

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

Complessi Luminescenti di Re(I) per la
Colorazione di Proteine in Gel SDS-PAGE

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Linda Bergamini

RELATORE

Prof. Stefano Stagni

CORRELATORI

Dott.ssa Valentina Fiorini

Dott.ssa Alessandra Stefan

II Sessione

Anno Accademico 2016-2017

ABSTRACT (ITA) Questo progetto di tesi sperimentale è stato volto alla sintesi e alla caratterizzazione di una nuova classe di complessi triscarbonilici Re(I) tetrazolici con formulazione generale $fac-[Re(N^{\wedge}N)(CO)_3(L)]^{+/-/0}$, dove i leganti diiminici ($N^{\wedge}N$) sono costituiti da **bcds** (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina-3,8-disulfonato), **bcds*** (4,4'-(2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-4,7-diil)dibenzen sulfonato) e **bfd**s (4,7-Difenil-1,10-fenantrolina-acido disolfonico), mentre (L) rappresenta la forma deprotonata del legante 2-(1*H*-tetrazol-5-il)piridina (**PTZ**) o 5-fenil-1*H*-tetrazolo (**Tph**). La progettazione dei derivati di Re(I) ha previsto sia l'utilizzo di leganti diiminici recanti residui solfonici ($-SO_3^-$), che un legante diiminico non sostituito (**bat**, batocuproina), con l'intento di ricercare una possibile interazione tra i complessi e i residui amminoacidici presenti sulle proteine. Ultimata la loro sintesi e caratterizzazione, infatti, i complessi sono stati testati come coloranti per il riconoscimento delle bande proteiche separate mediante elettroforesi su gel di poliacriammide (SDS-PAGE). I risultati ottenuti mostrano come i nuovi coloranti di Re(I) tetrazolici riconoscano le bande proteiche in maniera superiore e/o confrontabile rispetto ai coloranti commerciali più noti (Coomassie Brilliant Blue, Ag(I)) impiegati in questa tecnica.

ABSTRACT (ENG) This experimental work has been devoted to the synthesis and the spectroscopic characterization of a new class of luminescent Re(I)-triscarbonyl tetrazolate complexes, with general formula $fac-[Re(N^{\wedge}N)(CO)_3(L)]^{+/-/0}$, in which ($N^{\wedge}N$) can be either **bcds** (2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline-3,8-disulfonate), **bcds*** (4,4'-(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline-4,7-diyl)dibenzenesulfonate) or **bfd**s (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline disulphonic acid), and L is the anionic form of 2-(1*H*-tetrazol-5-yl)pyridine (**PTZ**) or 5-phenyl-1*H*-tetrazole (**Tph**). Nonetheless, a sulphonic-free diiminic ligand such as **bat** (bathophenanthroline) has been embedded into the structure of the complexes to get more insights about any eventual interaction between this new class of Re(I) systems and the $-NH_2$ protein residues. In this context, the Re(I) complexes has been used as luminescent staining agents for the detection of protein bands previously separated by the means of SDS-PAGE technique, exhibiting a competitive and/or comparable sensitivity performances in respect of the well-known staining agents Coomassie Brilliant Blue or Ag(I) ions.

INDICE

INTRODUZIONE	1
ELETTROFORESI SDS-PAGE E COLORANTI	4
RISULTATI E DISCUSSIONE	11
Sintesi di complessi di Re(I)	12
Caratterizzazione Fotofisica.....	19
<i>Spettroscopia di assorbimento.....</i>	<i>19</i>
<i>Spettroscopia di Emissione.....</i>	<i>20</i>
SDS-PAGE	24
CONCLUSIONI	30
PARTE SPERIMENTALE	33
Procedura Generale	33
<i>Sintesi di 5-fenil-1H-tetrazolo, TPh.....</i>	<i>37</i>
<i>Sintesi di 5-piridil-1H-tetrazolo, PTZ.....</i>	<i>38</i>
<i>Sintesi di Re(CO)₅Br</i>	<i>39</i>
SINTESI DEI PRECURSORI di Re(I)	40
<i>Sintesi di fac-[Re(bat)(CO)₃Br].....</i>	<i>40</i>
<i>Sintesi di [(TBA)₂(bfds)].....</i>	<i>41</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bfds)(CO)₃Br]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>42</i>
<i>Sintesi di [(TBA)₂(bcds)][*].....</i>	<i>43</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bcds)[*](CO)₃Br]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>44</i>
<i>Sintesi di [(TBA)₂(bcds)]</i>	<i>45</i>
SINTESI DEI COMPLESSI DI Re(I).....	47
<i>Sintesi di fac-[Re(bat)(CO)₃Tph]</i>	<i>47</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bfds)(CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>50</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bfds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>51</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bcds)[*](CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺ e fac-[Re(bcds)[*](CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>52</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bcds)[*](CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>53</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bcds)[*](CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>54</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bcds)(CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺ e fac-[Re(bcds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>55</i>

