

---

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

# Studio della flussionalità del complesso $(k^1-O)(k^2-O,O)[Ru(CO)(PPh_3)_2THA_2]$ . Confronto con nuove specie (N,O) coordinate

Tesi di laurea sperimentale

### **CANDIDATO**

Pietro Di Mucci

### **RELATORE**

Chiar.mo Prof. Silvia Bordoni

### **CORRELATORI**

Dott. Gabriele Micheletti

Dott. Stefano Cerini

---

**Anno Accademico 2017-2018**

---



## INDICE

Abstract	1
Abstract (English)	2
<b>INTRODUZIONE</b>	3
La scelta del Rutenio	3
Il complesso [(Ph <sub>3</sub> P) <sub>3</sub> Ru(CO)(H) <sub>2</sub> ] [1]	6
Reattività del complesso [(Ph <sub>3</sub> P) <sub>3</sub> Ru(CO)(H) <sub>2</sub>	7
Sorgente energetica a MW	9
La teoria della densità del funzionale (DFT)	10
Acido ( <i>R</i> )-9-idrossistearico	11
Coordinazione (N,O)	12
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	14
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	15
Reazione con THAc (k <sub>1</sub> ,k <sub>2</sub> )	15
DFT calcoli teorici	20
Analisi al <sup>13</sup> C-NMR	21
Caratterizzazione (k <sup>2</sup> -O,O)[Ru(CO)Pyz.(PPh <sub>3</sub> )THA]	22
Caratterizzazione (k <sup>1</sup> -O)[Ru(CO)Pyz.(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> HSA]	23
<b>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	26
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	27
Premessa	27
Sintesi del complesso [Ru(CO)(H) <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] [1]	28
Sintesi di (k-N,O)[Ru(CO)H(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Py-2-COO)]	29

Sintesi di (k-N,O)[Ru(CO)H(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Pyr-2-COO)] [2]	30
Sintesi di (k-N,O)[Ru(CO)H(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Pyr-2-COO)]	31
Sintesi (k <sup>2</sup> -O)[Ru(CO)H(PPh <sub>2</sub> )THA]	32
Sintesi (k <sup>2</sup> -O)[Ru(CO)Pyr.(PPh <sub>3</sub> )THAc] [2a]	33
Sintesi (k <sub>1</sub> -O)[Ru(CO)Pyr.(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> HSA][2b]	34
Sintesi (k <sup>1</sup> -O)(k <sup>2</sup> -O,O)[Ru(CO)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> THA <sub>2</sub> ]	35
Sintesi (k <sup>2</sup> N,O)[Ru(CO)(H)Immin.(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	36
Sintesi Acido-9R-Idrossistearico	36
Sintesi Acetofenonidene-2-Idrossianilina	38
<b>ALLEGATI</b>	40
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	53
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	55

## ABSTRACT:

Negli ultimi anni i complessi di Rutenio hanno dimostrato di essere validi alternativi ai complessi di Platino per quanto riguarda l'attività antitumorale. In questo lavoro verrà descritto il complesso  $(k^1-O)(k^2-O,O)[Ru(CO)(PPh_3)_2THA_2]$  mostrando due caratteristiche che lo contraddistinguono: la prima rappresenta la sua flussionalità in cui avviene la rapida interconversione della "gamba" del legante organico in cui una si apre, l'altra chela, ad una velocità più elevata della scala dei tempi NMR (effetto "merry go round"); la seconda rappresenta il riarrangiamento isomerico che avviene attraverso la perdita della fosfina e la conseguente formazione di un solvato-complesso. Questo processo avviene passando per uno stato di transizione pentacoordinato (bipiramidale trigonale o piramide a base quadrata) con un meccanismo di pseudorotazione di Berry, valutato attraverso NMR( $^1H, ^{31}P$ ) dove si verifica il distacco di  $PPh_3$  dopo circa cinque giorni in soluzione di  $CDCl_3$  e la concomitante formazione di due isomeri *cis* come osservato all'NMR: indice di flussionalità della molecola. Il riarrangiamento isomerico viene confermato anche dalla minima energia relativa DFT, calcolate nel vuoto. I raggi X inoltre dell'isomero *cis-fac(1)* evidenzia come allo stato solido intervengano oltre che a legami a H- del tipo Watson-Creek  $C(O) \cdots HN$  tra gli anelli timinici intramolecolari, anche interazioni intermolecolari ( $\pi$ -stacking). Infine viene valutata l'efficienza di reazione dei complessi di Rutenio con la coordinazione (N,O) derivanti da leganti organici quali piridin-carbossile e 2-((1-phenyletilidene)immino)fenolo).

**ABSTRACT** (English):

In the last decade Ruthenium complexes have proved to be valid alternatives to Platinum complexes with regard to antitumor activity. In this work we will describe the complex  $(k^1-O)(k^2-O, O)[Ru(CO)(PPh_3)_2(THA)_2]$  that showing two characteristics that distinguish it: the first represents its fluxionality in which the rapid interconversion by the pin of the organic binder in which one opens, the other claw, at a higher speed of the NMR time scale (" merry go round "effect); the second represents the isomeric rearrangement which occurs through the loss of the phosphine and the consequent formation of a solvent-complex. This process occurs through a pentacoordinate transition state (bipyridal trigonal or square-based pyramid) with a Berry pseudorotation mechanism, evaluated through NMR ( $^1H$ ,  $^{31}P$ ) where the detachment of  $PPh_3$  occurs after about five days in  $CDCl_3$  solution and the concomitant formation of two cis isomers as observed at the NMR: fluxionality index of the molecule. The isomeric rearrangement is also confirmed by the minimum relative energy DFT, calculated in the vacuum. Moreover, the X-ray of the cis-fac isomer (1) shows that in the solid state there are intervening as well as H-bonds of the Watson-Crick C (O) -HN type between the intramolecular thymine rings, also intermolecular interactions ( $\pi$ -stacking ). Finally, the reaction efficiency of Ruthenium complexes with the coordination (N, O) deriving from organic binders such as pyridin-carboxyl and 2 - ((1-phenylethyl) imino) phenol) is evaluated.

## INTRODUZIONE

### La scelta del Rutenio

I complessi di Rutenio in questi ultimi decenni sono tra i più studiati in quanto rappresentano la nuova frontiera di farmaci antitumorali in sostituzione ai vecchi composti a base di Platino. Per mezzo secolo i farmaci a base di platino hanno dominato il campo medico per la cura delle cellule cancerogene. Più precisamente la scoperta avvenne nel 1965 negli Stati Uniti nell'Università del Michigan da parte di Barnett Rodenberg. Il primo composto sintetizzato a tal proposito è stato il cis-diamminodicloroplatino(II).

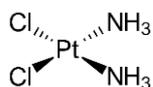


Fig.1 complesso cis-diamminodicloroplatino(II)

Analizzando l'efficacia di questo composto, negli anni a seguire, vennero introdotti nel campo medico altri composti, sempre a base di platino, in cui i leganti erano ossalati o carbossilati. Il meccanismo di questi complessi è conosciuto: il cloruro o il carbossilato viene idrolizzato dalla cellula generando una specie di-acquocoordinata che si lega irreversibilmente al DNA, solitamente con due basi azotate di guanina impedendo alla cellula malata di replicarsi. Tuttavia questi composti non sono risultati particolarmente efficaci contro tutti le tipologie di cancro, sono tossici, hanno effetti collaterali dannosi e generano resistenza dopo un utilizzo prolungato del farmaco. Per superare queste problematiche sono in fase di studio scientifico complessi basati su metalli di transizione, in particolare complessi metallorganici a base di Rutenio, che garantiscono maggiore flessibilità di coordinazione (esa- anziché tetra-) più numeri di coordinazione (III e II) e più possibilità di modulare la sfera dei leganti, aumentando ad esempio le caratteristiche di solubilità o di penetrazione delle cellule neoplastiche.

Essi si sono rivelati fondamentali nelle sperimentazioni cliniche perché risultano molto meno tossici rispetto a quelli di platino, il che può essere attribuito alla capacità del Rutenio di imitare il Ferro (essendone un omologo superiore) legandosi a molecole biologiche come l'albumina del siero umano<sup>[1]</sup>. I primi composti ad essere scoperti, come i Ru-arene,

hanno provocato una crescita costante di interesse come agenti antitumorali considerata la loro stabilità e soprattutto la tendenza a provocare meno effetti collaterali.

Recentemente, vari composti a base di Ru-arene sono stati oggetto di studio approfondito grazie alla loro attività antitumorale, infatti essi potrebbero funzionare come agenti antitumorali interagendo con DNA o enzimi / siti attivi di proteine. Inoltre numerosi studi sono stati rivolti verso complessi cationici per l'elevata solubilità in acqua, che facilita la loro penetrazione all'interno delle cellule cancerogene. Successivamente lo studio è stato rivolto verso prodotti metallorganici clorurati in quanto riescono ad interagire in modo selettivo con le cellule tumorali identificando la differenza che intercorre tra cellule malate e cellule sane<sup>[2]</sup>. Un altro aspetto favorevole di questi complessi è l'intervallo degli stati di ossidazione dell'atomo metallico che può variare a seguito delle condizioni fisiologiche della cellula, data la sua bassa energia di interconversione tra i vari stati di ossidazione. Inoltre il Rutenio(II) essendo un  $d^6$  forma dei complessi ottaedrici permettendo di avere due legami disponibili in più rispetto ai complessi a base di Platino. Il Rutenio ha anche la capacità di formare complessi con leganti caratterizzati da un'alta elettronegatività, quindi la variabilità di complessi studiabili è maggiore rispetto al caso di quelli di cis-platino. Oltre ciò il cis-platino presenta rispetto agli altri cationi metallici una velocità di sostituzione dei leganti molto minore. Secondo recenti studi, il Rutenio si dimostra meno tossico del Platino in quanto il suo stato di ossidazione varia da +3 a +2 in base al tipo di ambiente ossidativo in cui si trova. Poiché le cellule cancerogene si trovano in un ambiente meno ossidativo rispetto alle cellule sane, da ciò deriva il fatto che il Rutenio(II) si lega selettivamente alle cellule malate. Tuttavia questa teoria è ancora in fase di dibattito.<sup>[3]</sup>

Inoltre pochi mesi fa è stato pubblicato un lavoro di un gruppo di ricerca che prova l'attività citotossica di un complesso di Rutenio (N,O) coordinato molto simile a quello da noi studiato<sup>[4]</sup>. Con queste premesse, questo lavoro di tesi, estende lo studio già intrapreso della coordinazione di leganti (N,O) sul complesso di Rutenio  $[(Ph_3P)_3Ru(CO)(H)_2]$  **[1]** ed analizza il comportamento in soluzione del complesso precedentemente sintetizzato  $(k^1-O)(k^2-O,O)[Ru(CO)(PPh_3)_2(THA)_2]$ .

L'attenzione è stata rivolta alla progettazione della sintesi di un nuovo complesso che avesse la capacità di introdurre molecole biocompatibili come le basi nucleotidiche pirimidiniche (timina, citosina) sostituendo la maggior parte dei leganti fosfinici non desiderati per scarsa biocompatibilità e idrofilicità.

Inoltre lo studio di una pianificazione atta ad effettuare una nuova procedura di sintesi

seguendo i principi della green-chemistry, in accordo con un numero limitato di stadi e coprodotti, avendo un dispendio energetico controllato (tempi di reazione e MW come fonte energetica alternativa alla termica), può rappresentare il punto di svolta per la caratterizzazione del prodotto.

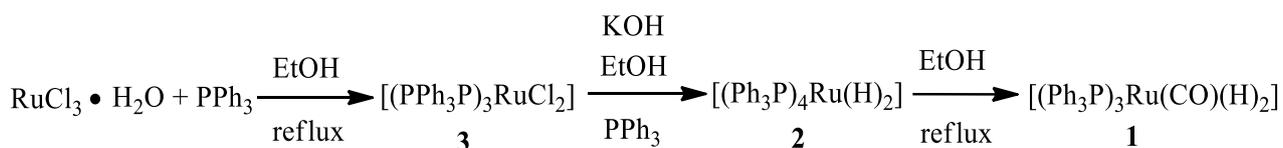
I leganti trifenilfosfinici sono responsabili della stabilità e della labilità del complesso che permette a [1] di essere reattivo ma sufficientemente robusto tale da non evidenziare una rapida decomposizione durante i tempi della reattività studiata, come dimostrano le tracce di composto inalterato, allorché la reazione non sia portata a compimento. Tuttavia i leganti trifenilfosfinici conferiscono al complesso idrofobicità ed è auspicabile che vengano sostituiti per permettere al complesso di sciogliersi facilmente in solventi fortemente polari biocompatibili ed affini all'acqua, per consentire gli studi biologici in vitro di attività anticancerogena.

In precedenti lavori di tesi sono stati sintetizzati prodotti che prevedevano chelazioni tramite derivati di acidi carbossilici formati da un anello contenente almeno un atomo di azoto, più nello specifico l'acido pirazinoico, l'acido picolinico ed un derivato carbossilico del pirrolo. La driving force di formazione di questi complessi organometallici risiede nella chelazione (N,O) che possedendo eteroatomi più donatori influisce sulla variazione di entalpia di formazione, sul contributo entropico favorevole e sull'allentamento della tensione sterica. Inoltre questi composti organometallici hanno nella loro sfera di coordinazione una funzione idrurica residua e quindi sono in grado di reagire ulteriormente in modo veloce non rilasciando alcun coprodotto in quanto la reazione libera  $H_2$ , prodotto dall'accoppiamento tra l'idruro metallico e il protone della funzione carbossilica. Una analoga procedura è stata utilizzata in questo lavoro per esplorare la sintesi tra il complesso diidruro di Ru [1] e 2-((1-phenyletilidene)ammino)fenolo).

**Il complesso [(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>Ru(CO)(H)<sub>2</sub>] [1]**

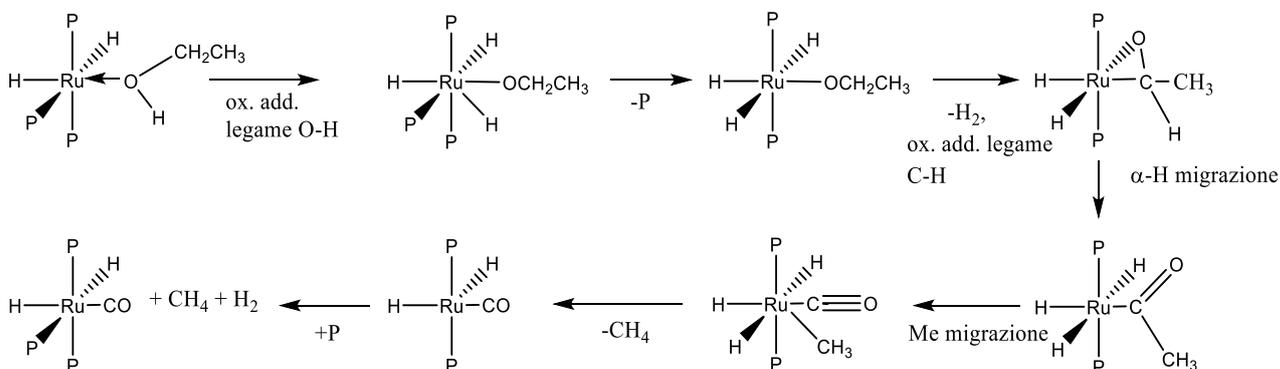
Oltre al complesso [(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>Ru(CO)(H)<sub>2</sub>], in letteratura altri composti analoghi quali [RuCl<sub>2</sub>(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], [RuCl(CO)H(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] sono stati candidati allo studio della coordinazione di leganti N,O, ma con risultati di resa e selettività non confrontabili.

Nello specifico la sintesi è avvenuta nei seguenti step indicati:



*Fig.2. Intermedi coinvolti nella sintesi di [1]*

La reazione avviene attraverso vari stadi partendo da RuCl<sub>3</sub><sup>[5]</sup>. Nella seguente immagine sono mostrati gli stadi intermedi del processo di formazione del complesso neutro diidruro desiderato:



*Fig.3 Meccanismo ipotizzato per la formazione del complesso [1]*

Gli stadi principali della reazione sono fondamentalmente due, il primo consiste in una addizione ossidativa dell'EtOH sul centro metallico, seguita da un alfa migrazione del CO per formare il legame carbonilico con conseguente formazione di CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>.

Questo prodotto metallorganico possiede alcune caratteristiche che lo rendono estremamente reattivo:

- Nella sua geometria ottaedrica presenta 3 gruppi trifenilfosfinici che termodinamicamente sono stabili ma cineticamente sono labili a causa del loro ingombro sterico e della loro scarsa donazione  $\pi$ , quindi la sostituzione con leganti più donatori e quindi più basici sarà favorevole.
- Il legame carbonilico rappresenta un grande vantaggio per la formazione di un nuovo complesso, in quanto facilmente identificabile (per via dell'elevato coefficiente di estinzione) attraverso spettroscopia IR e pertanto un ottimo metodo per seguire l'andamento delle reazioni
- L'elevato requisito sterico (angolo di cono di Tolman pari a 145 gradi) di  $\text{PPh}_3$  favorisce la disposizione *trans* dei legami che presentano caratteristiche di donazione, per ridurre l'affollamento sterico minimizzando le repulsioni elettroniche interlegandi.

#### Reattività del complesso $[(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{Ru}(\text{CO})(\text{H})_2]$

In letteratura sono presenti numerosi lavori in cui vengono sintetizzati diversi complessi metallici in cui sono presenti leganti organici, tuttavia complessi con derivati organici a base di acidi nucleici sono ancora in fase di studio, quindi ottimi come elementi di studio per una possibile attività biologica.

Complessi di metalli contenenti una base nucleotidica possono essere usati come strategia per la sintesi di molecole bioattive, fungendo da cavallo di Troia per cellule tumorali, dato che le basi nucleotidiche sono riconosciute dal DNA polimerasi e sono usate come elementi per la duplicazione della molecola di DNA<sup>[4]</sup>.

In questo lavoro di tesi viene studiata l'interazione che esiste tra il derivato carbossilico della timina (THA) ed il complesso di Rutenio trifenilfosfinico, con l'auspicio che questo sistema presenti capacità antineoplastiche in vitro.

In questo caso specifico il legante è il THA (timina acido acetico), nell'immagine che segue verranno mostrati i possibili prodotti che derivano dalla reazione del complesso  $[(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{Ru}(\text{CO})(\text{H})_2]$  con il legante nucleotidico.

