

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**Sintesi e studio delle proprietà antibatteriche
di nuovi complessi tetrazolici di Ru (II)**

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Nicola Monti

RELATORE

Prof. Stefano Stagni

CORRELATORI

Dott.ssa Valentina Fiorini

Dott.ssa Alessandra Stefan

II Sessione

Anno Accademico 2016-2017

ABSTRACT (ITA)

In questo elaborato di tesi sono presentate due classi di complessi cationici di Ru(II), la prima è costituita da una nuova tipologia di complessi tris-omolettici con formulazione generale *fac/mer*-[Ru(N[^]N')₃][PF₆]₂ in cui (N[^]N') rappresenta per la prima volta un legante 5-aril tetrazolico variamente funzionalizzato, ovvero **PTz-(N2-Me)** (2-(2-metil-tetrazol-5-il)piridina), **PTz-(N2-tBu)** (2-(2-(*tert*-butil)-tetrazol-5-il)piridina) o **QTz-(N2-Me)** (2-(2-metil-tetrazol-5-il)chinolina), e una serie di complessi eterolettici con formulazione generale [Ru(bpy)₂(N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N' = **PTz-(N2-Me)** o **QTz-(N2-Me)**) o [RuTpy(N[^]N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N[^]N' = **2,6-BTP-N2-tBu**, 2,6-bis(2-(*tert*-butil)-tetrazol-5-il)piridina). La progettazione dei complessi e la scelta dei derivati 5-aril tetrazolici alchilati, sono state rivolte allo studio della loro eventuale attività antibatterica nei confronti di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, in questo caso *Escherichia coli* e *Deinococcus radiodurans*, rispettivamente. Tramite test di diffusione su piastre Petri e cinetiche di crescita in terreno liquido è stato verificato come i complessi sintetizzati siano in grado di provocare una diminuzione della crescita cellulare in termini di biomassa finale prodotta nei confronti di *D. radiodurans*.

ABSTRACT (ENG)

This experimental work has been aimed to the design, synthesis and spectroscopic characterization of two classes of cationic Ru(II)-tetrazole complexes: a new class of tris-homoleptic complexes with general formula *fac/mer*-[Ru(N[^]N')₃][PF₆]₂, where N[^]N' is represented for the first time by 5-aryl tetrazolic ligands such as **PTz-(N2-Me)** (2-(2-methyl-tetrazol-5-yl)pyridine), **PTz-(N2-tBu)** (2-(2-(*tert*-butyl)-tetrazol-5-yl)pyridine) or **QTz-(N2-Me)** (2-(2-methyl-tetrazol-5-yl)quinoline), and a set of heteroleptic complexes with the general formula [Ru(bpy)₂(N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N' = **PTz-(N2-Me)** or **QTz-(N2-Me)**) or [RuTpy(N[^]N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N[^]N' = **2,6-BTP-N2-tBu**, 2,6-bis(2-(*tert*-butyl)-tetrazol-5-yl)pyridine). By following a “design to application” approach, all the complexes and especially the functionalized 5-aryl tetrazolic ligands, has been designed with the aim to evaluate their eventual antimicrobial activity toward Gram-negative and Gram-positive bacteria such as *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. By the means of disk diffusion tests and kinetics of growth was possible to appreciate how all the synthesized Ru(II) tetrazole derivatives have successfully managed the inhibition of the bacterial growth resulting in a decrease of their final population.

INDICE

INTRODUZIONE	1
RISULTATI E DISCUSSIONE	9
Sintesi dei leganti tetrazolici	9
Sintesi dei precursori di Ru (II)	12
Sintesi dei complessi di Ru (II)	12
Complessi tris-omolettici	12
Complessi Eterolettici	17
Spettroscopia di assorbimento	20
Studio dell'attività antibatterica	22
Test di diffusione in agar.....	22
Curve di crescita in terreno liquido	22
CONCLUSIONI	26
PARTE SPERIMENTALE	28
Procedura Generale	28
Ceppi batterici e terreni di coltura.....	29
Test di diffusione in agar (disk diffusion test)	29
Curve di crescita.....	29
Sintesi dei leganti	31
PTz-H	31
PTz-(N1-CH ₃), 2-PTz-(N2-CH ₃).....	32
PTz-(N2-tBu)	33
QTz-H	34
QTz-(N1-CH ₃), QTz-(N2-CH ₃).....	35
QTz-(N2-tBu).....	36
2,6-BTP-H ₂	37
2,6-BTP-(N2-tBu)	38
Sintesi dei precursori di Ru(II)	39
Ru(Bpy) ₂ Cl ₂	39
RuTpyCl ₃	40
Sintesi dei complessi di Ru(II)	41
fac/mer - [Ru(PTz-N2-Me) ₃][PF ₆] ₂	41
fac/mer - [Ru(PTz-N2-tBu) ₃][PF ₆] ₂	42
fac/mer - [Ru(QTz-N2-Me) ₃][PF ₆] ₂	43
[RuBpy ₂ (PTz-N2-Me)][PF ₆] ₂	44
[RuBpy ₂ (QTz-N2-Me)][PF ₆] ₂	45
[RuTpy-2,6-BTP(N2-tBu)][PF ₆] ₂	46
BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUZIONE

Gli studi fotofisici e fotochimici riguardanti i composti di rutenio sono principalmente incentrati sui derivati polipiridinici di Ru(II). Questi complessi sono infatti una delle classi di composti di metalli di transizione più ampiamente studiata nel corso degli ultimi quarant'anni. I motivi di un interesse così vasto nei confronti di questi composti sono da ricercare in diversi ambiti, partendo dalla loro sintesi, relativamente semplice, sino alla loro peculiare stabilità sia allo stato (elettronico) fondamentale che in quello eccitato. Inoltre, i derivati polipiridinici di Ru(II) mostrano un caratteristico comportamento elettrochimico, con processi di ossidazione metallo-centrati reversibili e processi di riduzione centrati sui leganti, a potenziali accessibili. L'insieme di queste peculiarità ha reso possibile l'impiego dei derivati polipiridinici di Ru(II) in svariati ambiti applicativi, dalla fotocatalisi^[1] alla costruzione di sistemi supramolecolari in grado di "rispondere" ad uno stimolo esterno.^[2] Il capostipite di questa classe di composti è, senza dubbio, il complesso $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Figura 1, sinistra), una specie con configurazione d^6 a basso spin. Lo stato eccitato a più bassa energia da cui si origina luminescenza è di tipo $^3\text{MLCT}$ (*metal to ligand charge transfer*), rendendolo un buon emettitore ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$, τ (tempo di vita) = 1ms, Φ (resa quantica di emissione) = 0.062 in soluzione degasata di CH_3CN , 298K).

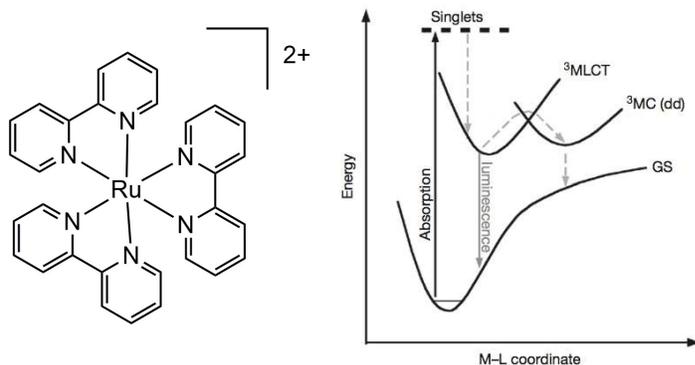


Figura 1. (sx) Struttura di $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$; (dx) possibili meccanismi di disattivazione non radiativa dello stato eccitato.

Le proprietà fotoemittive di $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dipendono in scarsa misura dalla natura del solvente in cui è disciolto, ma sono invece strettamente correlate alla temperatura e allo stato fisico in cui esso si trova (solido, liquido, matrice congelata).

Il motivo per cui l'emissione di questo complesso è strettamente legata alla temperatura deriva dalla presenza di uno stato di tipo 3MC (*metal centred*) termicamente accessibile, che fornisce un percorso competitivo di decadimento non radiativo nei confronti dell'emissione che si origina invece dallo stato 3MLCT (Figura 1, destra). Così come accade per tutti gli emettitori MLCT, le proprietà fotoemittive ed elettrochimiche dei complessi polipiridinici di Ru(II) possono essere finemente modulate variando la natura dei leganti che completano la sfera di coordinazione del metallo, consentendo quindi la progettazione di complessi specifici per l'applicazione desiderata.

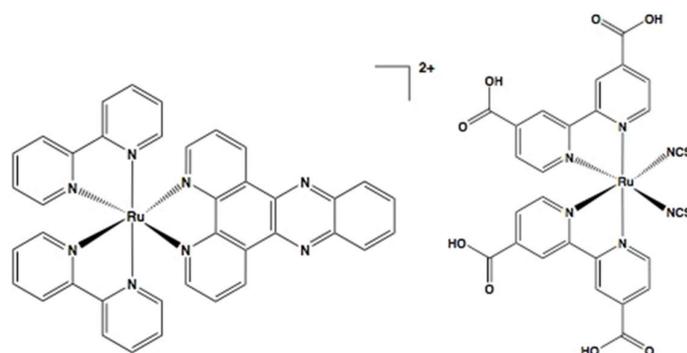


Figura 2. Struttura di $[Ru(bpy)_2(DPPZ)]^{2+}$ (sx), struttura di $[Ru(dcbpy)_2(NCS)_2]$ (dx).

Tra gli ambiti applicativi dei complessi polipiridinici di Ru(II) spiccano quello della conversione dell'energia solare in energia elettrica, effettuata mediante celle DSSC (*dye sensitized solar cells*),^[3] il bio-targeting di proteine e acidi nucleici,^[4] la fotocatalisi^[5] e applicazioni in campo medico, dove questi complessi vengono impiegati come agenti antimicrobici,^[6] chemioterapici^[7] e nella terapia fotodinamica.^[8]

Date le sorprendenti proprietà di questa classe di complessi, nel tempo, sono stati ricercati leganti con caratteristiche simili ai derivati bipyridinici. Sebbene siano numerosi gli esempi riportati in letteratura che vedono protagonisti in questo senso anelli imidazolici e triazolici, l'impiego di derivati tetrazolici nella composizione di queste specie risale solamente primi anni 2000. I tetrazoli ($[R-CN_4]$) sono una classe di molecole eterocicliche caratterizzate dalla presenza di un ciclo aromatico a cinque termini costituito da un atomo di carbonio e quattro atomi di azoto, noto come tetrazolo quando si presenta come composto neutro o tetrazolato se in forma anionica.

Tra questi, i derivati 5-aryl-tetrazolici sono noti per essere acidi di Brønsted con attività paragonabile a quella dei corrispondenti acidi carbossilici, caratteristica che assieme alla buona stabilità metabolica, bassa tossicità e alla maggior lipofilità rispetto ai

corrispondenti derivati carbossilici ha portato all'impiego di queste specie in farmacologia.

Contestualmente alle applicazioni dei derivati 5-aryl tetrazolici in farmacologia, negli ultimi decenni ha preso piede il loro impiego come leganti azotati per la chimica di coordinazione. La presenza di diversi azoti imminici all'interno dell'anello tetrazolico, infatti, rende questa molecola in grado di coordinare metalli appartenenti alla seconda e terza serie di transizione nonché quelli appartenenti alla serie lantanoidea (Figura 3).

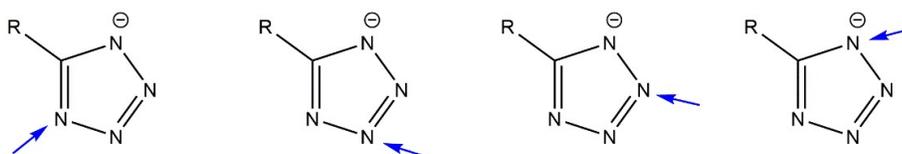


Figura 3. Siti disponibili per l'addizione elettrofila sull'anello $[R-CN_4]^-$.

Il gruppo di ricerca presso cui è stata svolta questa attività di tesi si occupa da diversi anni della chimica di coordinazione dei derivati 5-aryl tetrazolici e dello studio dei loro derivati in termini di proprietà fotofisiche, elettrochimiche e di reattività nei confronti di specie elettrofile. I primi sistemi studiati sono stati ottenuti funzionalizzando precursori ciclopentadienilici di Fe(II); i derivati sintetizzati sono risultati in grado di subire modificazioni strutturali reversibili (metilazione) o irreversibili (protonazione) a seguito di addizione elettrofila localizzata sull'anello pentatomico coordinato. [9]

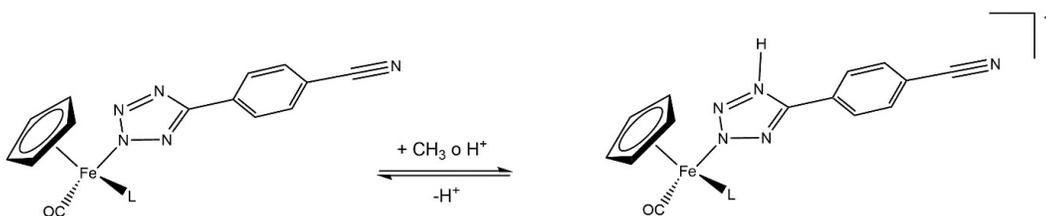


Figura 4. Reattività verso gli elettrofilici dei derivati $[Fe(Cp)(CO)(L)(TphCN)]^+$.

Le conoscenze apprese dallo studio di sistemi ferro-tetrazolici ha diretto l'interesse verso lo sviluppo della chimica di coordinazione dei derivati 5-aryl tetrazolici verso complessi polipiridinici di Ru(II). L'inserimento di questi leganti nella sfera di coordinazione di sistemi con formulazione generale $[Ru(bpy)(tpy)Cl]^+$, primo precursore metallico

impiegato, ha portato all'ottenimento di specie con caratteristiche strutturali e reattività del tutto riconducibili ai corrispondenti complessi di Fe(II).^[10] Inoltre, i complessi tetrazolici di tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tpy})(\text{L})]^{2+}$ si sono dimostrati essere interessanti per le loro peculiari proprietà elettrochemiluminescenti, aprendo la strada verso diversi ambiti applicativi.

Al fine di ricercare eventuali proprietà fotoluminescenti, la sfera dei leganti attorno al centro metallico di Ru(II) è stata successivamente modificata, passando da derivati con formulazione generale $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tpy})(\text{L})]^{+2+}$ a quelli più notoriamente emissivi di tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$. Per riuscire in questo intento sono stati impiegati derivati 5-aryl tetrazolici funzionalizzati con un anello piridinico o pirazinico, portando all'ottenimento di leganti in grado di chelare il frammento metallico $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]$ (Figura 5).

I nuovi complessi $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$ mostrarono una peculiare reattività nei confronti di specie elettrofile, la cui addizione, come nel caso dei derivati di Fe(II) e dei sistemi di tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tpy})(\text{L})]^{+2+}$, avviene regioselettivamente all'anello tetrazolico coordinato al centro metallico. E' necessario sottolineare come la reazione di addizione elettrofila abbia prodotto in questi derivati sostanziali modificazioni nell'output luminescente, confermando la partecipazione dell'anello tetrazolico nella composizione dei livelli HOMO/LUMO dei complessi corrispondenti.

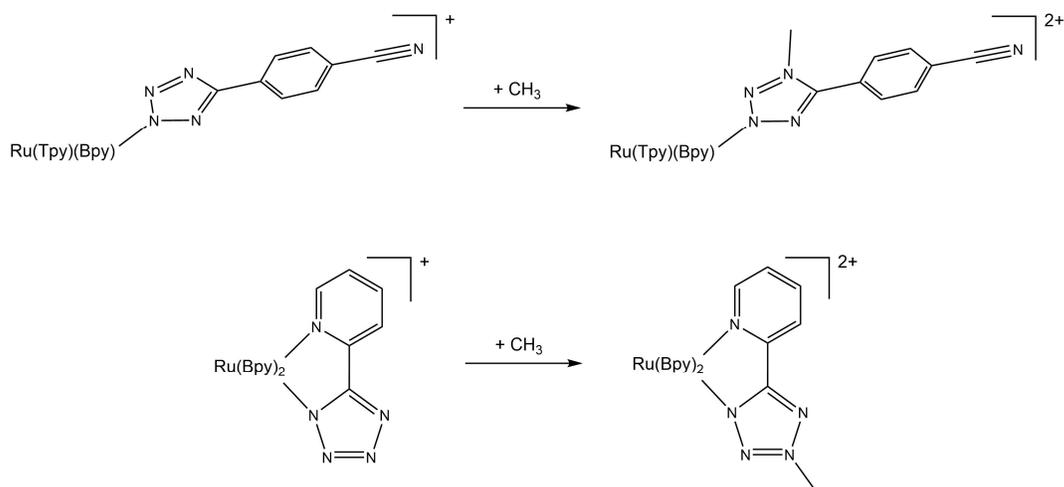


Figura 5. Reattività verso gli elettrofili ($-\text{CH}_3^+$) dei derivati $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{L})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$, L = derivato 5-aryl tetrazolico.

