portare la reazione a compimento.

Trascorse 3 ore dalle aggiunte si secca il solvente in evaporatore rotante e si scioglie il residuo in 90 mL di acetato di etile e 5 mL di diclorometano. Si esegue una serie di estrazioni in imbuto separatore lavando con soluzioni acquose di NaHCO₃ 5% (4x20 mL), acqua (1x20 mL), KHSO₄ 10% (4x20 mL) infine acqua (3x20 mL). La fase

organica residua è anidrificata con Na₂SO₄ per 1 ora per poi essere filtrata e portata a secco. La TLC del prodotto ottenuto rileva delle impurezze per cui si purifica il prodotto per Cromatografia Flash utilizzando come eluente DCM : EtOH 9:1. Dalla purificazione e le successive analisi HPLC-MS delle frazioni si riconoscono le molecole N-ferrocenilsuccinimide (per reazione intramolecolare) e Fc-NH-COCH₂CH₂CO-L-Arg(NO₂)-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl in presenza di altre impurezze.

MS (ESI/TOF) m/z: [M]⁺_{calc}= 854.8

[M+Na]⁺_{sper}= 854

4 Risultati e discussioni

4.1 Analisi $^1\text{H-NMR}$ e cristallografica dei prodotti con ferrocene

Acido N-ferrocenilmonosuccinammide

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 dell'acido $\text{Fc-NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (Fig. 8) mostra il segnale allargato del protone carbossilico a 12,1 ppm e la risonanza del protone ammidico a 9,3 ppm. Nella regione tra 2,50 ppm e 2,30 ppm si notano due multipletti parzialmente sovrapposti al segnale del solvente (DMSO non deuterato) che corrispondono ai protoni metilenici dell'acido succinico. I segnali del ferrocene, tipici della specie monosostituita, si presentano come un tripletto, un singoletto e un tripletto nella regione compresa tra 4,60 ppm e 3,80 ppm, integranti rispettivamente per due, cinque e due protoni.

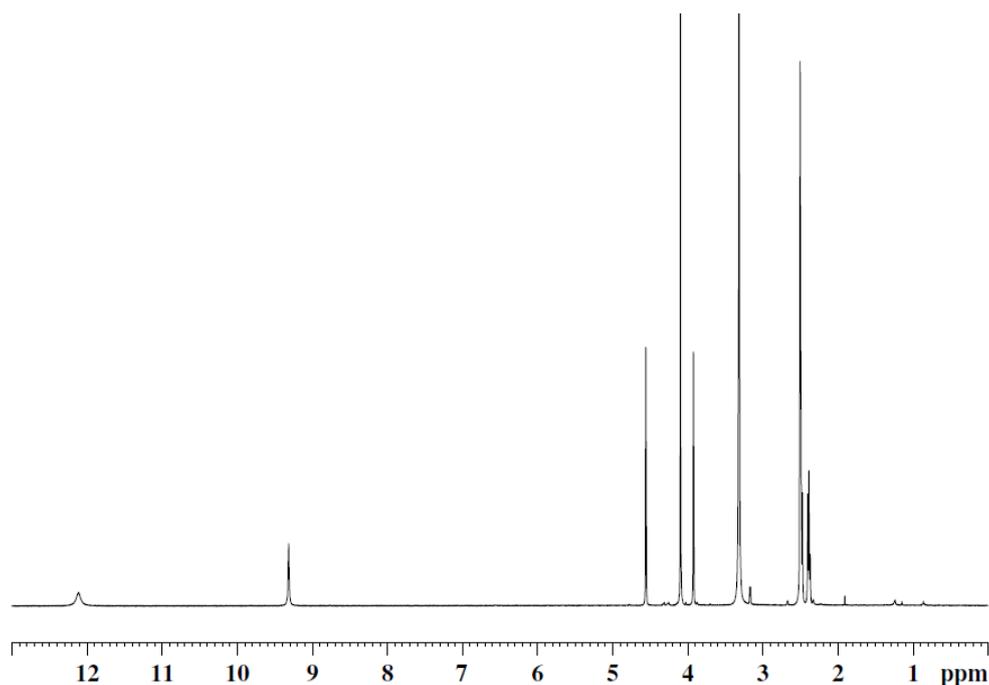


Figura 8. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di Acido N-ferrocenilmonosuccinammide in soluzione di DMSO-d_6 .

N-Ferrocenilsuccinimide

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ della N-ferrocenilsuccinimide in CDCl_3 (Fig. 9) mostra nell'intervallo tra 5,00 ppm e 4,00 ppm i segnali del ferrocene della specie monosostituita come un tripletto, un singoletto e un tripletto e a 2,79 ppm un singoletto che corrisponde ai protoni metilenici del ciclo. I due segnali a 7,26 ppm e 1,6 ppm

corrispondono, rispettivamente, alla piccola percentuale di solvente non deuterato e all'acqua contenuta nel solvente.