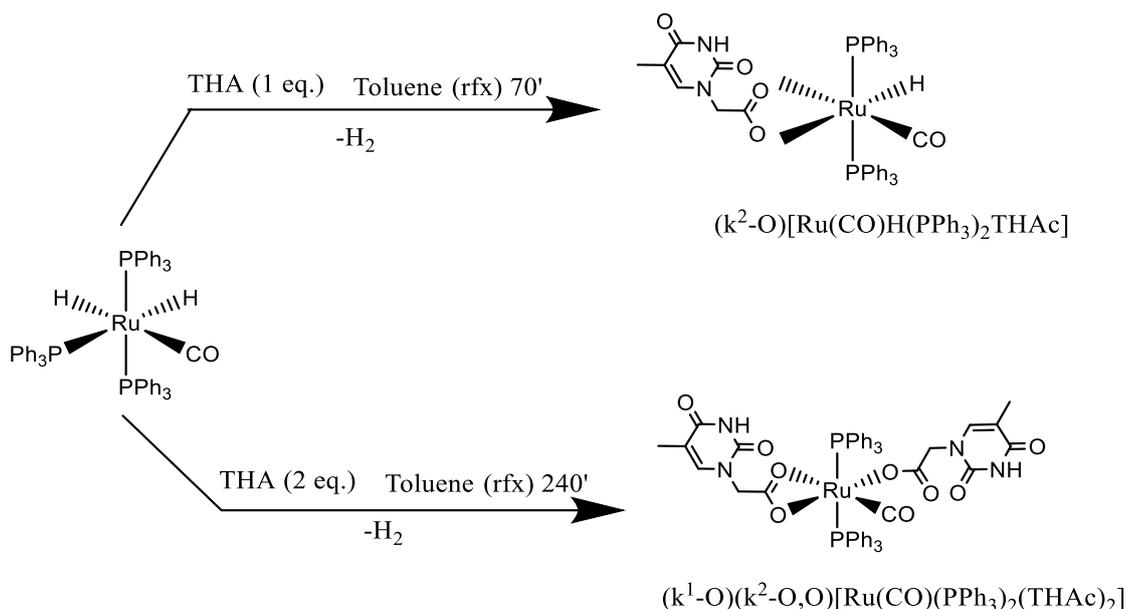


Fig.4 Prodotti di reazione di [1] con THA

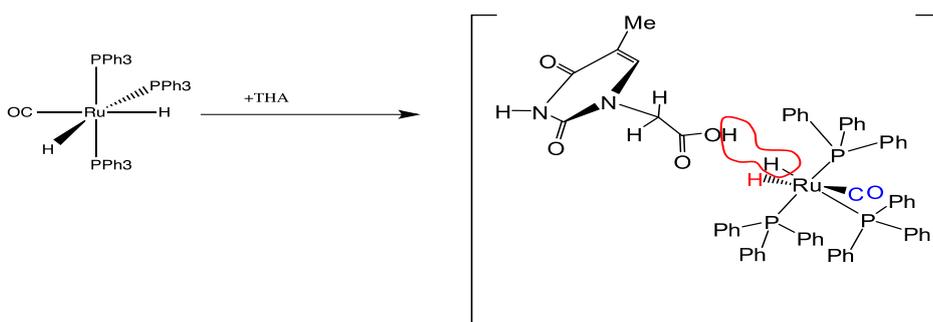


Fig.5 Meccanismo di reazione di [1] con THA

Tuttavia la solubilità di questi prodotti non è sufficiente per effettuare ulteriori studi al fine di saggiarne l'effettiva bioattività.

Il meccanismo di reazione è stata spiegato attraverso spettroscopia NMR multinucleare, mentre la struttura è stata valutata attraverso i raggi X e calcoli DFT.

Tuttavia nasce una discrepanza dall'interpretazione dell'isomero stabile in soluzione, con l'isomero che viene "catturato" ai raggi X. Per questo motivo la valutazione di una possibile flussionalità stereogeometrica del prodotto chelato è possibile solo attraverso analisi che possano avvenire in tempistiche diverse.

### *Sorgente energetica a MW*

I metodi tradizionali di riscaldamento utilizzano un forno o un bagno ad olio, che scaldano le pareti del recipiente di reazione per convezione o per conduzione. La parte centrale del campione impiega però molto tempo a riscaldarsi rispetto alle pareti del recipiente.

L'energia delle microonde è di diversi ordini di grandezza inferiori alle energie di dissociazione dei legami chimici, quindi si ritiene che sia da escludere che le microonde possano intervenire sui processi chimici indebolendo i legami. Finora si ha evidenza sperimentale solo di effetti di carattere termico delle microonde, che si manifestano in modo sensibile esclusivamente per sostanze con momento dipolare. L'effetto "termico" si può spiegare con l'assorbimento di energia da parte di molecole polari nei liquidi o nei solidi che interagiscono con il campo elettrico oscillante determinato dalla radiazione elettromagnetica. Maggiore è la polarità del solvente, maggiore sarà la sua capacità di assorbire calore dalle microonde.

Il riscaldamento con le microonde permette di riscaldare il solo campione senza scaldare tutto il forno o il bagno d'olio, risparmiando tempo ed energia. In teoria campioni sufficientemente piccoli possono essere riscaldati uniformemente in tutto il loro volume, anziché dalla superficie verso l'interno. Tuttavia il campo all'interno della maggior parte dei forni a microonde non è uniforme per problemi di omogeneità, e anche l'assorbimento da parte del campione da riscaldare può essere difforme. Per questi motivi si possono generare punti surriscaldati che potrebbero generare talvolta reazioni parassite indesiderate.

In generale la capacità di un materiale di assorbire microonde di una certa lunghezza d'onda trasformandone l'energia in calore dipende dalle caratteristiche dielettriche intrinseche del materiale, in particolare da un parametro detto tangente di perdita. Da un punto di vista pratico, i solventi non polari non sono riscaldati dalle microonde, mentre i solventi polari sono riscaldati, con una velocità di riscaldamento che dipende dal valore della loro tangente di perdita.<sup>[6]</sup>

Utilizzando un recipiente chiuso è possibile pertanto effettuare sintesi con temperature maggiori rispetto a quelle di riflusso, ciò rappresenta un grosso vantaggio in quanto un aumento di temperatura per un tempo prestabilito può portare ad un aumento della selettività della reazione. Questo sistema di sintesi può portare notevoli benefici, oltre alla

9

diminuzione dei tempi di reazione, si hanno notevoli risparmi in termini di dispendio energetico rispetto alle reazioni effettuate tramite la tecnica a riflusso.

### *La teoria della densità del funzionale (DFT)<sup>[7]</sup>*

La teoria della densità del funzionale (DFT) supera i metodi tradizionali ab-initio basati sul metodo HF poiché utilizza un approccio totalmente diverso per affrontare l'analisi della struttura delle molecole poliatomiche.

Il metodo Hartree-Fock talvolta abbreviato in HF è un metodo approssimato di fisica computazionale, molto utilizzato per simulare sistemi quantistici fermionici.

Con questo metodo le caratteristiche molecolari vengono descritte non per mezzo di una modellazione della molecola basata sulla elettrostatica e sulla meccanica classica, ma in termini quantomeccanici risolvendo direttamente l'equazione di Schrödinger per l'oggetto in esame (metodo ab initio), senza ricorrere a semplificazioni dovute a parametri ottenuti sperimentalmente.

Nella DFT alla complicata funzione d'onda degli orbitali molecolari viene sostituita la più semplice funzione di densità elettronica, che contiene le stesse informazioni della funzione d'onda: l'energia della molecola e funzione della densità elettronica.

La DFT venne proposta nel 1964 con i due teoremi di Hohenberg e Kohn ma in realtà già Thomas e Fermi nel 1920 avevano sviluppato un modello attraverso cui era possibile determinare l'energia di un sistema di elettroni a partire dalla conoscenza della sua funzione di densità elettronica. Il maggior impulso allo sviluppo della teoria fu dato in seguito dalla formulazione dovuta a Kohn e Sham (1965).

Mentre il metodo HF si basa su un numero di variabili pari a  $3n$  in cui ogni funzione d'onda di  $n$  elettroni va specificata con le tre coordinate cartesiane ( $x, y, z$ ), nella DFT la grandezza fondamentale è la densità di carica elettronica che dipende solo da tre variabili spaziali, indipendentemente dal numero di elettroni e in questo sta la notevole semplificazione rispetto ai metodi precedenti.

### Acido (R)-9-idrossistearico

Idroperossi- e idrossiderivati di acidi grassi poliinsaturi (PUFA), generati dai lipidi di membrana tramite meccanismi enzimatici o non enzimatici, hanno mostrato capacità di influenzare la sintesi del DNA e la proliferazione cellulare. Fra questi vi sono gli acidi 9-idrossistearico (9-HSA) e 10-idrossistearico (10-HSA), isolati dai costituenti di membrana di diverse linee cellulari tumorali e non<sup>[8]</sup>.

La valutazione del contenuto endogeno di 9-HSA e 10-HSA ha rivelato una loro presenza in cellule tumorali sensibilmente inferiore rispetto alle cellule normali; ciò ha fatto supporre che i composti potessero rivestire un qualche ruolo nell'ambito del controllo della crescita cellulare. In effetti, la somministrazione esogena *in vitro* di 9- e 10-HSA a cellule della linea di carcinoma polmonare di Lewis C108 ne ha provocato un calo nella proliferazione<sup>[9]</sup>.

E' stato poi dimostrato come l'isomero con il gruppo ossidrilico in posizione 9 manifestasse attività inibitrice maggiore, per cui ulteriori ricerche sono state focalizzate sull'impiego di 9-HSA. Di notevole interesse è il fatto che mentre 9-HSA inibisce la crescita delle cellule tumorali, alla stessa concentrazione non ha effetto sulle cellule normali. Le analisi effettuate su linee di carcinoma del colon umano HT29 hanno mostrato come il target principale di 9-HSA sia l'istone deacetilasi 1 (HDAC1)<sup>[10]</sup>.

Uno studio del 2012<sup>[11]</sup> ha approfondito i diversi effetti dei due enantiomeri (R)-9-HSA e (S)-9-HSA e ha investigato nel dettaglio l'attività biologica dei composti, utilizzando ancora una volta cellule HT29. L'enantiomero con configurazione (R) ha inoltre prodotto una migliore interazione con il sito catalitico dell'HDAC1, dimostrandosi quindi più efficiente nell'inibizione dell'enzima. Per questo gli studi successivi sono stati effettuati utilizzando l'enantiomero (R)-9-HSA, che ha mostrato attività anche su linee cellulari di altri carcinomi umani. Recentemente, la ricerca si è indirizzata verso le modalità di veicolazione di (R)-9-HSA<sup>[12]</sup>, inoltre si è progettato di utilizzare tale idrossiacido anche per formare nuovi complessi di Rutenio di potenziale applicazione biomedica come alternativa ai complessi del platino. L'ottenimento di (R)-9-HSA enantiopuro è stato possibile attingendo al pool chirale naturale che offre il precursore acido dimorfecolico (acido (S)-9-idrossi-10,12-ottadecadienoico), avente la funzionalità ossidrilica con la configurazione desiderata. Esso è presente, esterificato con il glicerolo, in quantità di circa

il 65% nell'olio di semi di *Dimorphoteca sinuata* L., una margherita nota anche come margherita africana (Cape marigold).

### Coordinazione (N,O)

Nei precedenti studi effettuati nel laboratorio dove ho svolto la tesi questo substrato di partenza [1] era stato fatto reagire con la THA ottenendo il complesso  $k^2$ - $(O,O)[RuHCO(PPh_3)_2(THA)]$ ; su questo complesso non è stato possibile effettuare studi in vitro per saggiarne la sua effettiva attività biologica, in quanto essendo presenti nel complesso tre molecole di  $PPh_3$ , possono conferire un'elevata insolubilità nei solventi polari biocompatibili utilizzati per gli studi in vitro come  $H_2O$ . Un grande interesse è stato recentemente mostrato nell'ambito della chimica metallorganica verso i chelanti (N,O), in quanto sono eteroatomici ed emilabili, ovvero in grado di formare un legame covalente forte con l'azoto ed uno più debole e reattivo con l'ossigeno attraverso un veloce spostamento della fosfina dalla posizione meridiana a quella equatoriale. Parte dell'interesse è nato quando si è osservato che possano rappresentare ottimi leganti per i metalli di transizione, buoni candidati per la sostituzione delle fosfine in quanto hanno mostrato maggiore carattere donatore da parte dell'atomo di azoto, ma conservando una certa reattività in quanto ammine aromatiche. Infatti, modulando la donazione di carica, si limita l'inerzia chimica dei prodotti ottenuti rispetto ad un legante diammino-alifatico<sup>[13]</sup>.

Sappiamo inoltre da studi precedenti che i complessi di Ru (II) contenenti leganti imminici O-donatore mostrano una notevole differenza nella loro attività antiproliferativa contro le cellule tumorali e tale capacità potrebbe essere attribuita alla loro lipofilicità<sup>[14]</sup>.

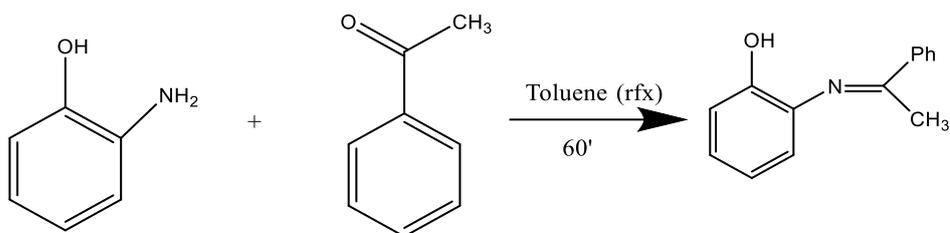
Per questo motivo in questo ambito di ricerca sono stati studiati ulteriori composti che contengono derivati imminici per verificarne la modalità di formazione e per aprire una nuova frontiera di studio di nuovi complessi organometallici.

E' stato sintetizzato a tal proposito un legante di tipo immino-fenolico in grado di effettuare la desiderata chelazione (N,O).

Partendo da queste considerazioni si è pensato di effettuare delle reazioni di sostituzione partendo dal prodotto contenente l'acetato del pirazinoico con due leganti organici quali (THA, 9R-HSA), al fine di sostituire le trifenilfosfine con leganti organici, per aumentare la solubilità del complesso e risultare innocui verso le cellule sane dell'organismo umano.

La caratterizzazione purtroppo non è stata completa per nessuno dei composti, tuttavia le analisi effettuate hanno riscontrato una diversa coordinazione dei leganti nei confronti del complesso [2].

E' stato anche sintetizzato al proposito un legante di tipo immino-fenolico in modo da effettuare la desiderata chelazione (N,O).



*Fig.6 Reazione di sintesi di 2-((1-phenyletilidene)immino)fenolo).*

La reazione con il complesso trifenilfosfinico di Rutenio [1] non conduce ad un risultato selettivo, ma ad una miscela di isomeri.

Come prospettiva futura ci si pone come obiettivo lo studio della reazione, cercando di ridurre la velocità di reazione (con altri solventi a minor polarità e temperature più basse per arrivare ad una maggior selettività).

## SCOPO DELLA TESI

Alla luce delle premesse esposte ci si propone la sintesi e la completa caratterizzazione di complessi già studiati e di nuovi prodotti adatti allo studio di potenziali proprietà anticancerogene. Pertanto l'obiettivo principale di questo lavoro è':

- Partendo dal complesso  $[\text{Ru}(\text{CO})(\text{H})_2(\text{PPh}_3)_3]$ , ottimizzare la sintesi del complesso  $(\text{k}^1\text{-O})(\text{k}^2\text{-O,O})[\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2(\text{THA})_2]$
- Approfondire il meccanismo di interconversione del complesso  $(\text{k}^1\text{-O})(\text{k}^2\text{-O,O})[\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2(\text{THA})_2]$
- Caratterizzare i prodotti ottenuti con le consuete tecniche spettroscopiche e strutturali, (ESI-MS, IR, NMR multinucleare e con tecniche bidimensionali)
- Valutare l'ulteriore coordinazione con leganti di cui lo studio è ancora attuale quali complessi imminici e caratterizzarne il tipo di meccanismo di chelazione
- Sintesi di nuovi complessi bischelati con leganti organici quali timina acido acetico (THA) o acido (R)-9-idrossistearico (R)-9-HSA).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Reazione con THAc ( $k^1, k^2$ )

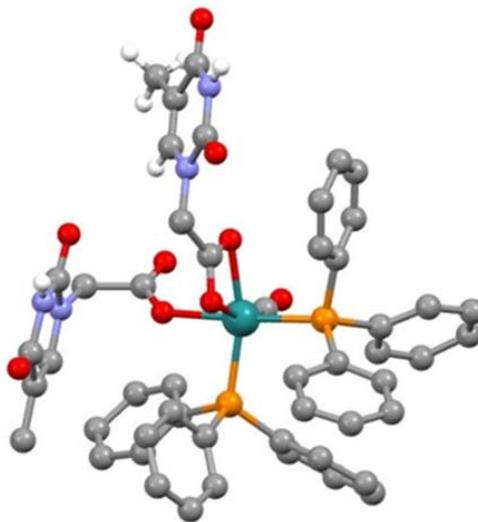
Il complesso idrurico  $\text{mer}-(\text{H}_2)\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_3$  reagisce con due equivalenti di timina acido-acetico (THA) con conseguente formazione di idrogeno molecolare tramite riscaldamento a refluxo in toluene per 3h e 30'. In prima analisi viene effettuato l' $^1\text{H-NMR}$  in cui non si segnala la presenza di legami Ru-H, sintomo del fatto che il complesso di partenza si è convertito completamente nel complesso ( $k^1, k^2$ ) perdendo ogni sua funzionalità idrurica.

L'attribuzione dei leganti del mono/diapro complesso viene effettuata tramite la valutazione della frequenza di stiramento delle bande caratteristiche. Nell'analisi IR si evidenzia la presenza del legame Ru-CO a  $1969\text{cm}^{-1}$  e le caratteristiche frequenze di stiramento simmetriche ed antisimmetriche relative agli acetati del frammento organico ( $\text{RuC}(\text{O})\text{O}_{\text{thac}}$ ) nella forma monoapro e chelata. In particolare la coordinazione monoapro dell'acetato ha una frequenza simmetrica ed antisimmetrica rispettivamente di  $1661; 1435\text{cm}^{-1}$  con una differenza di frequenza più elevata rispetto al prodotto chelato, in cui la differenza di stiramento simmetrica-antisimmetrica è minore, in accordo con ciò che è stato dimostrato in letteratura con la descrizione del complesso  $[\text{Ru}(\kappa^1\text{-OAc})(\kappa^2\text{-OAc})(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2]$ <sup>[15]</sup>.

L'analisi al protone effettuata nel complesso disostituito evidenzia due segnali relativi ai CH metilici a 4.47 e 2.05 ppm, che appartengono rispettivamente al frammento dell'acetato chelato ed a quello monoapro. I gruppi NH invece si trovano a circa 7.7 ppm come multipletti sovrapponibili, mentre il singoletto a 1,25 ( $^3\text{JHH}=1\text{Hz}$ ) e quello ad 1.05 ppm sono attribuiti rispettivamente ai protoni del metile del sostituito diapro e quelli del sostituito monoapro. I protoni isotopici del gruppo N-CH<sub>2</sub> a causa della rotazione lungo il legame C-C, mostrano due doppietti distinti centrati a  $\delta 4.47$  e  $2.23$  ( $^2\text{JHH} = 16.4\text{ Hz}$ , CH $\alpha$ H $\beta$ ), con coordinazione diapro e monoapro del legante.

La stereogeometria in soluzione è attribuita alla configurazione *trans-mer* relativa rispettivamente ai leganti fosfina ed acetati diversamente coordinati. La soluzione contenente inizialmente l'isomero *trans-mer* conservata in cloroformio deuterato a bassa

temperatura fornisce dopo 30 giorni, cristalli adatti per uno studio di diffrazione ai raggi X.