E' quindi facile intuire come i derivati polipiridinici di Ru(II), e in particolare anche quelli basati su leganti 5-aril tetrazolici, grazie alle loro peculiarità, siano in grado di determinare le proprietà dei complessi di Ru(II) cui prendono parte, direzionandone considerevolmente il panorama applicativo. In questo senso, il complesso $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{DPPZ})]^{2+}$,^[11] può essere senza dubbio considerato uno dei primi esempi di complessi polipiridinici di Ru(II) cationici il cui design ha indirizzato il suo impiego in ambito biologico, rendendolo capostipite di una classe di complessi che, ad oggi, è in continua espansione. Sono numerosi, infatti, gli studi basati sull'impiego del frammento $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^+$ per bio-imaging e, più recentemente, come agenti terapeutici. Considerata quindi la ben nota capacità dei complessi polipiridinici di Ru(II) di interagire con sistemi biologici e, vista la crescente necessità di sintetizzare molecole alternative ai più comuni antibiotici a causa dell'insorgenza di nuovi ceppi batterici resistenti ai farmaci più diffusi, la ricerca scientifica si è dedicata allo sviluppo di nuovi composti con attività antibatterica contenenti residui metallici.

Le infezioni causate da batteri patogeni sono, infatti, una delle principali cause di mortalità. Nel secolo scorso la scoperta casuale della penicillina da parte di Alexander Fleming (1928) ha aperto le porte alla ricerca incentrata su una nuova classe di composti, gli antibiotici, molecole organiche prodotte da vari microorganismi in grado di inibire la crescita di batteri, diminuendo quindi la pericolosità delle infezioni da essi provocate; questi agenti sono generalmente suddivisibili in quattro principali categorie, distinte in base al loro meccanismo d'azione, nello specifico:

- Inibizione della sintesi della parete cellulare: penicillina e derivati, cefalosporine, carbapenemi e glicopeptidi;^[12]
- Distruzione della membrana cellulare: polimixine, antibiotici polipeptidici cationici;^[13]
- Inibizione della sintesi di acidi nucleici: come chinoloni, riampicina e sulfonammidi;^[14]
- Inibizione della sintesi proteica: come tetracicline, aminoglicosidi, cloramfenicolo e macrolidi.^[15]

Nel decennio successivo al lancio della penicillina sul mercato farmaceutico è però stato isolato il primo ceppo batterico (*Staphylococcus aureus*) ad essa resistente.^[16] Nonostante nel corso degli anni la gamma di specie con attività antibatterica sia stata

notevolmente ampliata, sia dalla scoperta di altri agenti di origine biologica sia da derivati sintetici, l'insorgenza di resistenza a queste specie da parte di microorganismi patogeni è stata riscontrata sempre più frequentemente, in alcuni casi anche nei confronti di più di un antibiotico (multidrug-resistant bacteria).^[17] E' ormai chiaro come l'utilizzo massivo, e spesso inappropriato, di questi agenti abbia portato alla comparsa di ceppi batterici in grado di resistere, grazie a diversi meccanismi,^[18] alla maggior parte dei principi attivi presenti sul mercato. E' quindi necessaria la ricerca di molecole alternative ai più comuni antibiotici a matrice organica, in grado di contrastare la virulenza di ceppi resistenti tramite nuovi meccanismi di azione; in questo contesto si inserisce la ricerca dedicata allo sviluppo di nuovi composti metallici con attività antibatterica.

Nei sistemi biologici, metalli come Na, Mg, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn e Se determinano funzioni cellulari essenziali e sono per questo indispensabili per la loro sopravvivenza;^[19] si pensi al gruppo Fe-eme presente nell'emoglobina, proteina responsabile del trasporto di O₂ all'interno del corpo umano. Allo stesso tempo, un eccesso di questi metalli, definiti *essenziali*, possono portare alla morte cellulare. Inoltre, metalli che non rivestono alcun ruolo in sistemi biologici (*non-essenziali*) come Ag, Hg e Te risultano estremamente tossici nei confronti della maggior parte delle specie batteriche, dimostrando attività antimicrobica anche a concentrazioni estremamente basse.^[20] Sulla base di queste osservazioni la comunità scientifica ha dedicato grande interesse allo sviluppo di sistemi metallici in grado di contrastare la proliferazione di microorganismi patogeni, permettendo di approfondire i meccanismi d'azione di tali derivati in ambito biologico. Nello specifico, studi precedenti hanno rivelato come la tossicità di queste specie possa essere dovuta a:

- alterazione di proteine essenziali;^[21]
- insorgenza di mutazioni genetiche;^[22]
- produzione di ROS (*Reactive Oxygen Species*);^[23]
- sequestro di nutrienti essenziali;^[24]
- alterazione della membrana cellulare.^[25]

Con l'intento di ampliare la gamma di complessi metallici in grado di contrastare la crescita di vari ceppi batterici,^[26] il gruppo di ricerca ha verificato come, su due diverse linee batteriche, la conversione di una classe di composti Ir(III)-tetrazolici neutri nei corrispettivi complessi cationici si traduca in un notevole aumento delle loro proprietà antimicrobiche (Figura 6).^[27]

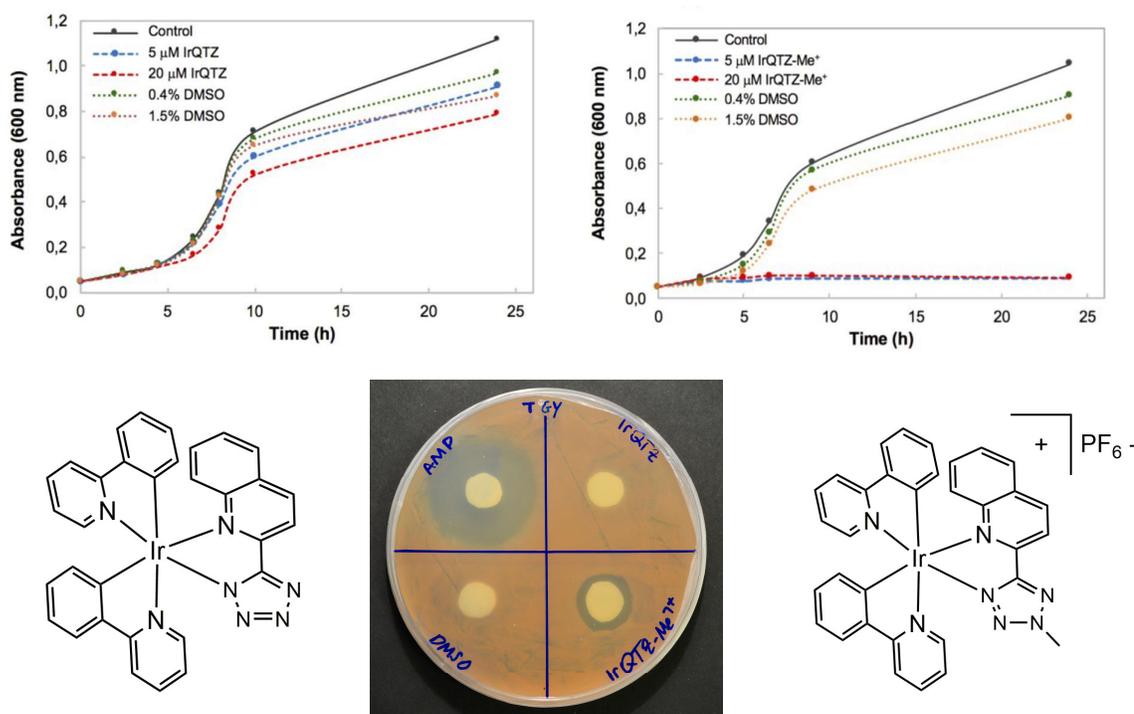


Figura 6. Cinetiche di crescita in terreno liquido e test di diffusione in agarosio relativa ai complessi $[Ir(Ppy)_2(QTz)]$ (struttura e curva sx) e $[Ir(Ppy)_2(QTz-Me)]^+$ (struttura e curva dx).

Recentemente, Crowley *et. al.*, hanno dimostrato come complessi cationici Ru(II)-triazolici siano in grado di inibire la crescita del batterio Gram-positivo *Staphylococcus aureus* danneggiandone la membrana cellulare,^[28] possedendo al contempo una citotossicità molto bassa verso cellule eucariote, consentendo di eliminare le infezioni provocate da questi batteri patogeni senza però danneggiare le cellule dell'organismo ospite.

Sulla scorta di queste indicazioni, questo elaborato di tesi sperimentale è rivolto alla progettazione, sintesi e caratterizzazione di due classi di complessi cationici Ru(II)-tetrazolici al fine di indagare eventuali differenze in termini di attività antibatterica dovute ad una diversa disposizione dei leganti coordinati al centro di Ru(II). La prima è costituita da una nuova tipologia di complessi tris-omolettici con formulazione generale *fac/mer*-[Ru(N[^]N')₃][PF₆]₂ in cui (N[^]N') rappresenta per la prima volta un legante 5-aryl tetrazolico variamente funzionalizzato, ovvero **PTz-(N2-Me)** (2-(2-metil-tetrazol-5-il)piridina), **PTz-(N2-tBu)** (2-(2-(*tert*-butil)-tetrazol-5-il)piridina) o **QTz-(N2-Me)** (2-(2-metil-tetrazol-5-il)chinolina), la seconda invece rappresenta una serie di complessi eterolettici con formulazione generale [Ru(bpy)₂(N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N' = **PTz-(N2-Me)** o **QTz-(N2-Me)**) o [RuTpy(N[^]^N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]^N[^]N' = **2,6-BTP-N2-tBu**, 2,6-bis(2-(*tert*-butil)-tetrazol-5-il)piridina (Figura 7).

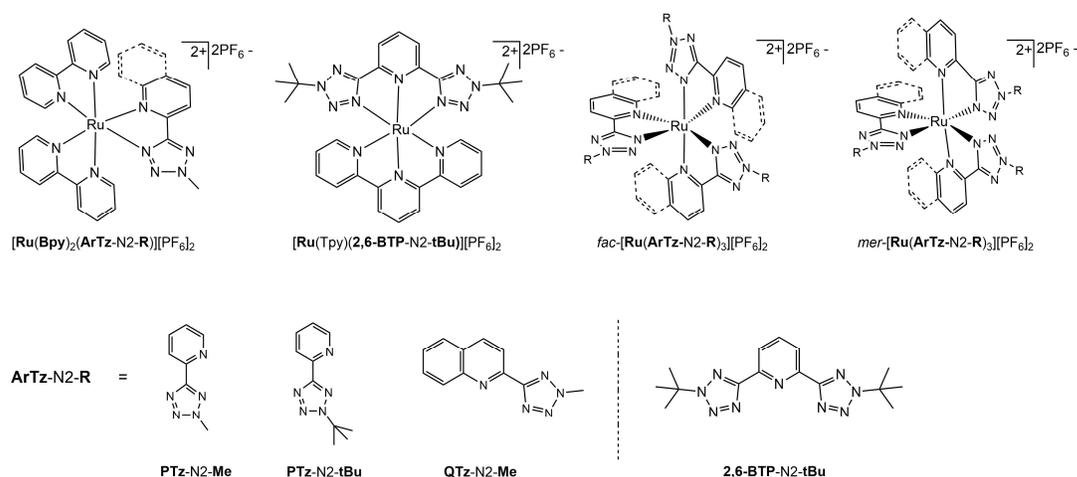


Figura 7. Complessi di Ru(II) presentati in questo lavoro di tesi e leganti tetrazolici impiegati con relativi acronimi.

L'attività antibatterica di entrambe le serie di complessi è stata poi verificata nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, nello specifico *Deinococcus radiodurans* ed *Escherichia coli*, mediante prove di diffusione in agarosio (*Disk Diffusion Test*) e cinetiche di crescita in terreno liquido.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli obiettivi di questo lavoro di tesi sono stati la sintesi di complessi cationici di Ru (II) tetrazolici e lo studio della loro eventuale attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi ovvero *Escherichia coli* e *Deinococcus radiodurans*.

Tutti i complessi sintetizzati possono essere suddivisi in due categorie principali: una nuova classe di composti omolettici, con formulazione generale *fac/mer*-[Ru(N[^]N')₃][PF₆]₂ in cui (N[^]N') rappresenta per la prima volta il legante 5-aril tetrazolico **PTz**-(N2-Me), **PTz**-(N2-tBu) o **QTz**-(N2-Me), e quella costituita da complessi eterolettici con formula generale [Ru(bpy)₂(N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N' = **PTz**-(N2-Me) o **QTz**-(N2-Me)) o [RuTpy(N[^]N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N[^]N' = **2,6-BTP**-(N2-tBu)).

Sintesi dei leganti tetrazolici

I leganti tetrazolici utilizzati (Figura 8) sono stati sintetizzati secondo due diverse procedure presenti in letteratura^[29,30] che prevedono la reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare tra sodio azide e l'opportuno nitrile a dare i corrispondenti composti anionici (tetrazolati), isolati per protonazione a dare i relativi composti tetrazolici.

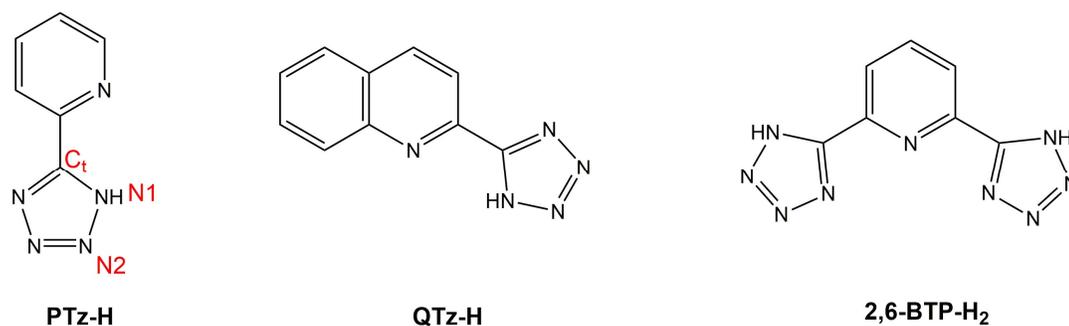


Figura 8. Leganti tetrazolici sintetizzati con relativi acronimi e numerazione adottata.

L'effettiva formazione delle specie desiderate è stata verificata tramite spettroscopia ¹H-NMR e, a titolo di esempio, si riporta in figura 9 lo spettro del legante **QTz-H**. In tutti i casi si osserva l'atteso numero di segnali relativi ai protoni aromatici nella regione compresa tra 7 e 9 ppm.

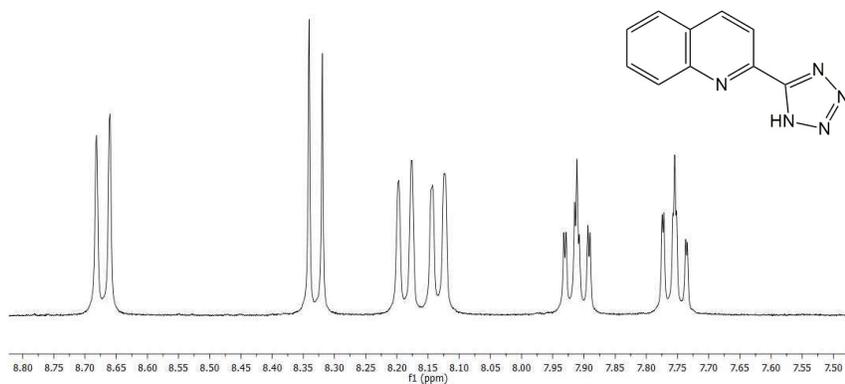
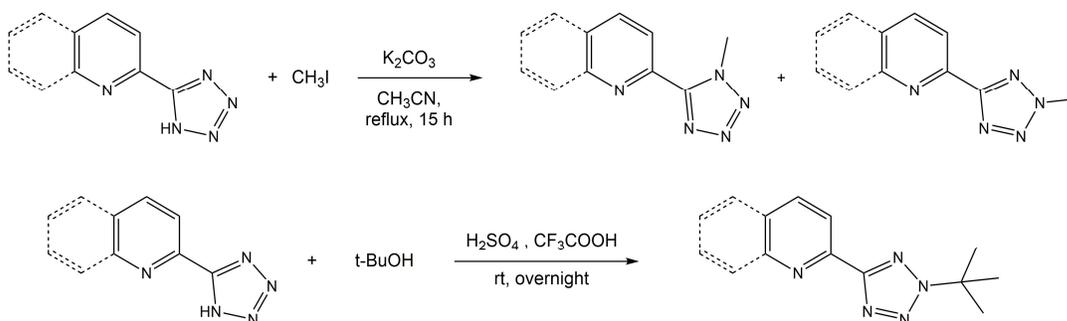


Figura 9. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del legante **QTz-H**, DMSO-d_6 , 400 MHz.