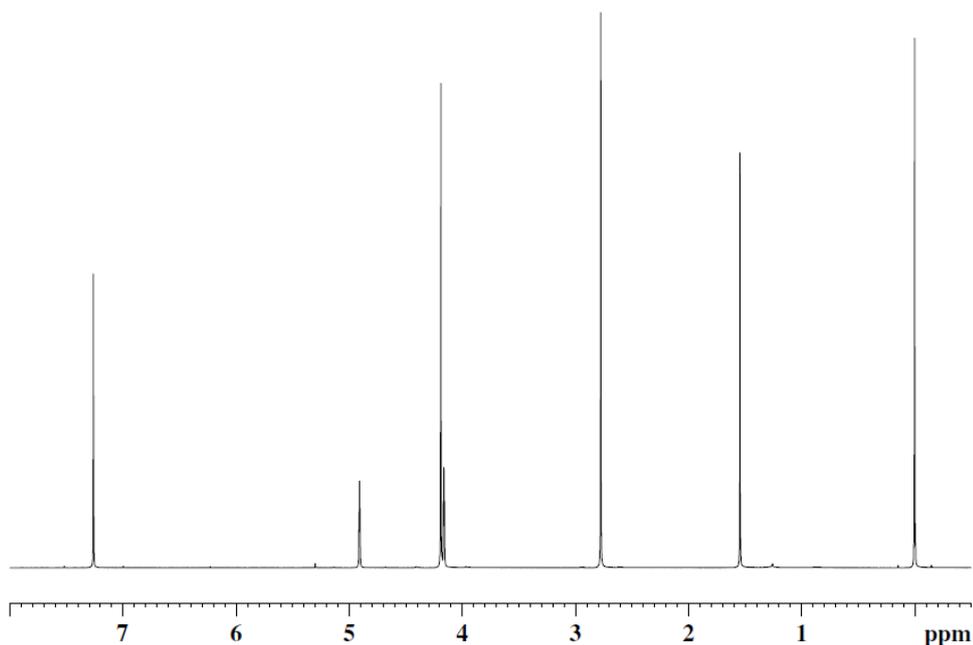


Figura 9. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del *N*-ferrocenilsuccinimide in CDCl_3 .

Ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ del composto Ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt in CDCl_3 (Fig. 10) i protoni ammidici si presentano come un singoletto a 7.12 per Fc-NH, un doppietto a 6.76 ppm per il residuo dell'alanina e un tripletto a 6.51 ppm nel caso della glicina. Nell'intervallo tra 4.80 ppm e 4.00 ppm si individuano i picchi del ferrocene monosostituito, mentre a 2.60 ppm si può osservare un multipletto corrispondente ai segnali metilenici del gruppo succinile.

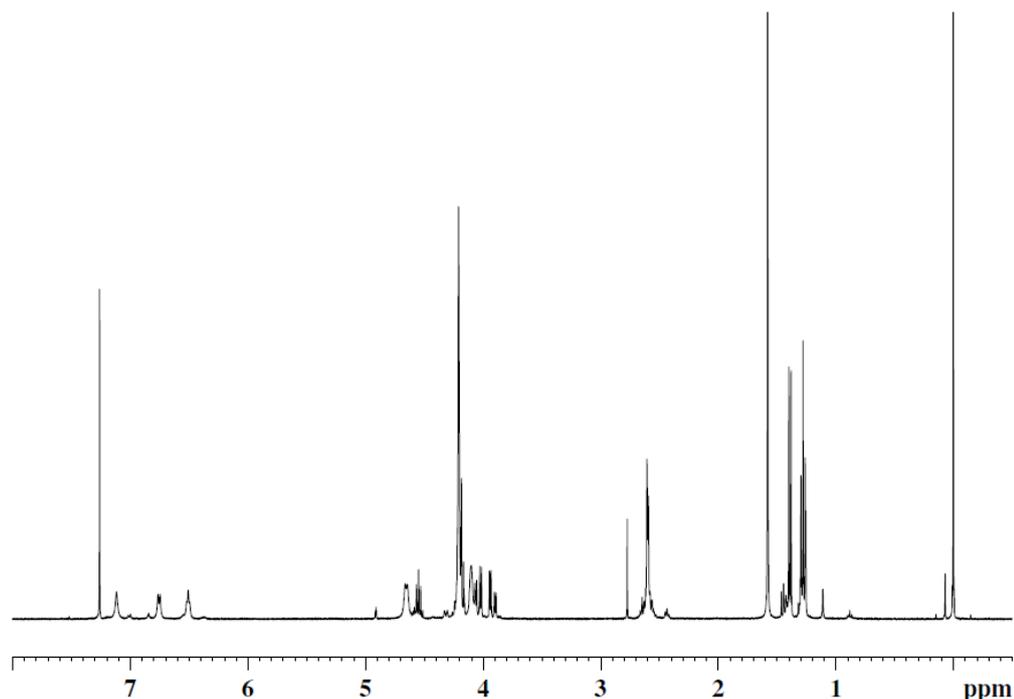


Figura 10. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt in CDCl_3 .