*Fig.7 Struttura ai raggi X dell'isomero cis-fac(1)*

Sorprendentemente la struttura a raggi X mostra la formazione dell'isomero *cis-fac* con un legame intermolecolare fra i leganti THAc  $k^1-$  (O) con gli anelli THAc opposti  $k^2$  (O, O) tramite interazioni NH--O di Watson-Creek dando origine a un metallociclo supramolecolare supportato da una disposizione antiparallela degli anelli della timina in modo da formare un impilamento di tipo  $\pi$  ( $\pi$ -stacking). La formazione del complesso finale è stata seguita tramite un'aggiunta alla volta di un equivalente di THA e gli intermedi di reazione sono stati caratterizzati spettroscopicamente e descritti mediante l'aiuto dei calcoli delle loro energie nel vuoto.

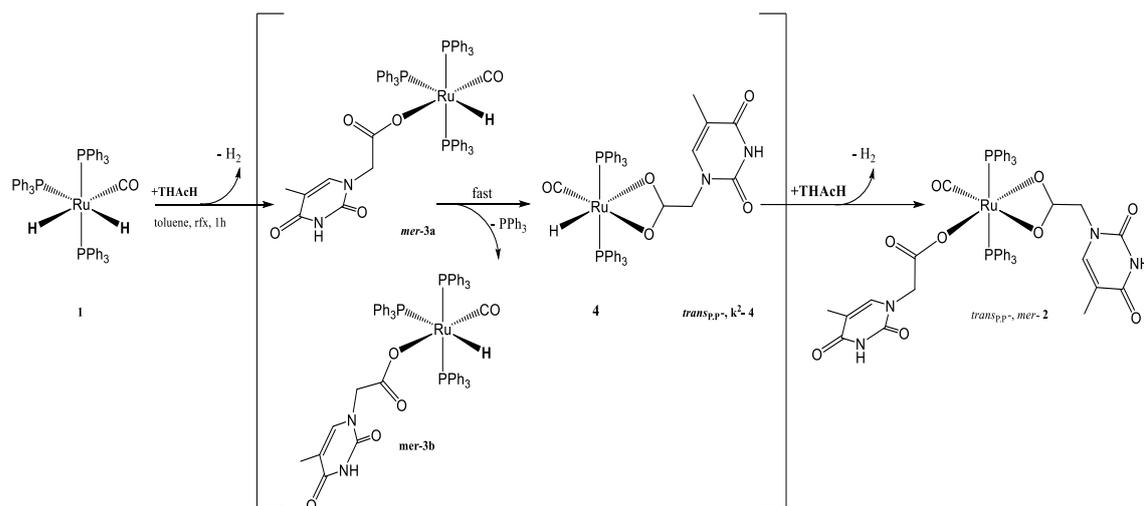


Fig.8 Stadi di reazione in cui il complesso metallorganico [1] passa da monoapto a chelato

Quando la reazione con rapporto stechiometrico 1:1 viene interrotta dopo 30 minuti la soluzione viene eluita con Et<sub>2</sub>O tramite filtrazione su celite da cui sono state raccolte due frazioni. La natura della prima frazione principale (60%) all'ATR mostra una singola banda carbonilica relativa al legame Ru-CO a  $\nu$  1923cm<sup>-1</sup> mentre la banda dell'acetato relativo al prodotto monoapto cade nei seguenti valori: [1682  $\nu_{as}$ , 1659 e 1495, cm<sup>-1</sup>] e viene attribuito al complesso *mer*-{HRu(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>[ $\kappa$ 1 (O) THAc]} relativo ai 2 conformeri.

Lo spettro <sup>31</sup>P-NMR mostra segnali intensi a  $\delta$  41.2 e 36.5 in rapporto reciproco 2: 1, che sono assegnati alla miscela di isomeri monosostituiti 3a e 3b, derivanti dalla rotazione impedita attorno al legame C-O nella conformazione *mer*. Il doppietto largo centrato a  $\delta$  = 38,7, con accoppiamento Ru-H residuo (<sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 14 Hz), supporta la presenza della specie *trans* <sub>P-P</sub> chelata.

I tripletti <sup>1</sup>H NMR reattivi al legame Ru-H posizionati a -6,1 e - 7,2 ppm (<sup>2</sup>J<sub>H-Ptrans</sub> = 18 Hz e <sup>2</sup>J<sub>H-Pcis</sub> = 24 Hz), suggeriscono il fatto che la sostituzione dell'idruo avviene preferenzialmente in *trans* al Ru-CO, in modo da stabilizzare l'acetato fortemente elettron-donatore. La seconda frazione eluita è il risultato dell'immediata chelazione dell'acetato mediante il rilascio concertato di PPh<sub>3</sub>. La chelazione dell'acetato viene confermata dall'intensa banda IR a  $\nu$  1962 cm<sup>-1</sup> per il legame Ru-CO e dalla separazione più stretta relative alle bande dell'acetato nel complesso chelato IR a 1535m, 1466w cm<sup>-1</sup> ( $\Delta\nu$  = 69

cm<sup>-1</sup>). Il tripletto presente all' <sup>1</sup>H-NMR a campo elevato a -16.5 ppm (t, <sup>2</sup>JHP = 20,0 Hz) (Figura 2), è attribuito al contributo maggiore del legante in posizione equatoriale ed alla posizione trans delle 2 fosfine come donatore di elettroni, come osservato per il complesso simile (k<sup>2</sup>-O(O)CH)(CO)(PCy<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a -18,5 ppm<sup>[16]</sup>.

Lo spettro <sup>31</sup>P del complesso trans<sub>p-p</sub> k<sup>2</sup>(O,O) mostra due doppietti a δ 46.8 e 43.3 (JP,P = 25 Hz) a temperatura ambiente. Inoltre su questo prodotto è stata effettuata un'analisi <sup>31</sup>P-NMR su cui è stata applicata una temperatura variabile per valutare la disposizione delle fosfine in modo da comprendere l'esistenza di possibili riarrangiamenti isomerici al variare della temperatura.

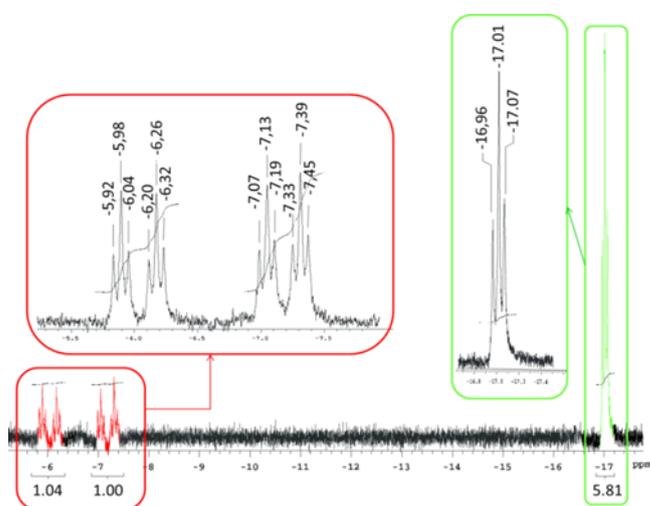


Fig.9 <sup>1</sup>H-NMR della zona idrurica, in rosso i 2 isomeri monocoordinato, in verde il complesso chelato

Il tripletto che si osserva a -16.5 ppm è indice del fatto che mantenendo la soluzione formata dall'isomero monocoordinato e da quello chelato in un solvente clorurato, avviene un riarrangiamento mediante il riposizionamento delle fosfine dalla posizione trans a quella cis in modo da ridurre l'ingombro sterico della molecola.

Nelle reazioni eseguite in CPME (ciclopentil-metil etere) tramite irradiazione MW, sono stati evidenziati due processi differenti entrambi osservati tramite spettri NMR <sup>31</sup>P. il primo processo che avviene concerne la perdita di una fosfina ed è la più veloce, in quanto l'analisi al <sup>31</sup>P-NMR effettuata cinque giorni dopo quella al protone mostra un comportamento flussionale con conseguente aumento nel tempo del suddetto segnale.

Questo aspetto è spiegabile attraverso il meccanismo di pseudorotazione di Berry. Infatti il rilascio della fosfina nell'ambiente di reazione ( $^{31}\text{P}$  NMR  $\delta=29\text{ppm}$ ) causa la formazione di un complesso pentacoordinato in cui un solvente (in questo caso l'etere etilico presente come componente dell'eluente del processo di purificazione) prende il posto della fosfina. L'intercettazione di questo intermedio osservato nello spettro  $^1\text{H}$ -NMR consente di sostenere l'ipotesi di tale meccanismo passando attraverso uno stato di transizione con geometria bipyramidale a base triangolare. Ciò è auspicabile anche dall'analisi al protone che mostra un quartetto di segnali coordinati.

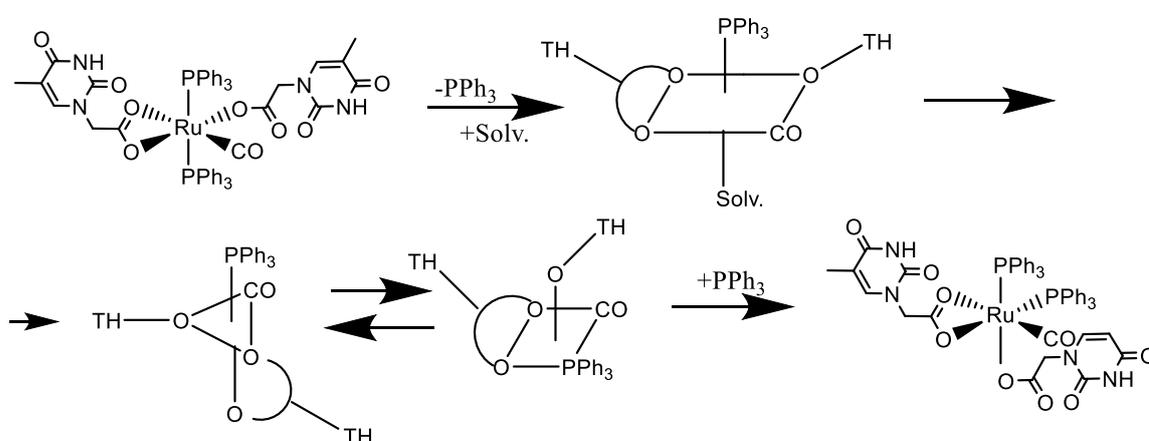


Fig.10 Meccanismo di pseudorotazione di Berry

Ne deriva il fatto che avviene globalmente un cambio della stereogeometria del complesso da isomero *trans-mer* a quello *cis-fac(1)*. Il secondo processo invece si verifica quando si solubilizza il prodotto *trans-mer* in un solvente estremamente polare come il DMSO, cioè la perdita di un legante nucleotidico (oltre alla perdita di una fosfina che avviene precedentemente rispetto alla perdita del legante), confermato dalle analisi al protone in cui si evidenzia l'aumento dei segnali relativi al legante libero.

La differenza di energia riguardante i due isomeri è stata calcolata tramite calcoli DFT ed è risultata essere molto piccola, pari a 3.4 KJ

### DFT calcoli teorici

Il primo stadio di reazione del complesso di partenza prevede l'aggiunta di THAc in eccesso con conseguente formazione di una miscela formata dal prodotto monoapto instabile e dal prodotto diapto, termodinamicamente favorito e la conseguente liberazione di un legante trifenilfosfinico (il contributo entropico aumenta). La distribuzione di questi prodotti dipende essenzialmente dalle condizioni di reazione (solvente, tempo di reazione). I calcoli DFT si sono concentrati sia sul prodotto monoapto, sia su quello chelato, dove si prevede nel primo caso una barriera energetica torsionale lungo il legame C-O pari a 50 KJ/mol. Per quanto riguarda il prodotto chelato invece, esso presenta una barriera energetica molto più bassa valutando il legame C-C metilenico confermando il fatto che il legante nucleotidico si presenta in posizione equatoriale, in trans sia all'idruro, sia al legame carbonilico, in quanto isomero più stabile. Il prodotto monoapto che rappresenta l'intermedio della reazione convertirà completamente nel prodotto chelato trans in quanto più stabile termodinamicamente con l'anello della base nucleotidica posta in up e in down alla posizione equatoriale della molecola. Nello schema che segue vengono mostrati i calcoli computazionali dei vari isomeri.

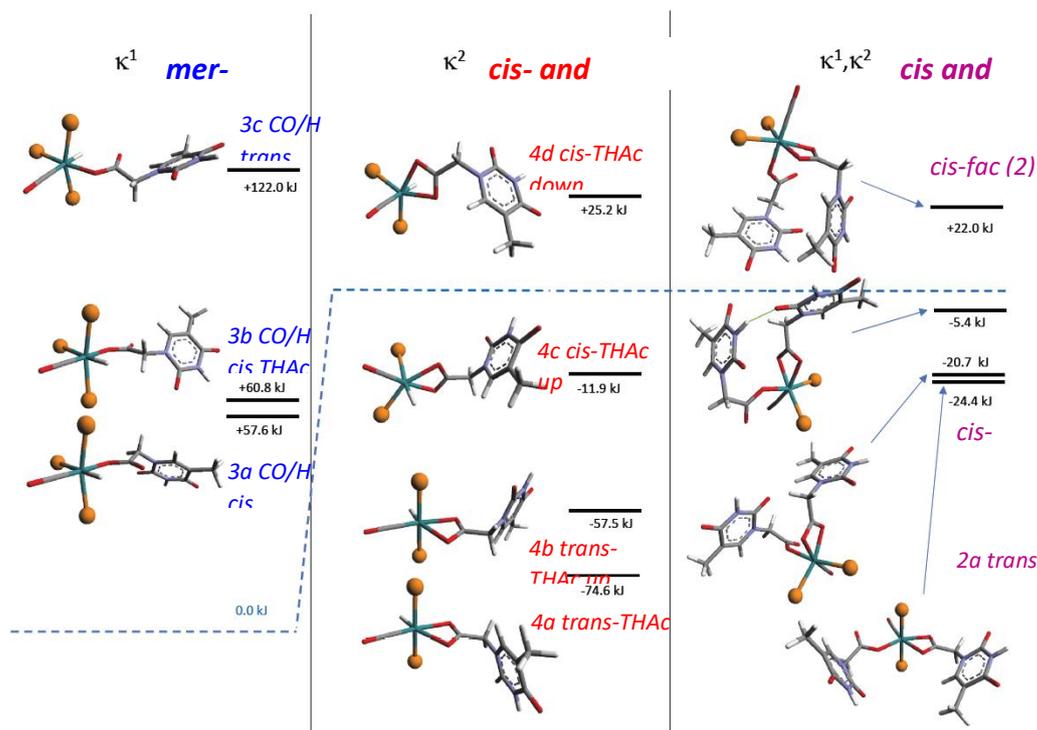
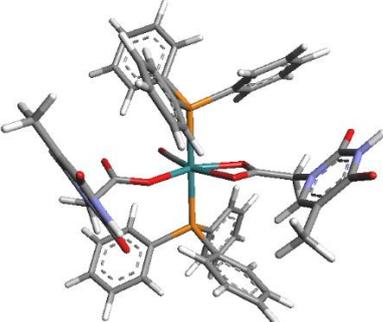
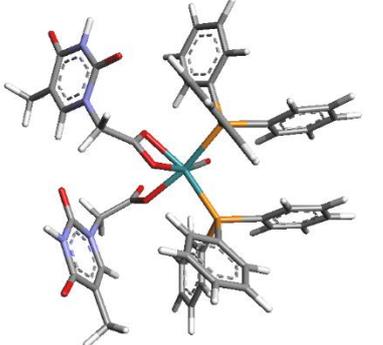


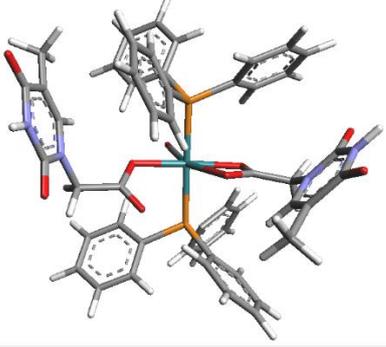
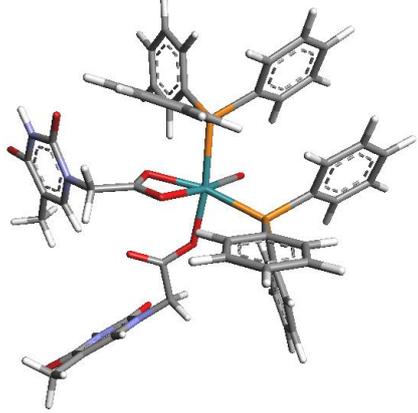
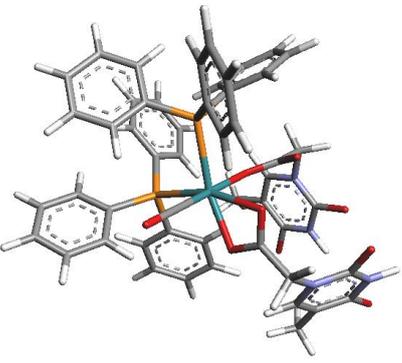
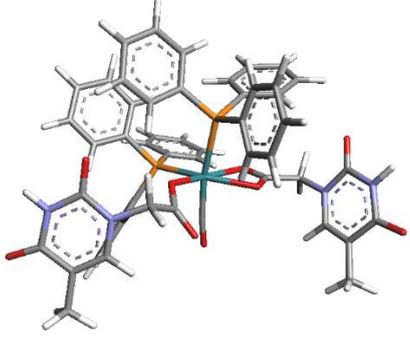
Fig.11 Calcoli DFT nel vuoto dei vari isomeri con le relative energie

Si può notare come i prodotti mono sostituiti (cioè con la presenza ancora della funzionalità idrurica) presentano una netta differenza di energia tra gli isomeri *cis* e *trans*, questo

dovuto principalmente al fatto che le fosfine in posizione *cis* sono tra loro sono stericamente più ingombranti. Questo non accade per quanto riguarda il complesso  $k^1-k^2$  in cui si nota che le configurazioni *cis-trans* presentano nel vuoto differenze di energia molto piccole (intorno ad una 1Kcal/mol), questo è indice del fatto che allo stato solido prevalgono interazioni intramolecolari tra gli N-H dei 2 anelli nucleotidici promuovendo la configurazione *cis<sub>p-p</sub>-fac* (struttura catturata ai raggi X), mentre in soluzione prevale la configurazione *trans* (con le 2 timine in posizione *fac*) dove prevalgono forze di tipo intermolecolari ( $\pi$  stacking).

Nella tabella che segue vengono mostrati gli isomeri in cui la denominazione *cis/trans* individuano la reciproca posizione dei leganti fosfinici, mentre con la denominazione *mer/fac* si individua la reciproca posizione degli acetati timinici rispettivamente in posizione apicale o equatoriale opposta occupanti la stessa faccia triangolare dell'ottaedro.