I leganti così ottenuti sono stati funzionalizzati alchilando l'anello tetrazolico con un gruppo metilico o terbutilico, seguendo due metodiche riportate in letteratura (Schema 1).^[31,32,33]



Schema 1. Procedure sintetiche impiegate per la funzionalizzazione dei derivati 5-aril tetrazolici.

La reazione di metilazione dell'anello tetrazolico ha portato, per entrambi i leganti, all'ottenimento di una miscela di due regioisomeri, uno metilato sull'azoto N1, l'altro in N2, separabili mediante colonna cromatografica. I due regioisomeri sono stati distinti mediante spettroscopia $^{13}\text{C-NMR}$. Studi precedenti svolti dal gruppo di ricerca presso cui è stata svolta questa attività di tesi, hanno infatti dimostrato come la sostituzione sulle due possibili posizioni del gruppo $[\text{R-CN}_4]^-$ determini valori di chemical shift del carbonio tetrazolico (C_t) diagnostici per la sostituzione in N1 o in N2;^[34] in particolare, nel caso in cui la sostituzione avvenga in posizione N1, il C_t risuonerà tra 157 e 152 ppm, mentre la sostituzione in N2 produce valori di chemical shift del C_t compresi tra 165 e 160 ppm (Figura 10).

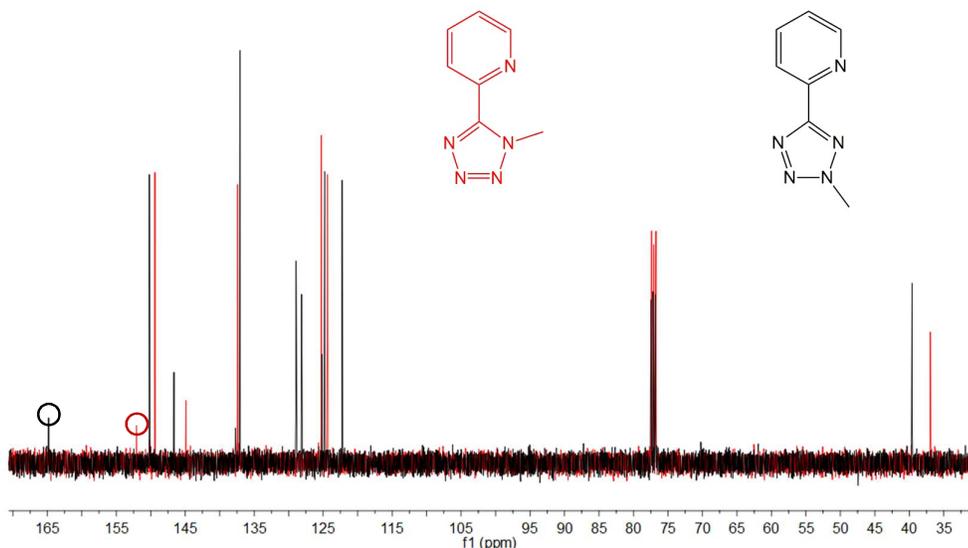


Figura 10. Sovrapposizione degli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ relativi ai leganti **PTz-N1-Me** (spettro rosso) e **PTz-N2-Me** (spettro nero). I segnali contrassegnati corrispondono ai carboni tetrazolici (C_1) dei due regioisomeri.

La reazione di tert-butilazione dell'anello tetrazolico, dato il maggior ingombro sterico del sostituente, conduce unicamente alla formazione dei derivati alchilati in posizione N2. Per entrambi i substrati, il segnale corrispondente al gruppo metilico è osservabile a circa 4.4 ppm mentre i protoni relativi al gruppo terbutilico risuonano a circa 1.8 ppm (Figura 11).

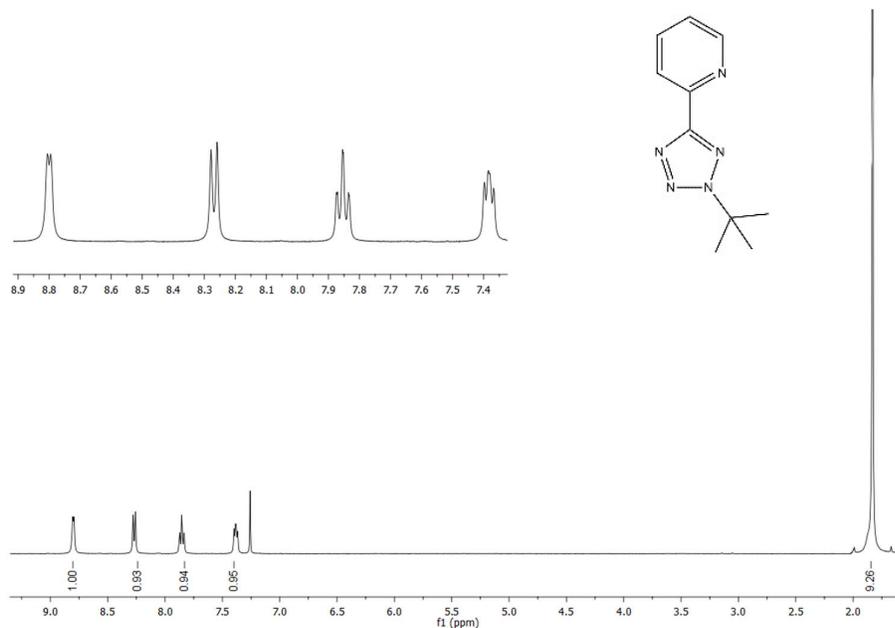
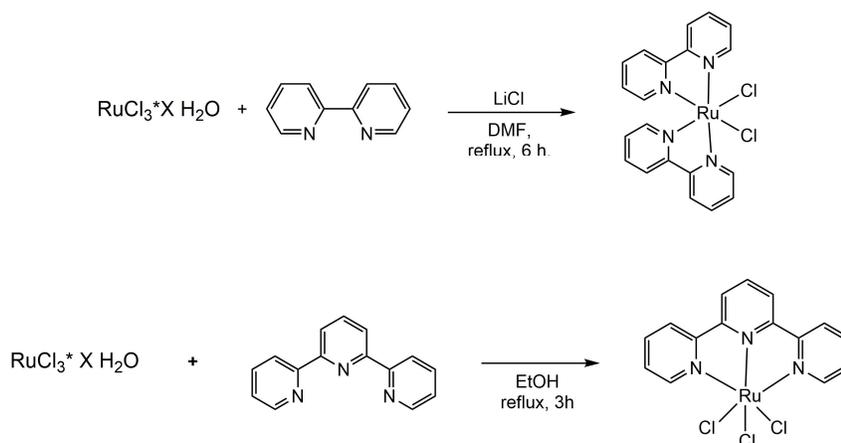


Figura 11. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del legante **PTz-N2-tBu**, CDCl_3 , 400 MHz.

Sintesi dei precursori di Ru (II)

Per la sintesi dei precursori di Ru (II) sono state seguite procedure sintetiche note^[35,36] (Schema 2), che prevedono la reazione tra $\text{RuCl}_3 \cdot \text{X} \cdot \text{H}_2\text{O}$ e l'opportuno legante polipiridinico, in questo caso 2,2' bipiridina o 2,2';6',2'' terpiridina.



Schema 2. Protocolli sintetici impiegati per i precursori di Ru(II).

Sintesi dei complessi di Ru (II)

Complessi tris-omolettici

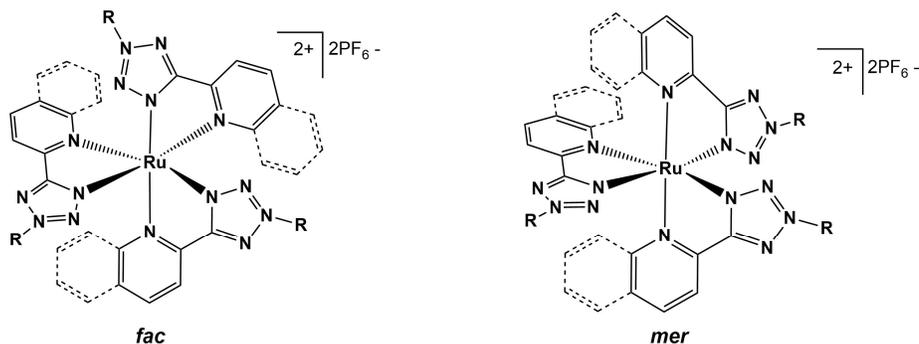


Figura 11. Complessi omolettici di Ru(II) sintetizzati durante questo lavoro di tesi. ($\text{R} = -\text{CH}_3$, $t\text{Bu}$. “*fac*” = facciale, “*mer*” = meridiano).

I complessi omolettici di Ru(II) con formulazione generale *fac/mer*- $[\text{Ru}(\text{N}^{\wedge}\text{N}')_3][\text{PF}_6]_2$ riportati in figura 11 sono stati ottenuti modificando una procedura presente in letteratura.^[37] La sintesi mediata dalle microonde ha permesso di ottenere le specie di Ru (II) sotto forma di miscela isomerica, in tempi di reazione notevolmente inferiori a quelli richiesti dalle metodiche tradizionali con valori di resa del tutto paragonabili.^[38]

L'effettiva formazione delle specie desiderate è stata verificata, in prima battuta, mediante spettrometria di massa ESI-MS, quindi con spettroscopia ^1H e ^{13}C NMR. Per tutti i complessi, la caratterizzazione ESI-MS ha permesso di identificare nella scansione in ioni positivi il segnale corrispondente all'atteso ione molecolare del frammento metallico mentre, nella scansione in ioni negativi, il segnale relativo al controione PF_6^- . In figura 12 è riportata, a titolo di esempio, la scansione in ioni positivi relativa al complesso $[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ in cui è possibile osservare la presenza del segnale relativo a $[\text{M}/2]^+ = 367 \text{ m/z}$.

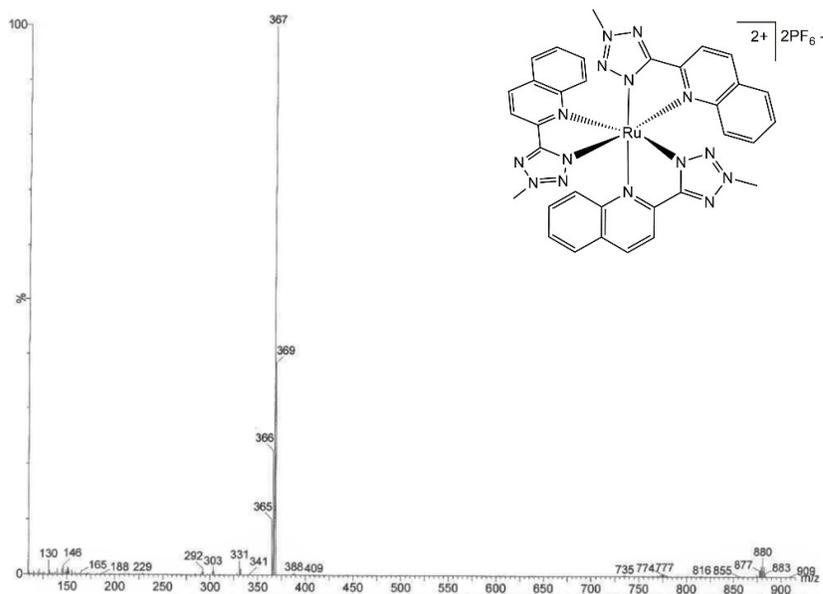


Figura 12. Spettro ESI-MS del complesso *fac*- $[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$.

Per l'interpretazione degli spettri ^1H -NMR dei complessi omolettici sintetizzati sono necessarie considerazioni preliminari in merito alla struttura dei leganti e sulle loro possibili disposizioni attorno all'atomo centrale di Ru(II). Soffermendosi sulla simmetria dei derivati 5-aryl tetrazolici impiegati, e tenendo presente la coordinazione ottaedrica adottata da questi attorno al centro metallico, è intuibile come questi possano dare chelazione, portando alla formazione di due diversi isomeri strutturali: l'isomero facciale (*fac*) e l'isomero meridiano (*mer*).

Definendo *N* l'azoto dell'anello piridinico o del sistema chinolinico ed *N'* l'azoto N1 dell'anello tetrazolico è possibile schematizzare i due isomeri come illustrato in figura 13.

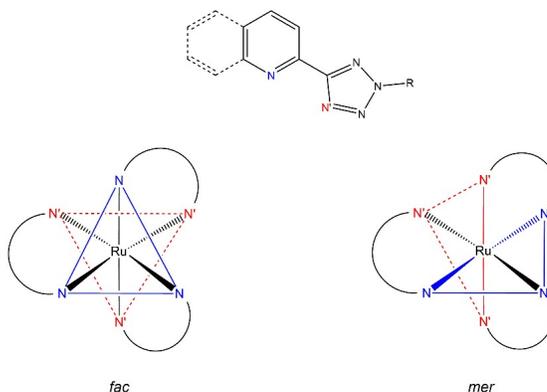


Figura 13. Rappresentazione degli isomeri strutturali *fac* e *mer* dei complessi sintetizzati.

Nell'isomero facciale, gli atomi N (o N') occupano tre dei sei vertici dell'ottaedro definendone una faccia, mentre nell'isomero meridiano questi definiscono un piano che contiene il centro metallico. La disposizione facciale dei leganti chelanti $N^{\wedge}N'$ (che comprendono quindi gli atomi N ed N') determina tre piani di simmetria σ e un asse di simmetria C_3 , passante per il centro metallico e perpendicolare al centro delle facce descritte dai sostituenti (gruppo puntuale C_{3h}). L'asse C_3 implica che una rotazione del complesso di 120° attorno ad esso restituisca la molecola di partenza, rendendo analoghi i tre leganti $N^{\wedge}N'$. I loro protoni, inoltre, avvinti dalle operazioni di simmetria descritte pocanzi, risultano essere magneticamente equivalenti, motivo per cui gli spettri NMR dell'isomero *fac* mostrano un pattern di segnali analogo a quello del singolo legante chelante.

Contrariamente al precedente, data la coordinazione di tipo chelante adottata dai leganti, l'isomero meridiano non contiene alcun elemento di simmetria rendendo i protoni non magneticamente equivalenti tra loro, risultando in spettri NMR con un pattern di segnali per ognuno dei tre leganti.

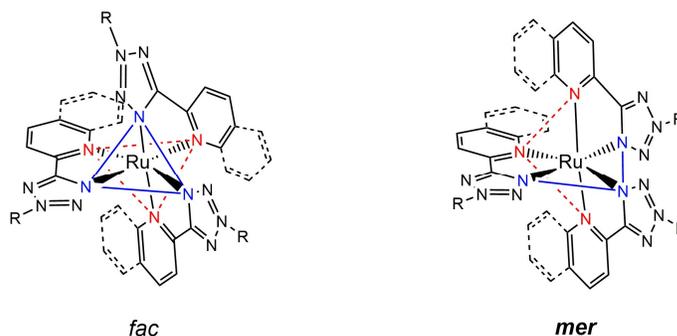


Figura 14. Rappresentazione degli isomeri *fac* e *mer* dei complessi sintetizzati.