4.2 Formazione di N-ferrocenilsuccinimide

Nella sintesi di ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt, dopo le estrazioni con solventi, la TLC del prodotto di reazione (diclorometano : etanolo 9:1) rivela due macchie distinte a $R_f = 0.94$ e $R_f = 0.71$. Grazie alle tecniche cromatografiche e prove HPLC-MS si ricavano i rapporti m/z delle due macchie: $[\text{M}]^+_{\text{macchia superiore}} = 283$, $[\text{M}]^+_{\text{macchia inferiore}} = 457$. Il picco molecolare della macchia inferiore coincide con la massa di $\text{Fc-NH-COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-Gly-L-Ala-OEt}$ (457.3 g/mol) mentre quello della macchia superiore è ricavabile come differenza tra la massa dell'acido N-ferrocenilmonosuccinammide e una molecola d'acqua (301.1 g/mol – 18.01 g/mol = 283.1 g/mol). Lo spettro NMR condotto sul composto a R_f maggiore non mostra i segni caratteristici del dipeptide. Si attribuisce dunque al composto incognito il prodotto di una reazione intramolecolare dell'acido: il gruppo carbossilico attivato con EDC e HOBt, anziché subire l'attacco nucleofilo da parte del gruppo amminico del dipeptide, forma un'immina ciclica legandosi all'azoto amidico del ferrocene (Fig. 11). Le immagini ottenute mediante diffrazione a raggi X sul prodotto isolato conferma l'avvenuta reazione intramolecolare (vedi capitolo 4.3).

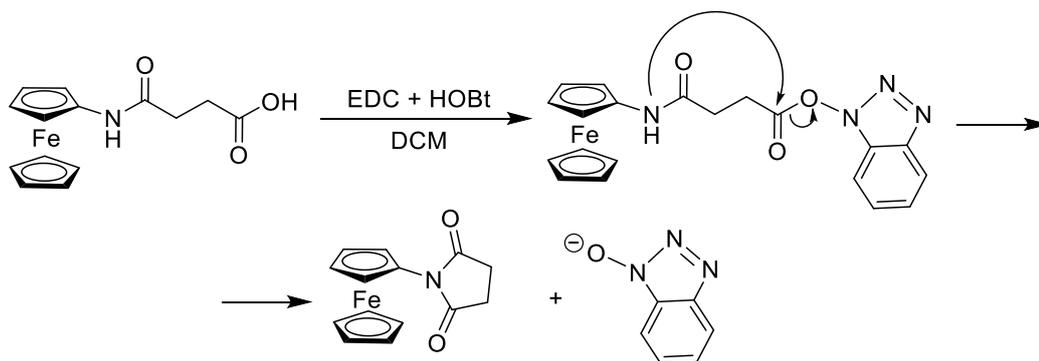


Figura 11. Meccanismo di reazione intramolecolare dell'acido *N*-ferrocenilmonosuccinammide.

La reazione intramolecolare porta ad un prodotto secondario non utile agli scopi del progetto e come tale è necessario impedirne la formazione.

Una possibile soluzione è mantenere la miscela di reazione concentrata aggiungendo poco solvente, in quanto la maggiore vicinanza dei reagenti dovrebbe favorire la reazione bimolecolare.

In alternativa l'impiego di un *linker* più lungo, come l'acido glutarico, porta a un maggiore distanziamento tra il gruppo carbossilico attivato e l'azoto ammidico, con una conseguente diminuzione della concentrazione locale dei reagenti e della velocità di reazione. Va considerato tuttavia, che la condensazione intramolecolare porta ad un prodotto ciclico a sei atomi, più stabile e termodinamicamente più favorito di un ciclo a cinque atomi (caso del *linker* succinico), favorendo la reazione intramolecolare. In conclusione, non è semplice prevedere l'andamento della reazione con acido glutarico e servono ulteriori studi.

4.3 Diffrazione a raggi X

I composti N-ferrocenilsuccinimide e N-ferrocenilmonosuccinammide cristallizzati sono stati analizzati ai raggi X (Fig. 12 e 13) riportando i dati cristallografici e i parametri dell'affinamento strutturale in Tab. 1.

La struttura dell'acido N-ferrocenilmonosuccinammide (Fig. 12) è stata risolta nel gruppo spaziale monoclinico $P2_1/c$ mentre la struttura di N-ferrocenilsuccinimide (Fig. 13) è stata risolta nel gruppo spaziale monoclinico $P2_1/m$. In entrambe le strutture, gli anelli Cp si legano allo ione Fe(II) con apticità η^5 disponendosi in configurazione quasi eclissata. Tale disposizione è stata precedentemente osservata in svariati derivati ferrocenilici.¹⁴ Le distanze Fe-C sono comprese tra 2.026-2.046 Å, mentre le distanze tra l'atomo di ferro e i centroidi degli anelli ciclopentadienilici sono pari a 1.644 Å.

Nell'acido N-ferrocenilmonosuccinammide, il protone H3 del gruppo carbossilico terminale, forma un legame idrogeno con l'atomo O2 (distanza intermolecolare O3-H1...O2=C12 uguale a 1.851 Å) portando alla formazione di una catena 1D a zig-zag supportata da questa interazione supramolecolare.