	Vacuum (KJ)	CH <sub>3</sub> Cl (KJ)	DMSO (KJ)
 <p><b>TRANS MER (C(O)O syn CO)</b></p>	0.0	0.0	0.0
 <p><b>CIS FAC(1) (RAGGI X) (C(O)O syn CO)</b></p>	+3.7	+0.8	-1.0

 <p><b>TRANS MER(C(O)O anti CO)</b></p>	<b>+9.8</b>	<b>+5.1</b>	<b>+3.2</b>
 <p><b>CIS FAC(1) (RAGGI X) (C(O)O anti CO)</b></p>	<b>+28.8</b>		
 <p><b>CIS FAC (C(O)O syn CO)</b></p>	<b>+46.4</b>	<b>+45.1</b>	<b>+42.7</b>
 <p><b>CIS MER (C(O)O syn CO)</b></p>	<b>+74.2</b>	<b>+69.8</b>	<b>+67.7</b>

### Analisi al $^{13}\text{C}$ -NMR

L'analisi al  $^{13}\text{C}$ -NMR è stata effettuata in due solventi differenti ed in due diversi tempi. Hanno dimostrato come il prodotto disostituito sia stabile ma allo stesso momento sia labile in base alla polarità del solvente in cui viene solubilizzato. La prima analisi è stata effettuata in cloroformio deuterato in cui sono stati rilevati segnali esclusivamente appartenenti ad un unico isomero. Questo è dovuto al fatto che l'analisi è stata effettuata immediatamente dopo la sintesi del prodotto. Tuttavia non è stato possibile ottenere un segnale distinguibile relativo al carbonile legato all'atomo metallico. Il prodotto iniziale in questione probabilmente viene attribuito all'isomero *trans-mer*. Purtroppo non abbiamo la conferma definitiva in quanto l'analisi al  $^{31}\text{P}$ -NMR effettuata invece giorni più tardi ed in solvente differente (DMSO) ha evidenziato la presenza di un prodotto che presentava già la perdita di una fosfina, quindi probabilmente cinque giorni si sono rilevati sufficienti per far avvenire il riarrangiamento isomerico tramite pseudorotazione di Berry. Tuttavia l'attribuzione ai diversi segnali relativi ai carboni è stata possibile.

Discorso diverso per l'analisi effettuata in DMSO in cui si evidenzia la tramutazione del prodotto *trans-mer* nei diversi isomeri *cis*. Quindi l'assegnazione relativa ai diversi segnali risulta maggiormente difficoltosa, in quanto lo spettro evidenzia una moltitudine di segnali che appartengono ad almeno tre isomeri diversi, oltre alla presenza dei segnali relativi al THA libero. Questo aspetto viene evidenziato anche dalle analisi bidimensionali (COSY) in cui è evidente la formazione di tre isomeri diversi. Caratteristica confermata anche dagli spettri  $^{31}\text{P}$  registrati in tempistiche diverse in cui appunto si evidenzia l'aumento dei segnali degli isomeri *cis* a discapito del prodotto iniziale, il *trans-mer*.

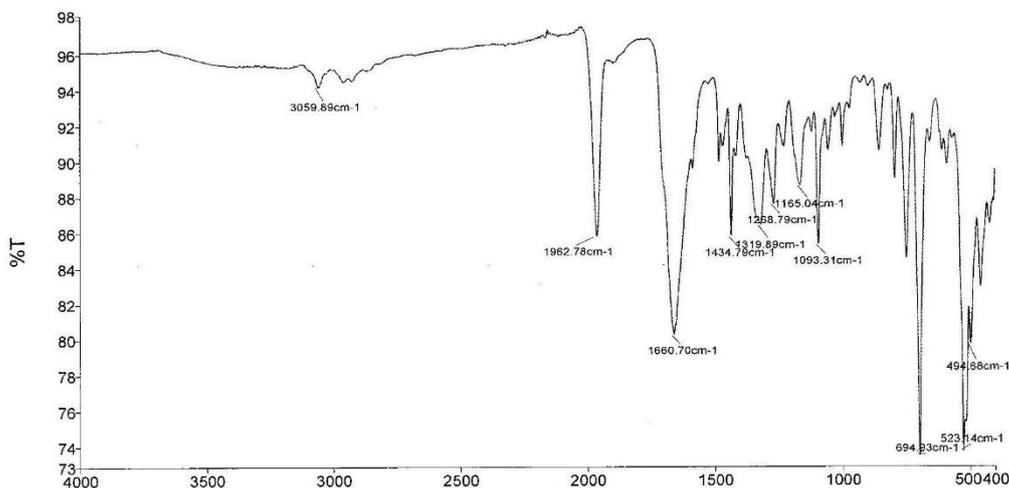
### Caratterizzazione ( $k^2\text{-O,O}$ )[Ru(CO)Pyz.(PPh<sub>3</sub>)THA

#### **ATR**

La reazione viene giudicata conclusa quando il complesso di partenza si è trasformato del tutto, a tal fine durante la reazione viene effettuata un'analisi IR in soluzione della miscela di reazione controllando la diminuzione nel tempo della banda a  $1927\text{ cm}^{-1}$  che identifica il complesso "pirazinoico" [Ru(H)(CO)Pyz.(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].

La banda a  $1927\text{ cm}^{-1}$  dopo due ore a riflusso non è più presente nello spettro della miscela di reazione, a questo punto si osserva lo spostamento della banda carbonilica a  $1662\text{ cm}^{-1}$  attribuibile alla formazione di un nuovo complesso.

Inoltre, si evidenzia la presenza di una banda molto intensa relativa alla forma chelante del carbossile del pirazinoico diapto a  $1660\text{ cm}^{-1}$  ed una meno intensa a  $1536\text{ cm}^{-1}$ .

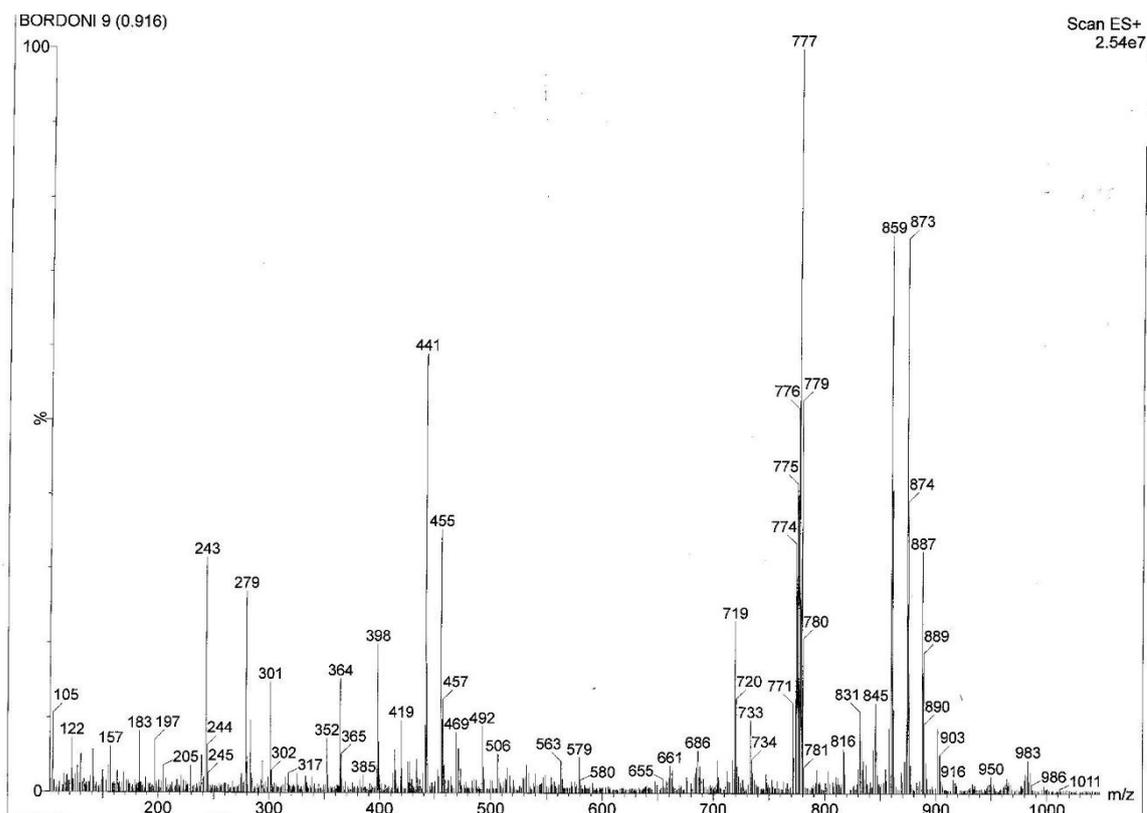


### ***<sup>1</sup>H-NMR***

Dallo spettro al protone si possono evidenziare alcuni segnali che caratterizzano i 2 diversi leganti organici. Il CH dell'anello timinico si trova alla frequenza di  $5.504\text{ ppm}$ , mentre i  $\text{CH}_2$  dei 2 possibili "rotameri" della gamba dell'anello si trovano a  $3.6$  e  $3.0\text{ ppm}$  ( $J=17\text{ Hz}$ ). Per quanto concerne invece il  $\text{CH}_3$  dell'anello nucleotidico, risulta particolarmente difficile distinguerlo in quanto si trova in una zona in cui "cadono" anche i segnali alifatici dei solventi utilizzati durante la sintesi. Infine nella zona a campi più alti si possono distinguere i segnali relativi al legame N-H; tuttavia la moltitudine di segnali presenti ne rende difficile il riconoscimento.

### ***ESI (MeOH)***

La scansione degli ioni positivi mostra un grafico con molto rumore di fondo, dovuto purtroppo alla moltitudine di segnali di diversi componenti presenti in miscela. Si nota come il segnale più intenso sia quello dello ione carbossilato del prodotto di partenza non reagito (Pirazinoico) con la contemporanea presenza della distribuzione isotopica tipica del Rutenio a  $777\text{ m/z}(+\text{H}^+)$ . Tuttavia si nota una piccola presenza dell'addotto sintetizzato con la relativa distribuzione isotopica a  $719\text{ m/z}(+\text{Na}^+)$



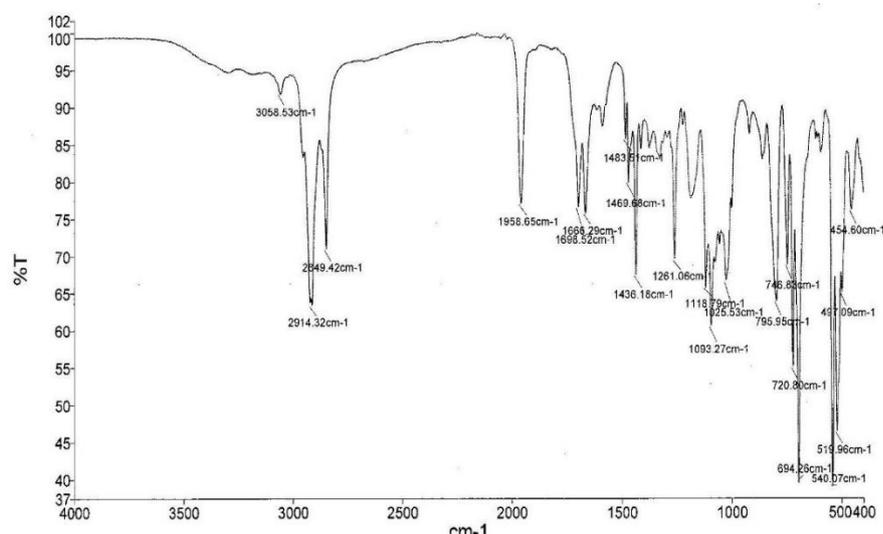
### Caratterizzazione ( $k^1$ -O)[Ru(CO)Pyz.(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>HSA]

#### **ATR**

La reazione viene giudicata conclusa quando il complesso di partenza si è trasformato del tutto, a tal fine durante il processo viene effettuata un'analisi IR in soluzione della miscela di reazione controllando la diminuzione nel tempo della banda carbonilica a 1927 cm<sup>-1</sup> che identifica il complesso **[2]** [Ru(H)(CO)Pyraz.(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].

La banda a 1927 cm<sup>-1</sup> dopo 23 ore a riflusso non è più presente nello spettro della miscela di reazione, a questo punto si osserva lo spostamento della banda carbonilica a 1958 cm<sup>-1</sup> attribuibile alla formazione di un nuovo complesso.

Inoltre, si evidenzia la presenza di una banda molto intensa relativa alla "chela" del carbossile del pirazinoico diapto a 1666 cm<sup>-1</sup> ed una di eguale intensità a 1698 cm<sup>-1</sup>, probabilmente relativa al carbossilato dell'acido(*R*)-9-idrossistearico.



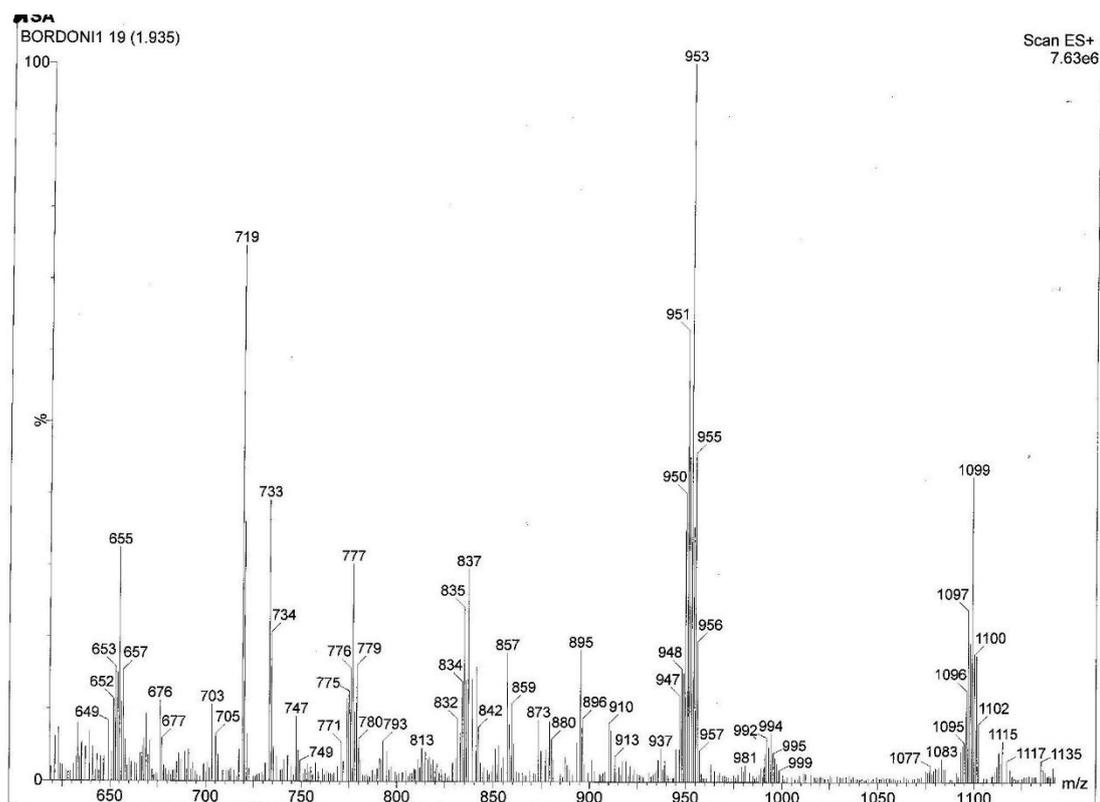
### ***<sup>1</sup>H-NMR***

Dallo spettro al protone si possono evidenziare alcuni segnali che caratterizzano i 2 diversi leganti organici. A campi più elevati (tra gli 8 ed i 9 ppm) si trovano gli N-H che caratterizzano l'anello pirazinoico con la medesima intensità. La zona alifatica invece risulta di difficile interpretazione dovuta alla saturazione dei segnali dei solventi, tuttavia sono distinguibili i segnali relativi alla catena alifatica dell'acido (*R*)-9-idrossistearico.

### ***ESI (MeOH)***

L'analisi, eseguita in MeOH, evidenzia nella scansione degli ioni positivi la presenza di diversi segnali in cui si osserva la caratteristica distribuzione isotopica tipica del Ru.

In ordine si riscontra la presenza del complesso di partenza non reagito a 777 m/z (+H). Si rileva anche la presenza dell'addotto doppiamente chelato +Na<sup>+</sup> a 1097m/z. analogamente si riscontra la presenza dell'addotto coordinato k<sub>1</sub> con l'acido (*R*)-9-idrossistearico (con la presenza di un legante trifenilfosfinico in più) a 835 m/z. Infine il segnale più intenso corrisponde al complesso contenente un legante HSA coordinato k<sup>2</sup> al posto del legante pirazinoico e la contemporanea presenza del legame CO e di 2 leganti trifenilfosfinici



### ***<sup>31</sup>P-NMR***

Nello spettro risultano una serie di segnali dovuti molto probabilmente alla copresenza di vari complessi dalla diversa coordinazione. Tuttavia sono presenti 2 doppietti caratterizzati dalla stessa costante di accoppiamento ( $J=17\text{Hz}$ ) attribuibili ad una conformazione trans delle fosfine del complesso  $K_1$  con l'acido idrossistearico, a 37 e 34 ppm. Risultano dallo spettro inoltre altri segnali molto intensi che appaiono come singoletti, attribuibili alla presenza di un solo legante trifenilfosfinico nel complesso finale bis-chelato.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

- In questo lavoro di tesi sono state mostrate alcune peculiarità particolari che contraddistinguono il complesso  $(k^1-O)(k^2-O,O)[Ru(CO)(PPh_3)_2(THA)_2]$ . Le tecniche spettroscopiche utilizzate sono state soddisfacenti nella caratterizzazione completa. Tuttavia ci si propone di trovare nuovi metodi di sintesi, sia in termini di tempo, magari sfruttando le sollecitazioni MW, sia in termini di resa quantica. La stabilità del prodotto è comunque risultata molto labile nonostante le precauzioni effettuate. Ci si propone inoltre la possibilità di saggiarne l'attività biologica per effettuare test in vitro, tuttavia nasce l'esigenza di ottenere dalla reazione il prodotto più puro possibile. Riservarsi la possibilità di ottenere dei cristalli da poter analizzare ai raggi X potrebbe rivelarsi un ottimo fattore per la completa caratterizzazione di questo prodotto.
- Le successive reazioni condotte per sollecitazione termica a conduzione con gli acidi carbossilici THA (timina acido acetico) e HSA (acido (*R*)-9-idrossistearico) non hanno condotto alla trasformazione apprezzabile negli addotti attesi.
- La completa sostituzione di questi leganti a discapito di leganti trifenilfosfinici potrebbe significare la vera svolta per ottenere dei complessi metallorganici che possano avere una vera attività biologica. Per quanto concerne queste ultime sintesi, ci si propone di realizzare sintesi più efficaci in termini di tempo e di conversione. L'analisi al  $^{13}C$  potrebbe rivelarsi fondamentale per la caratterizzazione completa di questi nuovi complessi
- Ottenere nuovi complessi con coordinazioni (N,O) attraverso l'uso di leganti ariliminici che in questa attività di tesi non hanno condotto alla sintesi di un prodotto selettivo. Questi tipi di leganti infatti rappresentano la nuova frontiera di studio per complessi metallorganici
- Coordinare in maniera diretta le basi nucleotidiche, Timina e Citosina, attraverso delle funzionalità – C(O)N(H) dell'anello pirimidinico in linea con quanto recentemente descritto dal gruppo di Correa<sup>[4]</sup>

## **PARTE SPERIMENTALE**

### **Premessa**

Tutti i prodotti che verranno descritti in questa sezione sono stati sintetizzati utilizzando una varietà di solventi che si differenziano oltre che per la loro struttura molecolare, per la loro polarità in modo da garantire una conversione più elevata possibile in base al tipo di prodotto metallorganico sintetizzato. Tutti i solventi utilizzati vengono anidrificati e distillati attraverso l'uso di opportuni distillatori in cui è riposto all'interno dei palloni provvisti di refrigeranti un particolare agente anidrificante (Na/benzofenone o  $\text{CaH}_2$  in base al tipo di solvente), in quanto i complessi si sono mostrati particolarmente sensibili nei confronti dell'ambiente esterno, fattore fondamentale per il mantenimento è stato lavorare in atmosfera di argon proprio per il motivo appena citato. L'argon oltre a garantire l'atmosfera inerte è risultato particolarmente efficace in quanto avendo un peso maggiore dell'aria garantiva una condizione di stabilità duratura che ha permesso ai composti di mantenersi stabili anche per diverse settimane.