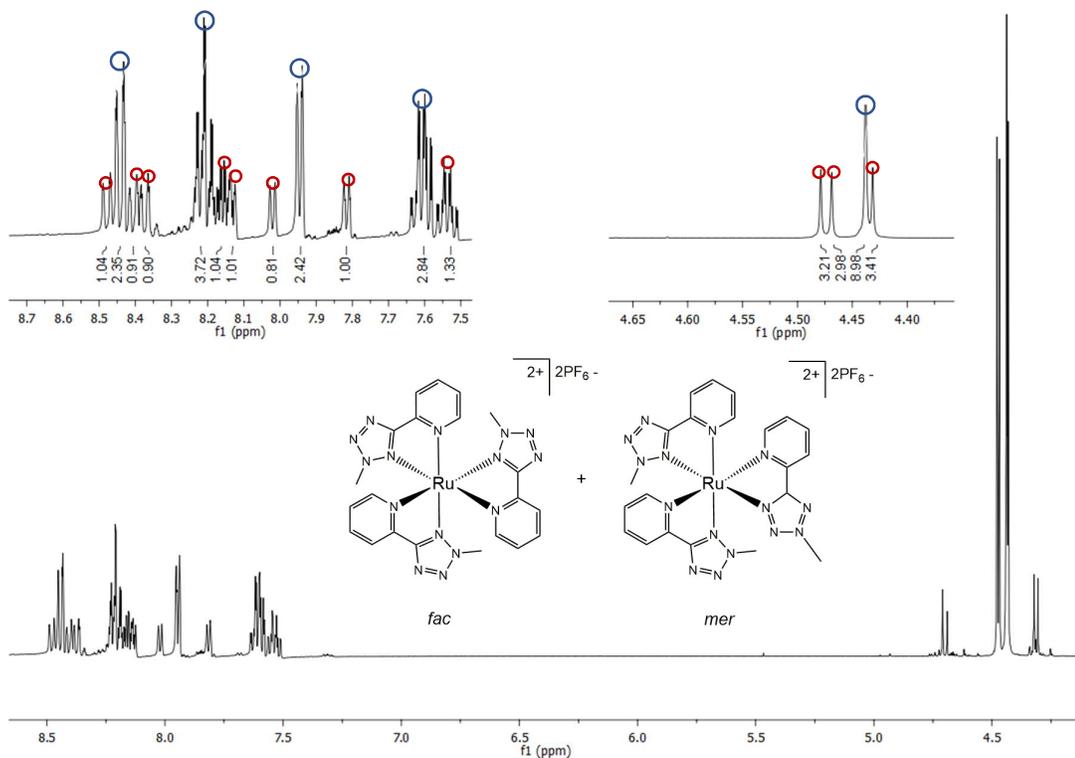


Figura 15. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso *fac/mer*- $[\text{Ru}(\text{PTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$, CD_3CN 400 MHz.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in figura 15 relativo alla miscela dei due isomeri *fac* e *mer* del complesso $[\text{Ru}(\text{PTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ conferma quanto atteso, riportando quattro distinti pattern di segnali, uno di intensità maggiore attribuibile all'isomero facciale ed altri tre ascrivibili ai protoni dell'isomero meridiano. Considerando inizialmente la regione alifatica si osservano, tra 4.50 e 4.40 ppm, quattro distinti segnali riconducibili ai gruppi metilici localizzati sull'anello tetrazolico, nello specifico un singoletto con integrale 9 relativo ai tre metili dell'isomero facciale e altri tre singoletti con integrale 3 attribuibili ai tre metili dell'isomero meridiano. Spostandosi a campi più bassi sono distinguibili quattro segnali di maggiore intensità e integrale pari a 3, attribuibili ai protoni degli anelli piridinici dell'isomero facciale; i segnali di minore intensità e di integrale pari a 1 sono invece relativi all'isomero meridiano. I due isomeri *fac* e *mer* costituiscono una coppia di diastereoisomeri, rendendo possibile, in alcuni casi, la loro separazione, effettuata mediante colonna cromatografica di Al_2O_3 , rendendo possibile la caratterizzazione NMR per ognuna delle due singole specie.

Soffermandosi sugli spettri $^1\text{H-NMR}$ (Figura 16 e 17) e $^{13}\text{C-NMR}$ (Figura 18) degli isomeri *fac* e *mer* del complesso $[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ è possibile osservare, per entrambe le specie, sia le risonanze dei protoni (o carboni per $^{13}\text{C-NMR}$) dei rispettivi gruppi metilici localizzati sull'anello tetrazolico che, nella zona aromatica, i pattern di segnali dei leganti 5-aryl tetrazolici coordinati al centro metallico. In accordo con la diversa simmetria dei due diastereoisomeri, lo spettro dell'isomero facciale presenta un solo pattern di segnali, mentre lo spettro dell'isomero meridiano, non avendo elementi di simmetria, riporta un set di segnali per ogni singolo legante.

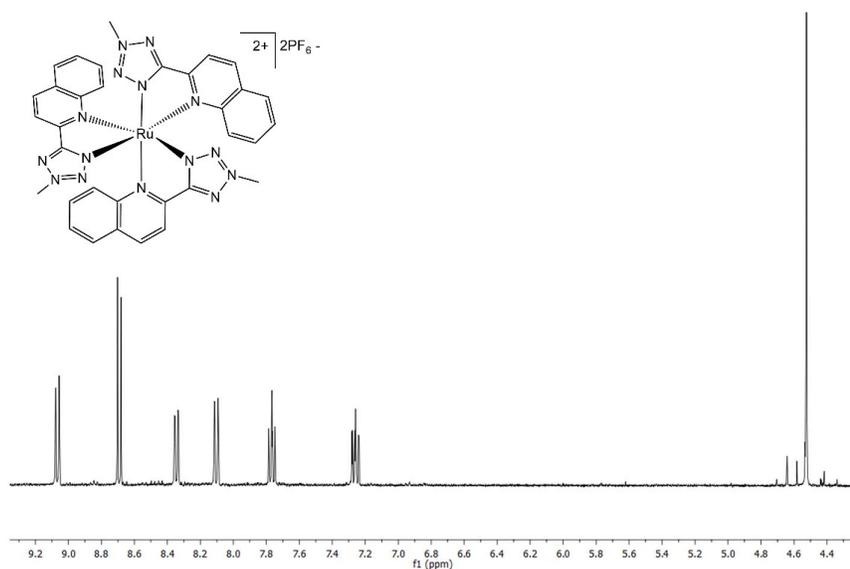


Figura 16. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso *fac*- $[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$, Acetone-d^6 , 400 MHz.

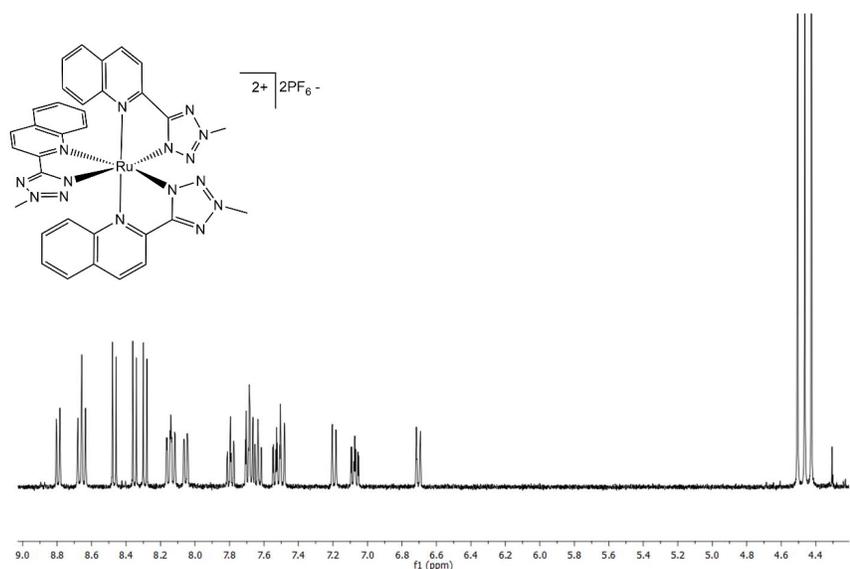


Figura 17. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso *mer*- $[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$, CD_3CN , 400 MHz.

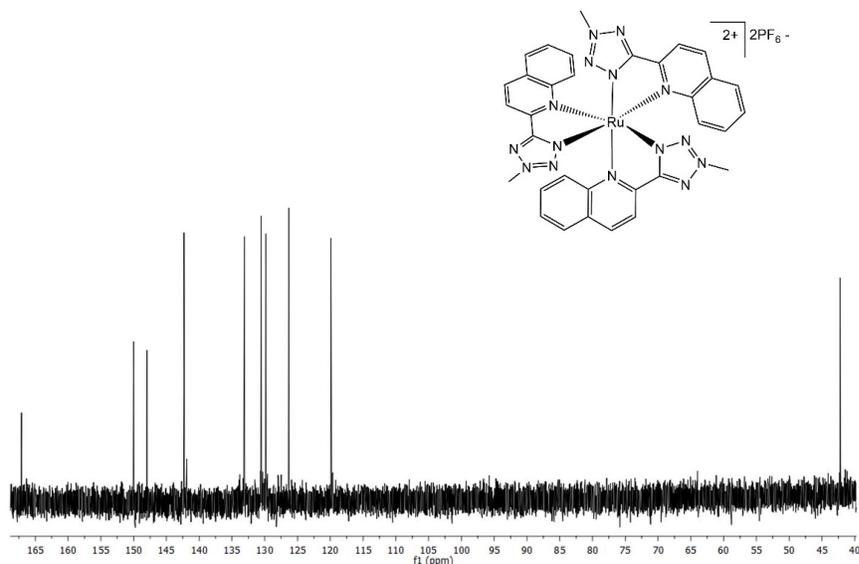


Figura 18. Spettro ^{13}C -NMR del complesso $\text{fac-}[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$, Acetone-d_6 , 100 MHz.

Complessi Eterolettici

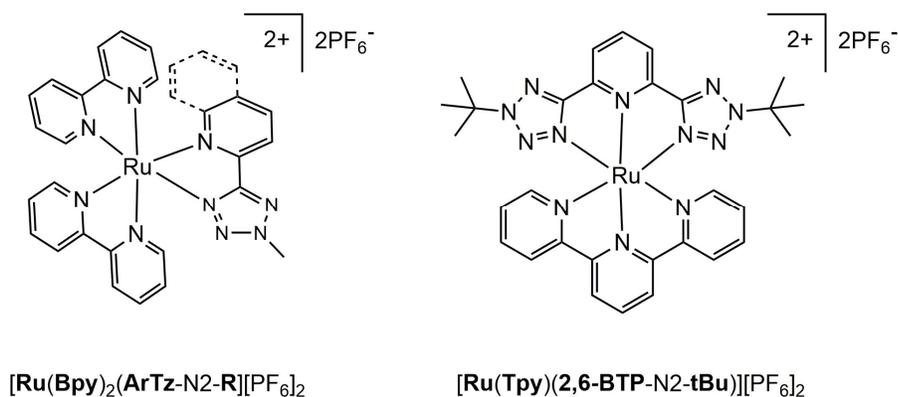


Figura 19. Complessi eterolettici $\text{Ru}(\text{II})$ sintetizzati durante questo lavoro di tesi.

I complessi eterolettici di $\text{Ru}(\text{II})$ con formula generale $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N}')][\text{PF}_6]_2$ o $[\text{RuTpy}(\text{N}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]_2$ sono stati ottenuti per reazione tra i corrispondenti precursori e gli opportuni leganti 5-aryl tetrazolici alchilati seguendo procedure sintetiche riportate in letteratura.^[10] Anche in questo caso, l'effettiva formazione delle specie desiderate è stata verificata tramite spettrometria di massa ESI-MS e spettroscopia NMR.

Non presentando alcun elemento di simmetria, gli spettri NMR dei complessi con formula generale $[\text{RuBpy}_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]_2$ riportano un set di segnali per ogni singolo legante.

In ogni caso il numero di segnali e il valore del loro integrale sono in accordo con quanto atteso sulla base della composizione del complesso esaminato. A titolo d'esempio sono riportati in figura 20 e 21 gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$, rispettivamente, del complesso $[\text{RuBpy}_2(\text{PTz-N2-Me})][\text{PF}_6]_2$. Il complesso $[\text{RuTpy}(2,6\text{-BTP-N2-tBu})][\text{PF}_6]_2$ (figura 19) invece, vede coordinati al centro metallico due leganti tris-chelanti simmetrici, risultando in spettri NMR congruenti agli elementi di simmetria presenti.

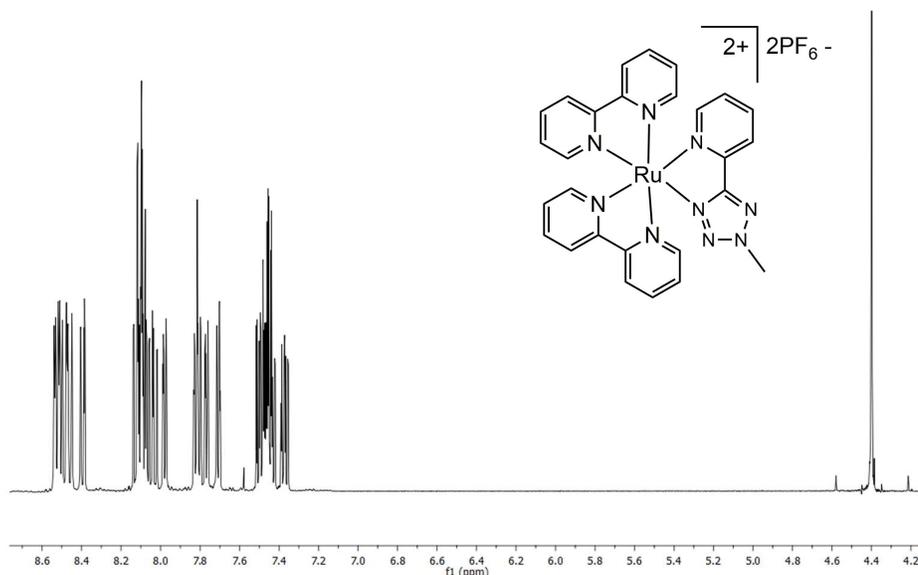


Figura 20. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso $[\text{RuBpy}_2(\text{PTz-N2-Me})]^{2+}[\text{PF}_6]_2$, CD_3CN , 400 MHz.

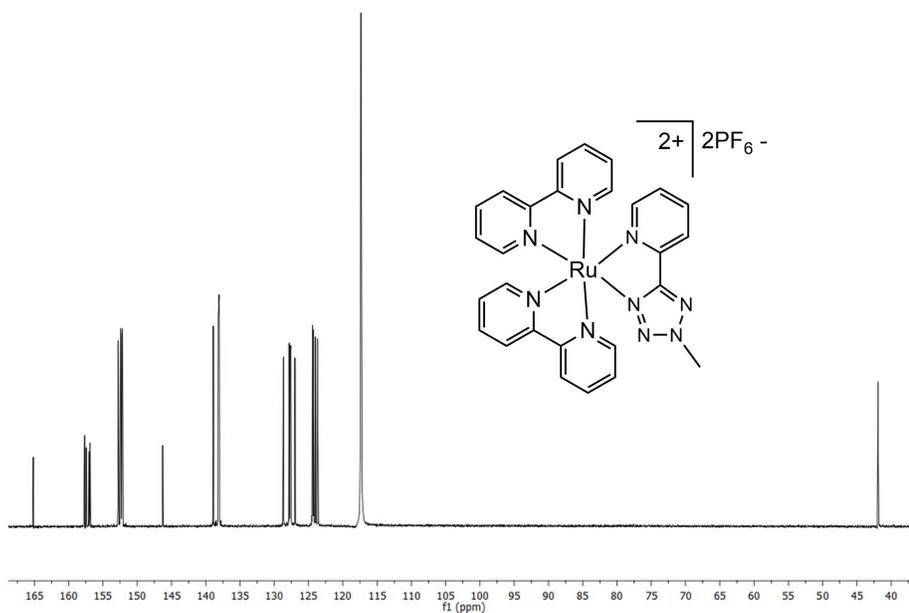


Figura 21. Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso $[\text{RuBpy}_2(\text{PTz-N2-Me})]^{2+}[\text{PF}_6]_2$, CD_3CN , 100 MHz.

A conferma delle caratterizzazioni spettroscopiche, si riportano le strutture dei complessi $mer\text{-}[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ (Figura 22) e $[\text{RuTpy}(2,6\text{-BTP-N2-tBu})][\text{PF}_6]_2$ (Figura 23) ottenute mediante diffrazione a raggi X su cristallo singolo.

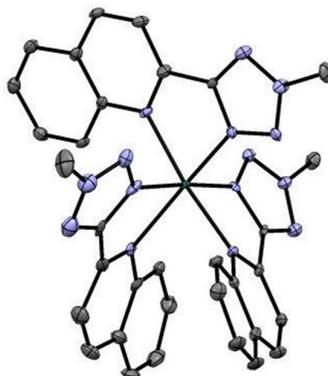


Figura 22. Struttura ai raggi X del complesso $mer\text{-}[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ (*H*, PF_6 e solventi di cristallizzazione sono stati omissi per chiarezza).

Dal diagramma relativo alla struttura del complesso $mer\text{-}[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ (sopra), si nota come il complesso sia ottaedrico, omolettico, in cui i leganti chelanti 5-aryl tetrazolici si dispongono attorno allo ione metallico con una geometria di tipo meridiano. Un'analisi più attenta dei leganti coordinati mostra come almeno uno di essi sia sostanzialmente co-planare, mentre i rimanenti due leganti coordinati evidenziano una parziale distorsione.

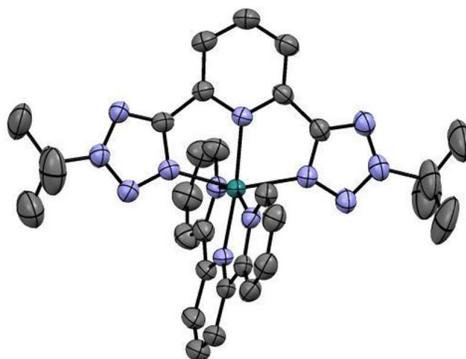


Figura 23. Struttura ai raggi X del complesso $[\text{RuTpy}(2,6\text{-BTP-N2-tBu})][\text{PF}_6]_2$, (*H*, PF_6 e solventi di cristallizzazione sono stati omissi per chiarezza).

Per il complesso $[\text{RuTpy}(2,6\text{-BTP-N2-tBu})][\text{PF}_6]_2$, il diagramma mette in evidenza l'attesa disposizione del legante 2,6-BTP-N2-tBu, la cui coordinazione risulta esattamente riconducibile a quella del legante terpiridinico (Tpy).