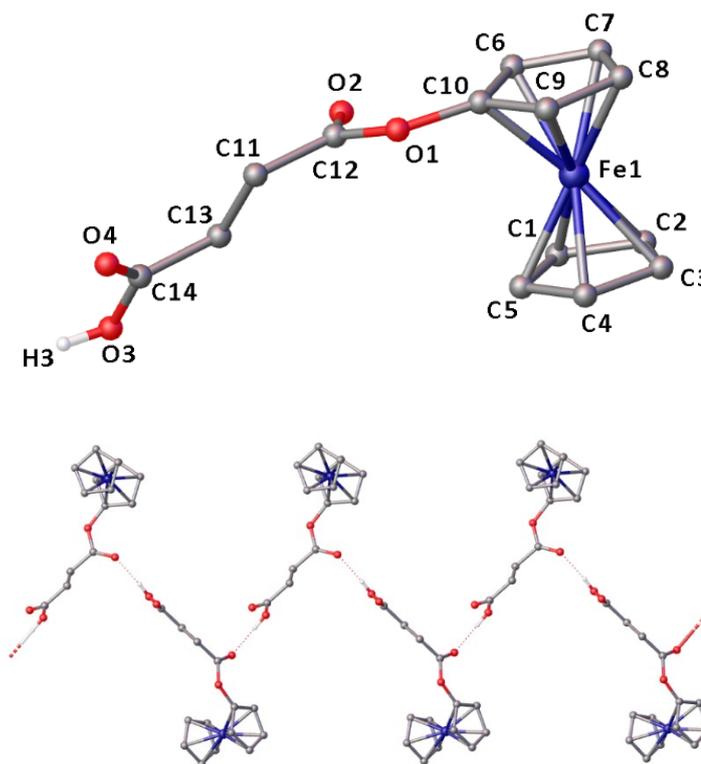


Figura 12. Struttura dell'acido N-ferrocenilmonosuccinammide e catena 1D supportata dal legame idrogeno. Per chiarezza, è visualizzato solo l'atomo di idrogeno coinvolto nell'interazione supramolecolare.

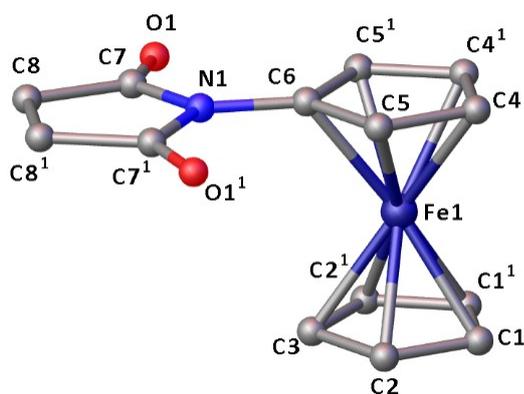


Figura 13. Struttura del composto *N*-ferrocenilsuccinimide. Per chiarezza, gli atomi di idrogeno non sono visualizzati. Operazione di simmetria $1 = +x, 3/2-y, +z$.

Tabella 1. Dati cristallografici e parametri dell'affinamento strutturale.

Composto	Acido <i>N</i> -ferrocenilmonosuccinamide	<i>N</i> -ferrocenilsuccinimide
Formula empirica	C ₁₄ H ₁₄ FeO ₄	C ₁₄ H ₁₃ FeNO ₂
Peso molecolare	302.10	283.10
Temperatura/K	299.5(2)	299.60(14)
Sistema cristallografico	monoclinico	monoclinico
Gruppo spaziale	P2 ₁ /c	P2 ₁ /m
a/Å	8.6378(2)	7.07528(15)
b/Å	11.4044(3)	10.9742(3)
c/Å	13.3788(3)	7.64512(14)
α/°	90	90
β/°	96.638(2)	93.1382(18)
γ/°	90	90
Volume/Å ³	1309.10(6)	592.72(2)
Z	4	2
ρ _{calc} /cm ³	1.533	1.586
μ/mm ⁻¹	9.314	10.139
F(000)	624.0	292.0
Misura del cristallo/mm ³	0.2 × 0.1 × 0.1	0.4 × 0.4 × 0.2
Radiazione	Cu Kα (λ = 1.54184)	Cu Kα (λ = 1.54184)
2θ intervallo per la raccolta dati/°	10.222 to 147.422	11.592 to 147.75
Indice degli intervalli	-10 ≤ h ≤ 8, -9 ≤ k ≤ 14, -16 ≤ l ≤ 16	-8 ≤ h ≤ 7, -13 ≤ k ≤ 12, -9 ≤ l ≤ 9
Riflessi raccolti	10099	8799

Riflessi indipendenti	2588 [$R_{\text{int}} = 0.0383$, $R_{\text{sigma}} = 0.0308$]	1258 [$R_{\text{int}} = 0.0636$, $R_{\text{sigma}} = 0.0331$]
Dati/restrizioni/parametri	2588/0/173	1258/0/88
Test del fit su F^2	0.997	1.077
Indici finali R [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0418$, $wR_2 = 0.1092$	$R_1 = 0.0389$, $wR_2 = 0.0979$
Indici finali R [tutti i data]	$R_1 = 0.0507$, $wR_2 = 0.1170$	$R_1 = 0.0413$, $wR_2 = 0.1010$
Maggiore diff. peak/hole / e \AA^{-3}	0.46/-0.46	0.35/-0.43