La vetreria utilizzata nelle sintesi veniva dapprima accuratamente lavata in bagno basico ( $\text{EtOH} + 10\% \text{ NaOH}$ ) e dopo risciacquo posta in bagno acido o/n ( $\text{HCl} 10\%$  in  $\text{EtOH}$ ) e con acetone ed acqua in modo da rimuovere le parti più grossolane, successivamente venivano applicati una serie di lavaggi con miscele di esano ed etere di petrolio garantendo una rimozione maggiore dei componenti indesiderati. Il passaggio finale consisteva nel porre la vetreria in stufa a  $135^\circ \text{C}$  e prima dell'utilizzo e della montatura, essa veniva scaldata ulteriormente con una pistola termica in modo da rimuovere qualsiasi traccia di umidità. Fondamentale prima dell'utilizzo, la doppia linea vuoto/argon in modo da garantire la completa assenza di aria all'interno degli schlenk/palloni e l'assoluta atmosfera inerte. I reagenti utilizzati non sono stati trattati con particolari accorgimenti, eccezione fatta per il  $\text{RuCl}_3$  utilizzato per la sintesi dello complesso iniziale, particolarmente sensibile all'atmosfera che ne causa l'ossidazione.

Gli spettri infrarossi (IR) sono stati registrati su spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR, usando per gli spettri in fase liquida una cella di KBr (spessore 1.0 mm) e tecnica ATR per la fase solida; la precisione sul numero d'onda registrato è di  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ . Per la registrazione

degli spettri NMR si sono utilizzati gli spettrometri Varian Mercury 400 e Varian Inova 600 MHz.

**Lista dei solventi utilizzati:**

CPME (Ciclopentil Metil Etere)

Toluene

Acetone

THF (Tetraidrofurano)

DCM (Diclorometano)

Et<sub>2</sub>O (Etere Etilico)

Etere di petrolio

EtOH (Etanolo)

CDCl<sub>3</sub> (cloroformio deuterato)

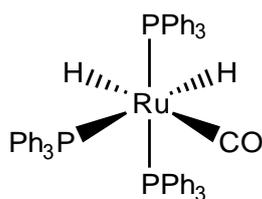
Pentano

Esano

CCl<sub>4</sub> (tetracloruro di carbonio)

DME (dimetossietano)

**Sintesi del complesso [Ru(CO)(H)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>[17]</sup> [1]**



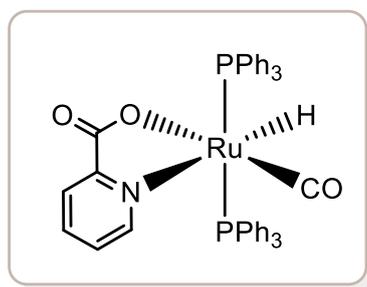
In un pallone a due colli da 250 mL, provvisto di refrigerante ed ancoretta magnetica, si dissolvono 0,524 g di RuCl<sub>3</sub>·xH<sub>2</sub>O (2,05 mmol) in 100 mL di EtOH; si scalda alla temperatura di riflusso per 10 minuti in atmosfera inerte di Argon. Si aggiungono quindi 2,002 g di PPh<sub>3</sub> (7,61 mmol), e si procede a riflusso per un'ora. La risultante sospensione scura [(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>RuCl<sub>2</sub>] viene lasciata raffreddare fino a temperatura ambiente per poi aggiungere 1,022g di KOH (15,56 mmol). Si agita quindi per un'ora a temperatura ambiente per omogeneizzare la miscela e successivamente si scalda ad una temperatura di

circa 62°. La soluzione di colore marroncino risultante viene lasciata reflussare per 14 ore fino ad ottenere la formazione di un precipitato di colore marrone ocra. Dopo raffreddamento si esegue la filtrazione mediante tecnica Schlenk. Il solido isolato viene lavato con aliquote di EtOH (4x10 mL), acqua deionizzata (4x10 mL) e nuovamente con EtOH (4x10 mL). Rimosse tramite sottovuoto le tracce di solvente, si ottiene un solido polveroso di colore marrone ocra, in cui verrà insufflato argon in modo da garantirne la stabilità nel tempo.

$^1\text{H-NMR}$  (400,0MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6,60-7,60 (m, 45H); -6,60 (tdd,  $J_{\text{H-H}} = 6\text{Hz}$ ,  $J_{\text{Pt-H}} = 31\text{Hz}$ ,  $J_{\text{Pc-H}} = 15\text{Hz}$ , 1H); -8,50 (dtd,  $J_{\text{H-H}} = 6\text{Hz}$ ,  $J_{\text{Pt-H}} = 79\text{Hz}$ ,  $J_{\text{Pc-H}} = 29\text{Hz}$ , 1H)

IR (ATR,  $\text{vcm}^{-1}$ ): 3056 m (C-H stretch); 1939 vs (CO); 1474 s ; 1434 vs ; 1088 s; 754 s; 682 vs; 521 vs.

**Sintesi di (k-N,O)[Ru(CO)H(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Py-2-COO)]**



Il complesso (k-N,O)[Ru(CO)H(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Py-2-COO)] è stato sintetizzato nella reazione tra [Ru(CO)(H)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] (200 mg, 0,218 mmoli) e acido picolinico (33 mg, 0,262 mmoli) in CPME (20 ml) attraverso l'uso di iMW. Dopo 20 minuti la soluzione viene analizzata tramite spettrometria IR e giudicata conclusa quando si valuta che la banda carbonilica del prodotto di partenza dopo il riscaldamento è scomparsa.

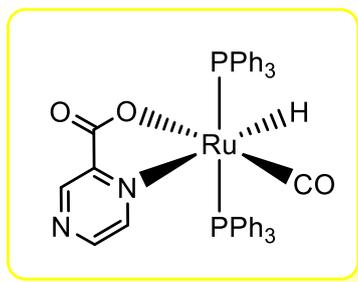
La miscela di reazione viene raffreddata, tirata a secco e filtrata su celite: prima vengono effettuati numerosi lavaggi con Et<sub>2</sub>O, infine il prodotto viene estratto con una miscela DCM/Et<sub>2</sub>O 2:1.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 6-8 ( $\text{H}_{\text{arom}}$ , Py/PPh<sub>3</sub>) ; -9,56 ( $t_{\text{Ru-H}}$ ,  $J_{\text{P-H}}=19,9$  Hz)

ATR ( $\text{vcm}^{-1}$ ): 3065 w (C-H stretch); 1915 vs (Ru-H) ; 1904 vs (CO) ; 1633 vs (stretch as.-COO) ; 1588 m (C=N;C=C) ; 1474 m (C-CH piano) ; 1434 m (P-Ph) ; 1333 m (stretch s. -COO) ; 1092 m (C-CH piano) ; 743 m (C-C fuori dal piano) ; 694 vs (C-C nel piano)

Resa:51%

**Sintesi di  $(k^2\text{-N,O})[\text{Ru}(\text{CO})\text{H}(\text{PPh}_3)_2(\text{Pyz-2-COO})][2]$**



Il complesso  $(k^2\text{-N,O})[\text{Ru}(\text{CO})\text{H}(\text{PPh}_3)_2(\text{Pyz-2-COO})]$  viene sintetizzato nella reazione tra  $[\text{Ru}(\text{CO})(\text{H})_2(\text{PPh}_3)_3]$  (200 mg, 0,218 mmoli) e acido pirazinoico (33 mg, 0,262 mmoli) in CPME (20 ml) in “reattore” a MW in cui è presente una piastrina in WEFLLON all’interno di un tubo in modo da scaldare il solvente . Dopo 20 minuti di riscaldamento si osserva la formazione di un precipitato di colore marrone. La soluzione viene analizzata tramite IR e giudicata conclusa quando si valuta che la banda carbonilica del prodotto di partenza dopo un’ora a riflusso è scomparsa.

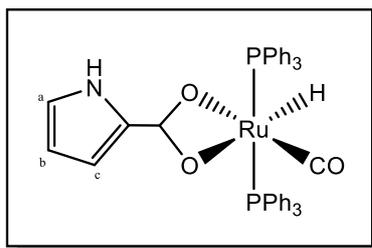
La miscela di reazione viene raffreddata, tirata a secco e filtrata su celite: prima vengono effettuati numerosi lavaggi con  $\text{Et}_2\text{O}$ , infine il prodotto viene estratto con una miscela DCM/ $\text{Et}_2\text{O}$  2:1. Il prodotto ottenuto è di colore giallo

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 6-9 ( $\text{H}_{\text{arom}}$ , Pyz/ $\text{PPh}_3$ ) ; -9,56 ( $t_{\text{Ru-H}}$ ,  $J_{\text{P-H}}=19,6$  Hz)

ATR ( $\text{v cm}^{-1}$ ): 3056 w (C-H stretch) ; 1976 w (Ru-H) ; 1927 vs (CO) ; 1675 vs (C=N; C=C) ; 1580 w (-COO stretch as.) ; 1474 m (C-CH nel piano) ; 1434 m (P-Ph) ; 1335 m (-COO stretch s.) ; 1092 m (C-CH nel piano) ; 744 m (C-C fuori dal piano) ; 693 vs (C-C nel piano)

Resa:63%

Sintesi di (k-N,O)[Ru(CO)H(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Pyr-2-COO)]



Il complesso (k-N,O)[Ru(CO)H(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Pyr-2-COO)] viene sintetizzato nella reazione tra [Ru(CO)(H)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] (200 mg, 0,218 mmoli) e acido picolinico (33 mg, 0,262 mmoli) in CPME (20 ml) in “reattore” ad MW. Dopo 20 minuti di riscaldamento si osserva la formazione di un precipitato di colore porpora. La soluzione viene analizzata con spettrometria IR e giudicata conclusa quando si valuta che la banda carbonilica del prodotto di partenza è scomparsa.

La miscela di reazione viene raffreddata, tirata a secco e filtrata su celite: prima vengono effettuati numerosi lavaggi con Et<sub>2</sub>O, infine il prodotto viene estratto con una miscela DCM/Et<sub>2</sub>O 2:1. Il prodotto ottenuto è di colore viola scuro

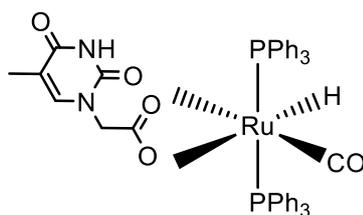
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 6-9 (H<sub>arom</sub>, Pyr/PPh<sub>3</sub>) ; Ru-H -16,76, -15,45, -16,4 (t<sub>Ru-H</sub>, J<sub>P-H</sub>=18 Hz); NH 8,4

ATR (δ cm<sup>-1</sup>): 3056 w (C-H stretch) ; 1976 w (Ru-H) ; 1924 vs (CO) ; 1662 vs (C=N; C=C) ; 1584 w (-COO stretch as.) ; 1480 m (C-CH nel piano) ; 1434 m (P-Ph) ; 1333 m (-COO stretch s.) ; 1096 m (C-CH nel piano) ; 744 m (C-C fuori dal piano) ; 693 vs (C-C nel piano)

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 205,9 (CO) ; 172,5 (COO) ; 125-138 (C-H<sub>arom</sub>, C<sub>q</sub>)

Resa:53%

Sintesi (k<sup>2</sup>-O)[Ru(CO)H(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>THAc]



(k<sup>2</sup>-O)[Ru(CO)H(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>THA]

Vengono pesati 200 mg di **[1]** con 44 mg di THA (timina acido acetico) e posti in un pallone provvisto di refrigerante a bolle. La reazione procede a refluxo per circa 3h e 30' fino alla completa scomparsa della banda carbonilica relativa al complesso **[1]**. Una volta avvenuto ciò il grezzo di reazione viene tirato a secco e lavato abbondantemente con Et<sub>2</sub>O in modo da rimuovere la fosfina in eccesso oltre che a "striappare" le tracce di toluene rimaste nel prodotto. Successivamente il grezzo viene filtrato su colonna contenente celite e rilavato con abbondanti lavaggi di etere etilico per rimuovere la fosfina libera in eccesso. Il solido rimasto su celite viene filtrato con una miscela di DCM ed etere etilico (3:1). La soluzione di colore scuro viene tirata a secco e lavata nuovamente con 5 aliquote da 5ml di etere etilico alternate ad etere di petrolio.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): CH(4.4) CH<sub>2</sub> (4.3; 2.2), Ru-H (-16.5)

ATR (ν cm<sup>-1</sup>): 3052 w (C-H stretch); 1962 vs (CO) ; 1685 w (-COO stretch as.) ; 1459 m (C-CH nel piano) ; 1434 m (P-Ph) ; 1336 m (-COO stretch s.) ; 1095 m (C-CH nel piano) ; 746 m (C-C fuori dal piano) ; 695 vs (C-C nel piano)

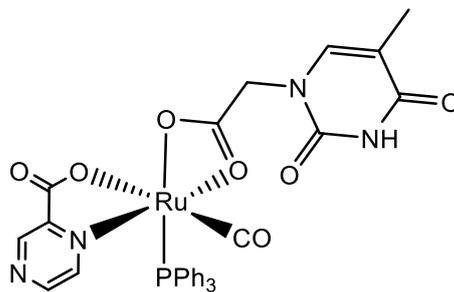
<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 169,5 (COO) ; 125-138 (C-H<sub>arom</sub>, C<sub>q</sub>)

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (161,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δppm): 46,9 / 43,4 (d, PPh<sub>3</sub>)

ESI(MeOH): 837 [(M/z)<sup>+</sup>]

Resa:67%

Sintesi (k<sup>2</sup>-O)[Ru(CO)Pvz.(PPh<sub>3</sub>)THA][2a]



La sintesi è stata realizzata per via termica con la tecnica del riscaldamento a riflusso (110 C). Nel pallone provvisto di ancoretta magnetica vengono posti 118mg di complesso [2] e 22 mg di THA (timina acido acetico) e sciolti in 20 ml di toluene. La reazione procede a riflusso per 2h fino alla completa scomparsa della banda carbonilica del complesso [2]. La soluzione di colore arancione viene tirata a secco e lavata con abbondanti quantità di aliquote (5ml) di etere di petrolio/etere etilico per strappare completamente le ultime tracce di toluene rimaste. Il grezzo viene fatto filtrare su celite. Il prodotto maggioritario si presenta di colore arancio solubile in DCM. Il prodotto viene seccato sotto vuoto ed analizzati all'ATR.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): CH(5,5) CH<sub>2</sub> (3,62 3,05)

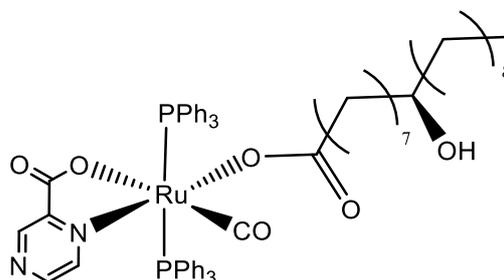
<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (161,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 37,97 / 34,04 (d, PPh<sub>3</sub>) J=17Hz

ATR (vcm<sup>-1</sup>): 3059 m (C-H stretch) ; 1958 s (CO) ; 1660 s (COO-) 1434 vs (P-Ph) ; 1093 s (C-CH nel piano) ; 720 (C-C fuori dal piano) ; 694 vs (C-C nel piano)

ESI(MeOH): 719 [(M/z)<sup>+</sup>]

Resa:52%

Sintesi (*k<sub>1</sub>-O*)[Ru(CO)Pyz.(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>HSA][2b]



La sintesi è stata realizzata ponendo in un pallone da 250ml, provvisto di ancoretta magnetica, 107mg di complesso [2] e 36mg di HSA (acido 9R-idrossistearico) in 20 ml di toluene. La reazione procede per via termica a riflusso per circa 24h, fino alla scomparsa della banda carbonilica di [2]. La soluzione di colore marrone viene tirata a secco e lavata con abbondanti aliquote di etere di petrolio/etere etilico. Il grezzo viene fatto filtrare su colonna contenente celite in cui viene fatto passare Et<sub>2</sub>O. La soluzione che si ottiene di colore giallo viene tirato a secco e lavata ulteriormente con abbondanti aliquote di etere di petrolio/etere etilico. Infine il prodotto viene analizzato all'ATR in modo da valutare la sua purezza e lo spostamento della banda carbonilica.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): CH<sub>3</sub> (1,05); CH<sub>2</sub> (2,18) NH(8,4; 8,62; 8,95)

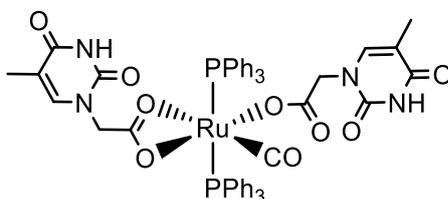
<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (161,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 37,21 / 34,73 (d, PPh<sub>3</sub>)

ATR (vcm<sup>-1</sup>): 3058 m (C-H stretch) ; 2914 m (CH<sub>2</sub>) 1962 s (CO) ; 1666-1698 s (COO-) ; 1469 m (C-CH nel piano) ; 1436 vs (P-Ph) ; 1093 s (C-CH nel piano) ; 720 (C-C fuori dal piano) ; 643 vs (C-C nel piano)

ESI(MeOH): 1097 [(M/z)<sup>+</sup>]

Resa:35%

Sintesi ( $k^1$ -O)( $k^2$ -O,O)[Ru(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(THA)<sub>2</sub>]



Vengono pesati 202 mg di [1] con 88mg di THA (timina acido acetico) e posti in un pallone provvisto di refrigerante a bolle. La reazione procede a refluxo per circa 4h fino alla completa scomparsa della banda carbonilica relativa al prodotto di partenza. Una volta avvenuto ciò il grezzo di reazione viene tirato a secco e lavato abbondantemente con Et<sub>2</sub>O in modo da rimuovere la fosfina in eccesso oltre che a “striappare” le tracce di toluene rimaste nel prodotto. Successivamente il grezzo viene filtrato su colonna contenente celite e rilavato con abbondanti lavaggi di etere etilico per rimuovere la fosfina libera in eccesso. Il solido rimasto su celite viene filtrato con una miscela di DCM ed etere etilico (3:1). La soluzione di colore scuro viene tirata a secco e lavata nuovamente con 5 aliquote da 5ml di etere etilico alternate ad etere di petrolio. Infine viene aggiunto acetone alla soluzione tirata a secco. Dopo circa 30 minuti si osserva la formazione di un precipitato bianco contenente una soluzione surnatante di colore verde. Una volta separata la soluzione surnatante, si procede per precipitazioni successive in modo da ottenere il solido bianco isolato.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO) δ(ppm): CH(6,66; 6,69; 6,84) CH<sub>2</sub> (4,16; 4,06; 3,92)

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): (CO) non presente; 163,9 (COO-THAcH) ; 161,5 (COO-THAcH) 134-128 (C-H<sub>arom</sub>, C<sub>q</sub>); 112,1 (C(CH<sub>3</sub>)); 96,1 (CH(THAcH)), 71,8(N-CH<sub>2</sub> k<sup>2</sup>); 60,4 (N-CH<sub>2</sub> k<sup>1</sup>), 48,8 (CH<sub>3</sub> k<sup>2</sup>); 29,7 (CH<sub>3</sub> k<sup>1</sup>)

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (161,9 MHz, DMSO) δppm: 46,6 / 41,7 (s, PPh<sub>3</sub>)

ESI(MeOH): 1042 [(M/z)<sup>+</sup>]

Resa=62%

### Sintesi $k^2(N,O)/Ru(CO)(H)Immin.(PPh_3)_2$

Il complesso viene sintetizzato nella reazione tra [1] (200 mg, 0,218 mmoli) ed acetofenonidene-2-idrossianilina (50 mg, 0,262 mmoli) in EtOH (20 ml) tramite sollecitazione MW. Dopo 90 minuti di riscaldamento si osserva la formazione di un precipitato di colore porpora. La soluzione viene analizzata con spettrometria IR e giudicata conclusa quando si valuta che la banda carbonilica del prodotto di partenza è scomparsa. La miscela di reazione viene raffreddata, tirata a secco e filtrata su celite: prima vengono effettuati numerosi lavaggi con Et<sub>2</sub>O, infine il prodotto viene estratto con una miscela DCM/Et<sub>2</sub>O 1:1. Il prodotto ottenuto è di colore viola.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): CH<sub>arom</sub>.7.0-6.2 (m) CH<sub>3</sub> 2.2 (s)

ATR (vcm<sup>-1</sup>): 3053 m (C-H stretch) ; 1904 s (CO) ; 1597 s (CO<sub>fenolo</sub>) ; 1478 m (C-CH nel piano) ; 1433 vs (P-Ph) ; 1093 s (C-CH nel piano) ; 740 (C-C fuori dal piano) ; 692 vs (C-C nel piano)

### Sintesi Acido-(R)9-Idrossistearico<sup>[18]</sup>

L'acido-(R)-9-idrossistearico è una molecola organica sintetizzata in laboratorio in più stadi:

Inizialmente si pesano 12,014g di semi di *Dimorphoteca sinuata* L., macinati, quindi inseriti in un pallone a tre colli con una miscela CHCl<sub>3</sub>/Et<sub>2</sub>O (rapporto 2/1; 300 mL).