Spettroscopia di assorbimento

Contestualmente alle caratterizzazioni appena discusse, sono state studiate le proprietà di assorbimento delle specie ottenute. Gli spettri di assorbimento UV-Vis dei complessi tris-omolettici sintetizzati (soluzione 10^{-5} M in CH_3CN) mostrano in tutti i casi due principali massimi, uno nella regione UV attribuibile a transizioni $\pi\text{-}\pi^*$ ligando centrate (LC), ed uno nella regione del visibile, relativo a processi a trasferimento di carica tra il centro metallico e i leganti ad esso coordinati (${}^3\text{MLCT}$ ($d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{N}^{\wedge}\text{N})$)). Come osservabile in figura 24, i due diversi isomeri strutturali dei complessi in esame presentano profili di assorbimento e coefficienti di estinzione molare comparabili.

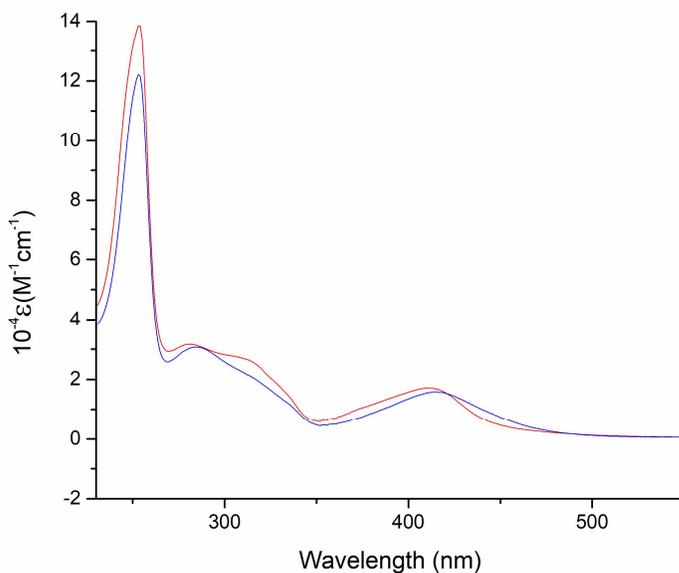


Figura 24. Spettri di assorbimento dei complessi *fac*- $[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ (curva rossa) e *mer*- $[\text{Ru}(\text{QTz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$ (curva blu), solvente CH_3CN .

Anche nel caso dei complessi eterolettici di Ru(II) tetrazolici sono stati registrati gli spettri di assorbimento UV-Vis in soluzioni diluite (10^{-5} M in CH_3CN) di $[\text{RuBpy}_2(\text{Qtz-N2-Me})][\text{PF}_6]_2$, $[\text{RuBpy}_2(\text{Ptz-N2-Me})][\text{PF}_6]_2$ e $[\text{RuTpy}(2,6\text{-BTP-N2-tBu})][\text{PF}_6]_2$. Per tutti i complessi studiati, come è possibile osservare dalla figura 25, nella regione UV (230-350 nm) sono distinguibili transizioni centrate sui leganti (LC) mentre, ad energie inferiori (350-550 nm) sono presenti massimi di assorbimento ascrivibili a transizioni a trasferimento di carica di tipo MLCT.

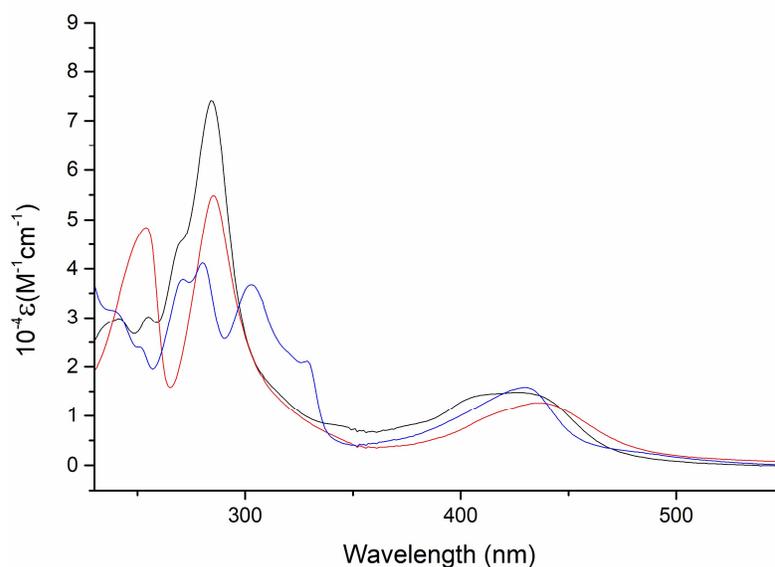


Figura 25. Spettri di assorbimento dei complessi $[\text{RuBpy}_2(\text{Qtz-N2-Me})][\text{PF}_6]_2$ (curva rossa), $[\text{RuBpy}_2(\text{Ptz-N2-Me})][\text{PF}_6]_2$ (curva nera) $[\text{RuTpy}(2,6\text{-BTP-N2-tBu})][\text{PF}_6]_2$ (curva blu), solvente CH_3CN .

Tabella 1. Dati fotofisici relativi ai complessi sintetizzati (10^{-5}M in CH_3CN); sh = shoulder – spalla nel profilo di assorbimento.

Complesso (solvente: CH_3CN)	λ abs (nm)	$10^4 \epsilon$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
fac/mer- $[\text{Ru}(\text{Ptz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$	468; 432; 367; 289	8.7; 7.3; 7.2; 49.0
fac- $[\text{Ru}(\text{Ptz-N2-tBu})_3][\text{PF}_6]_2$	382; 265	5.94; 21.6
mer- $[\text{Ru}(\text{Ptz-N2-tBu})_3][\text{PF}_6]_2$	380; 263	9.56; 34.3
fac- $[\text{Ru}(\text{Qtz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$	410; 305 (sh); 280; 253	1.71; 3.17; 13.9
mer- $[\text{Ru}(\text{Qtz-N2-Me})_3][\text{PF}_6]_2$	416; 310 (sh); 285; 253	1.58; 3.07; 12.2
$[\text{RuBpy}_2(\text{Ptz-N2-Me})][\text{PF}_6]_2$	426; 284; 275 (sh)	1.48; 7.41
$[\text{RuBpy}_2(\text{Qtz-N2-Me})][\text{PF}_6]_2$	436; 285; 254	1.17; 5.17; 4.56
$[\text{RuTpy}(2,6\text{-BTP-N2-tBu})][\text{PF}_6]_2$	429; 325 (sh); 303; 271	1.54; 3.52; 3.63

Studio dell'attività antibatterica

L'attività antibatterica dei complessi sintetizzati è stata studiata nei confronti dei batteri *Escherichia coli* (Gram-negativo) e *Deinococcus radiodurans* (Gram-positivo) mediante test di diffusione in agar e analisi delle cinetiche di crescita delle colture batteriche in terreno liquido.

Test di diffusione in agar

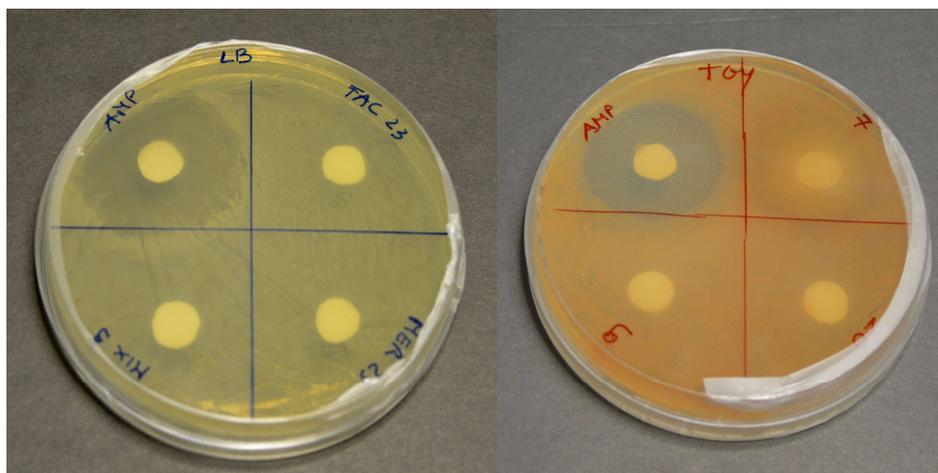


Figura 26. Colture batteriche di *E. coli* (sx) e *D. radiodurans* (dx) sottoposte a test di diffusione in agar.

Dai test di diffusione in agar effettuati, confrontando i dischi di carta imbevuti di soluzione di complesso con quello di riferimento imbevuto di ampicillina non si osservano evidenti effetti inibitori, né verso *E. coli* né verso *D. radiodurans*.

Curve di crescita in terreno liquido

Dai test di diffusione in agar, suffragati inoltre da prove effettuate in precedenza, si è osservato come i complessi cationici non inibiscono apprezzabilmente la crescita di *E. coli*^[27], per questo motivo lo studio dell'attività antibatterica dei complessi sintetizzati mediante cinetiche di crescita è stato effettuato unicamente nei confronti di *D. radiodurans*.

Nelle colture batteriche effettuate in *batch*, ossia senza apporto di terreno fresco, i microrganismi presenti consumano i nutrienti disponibili producendo al contempo prodotti di rifiuto. In conformità a questo, si possono individuare quattro principali fasi caratterizzanti la crescita batterica (Figura 27):

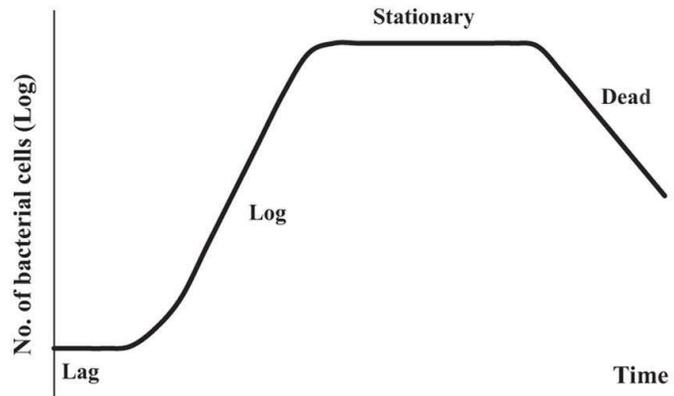


Figura 27. Fasi temporali della crescita batterica.

- **fase di latenza** o *lag-time*: in questa fase il numero di microrganismi rimane pressoché costante, in quanto il ceppo ha la necessità di adattarsi al tipo di nutrienti e di terreno in cui è stato inoculato;
- **fase esponenziale**: una volta adattate al terreno di coltura, le cellule della popolazione si dividono e crescono in maniera numericamente esponenziale, con velocità di crescita costante;
- **fase stazionaria**: in questa fase il terreno non contiene più i substrati necessari alla crescita batterica, può quindi presentare una variazione di pH o un accumulo di sostanze tossiche. La densità di popolazione rimane costante perché le cellule arrestano il loro ciclo cellulare. In questa fase, la vitalità cellulare tende a diminuire con l'avanzare del tempo.
- **fase di morte**: dopo un periodo in fase stazionaria le cellule sono soggette a lisi cellulare e muoiono. La densità di popolazione microbica di conseguenza diminuisce.

Nel caso in esame, ci si è soffermati alla fase di *lag* e su quella esponenziale, che fornisce informazioni riguardo alla velocità di crescita.

Il grafico in figura 28 riporta le curve di crescita ottenute misurando la densità ottica a 600 nm (OD_{600}) delle soluzioni contenenti *D. radiodurans* e i vari complessi di Ru(II) ad opportuni intervalli di tempo. La OD_{600} di una soluzione, indice della sua torbidità, né rappresenta essenzialmente l'assorbanza misurata a 600 nm. Essendo questo parametro proporzionale al numero di microorganismi presenti in soluzione, si è in grado di ottenere informazioni sulla variazione della popolazione batterica nel tempo monitorandone il valore.

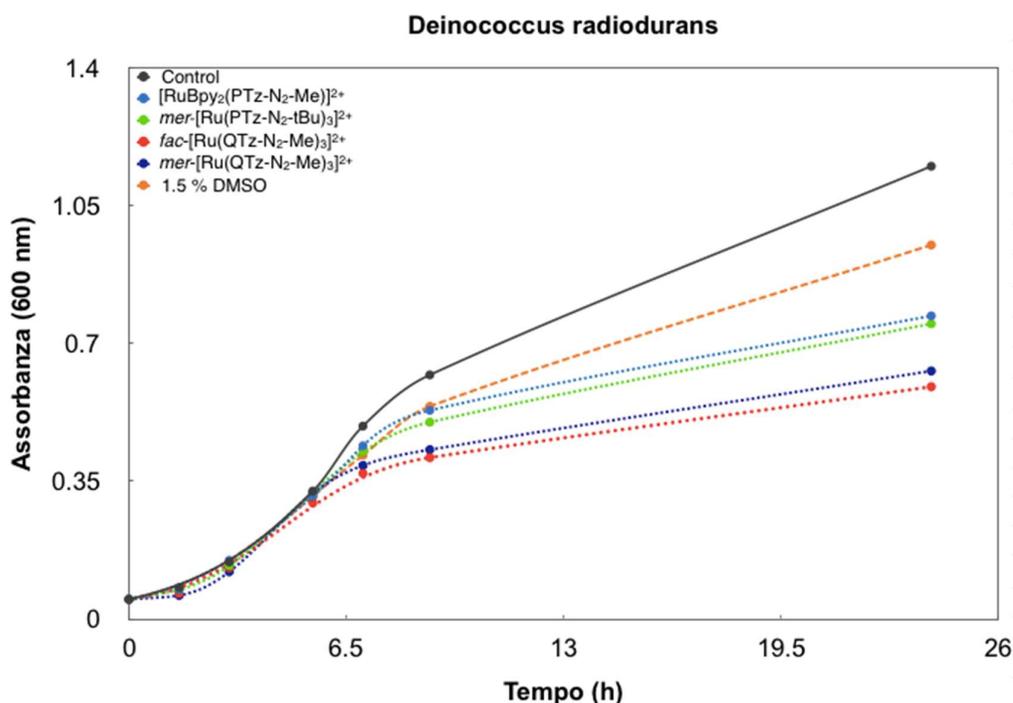


Figura 18. Curve di crescita registrate dai campioni in terreno liquido.

Tabella 2. Valori di densità ottica (OD_{600}) risolti nel tempo.

Time	$OD_{600\text{ nm}}$					
	Cont.	$[RuBpy_2(PTz-N_2-Me)]^{2+}$	$mer-[Ru(PTz-N_2-tBu)_3]^{2+}$	$fac-[Ru(QTz-N_2-Me)_3]^{2+}$	$mer-[Ru(QTz-N_2-Me)_3]^{2+}$	1.5 % DMSO
0	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
1.5	0.08	0.08	0.08	0.07	0.06	0.08
3	0.15	0.15	0.14	0.13	0.12	0.14
5.5	0.33	0.31	0.32	0.30	0.32	0.31
7	0.49	0.44	0.43	0.37	0.39	0.45
9	0.62	0.53	0.50	0.41	0.43	0.54
24	1.15	0.77	0.75	0.59	0.63	0.95

Contrariamente a quanto suggerito dai test di diffusione, confrontando la curva relativa al solo microorganismo con quelle registrate in presenza dei complessi e di DMSO 1.5% (figura 28), è osservabile come tutti i complessi utilizzati siano in grado di provocare una diminuzione della crescita cellulare in termini di biomassa finale prodotta (OD_{600} inferiori, tabella 2). L'effetto inibitorio delle specie di Ru (II) è risultato, in ogni caso, superiore a quello del controllo contenente DMSO, utilizzato per solubilizzarle. In particolare, la presenza in coltura dei complessi cationici *fac*-[Ru(QTz-N₂-Me)₃][PF₆]₂ e *mer*-[Ru(QTz-N₂-Me)₃][PF₆]₂ impiegati a concentrazione 20 μ M ha determinato, in misura paragonabile, un considerevole diminuzione della crescita microbica, attestandosi a valori di OD_{600} pari a circa il 40 % del controllo positivo (Tabella 2).

Da lavori precedentemente effettuati dal gruppo di ricerca,^[27] è emerso come l'attività antibatterica di complessi neutri di Ir(III) nei confronti del batterio Gram-positivo *D. radiodurans* possa essere implementata a seguito della metilazione sul gruppo [R-CN₄]⁻, modificazione che rende il complesso cationico. È quindi ipotizzabile come la carica positiva delocalizzata sul complesso contribuisca in modo determinante alle loro proprietà antibatteriche. Considerando quindi la natura cationica delle specie di Ru(II) sintetizzate e le evidenze sperimentali riguardo il loro meccanismo d'azione,^[28] una delle probabili ipotesi vede alla base della attività antimicrobica osservata la distruzione della membrana cellulare di microorganismi Gram-positivi come *D. radiodurans*; la loro inefficacia nei confronti di batteri Gram-negativi come *E. coli* è attribuibile invece alla diversa struttura del involucro cellulare di questi ultimi che, presentando una doppia membrana fosfolipidica, risultano più difficilmente attaccabili.