4.4 Voltammetria ciclica

La voltammetria ciclica (CV) è una tecnica utilizzata per lo studio delle proprietà redox di molecole elettroattive. Durante un'analisi CV viene misurata la corrente all'elettrodo di lavoro a diversi valori di potenziale, il quale varia da un punto iniziale ad uno finale, per poi tornare al valore di partenza.¹⁴

I composti analizzati, acido N-ferrocenilmonosuccinammide 2.1 mM e ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-AlaOEt 1.1 mM sono stati sciolti in diclorometano in presenza di $(n\text{Bu})_4\text{BPF}_6$ (0.1 M) come elettrolita di supporto (Fig. 14). L'obiettivo della misura è principalmente quello di valutare l'effetto del gruppo $-\text{NHCO}-$, oltre che del *linker* succinico e del dipeptide, sul potenziale di ossidazione ($E_{1/2}$) e di conseguenza la potenzialità di questi composti come ossidanti in condizioni fisiologiche. Il gruppo $-\text{NHCO}-$, sulla base delle sue proprietà elettron-donatrici permette di diminuire il potenziale di ossidazione del gruppo Fc a valori di circa 0.3-0.4 V. Al contrario, l'effetto elettron-attrattore del gruppo $-\text{CONH}-$ provoca un aumento del potenziale di ossidazione fino a valori di 0.6-0.8 V non compatibili con l'ambiente intracellulare (tra 0.40 e -0.44 V vs SCE). Ad esempio, in letteratura si riporta un valore di $E_{1/2} \approx (E^0)$ per il composto Fc-CO-[L-Dap(Boc)]₂-NH-iPr pari a 0.66 V.¹⁵ Al contrario, per il peptide Bz-[(L-Dap(Boc))₂-NH-Fc si registra un valore di 0.34 V.¹⁵

È possibile osservare come tutti i prodotti oggetto di analisi mostrino una singola onda di ossidazione monoelettronica, reversibile e nernstiana ($\Delta E_p = 60$ mV, Tab. 2) nell'intervallo di velocità di scansione 0.2-10 Vs^{-1} .

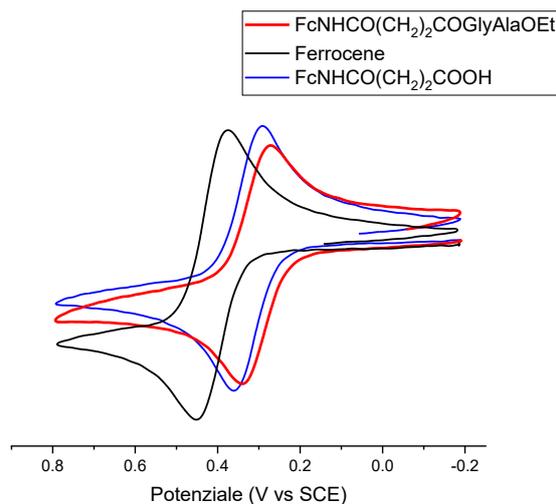


Figura 14. CV dei composti acido *N*-ferrocenilmonosuccinammide 2.1 mM, ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt 1.1 mM e ferrocene 3.2 mM in DCM. Velocità di scansione del potenziale $v = 0.2 \text{ Vs}^{-1}$. La corrente è normalizza secondo l'equazione $iv^{-1/2} \text{ c}^{-1}$.

I valori di $E_{1/2}$ riportati in tabella dimostrano, come atteso, che il gruppo funzionale –NHCO– legato al residuo Fc attraverso l'azoto anticipa il potenziale del ferrocene di 90 mV (acido *N*-ferrocenilmonosuccinammide) e 110 mV (ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt), rendendo possibile l'impiego di entrambi i composti in ambiente intracellulare.

Tabella 2. Dati elettrochimici: E_p = potenziale di picco (anodico), $E_{p/2}$ = potenziale a $i = i_{p/2}$, $E_{1/2} = E_{p/2} + \Delta E_p / 2 \approx E^0$ = potenziale di semionda, $\Delta E_p = E_p - E_{p/2}$, $\delta E = \pm 2 \text{ mV}$.

Composto	E_p (V)	$E_{p/2}$ (V)	$E_{1/2}$ (V)	ΔE_p (V)
Ferrocene	0.45	0.39	0.42	0.060
Acido <i>N</i> -ferrocenilmonosuccinammide	0.36	0.30	0.33	0.060
Ferrocenilamminosuccinil-Gly-L-Ala-OEt	0.34	0.28	0.31	0.060

5. Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati due peptidi coniugati ad un'unità di ferrocene utilizzando come *linker* l'acido succinico al fine di studiare la loro attività antitumorale. Si è seguita una strategia di sintesi in soluzione che ha permesso di isolare e purificare i prodotti intermedi, conducendo caratterizzazioni HPLC-MS e ¹H-NMR per ognuno di essi. Le rese di reazione sono buone/discrete, abbastanza da poter recuperare al termine delle sintesi un quantitativo sufficiente per poter svolgere analisi CV e cristallografiche di alcune molecole.