La miscela viene lasciata sotto agitazione per 24 ore al buio.

Il residuo solido proveniente dai semi viene filtrato sotto vuoto, e nella beuta codata viene raccolto il liquido di estrazione a cui viene aggiunta una soluzione HCl 0,1M/NaCl 0,1 M (rapporto 1/1; 40 mL).

Vengono effettuate estrazioni, attraverso l'uso di un imbuto separatore, con cloroformio (3x20 mL) al fine di recuperare tutto il prodotto grezzo e le fasi organiche riunite vengono successivamente anidificate su sodio solfato anidro e, dopo filtrazione, il sovente viene rimosso sotto vuoto. Si ottiene un olio contenente esteri fra il glicerolo e acidi grassi di diversa natura.

Durante la fase di transesterificazione l'olio viene disciolto in 40 mL CH<sub>3</sub>OH, quindi si aggiunge CH<sub>3</sub>ONa (2,351 g, 0,043 mol) alla miscela di reazione precedentemente raffreddata in un bagno di ghiaccio, e si lascia reagire per 4 ore sotto agitazione al fine di effettuare una reazione di transesterificazione per ottenere i corrispondenti esteri metilici.

Si aggiungono quindi 20 mL di H<sub>2</sub>O e 15 mL di HCl 0,1 M, quindi vengono effettuate estrazioni, attraverso l'uso di un imbuto separatore, con n-esano (3x40 mL). Il prodotto quindi viene anidrificato su sodio solfato anidro, filtrato e tirato a secco.

Successivamente si procede all'idrogenazione della miscela di prodotti contenenti insaturazioni. Il residuo grezzo proveniente dalla precedente reazione di transesterificazione viene sciolto in 25 mL di acetato di etile, addizionato con il catalizzatore di Adams e fatto reagire per un'ora in apparato idrogenatore di Parr.

La reazione viene controllata all'<sup>1</sup>H-NMR e viene giudicata conclusa quando non sono più presenti i segnali caratteristici dei doppi legami.

Al fine di separare la fase liquida dal catalizzatore solido, viene effettuata una filtrazione su celite. La fase liquida contenente i vari esteri saturi viene tirata a secco.

Al fine di isolare il solo prodotto desiderato effettuiamo una separazione su colonna, utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente una miscela etere di petrolio/etere etilico (rapporto 7/3).

Il contenuto delle provette di raccolta dell'eluato viene analizzato mediante TLC al fine di selezionare solo le frazioni contenenti l'estere metilico dell'acido (*R*)-9-idrossistearico, quindi raccolte in un pallone e concentrate. Si effettua un ulteriore controllo all'<sup>1</sup>H-NMR per verificare che la separazione sia andata a buon fine.

Il prodotto viene sciolto in CH<sub>3</sub>OH (20 mL) e fatto reagire con KOH a temperatura ambiente per 3 ore sotto agitazione. La soluzione viene tirata a secco. Il solido viene disciolto in 20 mL di H<sub>2</sub>O, acidificato con HCl 0,1 M fino ad un pH circa 3, quindi vengono effettuate estrazioni, attraverso l'uso di un imbuto separatore, con acetato di etile (3x40 mL). Il prodotto quindi viene anidrificato su sodio solfato anidro, filtrato e tirato a secco.

Il residuo viene cristallizzato sciogliendolo nella minor quantità di CH<sub>3</sub>OH a caldo e lasciato raffreddare sino a temperatura ambiente. I cristalli vengono raccolti per filtrazione e analizzati.

(Resa: 60%). P.f : 78.4-79.3 °C

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 4,73 (br.s, 1H, OH); 3,66-3,54 (m, 1H, CHOH); 2,37 (t,  $J=7,8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 1,63 (quint, 2H,  $J=7\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,60-1,23 (m, 27H, CH alifatici e OH); 0,89 (t,  $J=6,8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 178.7, 72.0, 37.5, 37.4, 33.5, 31.9, 29.7, 29.6 (2 segnali sovrapposti), 29.4, 29.3, 29.2, 29.0, 25.7, 25.5, 24.7, 22.7, 14.1.

MS (m/z): 283(15), 282 ( $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ , 30), 264(17), 155 (100)

### **Sintesi 2-((1-phenyletilidene)immino)fenolo.**

Vengono pesati 1,64 g di 2-idrossianilina con 1,75 mL di acetofenone e posti in un palloncino da 25 mL, provvisto di refrigerante Dean Stark. La miscela viene solubilizzata in 10 mL di toluene. Successivamente si procede a riflusso per 60' fino alla formazione di un precipitato di colore arancio acceso. Il solido precipitato viene privato della soluzione surnatante e tirato a secco fino ad ottenere dei cristalli. Il prodotto viene ulteriormente purificato tramite lavaggi con  $\text{Et}_2\text{O}$ .

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (ppm): 8.0-6.7 (m, CH aromatici), 2.43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.1 (s, 1H, OH).

### **Calcoli computazionali**

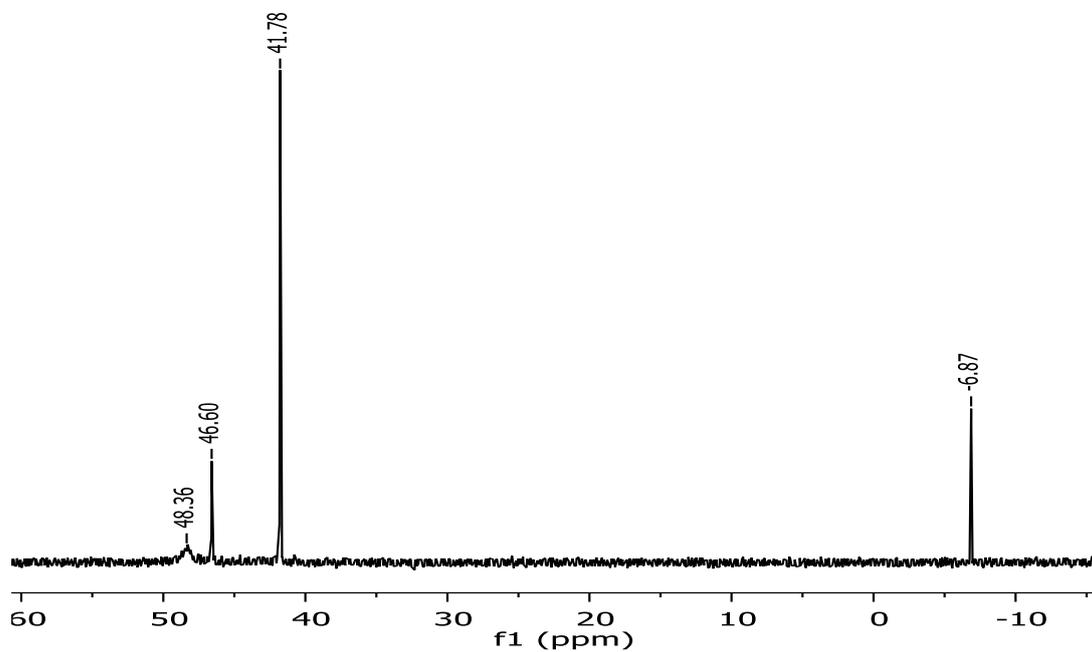
I calcoli DFT sono stati eseguiti utilizzando il software Molpro2010. A causa delle dimensioni delle specie coinvolte, le ottimizzazioni della geometria e i calcoli di energia libera (a 298 K) sono stati effettuati con la base stretta piccola e con il funzionale B3LYP. Ulteriori calcoli di energia a punto singolo sono stati eseguiti per la valutazione delle geometrie con la più ampia base def2-TZP e lo stesso funzionale. L'energia finale di ciascuna struttura, utilizzata per valutare le relative energie libere dei vari prodotti e intermedi, è stata costruita sommando la differenza tra l'energia elettronica LANL2DZ e le energie libere per l'energia elettronica def2-TZP. Tutti i calcoli sono stati eseguiti "in vuoto", cioè senza considerare l'effetto della costante dielettrica del solvente.

## **Cristallografia a raggi X**

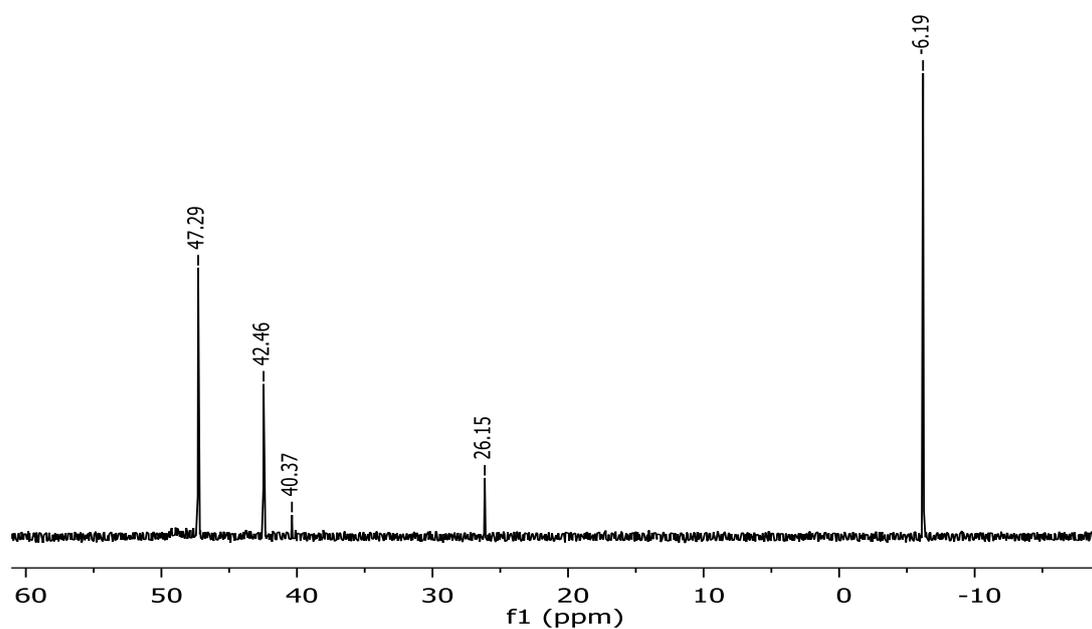
I dati sull'intensità dei raggi X sono stati misurati su un diffrattometro CCD Bruker Apex II. Le dimensioni delle celle e la matrice di orientamento sono state inizialmente determinate da un raffinamento dei minimi quadrati su riflessioni misurate in tre serie di 20 esposizioni, raccolte in tre diverse regioni  $\omega$  e infine perfezionate rispetto a tutti i dati. Una sfera piena di spazio reciproco è stata scansionata con incrementi di  $0,3^\circ \omega$ . Il software SMART è stato utilizzato per la raccolta di frame di dati, indicizzazione riflessioni e determinazione dei parametri reticolo. I frame raccolti sono stati quindi elaborati per l'integrazione dal programma SAINT, 13 e una correzione di assorbimento empirico è stata applicata utilizzando SADABS. Le strutture sono state risolte con metodi diretti (SIR 97) con successive sintesi di Fourier e perfezionate con minimi quadrati a matrice intera su F2 (SHELXTL) utilizzando parametri termici anisotropi per tutti gli atomi di non idrogeno. La struttura conteneva spazio vuoto significativo ( $527 \text{ \AA}^3$ ) e densità di elettroni residua che non poteva essere modellata in modo significativo; quindi è stata impiegata la routine SQUEEZE di PLATON.

## ALLEGATI

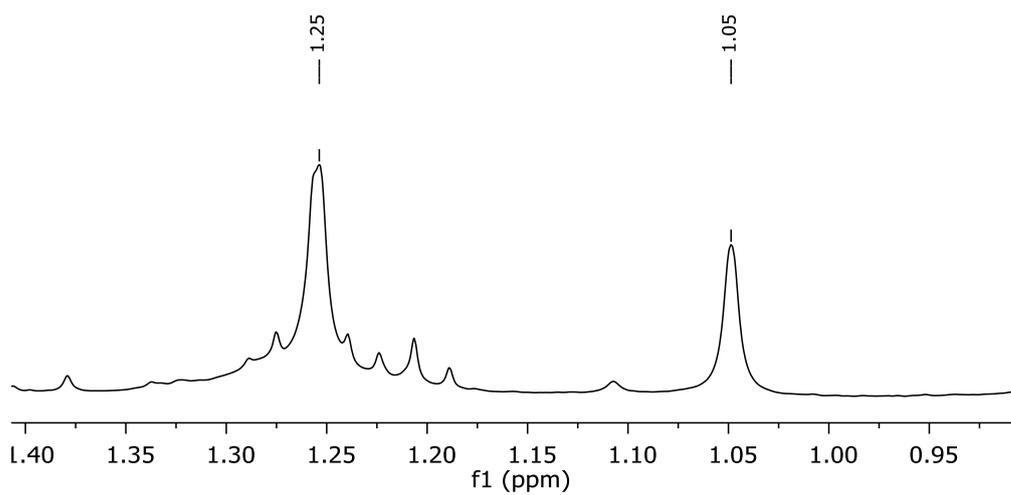
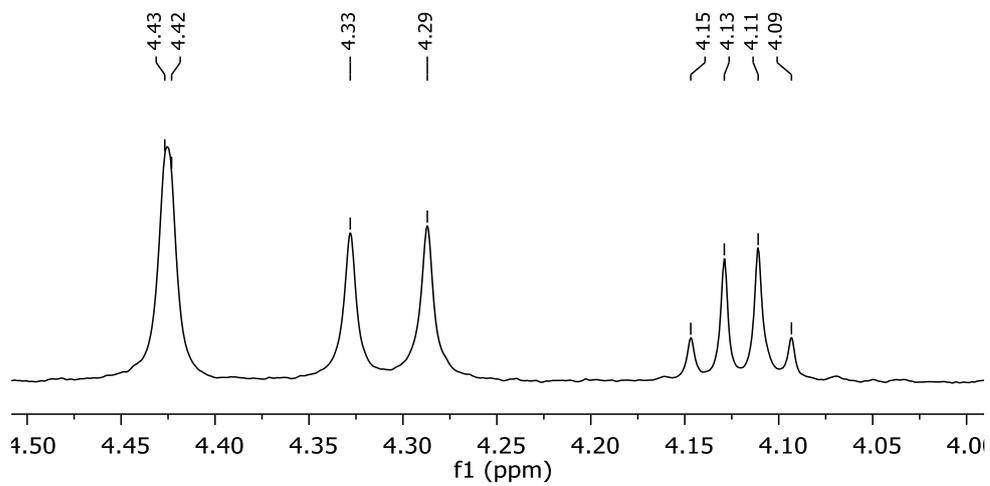
**Allegato A:**  $^{31}\text{P}$  (DMSO)  $(k^1\text{-O})(k^2\text{-O,O})[\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2\text{THA}_2]$  cinque giorni dopo la sintesi



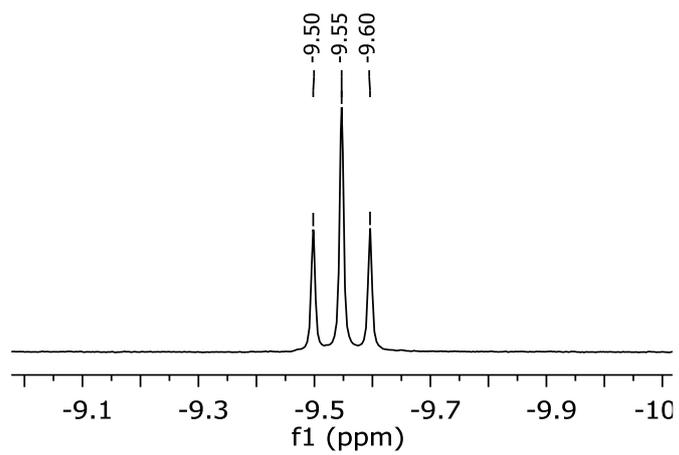
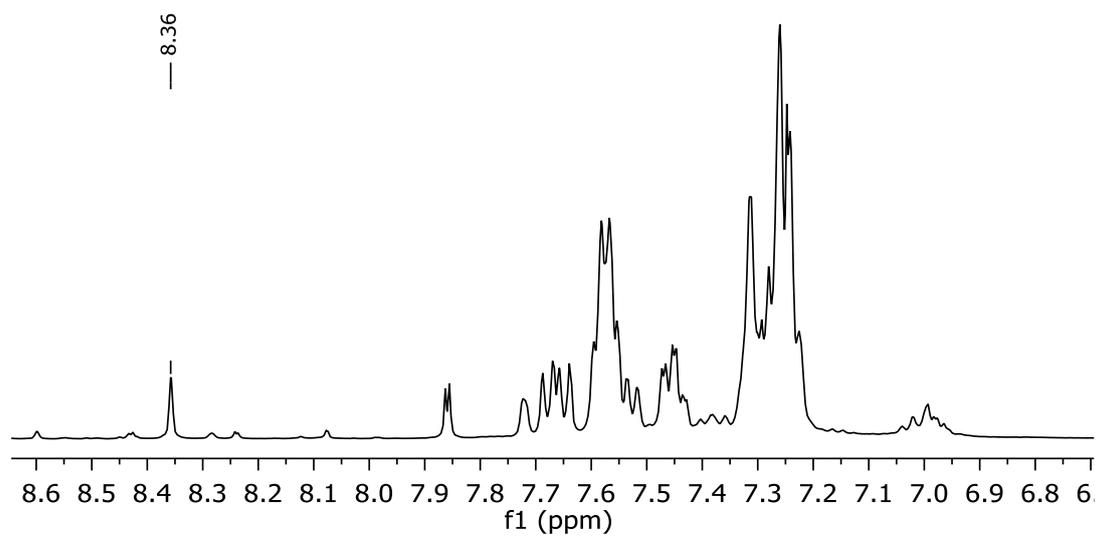
**Allegato B:**  $^{31}\text{P}$  (DMSO)  $(k^1\text{-O})(k^2\text{-O,O})[\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2\text{THA}_2]$  14 giorni dopo la sintesi