CONCLUSIONI

Nel corso di questo lavoro di tesi sperimentale sono state sintetizzate e caratterizzate due classi di complessi cationici Ru(II)-tetrazolici. La prima è costituita da una nuova tipologia di complessi tris-omolettici con formulazione generale *fac/mer*-[Ru(N[^]N')₃][PF₆]₂ in cui (N[^]N') rappresenta per la prima volta un legante 5-aril tetrazolico variamente funzionalizzato, ovvero **PTz-(N2-Me)** (2-(2-metil-tetrazol-5-il)piridina), **PTz-(N2-tBu)** (2-(2-(*tert*-butil)-tetrazol-5-il)piridina) o **QTz-(N2-Me)** (2-(2-metil-tetrazol-5-il)chinolina), la seconda invece rappresenta una serie di complessi eterolettici con formulazione generale [Ru(bpy)₂(N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N' = **PTz-(N2-Me)** o **QTz-(N2-Me)**) o [RuTpy(N[^]N[^]N')][PF₆]₂ (N[^]N[^]N' = **2,6-BTP**, 2,6-bis(2-(*tert*-butil)-tetrazol-5-il)piridina). L'attività antibatterica di entrambe le serie di complessi è stata verificata nei confronti di batteri Gram-positivi (*Deinococcus radiodurans*) e Gram-negativi (*Escherichia coli*) mediante prove di diffusione in gel di agarosio (*Disk Diffusion Test*) e cinetiche di crescita in terreno liquido. Dai test in agarosio effettuati non si sono osservati evidenti effetti inibitori, né verso *E. coli* né verso *D. radiodurans*, mentre le analisi delle cinetiche di crescita delle colture batteriche esposte ai vari complessi hanno evidenziato che come tutti i complessi sintetizzati siano in grado di inibire la crescita di *D. radiodurans*, in completo accordo con i promettenti risultati ottenuti a partire dagli analoghi e isoelettronici complessi di Ir(III).

Per quanto attiene i complessi di Ru(II) utilizzati in questo lavoro, il differente esito delle prove effettuate è probabilmente dovuta al diverso rapporto tra carica batterica e concentrazione di complesso. Tale rapporto risulta molto alto per i test in terreno solido rispetto al caso delle cinetiche di crescita batterica. In quest'ultimo caso, la presenza in coltura dei complessi cationici *fac*-[Ru(**QTz-N2-Me**)₃][PF₆]₂ e *mer*-[Ru(**QTz-N2-Me**)₃][PF₆]₂ impiegati a concentrazione 20 μM ha determinato un considerevole diminuzione della crescita microbica, attestandosi a valori di OD₆₀₀ pari al 40 % di quelli relativi al controllo positivo. Un effetto così pronunciato può essere ascritto alla presenza di sostituenti alifatici sui leganti coordinati, fattore che, con ogni probabilità, induce un grado di lipofilità appropriato per poter migliorare l'affinità verso la membrana cellulare dei batteri. In definitiva questo studio apre una nuova interessante prospettiva applicativa per i complessi Ru(II)-tetrazolici. In tale contesto la ricerca verrà sviluppata prendendo in considerazione diversi sostituenti alchilici, con l'obiettivo di raggiungere

valori elevati di attività antibatterica a seguito di opportune modulazioni del carattere idrofilico/lipofilico dei complessi.

PARTE SPERIMENTALE

Procedura Generale

Le reazioni, ove necessario, sono state condotte in atmosfera inerte utilizzando una linea vuoto-argon. I solventi utilizzati durante le sintesi: etanolo, acetonitrile, toluene, dimetilformammide, acetone, tertbutanolo, diclorometano (Sigma Aldrich), (Alfa Aesar), (Fluka) sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. I reagenti: 2-cianopiridina, chinolina-2-carbonitrile, 2,6-dicianopiridina, 2,2'-bipiridina, 2,2';6',2"-terpiridina, Et₃N, CH₃I, LiCl, NH₄Cl, K₂CO₃, NH₄PF₆, AgBF₄, AgPF₆, HCl, HClO₄, H₂SO₄, CF₃COOH, NaOH (Sigma Aldrich), RuCl₃*X H₂O (Strem Chemicals), sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Il gel di silice utilizzato nelle cromatografie (40-63 µm, Merck) e Al₂O₃ (Brockmann Activity I, Sigma Aldrich) sono stati utilizzati senza trattamenti ulteriori. I prodotti sono stati caratterizzati attraverso spettroscopia NMR, IR, UV-Vis ed ESI-MS. Gli spettri NMR sono stati registrati a 298K impiegando lo strumento Varian Mercury Plus VX400 (¹H, 399.9 MHz, ¹³C, 100.6 MHz). Tutti i valori di chemical shift sono riportati in ppm (scala δ) ricorrendo, come standard interno, alla risonanza del residuo protonico non deuterato: DMSO-*d*⁶ (1.93 ppm), Acetone-*d*⁶ (2.05 ppm), CD₃CN (1.93 ppm), CD₃OD (3.31 ppm). I solventi deuterati utilizzati (Euriso-top) sono stati impiegati senza ulteriori purificazioni. Gli spettri UV-Vis sono stati registrati su spettrofotometro a doppio raggio VARIAN Cary100, utilizzando cuvette di quarzo di spessore 1.00 cm ed una larghezza di banda superiore (SBW) pari a 1.0 nm. Le analisi ESI-MS sono state eseguite per iniezione diretta di una soluzione di CH₃CN dei composti impiegando uno spettrometro di massa WATERS ZQ 4000. Le reazioni eseguite nel reattore a microonde sono state effettuate con uno strumento Milestone PRO 16/24 "High throughput rotor" usando vials in teflon equipaggiati con sensori di temperatura e pressione. La potenza dello strumento è stata regolata a 220 W. La programmata di temperatura consiste in una rampa della durata di 5 minuti sino al raggiungimento della temperatura di 120°C, mantenuti per 50 minuti. Al termine i campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente.

Ceppi batterici e terreni di coltura

Il ceppo TOP10 del batterio Gram-negativo *Escherichia coli* (Invitrogen) è stato coltivato in terreno liquido Luria-Bertani (LB, 1% triptone, 0.5 % estratto di lievito, 1% NaCl). Il ceppo di *Deinococcus radiodurans*, batterio Gram-positivo rosso pigmentato, è stato coltivato in terreno liquido TGY (0.5 % triptone, 0.1 % glucosio, 0.3% estratto di lievito). Per la preparazione delle piastre solide si è proceduto aggiungendo 1.5% in peso di agar al terreno liquido. Tutti i terreni sono stati sterilizzati mediante autoclave.

Test di diffusione in agar (disk diffusion test)

Il preinoculo è stato preparato trasferendo una singola colonia dalla coltura in terreno solido (piastra Petri) in 5 mL dell'opportuno terreno liquido, LB o TGY. Il preinoculo contenente il ceppo TOP10 di *E. coli* è stato lasciato in incubazione in agitazione per 15 h a 37 °C, mentre quello contenente *D. radiodurans* è stato lasciato in incubazione in agitazione per 24 h a 30 °C. Al termine dell'incubazione sono stati prelevati 100 µL di preinoculo e distribuiti uniformemente mediante ansa sulle piastre di terreno solido. Successivamente sono stati posizionati sulla superficie del terreno solido dei dischi di carta da filtro impregnati di ampicillina (100 µg/mL), [RuBpy₂Ptz(N2-Me)][PF₆]₂, *fac/mer*-[Ru(Ptz(N2-tBu)₃][PF₆]₂, *fac*-[Ru(Qtz(N2-Me)₃][PF₆]₂, *mer*-[Ru(Qtz(N2-Me)₃][PF₆]₂ e [RuTpy(2,6-Pbtz(N2-tBu))][PF₆]₂ a concentrazione 20 µM e DMSO per 24 h.

Curve di crescita

L'inoculo di *D. radiodurans* è stato preparato come riportato in precedenza. Per le prove di crescita, effettuate singolarmente su ogni complesso, la precoltura così ottenuta è stata diluita in una provetta falcon fino a densità ottica pari a 0.05 a 600 nm (OD_{600nm}) in 5 mL di terreno TGY fresco, a cui sono stati aggiunti [RuTpy(2,6-Pbtz(N2-tBu))][PF₆]₂, *fac/mer*-[Ru(Ptz(N2-tBu)₃][PF₆]₂, *fac*-[Ru(Qtz(N2-Me)₃][PF₆]₂, *mer*-[Ru(Qtz(N2-Me)₃][PF₆]₂ 20 µM. La crescita batterica a 30 °C è stata monitorata osservando la variazione di densità ottica ad opportuni intervalli di tempo utilizzando uno spettrofotometro (GeneQuant, Amersham Pharmacia).

Abbreviazioni Utilizzate

EtOH: etanolo

Et₂O: etere etilico

EtOAc: etile acetato

DMSO: dimetilsolfossido

DCM: diclorometano

ACN: acetonitrile

Hex: esano

DMF: dimetilformammide

Et₃N: trietilammina

Bpy: 2,2'-bipiridina

Tpy: terpiridina

PTz: 2-(1H-tetrazol-5-il)-piridina

PTz-(N_n-CH₃): 2-(N_n-metil-tetrazol-5-il)-piridina

PTz-(N₂-tBu): 2-(N₂-tertbutil-tetrazol-5-il)-piridina

QTz: 2-(1H-tetrazol-5-il)-chinolina

QTz-(N_n-CH₃): 2-(N_n-metil-tetrazol-5-il)-chinolina

PTz-(N₂-tBu): 2-(N₂-tertbutil-tetrazol-5-il)-chinolina

2,6-BTP: 2,6-bis-(1H-tetrazol-5-il)-piridina

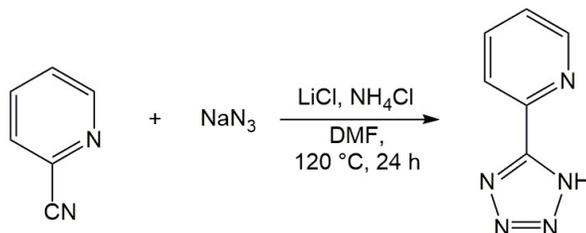
2,6-BTP-(N₂-tBu): 2,6-bis-(N₂-tertbutil-tetrazol-5-il)-piridina

fac: stereoisomero facciale

mer: stereoisomero meridiano

Sintesi dei leganti

PTz-H

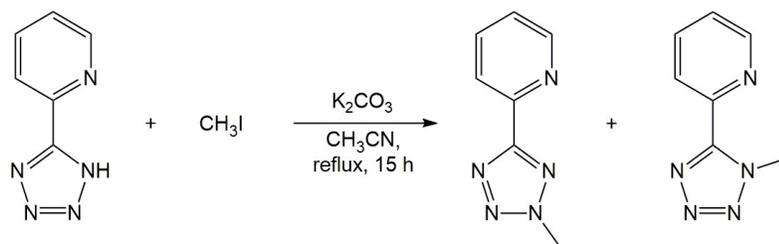


In un pallone a due colli da 100 mL vengono disciolti 1.0 g (9.61 mmol) di 2-cianopiridina, 0.7 g (10.58 mmol) di NaN_3 , 0.8 g (19.22 mmol) di LiCl e 0.6 g (10.58 mmol) di NH_4Cl in 30 mL di DMF. La reazione prosegue per 24 h a $120\text{ }^\circ\text{C}$ sotto agitazione magnetica. Al termine, dopo aver evaporato il solvente sottovuoto, il grezzo di reazione viene ripreso nella minima quantità di H_2O e, aggiungendo goccia a goccia una soluzione $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ 3:1, si osserva la precipitazione del legante tetrazolico. Il prodotto ottenuto sottoforma di solido beige viene recuperato tramite filtrazione.

Y = 87%; 1.23 g (PM = 147 g/mol; 8.36 mmol).

$^1\text{H-NMR}$, 400 MHz, $\text{DMSO-}d^6$ δ (ppm): 8.80 (m, 1H), 8.23 (m, 1H), 8.09 (m, 1H), 7.64 (s, 1H).

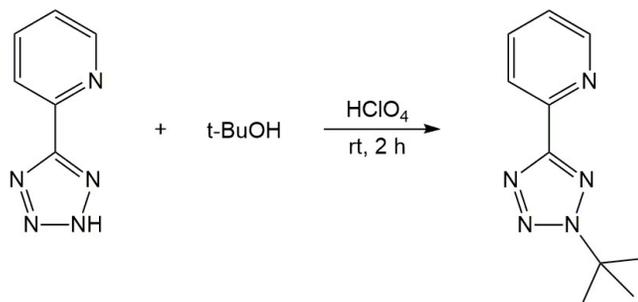
PTz-(N1-Me), PTz-(N2-Me)



In un pallone a due colli da 50 mL vengono disciolti 0.5 g (3.4 mmol) di PTz-H e 1.8 g (13.6 mmol) di K₂CO₃ in 20 mL di CH₃CN e infine aggiunti 0.423 mL (6.8 mmol) di CH₃I. La reazione prosegue per 15 h alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Al termine l'eccesso di K₂CO₃ viene rimosso per filtrazione su filtro di carta, si procede quindi rimuovendo il solvente sottovuoto e riprendendo il grezzo di reazione nella minima quantità di DCM; la frazione solubile è poi purificata su colonna cromatografica di SiO₂ eluendo con una miscela toluene/acetone 9:1. La prima frazione è stata identificata come PTz-(N₁-CH₃), (Y = 25%, PM = 161.06 g/mol, 0.84 mmol) e la seconda come PTz-(N₂-CH₃), (Y = 20%, 0.69 mmol).

PTz-(N2-Me): ¹H-NMR, 400 MHz, CDCl₃ δ (ppm): 8.79 (m, 1H), 8.26 (d, 1H, J_{H-H} = 7.83 Hz), 7.89 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 4.46 (s, 3H). ¹³C-NMR, 100 MHz, CDCl₃ δ (ppm): 164.93 (C_t), 150.21, 146.82 (C_{ipso}), 137.22, 124.87, 122.35, 39.68 .

PTz-(N2-tBu)

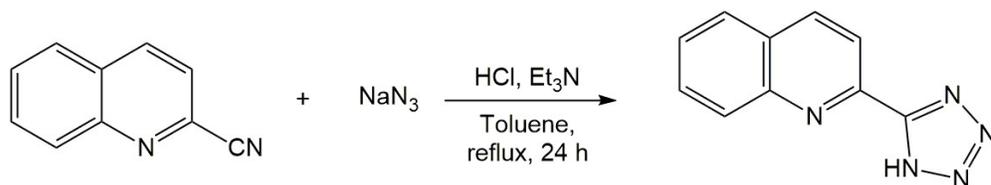


In un pallone a due colli da 10 mL si pongono 0.482 g (3.3 mmol) di PTz-H e 5 mL di HClO₄, dopodichè si aggiungono goccia a goccia 0.320 mL (3.3 mmol) di tertbutanolo. La reazione prosegue per 2 h a temperatura ambiente, sotto agitazione magnetica. Al termine il prodotto desiderato è stato ottenuto modificando una procedura riportata in letteratura.^[33] Il prodotto è stato estratto dalla miscela di reazione con CHCl₃, la fase organica anidrificata con MgSO₄ e una volta rimosso il solvente sottovuoto si è ottenuto un olio giallo. Infine tramite ricristallizzazione da etere etilico il legante terbutilato è stato isolato sottoforma di solido bianco.

Y = 77%; 0.514 g (PM = 203.104 g/mol, 2.53 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, CDCl₃ δ (ppm): 8.80 (d, 1H, J_{H-H} = 4.18 Hz), 8.27 (d, 1H, J_{H-H} = 7.83 Hz), 7.86 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 1.83 (s, 9H).

QTz-H

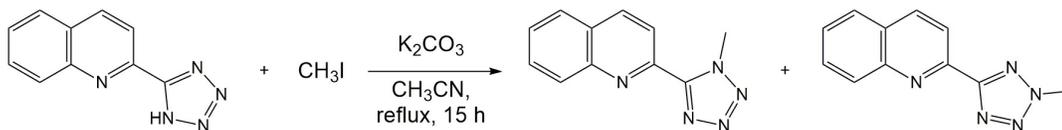


In una pallone a due colli da 100 ml vengono aggiunti 2.6 mL (30 mmol) di HCl 37% V/V e 4.2 mL (30 mmol) di Et₃N a 30 mL di toluene raffreddato a 0°C. Si osserva così la precipitazione di trietilammonio cloruro e dopo aver riportato la miscela a temperatura ambiente si aggiungono 0.550 g (3.89 mmol) di chinolina-2-carbonitrile e 1.14 g (17.5 mmol) di NaN₃. La reazione prosegue per 24 h alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Al termine, dopo aver evaporato il solvente sottovuoto, il grezzo di reazione viene ripreso nella minima quantità di H₂O e, aggiungendo goccia a goccia una soluzione H₂O/HCl 3:1, si osserva la precipitazione del legante tetrazolico. Il prodotto ottenuto sottoforma di solido giallo pallido viene recuperato tramite filtrazione.