Una criticità emersa durante il processo è la formazione di N-ferrocenilsuccinimide come prodotto secondario: per limitare la sua formazione le principali strategie che possono essere adottate sono aumentare la concentrazione delle miscele di reazione o cambiare *linker*.

Per il composto ferrocenilamminosuccinil-RGD, riconosciuto dal picco molecolare via MS (ESI/TOF), sono state ottenute quantità limitate di prodotto, per cui non è stato possibile effettuare l'analisi ¹H-NMR ed elettrochimica.

Dai risultati elettrochimici sulle molecole Fc-NHCO- si riscontra come l'effetto elettron-donatore dell'azoto ammidico sia in grado di diminuire il potenziale di Fc rendendolo più facilmente ossidabile, sufficientemente da ritenerlo attivo nel suo stato ossidato in ambiente intracellulare. In futuro sono previste prove di stabilità in condizioni fisiologiche (con test enzimatici) e in colture cellulari per verificarne il potere ossidante.

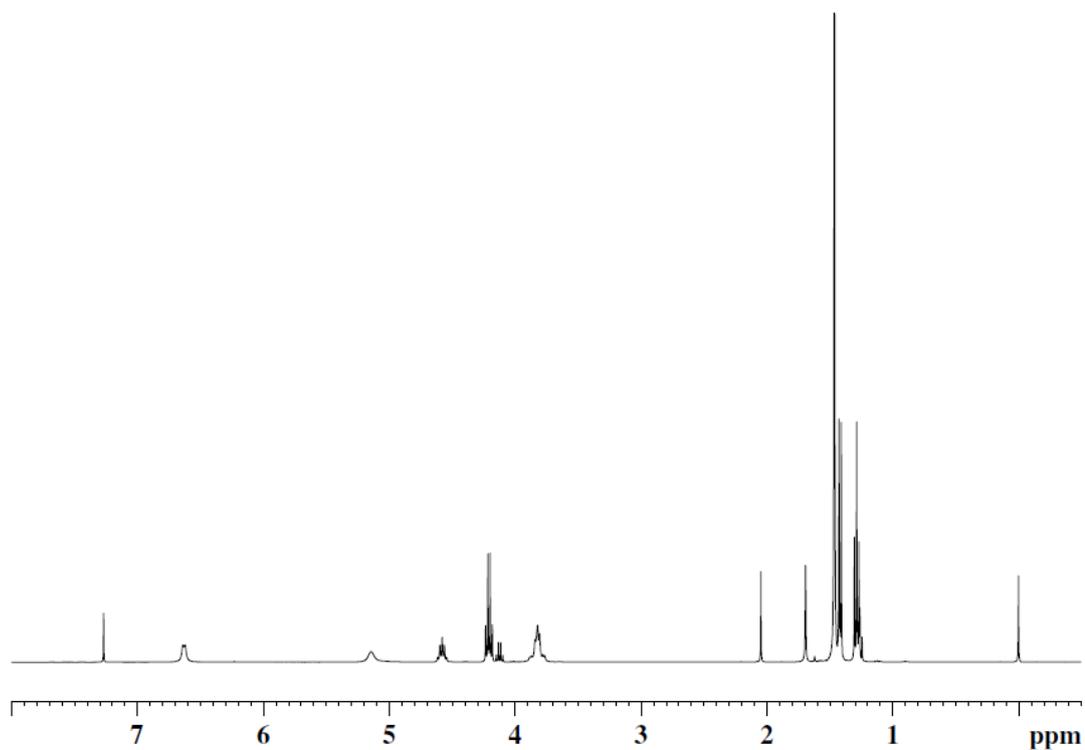
6. Bibliografia

1. Astruc, D. Why Is Ferrocene so Exceptional? *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017 (1), 6–29.
2. Chaudhary, A.; Poonia, K. The Redox Mechanism of Ferrocene and Its Phytochemical and Biochemical Compounds in Anticancer Therapy: A Mini Review. *Inorg. Chem. Commun.* **2021**, 134, 109044.
3. Lal, B.; Badshah, A.; Altaf, A. A.; Khan, N.; Ullah, S. Miscellaneous Applications of Ferrocene-based Peptides/Amides. *Appl. Organomet. Chem.* **2011**, 25 (12), 843–855.
4. Braga, S. S.; Silva, A. M. S. A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics* **2013**, 32 (20), 5626–5639.
5. Ludwig, B. S.; Tomassi, S.; Di Maro, S.; Di Leva, F. S.; Benge, A.; Reichart, F.; Nieberler, M.; Kühn, F. E.; Kessler, H.; Marinelli, L.; Reuning, U.; Kossatz, S. The Organometallic Ferrocene Exhibits Amplified Anti-Tumor Activity by Targeted Delivery via Highly Selective Ligands to $\text{Av}\beta 3$, $\text{Av}\beta 6$, or $\text{A5}\beta 1$ Integrins. *Biomaterials* **2021**, 271, 120754.
6. Harry, A. G.; Murphy, J.; Butler, W. E.; Tiedt, R.; Mooney, Á.; Manton, J. C.; Pryce, M. T.; O'Donovan, N.; Walsh, N.; Crown, J.; Rai, D. K.; Kenny, P. T. M. The Synthesis, Structural Characterization and in Vitro Anti-Cancer Activity of Novel N-{6-(Ferrocenyl) Ethynyl-2-Naphthoyl} Amino Acid and Dipeptide Ethyl Esters. *J. Organomet. Chem.* **2013**, 734, 86–92.