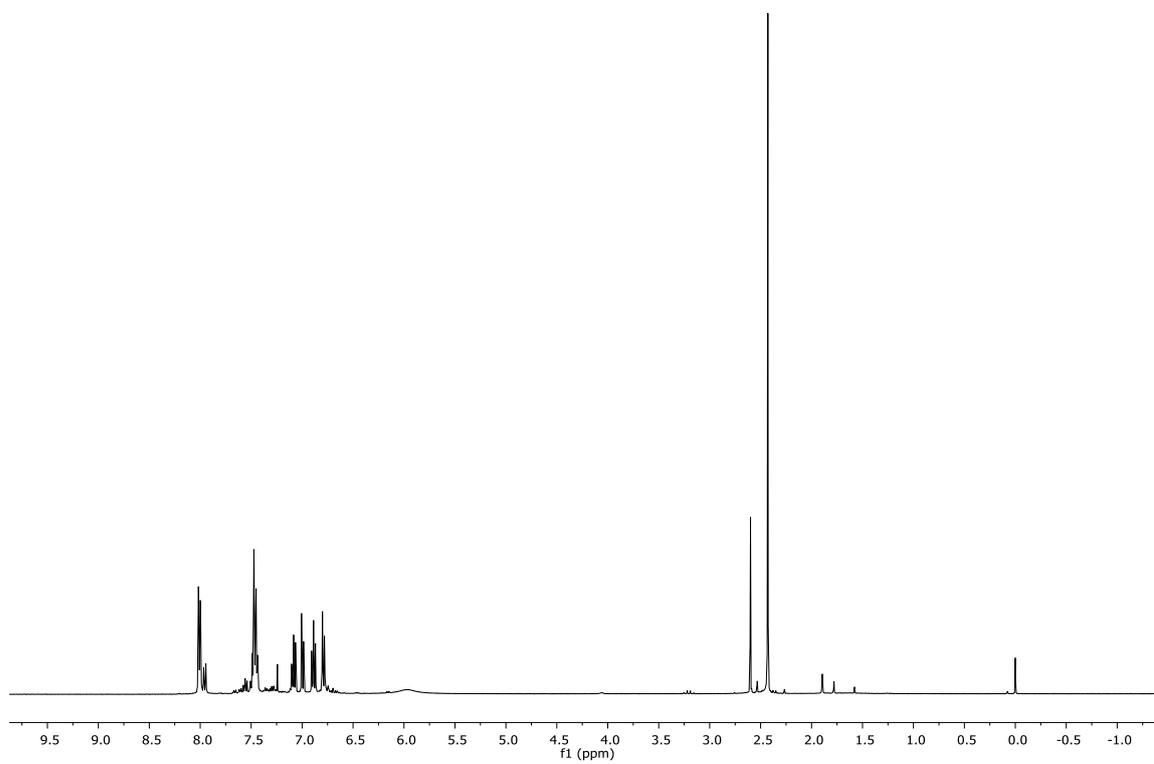
**Allegato C:**  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\text{k}^1\text{-O}$ )( $\text{k}^2\text{-O,O}$ )[ $\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2\text{THA}_2$ ]



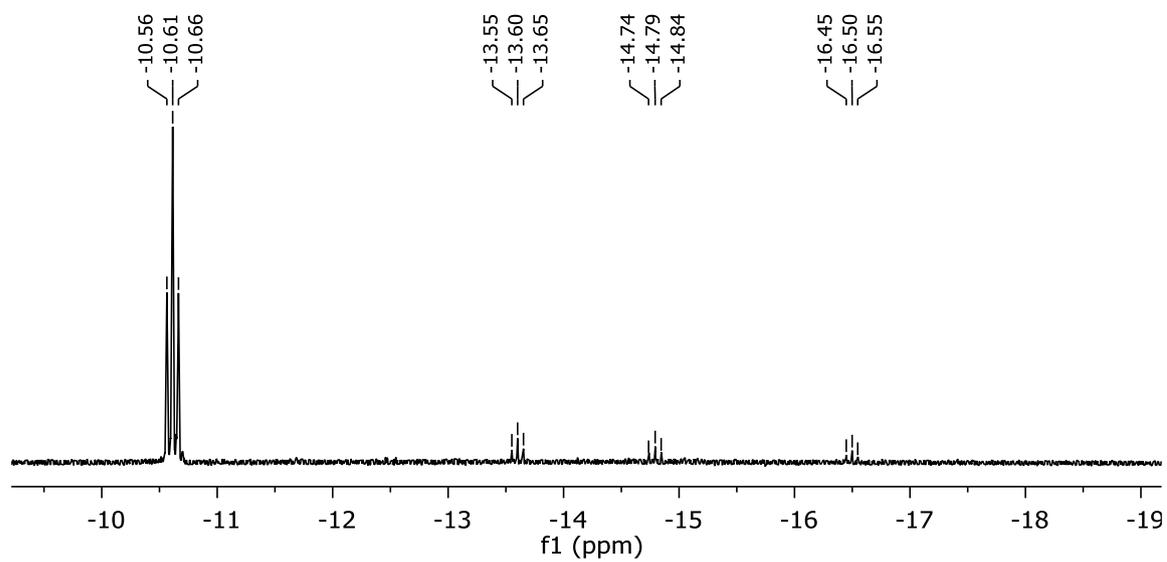
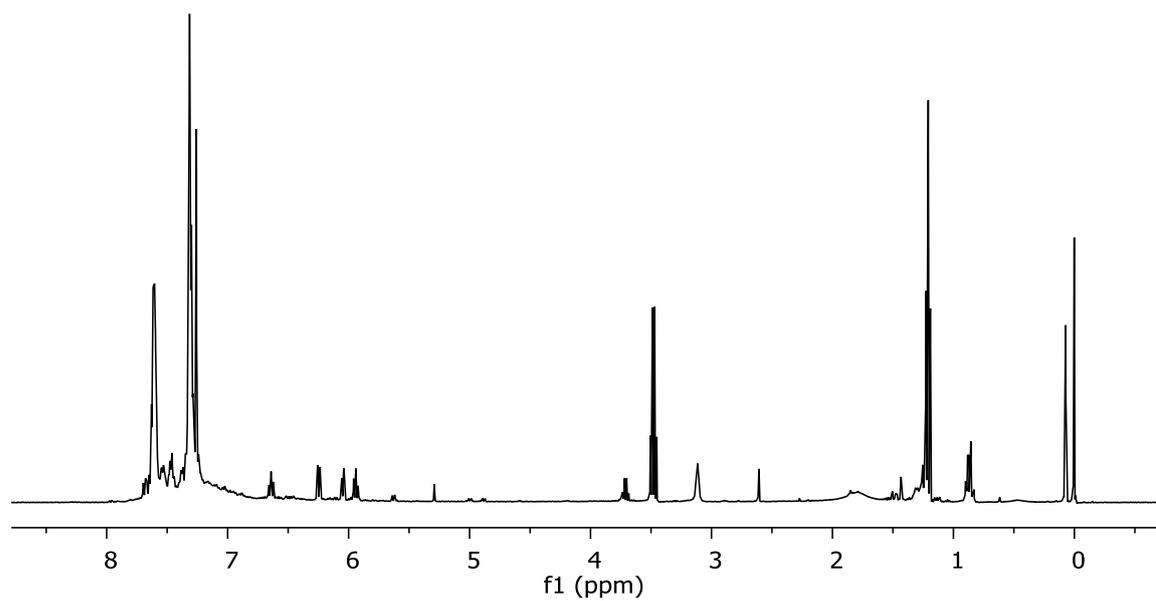
**Allegato D:  $^1\text{H-NMR}$  [2] ( $\text{CDCl}_3$ )**



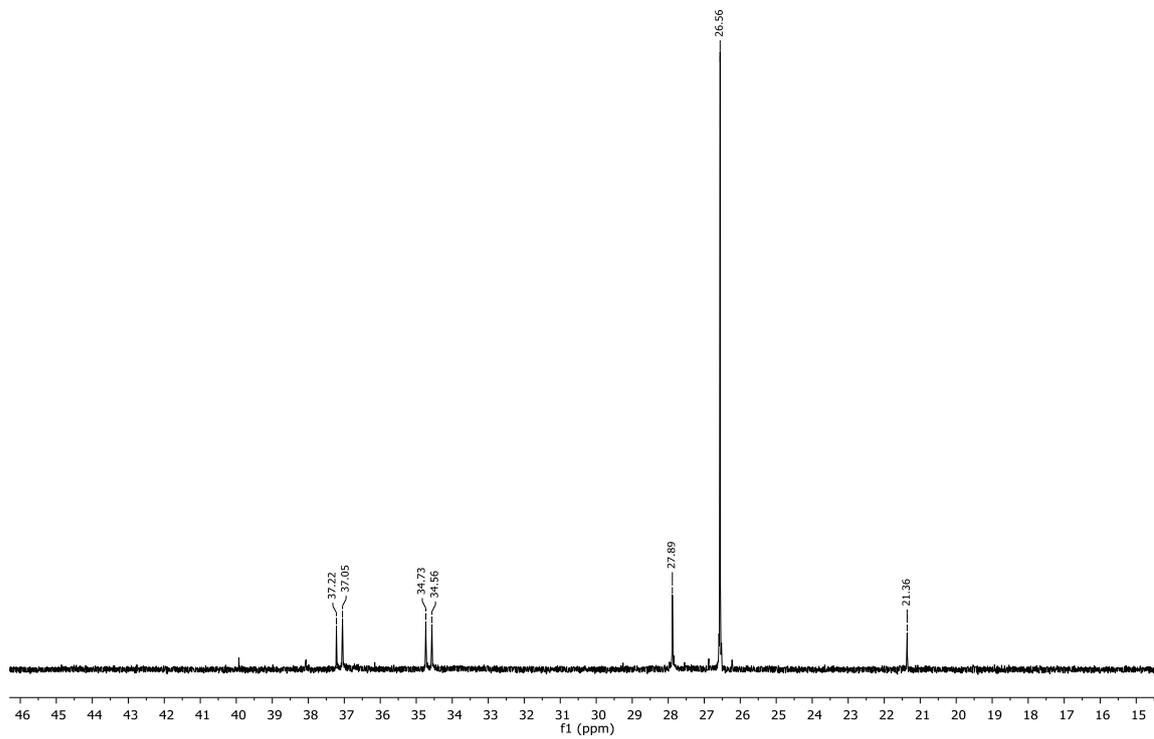
**Allegato E:**  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 2-((1-phenyletilidene)immino)fenolo).



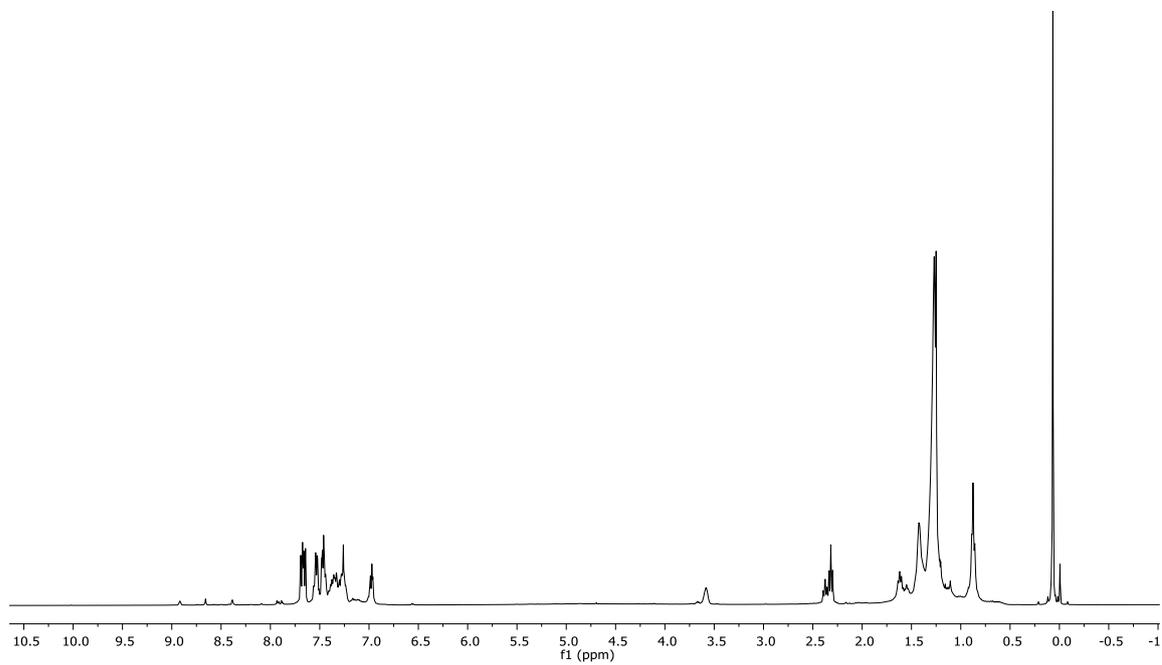
**Allegato F:**  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\text{k}^2(\text{N,O})[\text{Ru}(\text{CO})(\text{H})\text{Immin.}(\text{PPh}_3)_2]$



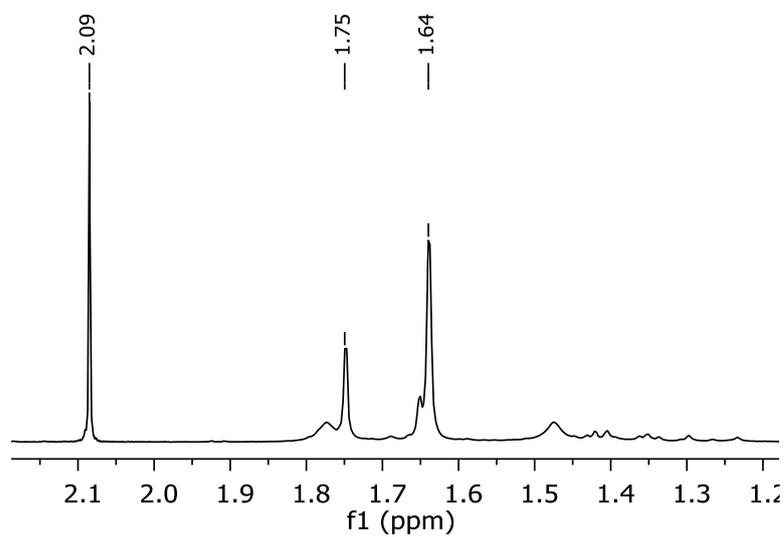
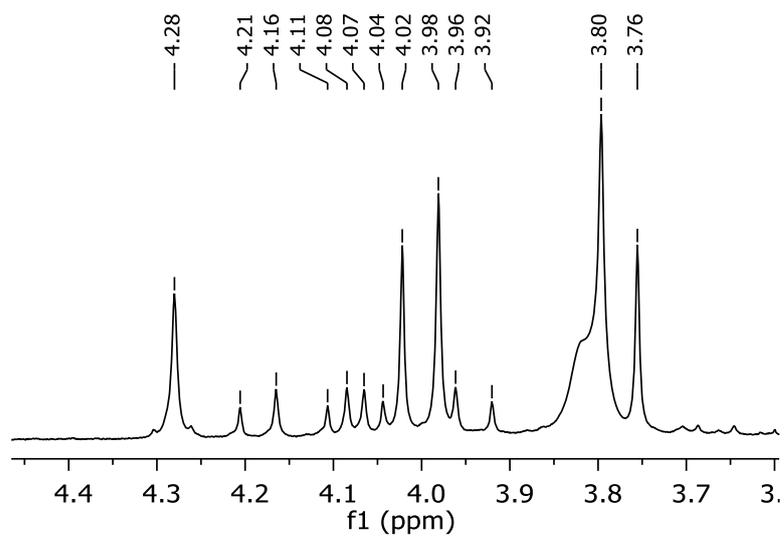
**Allegato G:**  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $k^1\text{-O}$ )/ $k^2(\text{O},\text{O})[\text{Ru}(\text{CO})\text{Pyz}(\text{PPh}_3)_2\text{HSA}]$



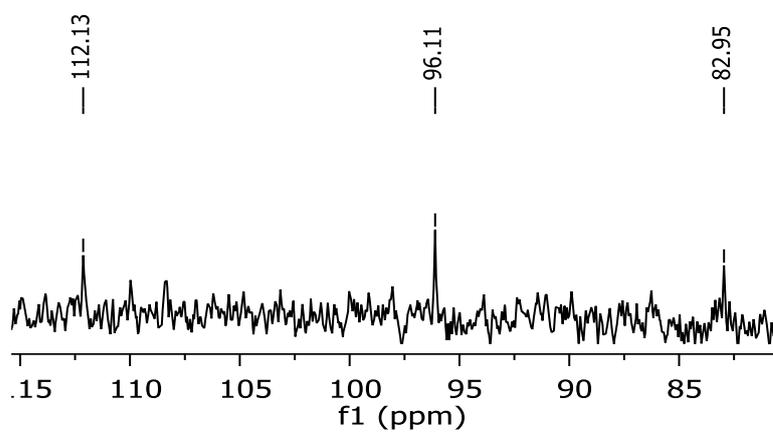
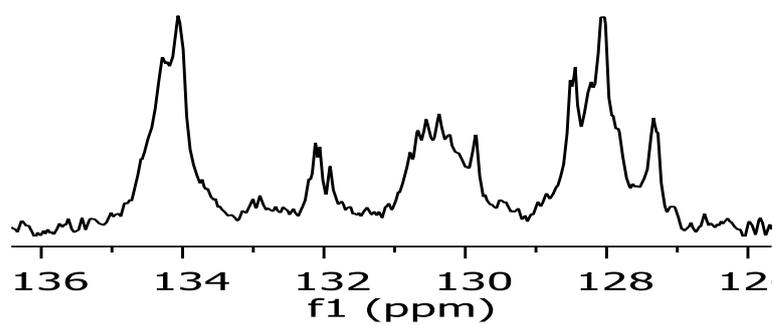
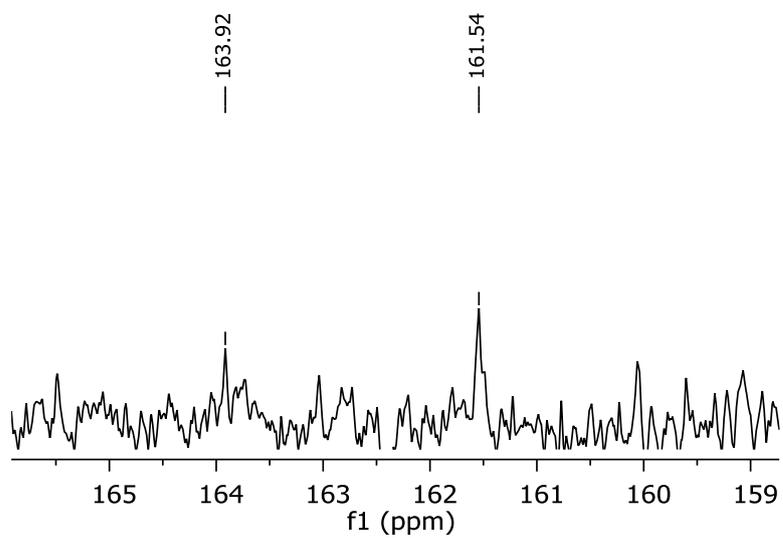
**Allegato H:**  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $k_1\text{-O}$ )[ $\text{Ru}(\text{CO})\text{Pyz}(\text{PPh}_3)_2\text{HSA}$ ]