Y = 96% (PM = 197 g/mol, 0.734 g, 3.72 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, DMSO-*d*⁶ δ (ppm): 8.67 (d, 1H, J_{H-H} = 8.49 Hz), 8.33 (d, 1H, J_{H-H} = 8.51 Hz), 8.33 (d, 1H, J_{H-H} = 8.5 Hz), 8.19 (d, 1H, J_{H-H} = 8.03 Hz), 8.13 (d, 1H, J_{H-H} = 7.48 Hz), 7.91 (m, 1H), 7.75 (m, 1H).

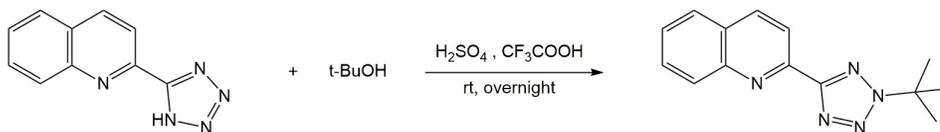
QTz-(N1-Me), QTz-(N2-Me)



In un pallone a due colli da 100 mL vengono disciolti 0.400 g (2.03 mmol) di QTz-H e 1.12 g (8.12 mmol) di K_2CO_3 in 20 mL di CH_3CN ed aggiunti 0.423 mL (6.8 mmol) di CH_3I . La reazione prosegue per 15 h alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Al termine l'eccesso di K_2CO_3 viene rimosso per filtrazione su filtro di carta, si procede quindi rimuovendo il solvente sottovuoto e riprendendo il grezzo di reazione nella minima quantità di DCM; la frazione solubile è poi purificata su colonna cromatografica di SiO_2 eluendo con una miscela EtOAc/Hex 6:4. La prima frazione è stata identificata come QTz-(N₁-CH₃), (Y = 47%, PM = 210.07 g/mol, 0.95 mmol) e la seconda come QTz-(N₂-CH₃), (Y = 39%, 0.79 mmol).

QTz-(N2-Me): **¹H-NMR**, 400 MHz, CDCl_3 δ (ppm): 8.22 (m, 1H), 7.74 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8.15$ Hz), 7.67 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 4.39 (s, 3H). **¹³C-NMR**, 100 MHz, CDCl_3 δ (ppm): 164.98 (C₁), 148.01, 146.49, 137.25, 130.01, 129.93, 128.32, 127.54, 127.42, 119.54, 39.71 (CH₃).

QTz-(N2-tBu)

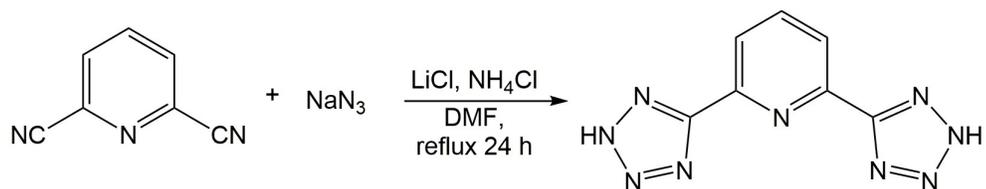


In un pallone a due colli da 50 mL vengono disciolti 0.300 g (1.53 mmol) di QTz-H in 25 mL di tertbutanolo, si aggiungono poi 3 mL di CF₃COOH 99% e 3 mL di H₂SO₄ 98%. La reazione prosegue overnight a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Al termine la miscela di reazione viene trasferita in un becher contenente acqua e ghiaccio e si procede basificando la soluzione fino a pH 12 per aggiunta di una soluzione di NaOH 1 M. Il prodotto è stato estratto dalla miscela di reazione con CHCl₃, la fase organica anidrificata con MgSO₄ e una volta rimosso il solvente sottovuoto si è ottenuto un olio giallo. Infine tramite ricristallizzazione da etere etilico il legante terbutilato è stato isolato sottoforma di solido giallo pallido.

Y = 83% (PM = 252 g/mol, 0.320 g, 1.27 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, CDCl₃ δ (ppm): 8.38 – 8.30 (m, 3H), 7.87 (m, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.60 (m, 1H), 1.87 (s, 9H).

2,6-BTP-H₂

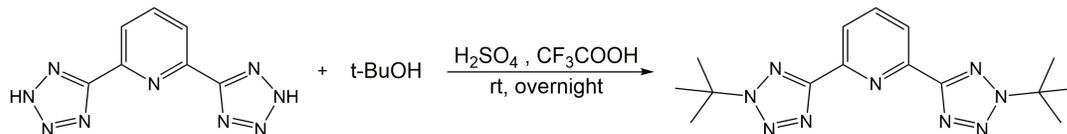


In un pallone a due colli da 100 mL vengono disciolti 0.500 g (3.9 mmol) di 2,6-dicianopiridina, 0.700 g (10.8 mmol) di NaN₃, 0.500 g (11.8 mmol) di LiCl e 0.570 g (10.75 mmol) di NH₄Cl in 30 mL di DMF. La reazione prosegue per 24 h a 120 °C sotto agitazione magnetica. Al termine, dopo aver rimosso il solvente sottovuoto, il grezzo viene ripreso nella minima quantità di H₂O e aggiungendo goccia a goccia una soluzione H₂O/HCl 3:1 si osserva la precipitazione del legante tetrazolico. Il prodotto ottenuto sottoforma di solido beige viene recuperato mediante filtrazione.

Y = 84%, 0.709 g (PM = 214 g/mol; 3.31 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, DMSO-*d*⁶ δ (ppm): 8.23 (m, 2H), 8.14 (m, 1H).

2,6-BTP-(N2-tBu)



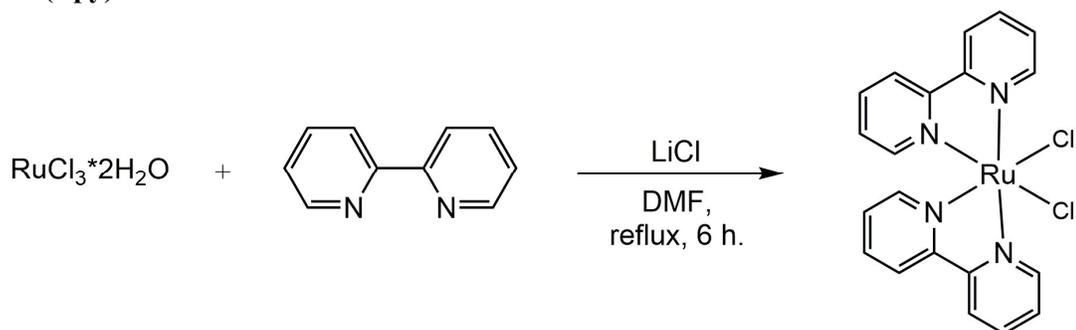
In un pallone a due colli da 50 mL vengono disciolti 0.370 g (1.7 mmol) di 2,6-BTP- H_2 in 25 mL di tertbutanolo, si aggiungono poi 3 mL di CF_3COOH 99% e 3 mL di H_2SO_4 98%. La reazione prosegue over night a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Al termine la miscela di reazione viene trasferita in un becher contenente acqua e ghiaccio e si procede basificando la soluzione fino a pH 12 per aggiunta di una soluzione di NaOH 1 M. Il prodotto è stato estratto dalla miscela di reazione con CHCl_3 , la fase organica anidrificata con MgSO_4 e una volta rimosso il solvente sottovuoto si è ottenuto un olio giallo. Infine tramite ricristallizzazione da etere etilico il legante terbutilato è stato isolato sottoforma di solido giallo pallido.

Y = 46% (PM = 327 g/mol, 0.256 g, 0.782 mmol).

$^1\text{H-NMR}$, 400 MHz, CDCl_3 δ (ppm): 8.33 (d, 2H, $J_{\text{H-H}} = 8.00$ Hz), 8.03 (m, 2H), 1.84 (s, 18H).

Sintesi dei precursori di Ru(II)

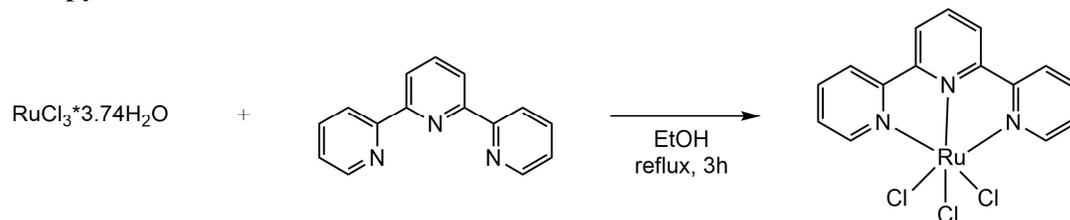
Ru(Bpy)₂Cl₂



In un pallone a due colli da 100 mL vengono disciolti 0.500 g (2.22 mmol) di $\text{RuCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.694 g (4.44 mmol) di Bpy, 0.621 g (14.64 mmol) di LiCl e 0.570 g (10.75 mmol) in 20 mL di DMF. La reazione prosegue per 6 h a 120 °C sotto agitazione magnetica. Al termine si aggiungono circa 150 mL di acetone e si pone il pallone in frigorifero per una notte al fine di indurre la precipitazione del precursore metallico. Il prodotto desiderato è stato ottenuto sottoforma di solido nero tramite filtrazione seguita da lavaggi con H_2O ed Et_2O .

Y = 49 % (PM = 484.98 g/mol, 0.528 g, 1.09 mmol). Y = 46% (PM = 484.35 g/mol, 0.256 g, 0.782 mmol).

RuTpyCl₃

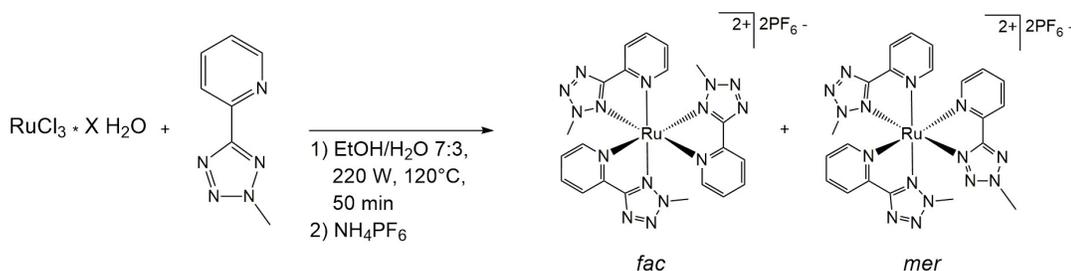


In un pallone a due colli da 250 mL vengono disciolti 0.305 g (1.11 mmol) di $\text{RuCl}_3 \cdot 3.74\text{H}_2\text{O}$ e 0.233 g (1 mmol) di terpiridina in 125 mL di EtOH. La reazione prosegue per 3 h alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Al termine il prodotto desiderato, insolubile nell'ambiente di reazione, è stato recuperato sottoforma di solido bruno tramite filtrazione seguita da lavaggi con EtOH ed Et₂O.

Y = 63 % (PM = 440.7 g/mol, 0.308 g, 0.700 mmol).

Sintesi dei complessi di Ru(II)

fac/mer - [Ru(PTz-N2-Me)₃][PF₆]₂



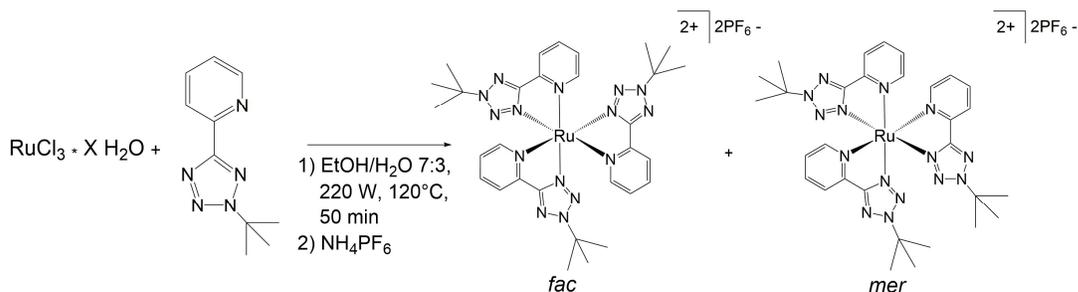
In un tubo di teflon per reattore a microonde vengono disciolti 0.0500 g (0.199 mmol) di RuCl₃·2.48H₂O e 0.096 g (0.600 mmol) di, PTz-N2-Me in 15 mL di una miscela 7:3 EtOH/H₂O. La reazione prosegue irradiando a 220 W per 50 minuti a 120°C sotto agitazione magnetica. Al termine si trasferisce il grezzo di reazione in un pallone e lo si pone in un dewar contenente ghiaccio, a seguito dell'aggiunta di NH₄PF₆ si osserva la precipitazione delle specie di Ru(II). Il prodotto viene quindi risolubilizzato in CHCl₃, procedendo con un'estrazione con H₂O al fine di rimuovere l'eccesso di NH₄PF₆. La fase organica viene anidrificata con MgSO₄ ed il solvente allontanato sottovuoto. Infine si scioglie il prodotto nella minima quantità di acetone e a seguito dell'aggiunta di Et₂O si osserva la precipitazione di un solido giallo ocra.

Y = 39 % (PM = 874.16 g/mol, 0.0680 g, 0.0778 mmol).

fac: ¹H-NMR, 400 MHz, CD₃CN δ (ppm): 8.42 (m, 3H), 8.19 (m, 3H), 7.92 (m, 3H), 7.57 (m, 3H), 4.42 (s, 9H). ¹³C-NMR, 100 MHz, CD₃CN δ (ppm): 166.36 (C_t), 154.90, 147.40, 140.52, 129.84, 125.28, 42.97 (CH₃). ESI-MS (*m/z*): [M/2]⁺ = 292 [M]⁻ = 145 (PF₆⁻).

mer: ¹H-NMR, 400 MHz, CD₃CN δ (ppm): 8.45 (m, 1H), 8.38 (m, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 8.15 – 8.08 (m, 2H), 7.98 (m, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.50 (m, 3H), 4.45 (s, 3H), 4.44 (s, 3H), 4.41 (s, 3H). ¹³C-NMR, 100 MHz, CD₃CN δ (ppm): 166.55 (C_t), 166.46 (C_t), 166.38 (C_t), 155.37, 155.26, 147.58, 147.56, 147.35, 140.40, 140.37, 140.30, 129.69, 129.1), 128.96, 125.56 (s), 124.94, 124.74, 42.99 (CH₃), 42.92 (CH₃), 42.91 (CH₃). ESI-MS (*m/z*): [M/2]⁺ = 292 [M]⁻ = 145 (PF₆⁻).

fac/mer - [Ru(PTz-N2-tBu)₃][PF₆]₂



In un tubo di teflon per reattore a microonde vengono disciolti 0.0800 g (0.355 mmol) di RuCl₃·2H₂O e 0.252 g (1.24 mmol) di PTz-N2-tBu in 15 mL di una miscela 7:3 EtOH/H₂O. La reazione prosegue irradiando a 220 W per 50 minuti a 120°C sotto agitazione magnetica. Seguendo la procedura riportata in precedenza si ottiene il prodotto desiderato sottoforma di solido arancione.

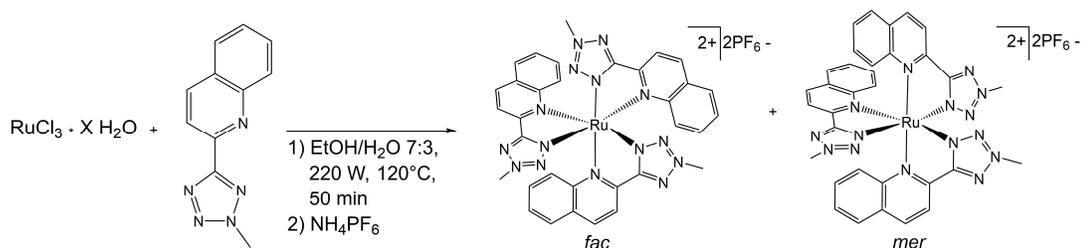
Y = 26 % (PM = 1000.31 g/mol, 0.0937 g, 0.0937 mmol).