7. Kovacic, P. Unifying Mechanism for Anticancer Agents Involving Electron Transfer and Oxidative Stress: Clinical Implications. *Med. Hypotheses* **2007**, 69 (3), 510–516.
8. Albada, B.; Metzler-Nolte, N. Organometallic-Peptide Bioconjugates: Synthetic Strategies and Medicinal Applications. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (19), 11797–11839.
9. Raza, M. H.; Siraj, S.; Arshad, A.; Waheed, U.; Aldakheel, F.; Alduraywish, S.; Arshad, M. ROS-Modulated Therapeutic Approaches in Cancer Treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, 143 (9), 1789–1809.
10. Yeary, R. A. Chronic Toxicity of Dicyclopentadienyliron (Ferrocene) in Dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1969**, 15 (3), 666–676.
11. Miklán, Z.; Szabó, R.; Zsoldos-Mády, V.; Reményi, J.; Bánóczy, Z.; Hudecz, F. New Ferrocene Containing Peptide Conjugates: Synthesis and Effect on Human Leukemia (HL-60) Cells. *Peptide Sci.* **2007**, 88 (2), 108–114.
12. Ludwig, B. S.; Correia, J. D. G.; Kühn, F. E. Ferrocene Derivatives as Anti-Infective Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 396, 22–48.

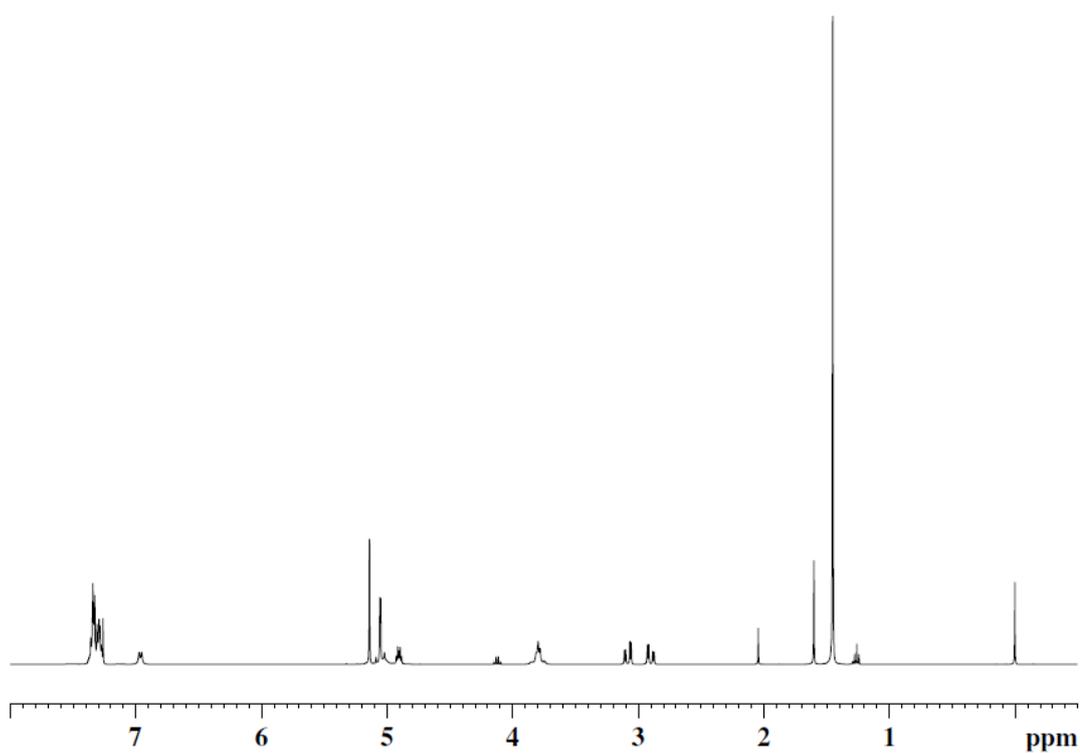
13. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.
14. (a) Donoli, A.; Marcuzzo, V.; Moretto, A.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Cardena, R.; Bisello, A.; Santi, S. New bis-ferrocenyl end-capped peptides: synthesis and charge transfer properties *Peptide Sci.* **2012**, *100*, 14-24. (b) Santi, S.; A. Bisello, Cardena, R.; Tomelleri, S.; Schiesari, R.; Biondi, B.; Crisma, M.; Formaggio, F. Flat, C^{α,β}-Didehydroalanine Foldamers with Ferrocene Pendants: Assessing the Role of α-Peptide Dipolar Moments. *ChemPlusChem* **2021**, *86*, 723–730. (c) Biondi, B.; Bisello, A.; Cardena, R.; Schiesari, R.; Cerveson, L.; Facci, M.; Rancan, M.; Formaggio, F.; Santi, S. Flat, Ferrocenyl-Conjugated Peptides: A Combined Electrochemical and Spectroscopic Study. *ChemElectroChem* **2021**, *8*, 2693-2700; (d) Biondi, B.; Bisello, A.; Cardena, R.; Schiesari, R.; Cerveson, L.; M.; Rancan, M.; Formaggio, F.; Santi, S. Conformational Analysis and Through-Chain Charge Propagation in Ferrocenyl-Conjugated Homopeptides of 2,3-Diaminopropionic acid (Dap). *Eur. J. Inorg. Chem.* **2022**, *6*, e202100966
15. W. Bauer, K. Polborn, W. Beck, *J. Organomet. Chem.*, **1999**, *579*, 269-279.