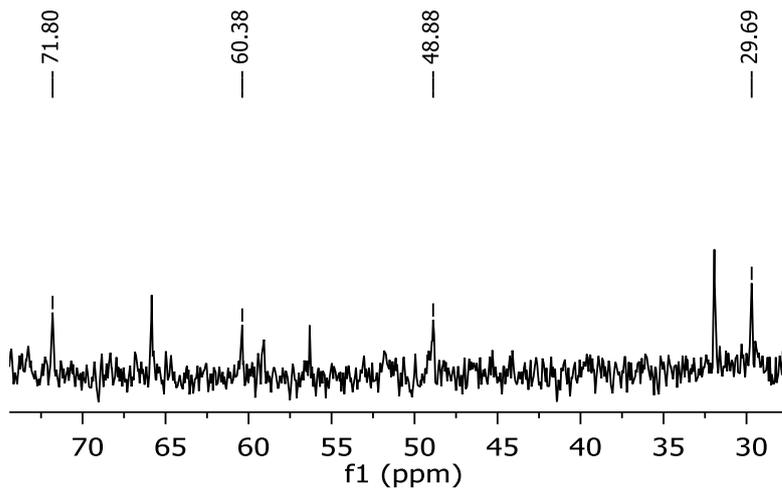


**Allegato I:**  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO) ( $k^1\text{-O}$ )( $k^2\text{-O,O}$ )[Ru(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(THA)<sub>2</sub>]

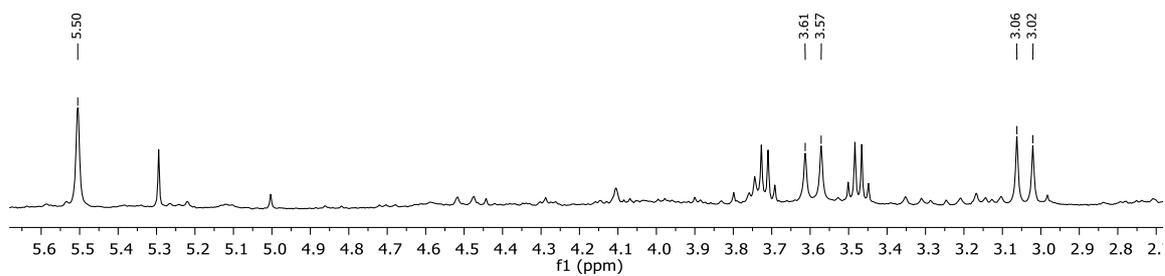
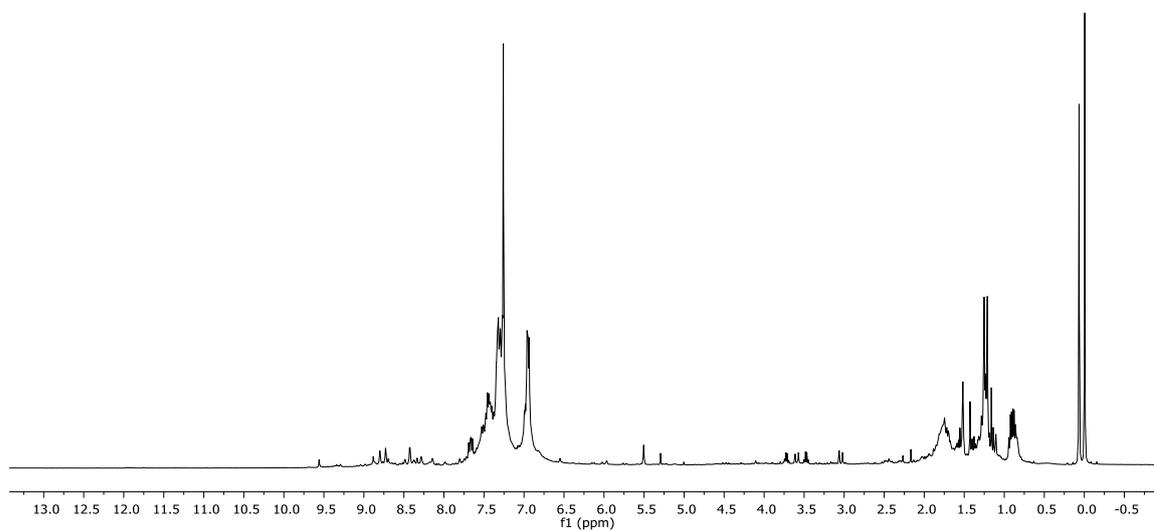


**Allegato J:**  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\text{k}^1\text{-O}$ )( $\text{k}^2\text{-O,O}$ )[ $\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2(\text{THA})_2$ ]

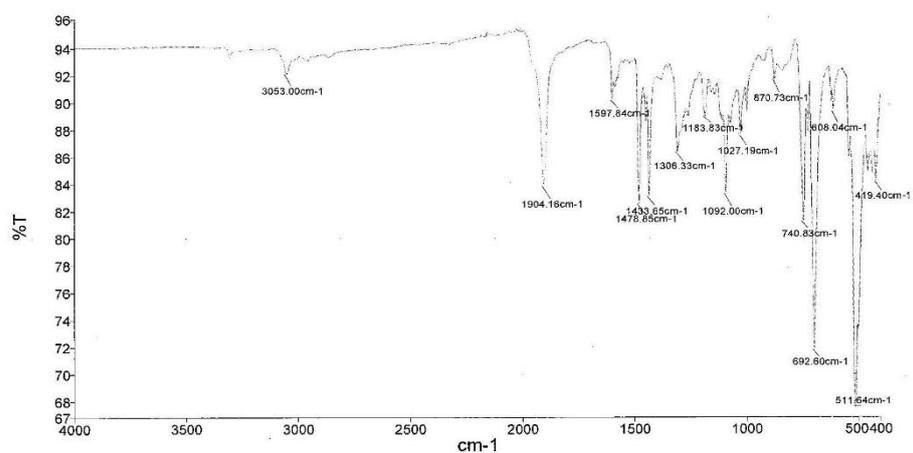




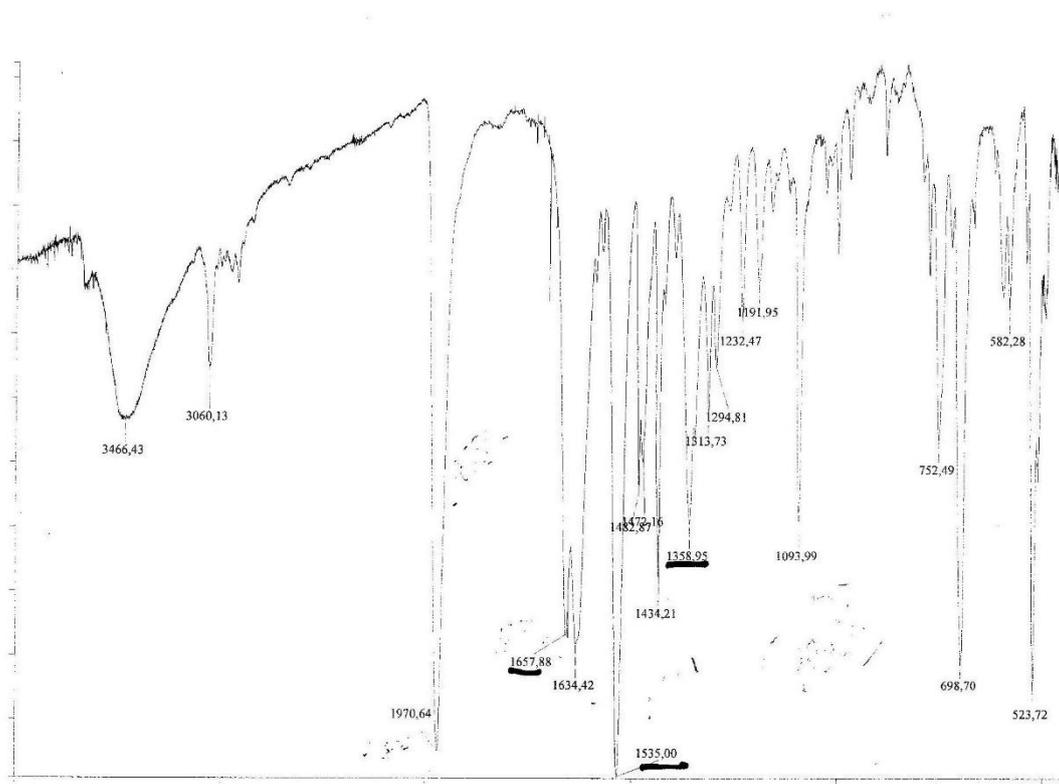
**Allegato K:**  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\text{k}^2\text{-O}$ ) $[\text{Ru}(\text{CO})\text{Pyz}(\text{PPh}_3)\text{THA}]$



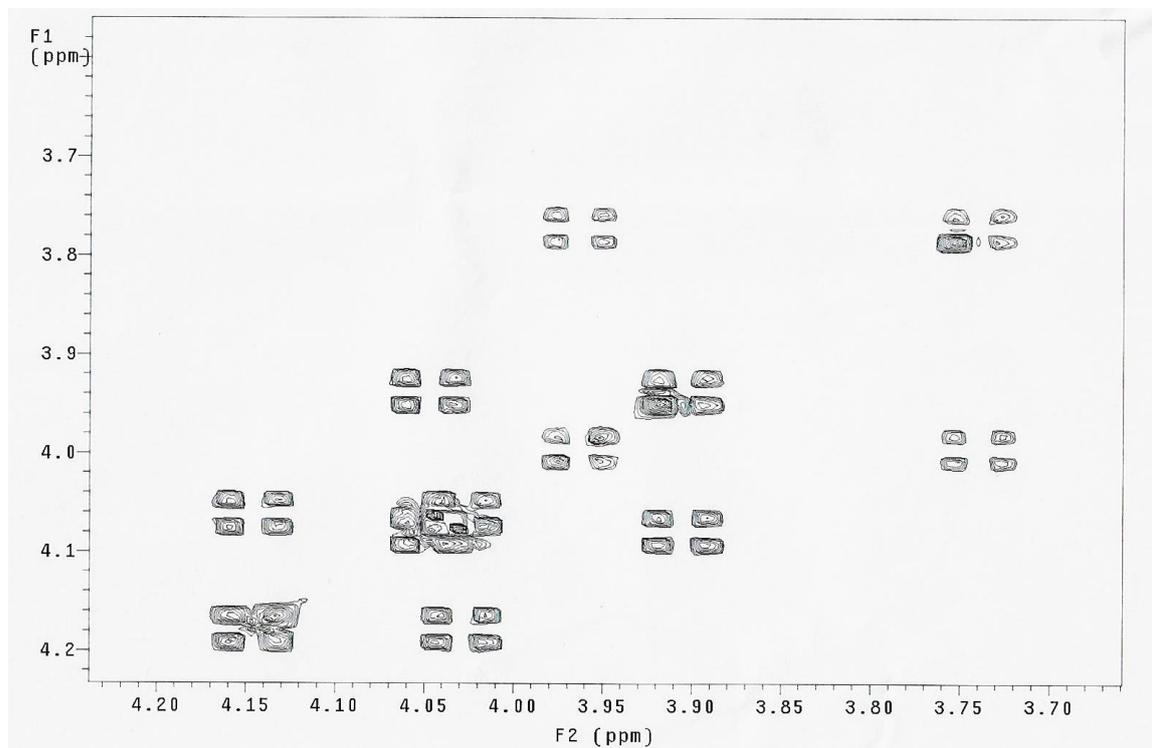
**Allegato L: ATR  $k^2(N,O)[Ru(CO)(H)Immin.(PPh_3)_2]$**



**Allegato M: IR(KBr)  $(k^1-O)(k^2-O,O)[Ru(CO)(PPh_3)_2THA_2]$**



**Allegato N: COSY ( $k^1$ -O)( $k^2$ -O,O)[Ru(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>THA<sub>2</sub>]**



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Wei Su; Yuchun Li; Peiyuan Li; Design of Ru-arene complexes for antitumor drugs, Mini review in Medicinal Chemistry, **2018**, 18, 184-193
- 2) Yang Zhang, Wei Zheng, Qun Luo, Yao Zhao, Erlong Zhang, Suyan Liu and Fuyi Wang; Dual-targeting organometallic ruthenium(II) anticancer complexes bearing EGFR-inhibiting 4-anilinoquinazoline ligands; Dalton Trans., **2015**, 44, 13100
- 3) Simon Page; Ruthenium Compounds as anticancer agent; Education in Chemistry; January **2012**
- 4) Rodrigo S. Correa, Vitoria Freire, a Maria I. F. Barbosa, Daniel P. Bezerra, Larissa M. Bomfim, Diogo R. M. Moreira, Milena B. P. Soares, de Javier Ellena and Alzir A. Batista; Ru(II)-thymine complexes: new metallodrug candidates against tumor cells; *New J. Chem.*, **2018**, 42, 6794
- 5) H. samouei, V.V. Grushin, New, Highly efficient, Simple, Safe, and Scalable Synthesis of  $[(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{Ru}(\text{CO})\text{H}_2]$ , *Organometallics* **2013**, 32 (15), p.4440-4443
- 6) C. O. Kappe, *Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry*, in *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, **2008**, pp. 1127-1139
- 7) Cristina Cossettini; Tesi di Laurea Studio della sintesi del perossiacetilnitrito (PAN) nella troposfera mediante metodi quantomeccanici ab initio; Università degli Studi di Udine; AA 2007-2008
- 8) Galeotti, T.; Borrello, S.; Masotti, L. Oxygen radicals: Systemic events and disease processes (eds. Das, D.K.; Essman, W.B.), Karger, Basel, **1990**, 129-148
- 9) Casali, E.; Cavalli, G.; Spisni, A.; Masotti, L. Identification of the peroxidation product hydroxystearic acid in Lewis lung carcinoma cells, *Rec. Adv. Cell. Mol. Biol.*, **1992**, 6, 245-250.
- 10) Calonghi, N.; Cappadone, C.; Pagnotta, E.; Boga, C.; Bertucci, C.; Fiori, J.; Tasco, G.; Casadio, R.; Masotti, L. Histone deacetylase 1: a target of 9-hydroxystearic acid in the inhibition of cell growth in human colon cancer. *J. Lipid Res.*, **2005**, 46, 1596-1603.
- 11) Parolin, C.; Calonghi, N.; Presta, E.; Boga, C.; Caruana, P.; Naldi, M.; Andrisano, V.; Masotti, L.; Sartor, G. Mechanism and stereoselectivity of HDAC I inhibition by (R)-9-hydroxystearic acid in colon cancer. *BBA*, **2012**, 1821, 1334-1340.
- 12) Boanini, E.; Torricelli, P.; Boga, C.; Micheletti, G.; Cassani, M.C.; Fini, M.; Bigi,

- A. (9R)-9-hydroxystearate-functionalized hydroxyapatite as anti-proliferative and cytotoxic agent toward osteosarcoma cells. *Langmuir*, **2016**, 32, 188-194.
- Busi, A.; Aluigi, A.; Guerrini, A.; Boga, C.; Sartor, G.; Calonghi, N.; Sotgiu, G.; Posati, T.; Corticelli, F.; Fiori, J.; Varchi, G.; Ferroni, C. Unprecedented behavior of (9R)-9-hydroxystearic acid loaded keratin nanoparticles on cancer cell cycle *Mol. Pharm.*, **2019**, 16, 931-942.
- 13) .M. Lynam, C.E. Welby, A.C. Whitwood *Organomet.* **2009**, 28, 1320-1328: C. E. Welby, T. O. Eschemann, C. A. Unsworth, E. J. Smith, R. J. Thatcher, A. C. Whitwood, J. M. Lynam *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 1493–1506
- 14) Mohammad Mehdi Haghdoust, Juliette Guard, Golar Golbaghi, and Annie Castonguay; Anticancer Activity and Catalytic Potential of Ruthenium(II)–Arene Complexes with N,O-Donor Ligands; *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 7558–7567
- 15) J.M. Lynam, C.E. Welby, A.C. Whitwood *Organomet.* **2009**, 28, 1320-1328: C. E. Welby, T. O. Eschemann, C. A. Unsworth, E. J. Smith, R. J. Thatcher, A. C. Whitwood, J. M. Lynam *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 1493–1506
- 16) <sup>1</sup> L. Vendier, S. Sabo-Etienne *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012** , 51 , 1671 –1674
- 17) H. samouei, V.V. Grushin, New, Highly efficient, Simple, Safe, and Scalable Synthesis of [(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>Ru(CO)H<sub>2</sub>], *Organometallics* 2013, 32 (15), p.4440-4443
- 18) Calonghi, N.; Pagnotta, E.; Parolin, C.; Molinari, C.; Boga, C.; Dal Piaz, F.; Brusa, G.L.; Santucci, M.A.; Masotti, L.; Modulation of apoptotic signalling by 9-hydroxystearic acid in osteosarcoma cells; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2007**, 1771, p.139-146.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio di cuore la mia relatrice la professoressa Silvia Bordoni che mi ha sostenuto durante tutta la mia esperienza e mi ha stimolato a dare il meglio di me stesso.

Ringrazio la professoressa Carla Boga per i suoi preziosissimi suggerimenti ed il suo aiuto, per aver messo a disposizione il suo laboratorio per la sintesi dell'immina e dell'acido 9-(R)-idrossistearico e per la revisione della tesi.

Ringrazio Dott. Stefano Cerini per la sua enorme disponibilità

Ringrazio Dott. Gabriele Micheletti per il suo aiuto nella valutazione dei dati sperimentali.

Infine ringrazio:

Riccardo Tarroni (Chimica Industriale) per i calcoli DFT.

Magda Monari (Ciamician) per i raggi X e per la relativa discussione.