La separazione degli stereoisomeri *fac* e *mer* della specie di Ru (II) è stata effettuata tramite colonna cromatografica di Al₂O₃ eluendo con una miscela DCM/ACN 1:1.

fac: ¹H-NMR, 400 MHz, CD₃CN δ (ppm): 8.49 (d, 1H, J_{H-H} = 7.9 Hz), 8.33 – 8.26 (m, 1H), 8.09 (d, 1H, J_{H-H} = 5.4 Hz), 7.70 (m, 1H), 1.81 (s, 27H, tBu). ¹³C-NMR, 100 MHz, (CD₃)₂O δ (ppm): 166.45 (C_t), 155.11, 148.06, 140.68, 130.10, 125.43, 69.50, 29.26 (CH₃). ESI-MS (m/z): [M/2]⁺ = 355 [M]⁻ = 145 (PF₆⁻).

mer: ¹H-NMR, 400 MHz, CD₃CN δ (ppm): 8.41 (m, 1H), 8.37 (m, 1H), 8.33 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 8.13 (m, 2H), 7.96 (m, 1H), 7.91–7.87 (m, 1H), 7.87 – 7.81 (m, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.57 – 7.46 (m, 2H), 1.75 (s, 9H), 1.73 (s, 9H), 1.71 (s, 9H). ESI-MS (m/z): [M/2]⁺ = 355 [M]⁻ = 145 (PF₆⁻).

fac/mer - [Ru(QTz-N2-Me)₃][PF₆]₂



In un tubo di teflon per reattore a microonde vengono disciolti 0.0800 g (0.199 mmol) di RuCl₃·3.74H₂O e 0.0960 g (0.600 mmol) di, QTz-N2-Me in 15 mL di una miscela 7:3 EtOH/H₂O. La reazione prosegue irradiando a 220 W per 50 minuti a 120°C sotto agitazione magnetica. Seguenda la procedura riportata in precedenza si ottiene il prodotto desiderato sottoforma di solido arancione.

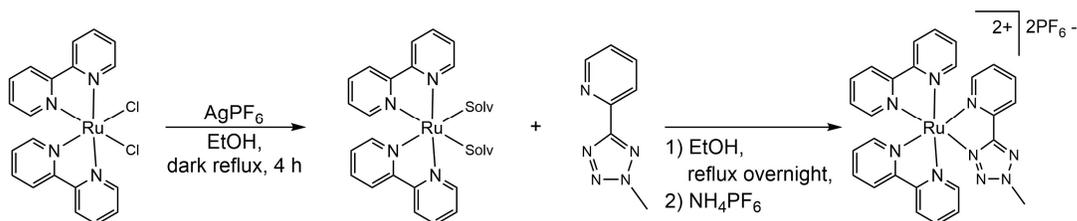
Y = 49 % (PM = 1024.21 g/mol, 0.0923 g, 0.0895 mmol).

La separazione degli stereoisomeri *fac* e *mer* della specie di Ru (II) è stata effettuata tramite colonna cromatografica di Al₂O₃ eluendo con una miscela ACN/DCM 1:1.

fac: **¹H-NMR**, 400 MHz, (CD₃)₂CO δ (ppm): 9.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H), 8.69 (d, 3H, *J*_{H-H} = 8.4 Hz), 8.34 (m, 3H), 8.10 (d, 3H, *J*_{H-H} = 8.9 Hz), 7.76 (m, 3H), 7.28–7.23 (m, 3H), 4.52 (s, 9H, CH₃). **¹³C-NMR**, 100 MHz, (CD₃)₂O δ (ppm): 168.01 (C_t), 150.94, 148.90, 143.24, 134.01, 131.46, 131.42, 130.76, 130.76, 127.26, 120.82, 43.14 (CH₃). **ESI-MS** (*m/z*): [M/2]⁺ = 367 [M]⁻ = 145 (PF₆⁻).

mer: **¹H-NMR**, 400 MHz, CD₃CN δ (ppm): 8.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.63 (m, 2H), 8.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.16 – 8.07 (m, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 – 7.57 (m, 2H), 7.50 (m, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.05 (m, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.48 (s, 3H), 4.44 (s, 3H), 4.40 (s, 3H). **ESI-MS** (*m/z*): [M/2]⁺ = 367 [M]⁻ = 145 (PF₆⁻).

[RuBpy₂(PTz-N2-Me)][PF₆]₂

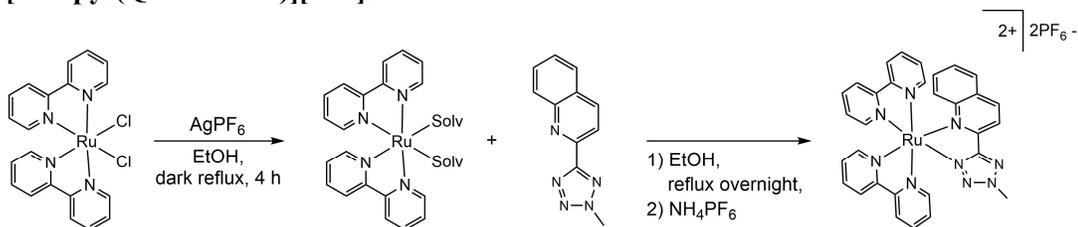


In un pallone a due colli da 50 mL vengono disciolti 0.146 g (0.360 mmol) di RuBpy₂Cl₂ e 0.200 g di AgPF₆ in 15 mL di EtOH. La reazione prosegue al riparo dalla luce per 4 h, alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Al termine il grezzo di reazione viene filtrato tramite un plug di celite e trasferito in un secondo pallone al quale si aggiungono 0.0580 g (0.360 mmol) di PTz-N2-Me. La reazione prosegue over night alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Terminata la reazione si pone il pallone in un dewar contenente ghiaccio e a seguito dell'aggiunta di NH₄PF₆ si osserva la precipitazione di un solido. Il prodotto viene risolubilizzato in CHCl₃ ed estratto con H₂O al fine di rimuovere l'eccesso di NH₄PF₆. La fase organica viene anidrificata con MgSO₄, ed il solvente allontanato sottovuoto. Infine si riprende nella minima quantità di acetone e a seguito dell'aggiunta di Et₂O si osserva la precipitazione del prodotto desiderato sottoforma di solido arancio, recuperato tramite filtrazione.

Y = 37 % (PM = 864.42 g/mol, 0.115 g, 0.133 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, CD₃CN δ (ppm): 8.54 (m, 1H), 8.51 (m, 1H), 8.50 – 8.44 (m, 2H), 8.40 (m, 1H), 8.15 – 8.01 (m, 5H), 7.98 (m, 1H), 7.81 (m, 2H), 7.77 (m, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.52 – 7.41 (m, 4H), 7.37 (m, 1H), 4.40 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR, 100 MHz, CD₃CN δ (ppm): 166.07 (C_t), 158.58, 158.35, 157.95, 157.78, 153.67, 153.34, 153.29, 153.13, 153.06, 147.18, 139.81, 139.09, 138.97, 138.96, 138.92, 129.58, 128.74, 128.61, 128.51, 127.89, 125.33, 125.29, 125.20, 124.91, 124.57, 42.82 (CH₃). ESI-MS (m/z): [M/2]⁺ = 287 [M-] = 145 (PF₆⁻).

[RuBpy₂(QTz-N2-Me)][PF₆]₂

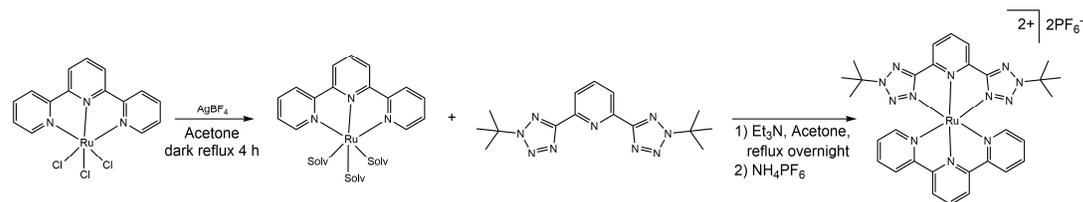


In un pallone a due colli da 50 mL vengono disciolti 0.146 g (0.360 mmol) di RuBpy₂Cl₂ e 0.200 g di AgPF₆ in 15 mL di EtOH. La reazione prosegue al riparo dalla luce per 4 h, alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Al termine il grezzo di reazione viene filtrato tramite un plug di celite e trasferito in un secondo pallone al quale si aggiungono 0.0520 g (0.247 mmol) di QTz-N2-Me. La reazione prosegue overnight alla temperatura di riflusso, sotto agitazione magnetica. Seguendo la procedura riportata in precedenza si ottiene il prodotto desiderato sottoforma di solido arancione.

Y = 64 % (PM = 913.44 g/mol, 0.145 g, 0.159 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, CD₃CN δ (ppm): 8.72 (d, 1H, J_{H-H} = 8.1 Hz), 8.56 – 8.46 (m, 3H), 8.42 (d, 1H, J_{H-H} = 8.0 Hz), 8.17 – 8.03 (m, 5H), 8.03 – 7.97 (m, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.64 m, 1H), 7.56 – 7.51 (m, 1H), 7.41 – 7.32 (m, 3H), 7.24 – 7.20 (m, 1H), 4.44 (s, 3H, CH₃). **¹³C-NMR**, 100 MHz, CD₃CN δ (ppm): 166.34 (C_t), 158.18, 157.44, 157.09, 156.98, 153.93, 152.64, 151.74, 150.06, 147.93, 140.96, 138.37, 138.30, 138.29, 138.01, 132.50, 130.31, 130.00, 129.39, 128.00, 127.78, 127.50, 127.20, 124.93, 124.64, 124.24, 124.15, 123.82, 119.68, 42.05 (CH₃). **ESI-MS** (*m/z*): [M/2]⁺ = 312 [M-] = 145 (PF₆⁻).

[RuTpy-2,6-BTP(N2-tBu)][PF₆]₂



In un pallone a due colli da 50 mL vengono disciolti 0.146 g (0.360 mmol) di RuBpy₂Cl₂ e 0.200 g di AgPF₆ in 15 mL di EtOH. La reazione prosegue al riparo dalla luce per 4 h, alla temperatura di riflusso sotto agitazione magnetica. Al termine il grezzo di reazione viene filtrato tramite un plug di celite e trasferito in un secondo pallone al quale si aggiungono 0.0566 g (0.173 mmol) di 2,6-BTP-(N2-tBu). La reazione prosegue overnight alla temperatura di riflusso, sotto agitazione magnetica. Seguendo la procedura riportata in precedenza si ottiene il prodotto desiderato sottoforma di solido arancione.

Y = 86 % (PM = 952.15 g/mol, 0.130 g, 0.136 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, (CD₃)₂CO δ (ppm): 9.02 (d, 2H, J_{H-H} = 8.1 Hz), 8.98 (d, 2H, J_{H-H} = 8.0 Hz), 8.81 – 8.72 (m, 3H), 8.63 (m, 1H), 8.18 – 8.06 (m, 2H), 7.73 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 1.56 (s, 18H, tBu). **¹³C-NMR**, 100 MHz, (CD₃)₂O δ (ppm): 166.98 (C_i), 159.10, 157.77, 154.94, 147.96, 139.77, 139.69, 138.51, 128.74, 125.78, 125.25, 124.32, 69.47 (CH₃), 28.94. **ESI-MS** (*m/z*): [M⁺] = 331 [M⁻] = 145 (PF₆⁻).

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Inagaki, S. Yatsuda, S. Edure, A. Suzuki, T. Takahashi, M. Akita; *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 2432.
- [2] P. J. Sauvage, J. P. Collin, J. C. Chambron, S. Guillerez, C. Coudret, V. Balzani, F. Barigelletti, L. de Cola, L. Flamigni; *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 993.
- [3] Y. Qin, Q. Peng; *Int. J. of Photoenergy*, **2012**, *vol. 2012*, Article ID 291579.
- [4] M. R. Gill, S. N. Harun, S. Halder, R. A. Boghozian, K. Ramadan, H. Ahmad, K. A. Vallis; *Nature Sci. Rep.*, **2016**, *6*, Article ID 31973.
- [5] V. Balzani, A. Juris, M. Venturi, S. Campagna, S. Serroni; *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 993.
- [6] F. Li, Y. Mulanya, M. Feterl, J. M. Warner, J. G. Collins, F. R. Keene; *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 5032-5038.
- [7] W. M. Motswainyana, P. A. Ajibade; *Advances in Chemistry*, **2015**, *vol. 2015*, Article ID 859730.
- [8] A. Frei, R. Rubbiani, S. Tubfard, O. Blacque, P. Anstaett, A. Felgenträger, T. Maisch, L. Spiccia, G. Gasser; *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 7280-7292.
- [9] A. Palazzi, S. Stagni, S. Bordoni, M. Monari, S. Selva; *Organometallics*, **2002**, *21*, 3774 – 3781.
- [10] a) S. Stagni, A. Palazzi, S. Zacchini, B. Ballarin, C. Bruno, M. Marcaccio, F. Paolucci, M. Carano, M. Monari, A. J. Bard; *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 695-709. b) S. Stagni, E. Orselli, A. Palazzi, L. De Cola, S. Zacchini, C. Femoni, M. Marcaccio, F. Paolucci, S. Zanarini; *Inorg. Chem.*, **2007**, *46* (22), 9126-9138.
- [11] A. E. Friedman, J. C. Chambron, J. P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112* (12), 4960–4962.
- [12] M. C. McManus; *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **1997**, *54*, 1420.
- [13] J. D. F. Hale, R. E. W. Hancock; *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, **2007**, *5*, 951.
- [14] G. Cheng, H. Hao, M. Dai, Z. Liu, Z. Yuan; *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *66*, 555.
- [15] S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi; *EMBO J.*, **1998**, *17*, 6437.
- [16] W. M. M. Kirby; *Science*, **1944**, *99*, 452-453.
- [17] A. P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Galagas, C. G. Giske, S. Habarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, D. L. Monnet; *Clin. Microbiol. Infect.*, **2012**, *18*, 268-281.

- [18] J. M. A. Bair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, L. J. V. Piddock; *Nature Rev. Microbiology*, **2015**, *13*, 42-51.
- [19] K. J. Waldron, N. J. Robinson; *Nature Reviews Microbiology*, **2009**, *7*, 25-35.
- [20] a) J. J. Harrison, H. Ceri, C. Stremick, R. J. Turner; *Environ. Microbiol.*, **2004**, *6*, 1220-1227; b) D. H. Nies; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, *51*, 730-750.
- [21] L. Macomber, J.A. Imlay; *Proc. Natl Acad. Sci. Usa*, **2009**, *106*, 8344-8349.
- [22] a) H. Nishioka; *Mutat. Res.*, **1975**, *31*, 185-189. b) M. Green, W. J. Muriel, B. A. Bridges; *Mutat. Res*, **1976**, *38*, 33-42. c) P. K. Wong; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1988**, 597-603.
- [23] J. A. Imlay; *Rev. Microbiol.*, **2003**, *57*, 395-418.
- [24] Y. Pereira, G. Lagniel, E. Godat, P. Baudouin-Cornu, C. Junot, J. Labarre; *Toxicol Sci.*, **2008**, *106*, 400-412.
- [25] a) Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim; *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, *50*, 662-668. b) E. S. Yaganza, D. Rioux, M. Simard, J. Arul, R. J. Tweddell; *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *70*, 6800-6808.
- [26] L. Lu, L.-J. Liu, W.-C. Chao, H.-J. Zhong, M. Wang, X.-P. Chen, J.-J. Lu, R.-N Li, D.-L. Ma and C.-H. Leung; *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 14544.
- [27] V. Fiorini, I. Zanoni, S. Zacchini, A. L. Costa, A. Hochkoeppler, V. Zanotti, A. Ranieri, M. Massi, A. Stefan, S. Stagni; *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, 12328-12338.
- [28] S. V. Kumar, S. Ø. Scottwell, E. Waugh, C. J. McAdam, L. R. Hanton, H. J. L. Brooks, J. D. Crowley; *Inorg. Chem.*, **2016**, *55* (19), 9767-9777.
- [29] W. G. Finnegan, R. A. Henry, R. Lofquist; *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 3908.
- [30] K. Koguro, T. Oga, S. Mitsui, R. Orita; *Synthesis* **1998**, 910-914.
- [31] R. A. Henry; *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 4470.
- [32] A. H. Downard, P. J. Steel, J. Steenwijk; *Aust. J. Chem.*, **1995**, *48*, 1625-1642.
- [33] A. P. Mosalkova, S. V. Voitekhovich, A. S. Lyakhov, L. S. Ivashkevich, J. Lach, B. Kersting, P. N. Gaponik, O. A. Ivashkevich; *Dalton Trans.*, **2013**, *42*, 2985-2997.
- [34] a) M. V. Werrett, G. S. Huff, S. Muzzioli, V. Fiorini, S. Zacchini, B. W. Skelton, A. Maggiore, J. M. Malicka, M. Cocchi, K. C. Gordon, S. Stagni, M. Massi; *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 8379. b) M. W. Werrett, S. Muzzioli, P. J. Wright, A. Palazzi, P. Raiteri, S. Zacchini, M. Massi, S. Stagni; *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 229.
- [35] B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T. J. Meyer; *Inorganic Chemistry*, **1978**, *12*, 3335
- [36] B. P. Sullivan, J. M. Calvert, T. J. Meyer; *Inorganic Chemistry*, **1980**, *5*, 1405.

- [37] J. P. Byrne, J. A. Kitchen, O. Kotova, V. Leigh, A. P. Bell, J. J. Boland, M. Albrecht, T. Gunnlaugsson; *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 196–209.
- [38] J. T. Fletcher, B. J. Bumgarner, N. D. Engels, D. A. Skoglund; *Organometallics*, **2008**, 27, 5430-5433.