7. Materiale di supporto

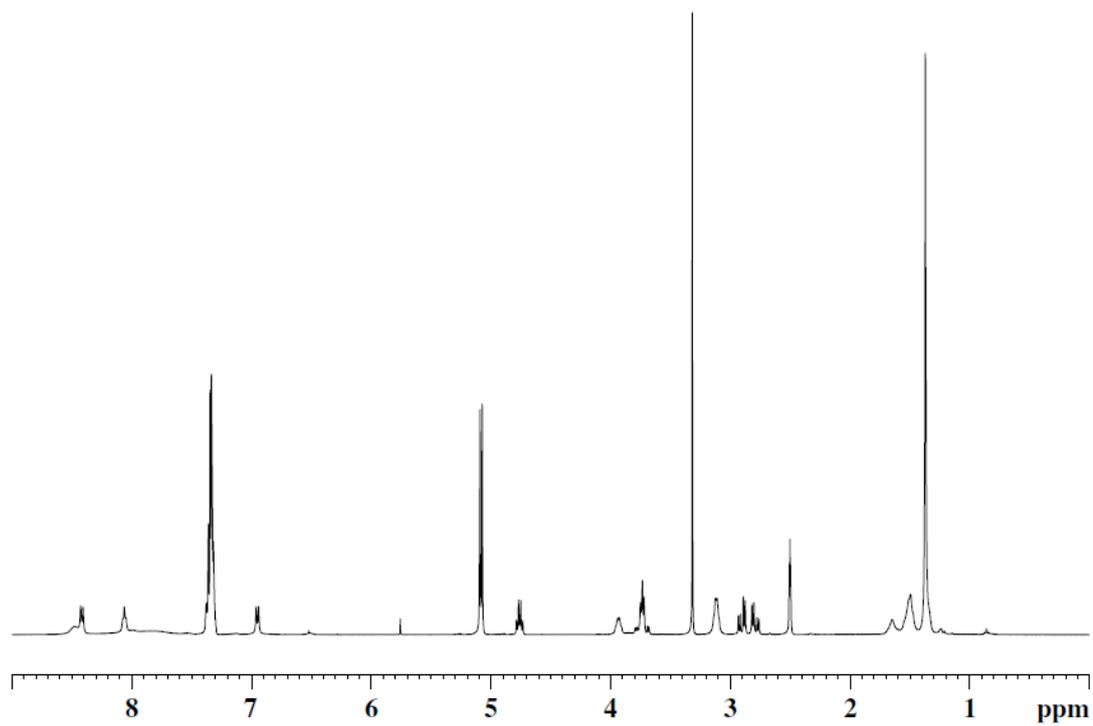
Boc-Gly-L-Ala-OEt



Boc-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl



Boc-Arg(NO₂)-Gly-L-Asp(OBzl)Bzl



8. Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare i professori Saverio Santi e Fernando Formaggio per avermi introdotto e seguito nelle attività di ricerca di questo progetto nazionale, e per essere stati in ogni momento disponibili per risolvere i miei dubbi in sede di laboratorio e durante la stesura della tesi. Ringrazio inoltre dr. Annalisa Bisello per aver diretto e seguito assiduamente le operazioni in laboratorio, svolgendo un ruolo primario nell'esecuzione e analisi di risonanza nucleare, nella redazione della tesi e come coordinatrice con altri docenti. Un ringraziamento particolare va ad Alessia Difino con cui ho condotto fianco a fianco tutte le attività pratiche di laboratorio e che ha mantenuto sempre un atteggiamento cordiale e disponibile. Ringrazio il dr. Marzio Rancan per aver svolto le analisi cristallografiche, la dr. Barbara Biondi per le misure MS (ESI/TOF) e la dr. Roberta Cardena per le caratterizzazioni elettrochimiche. L'attività di ricerca è stata possibile anche grazie al supporto da parte di *Institute of Condensed Matter Chemistry and Technologies for Energy (ICMATE)*, CNR e di *Institute of Biomolecular Chemistry, CNR* a cui va la mia riconoscenza. Vorrei ringraziare infine la mia famiglia per il supporto e l'aiuto che mi ha dato durante la mia carriera universitaria che, con il loro sostegno, continuerò a condurre.