<i>Sintesi di fac-[Re(bcds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>56</i>
<i>Sintesi di fac-[Re(bcds)(CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺</i>	<i>57</i>
<i>Preparazione running gel (12%) e stacking gel (4%) per SDS-PAGE.....</i>	<i>58</i>
<i>Colorazione con CBB.....</i>	<i>58</i>
<i>Colorazione con complessi di Re(I) tetrazolici</i>	<i>59</i>
BIBLIOGRAFIA	60

INTRODUZIONE

L'interesse crescente verso lo sviluppo di nuovi sensori luminescenti in grado di interagire con substrati biologici di diversa natura ha richiamato, negli ultimi anni, la comunità scientifica verso la progettazione e la sintesi di nuovi *probes* in grado di segnalare e rilevare la presenza di diverse tipologie di analiti e biomolecole. In tale contesto, accanto a un'attività di ricerca prevalentemente focalizzata alla progettazione di nuovi fluorofori di natura prettamente organica, si è recentemente affermata una tendenza orientata verso l'utilizzo di *probes* fosforescenti basati su composti di coordinazione in cui lo ione metallico centrale appartiene alla seconda o alla terza serie di transizione. In una simile casistica sono quindi rientrati gli esponenti delle classi di complessi metallici tradizionalmente studiate per le proprietà luminescenti, come i complessi polipiridinici di Ru(II) e gli analoghi isostrutturali e isoelettronici di Ir(III) e Re(I).

Se confrontati con i fluorofori organici, i complessi metallici fosforescenti offrono una serie di vantaggi che derivano, in prima analisi, dalla loro stabilità e dalla possibilità di introdurre diversi tipi di leganti organici nella sfera di coordinazione dello ione metallico e dalla pronunciata capacità di modulare il loro output luminescente in seguito sia a minime variazioni nella struttura dei leganti coordinati che alle piccole modificazioni (pH, presenza di analiti, ecc.) che possono intervenire nel loro intorno chimico. Inoltre, i tempi di vita (τ) lunghi che caratterizzano i processi radiativi fosforescenti ($\tau > 100$ ns) e il pronunciato *Stokes shift* delle emissioni dei complessi metallici permettono di minimizzare problematiche quali l'autofluorescenza delle cellule e i fenomeni di autoquenching che si incontrano comunemente in seguito all'impiego di fluorofori organici.

In un panorama applicativo estremamente vasto, che comprende tecniche quali l'imaging in vitro di cellule o tessuti, si è inserito l'utilizzo di alcuni complessi polipiridinici di Ru(II) come "*staining agents*" per substrati proteici sottoposti alla tecnica di elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). L'elettroforesi SDS-PAGE è ampiamente utilizzata nell'ambito degli studi inerenti allo sviluppo di nuovi farmaci e, più in generale, nella

proteomica, dove è impiegata per separare proteine in base al loro peso molecolare e/o carica globale. Dopo la separazione effettuata tramite SDS-PAGE, le proteine si presentano come bande discrete incolori; diventa quindi necessario, ai fini della loro identificazione, renderle visibili impiegando opportuni coloranti. La colorazione dei gel viene tipicamente effettuata utilizzando coloranti basati sul cosiddetto "Coomassie Blue" (Coomassie staining) o su sali di Argento (Silver staining). In tempi recenti è stata dedicata una notevole attenzione all'uso di composti luminescenti per la rilevazione delle proteine. A tale scopo, è stato proposto l'uso di un complesso luminescente di Ru(II), quale il prodotto commercialmente noto come SYPRO Ruby. La struttura di questo composto è plausibilmente riconducibile a quella di un tipico complesso polipiridinico tris-chelato di Ru(II), in cui la funzionalizzazione delle batofenantroline con gruppi solfonati ha la duplice funzione di assicurare la solubilità nel mezzo acquoso del complesso e, nel contempo, di fornire una interazione di tipo elettrostatico con i residui amminici delle proteine in questione. Il sistema così configurato ha dimostrato caratteristiche di rilevabilità dei substrati proteici superiori rispetto ai protocolli basati sul Coomassie blue o sui sali di Ag(I).¹ In seguito, questa classe di agenti colorimetrici luminescenti è stata ulteriormente ampliata con l'introduzione di complessi isostrutturali e isoelettronici di Ir(III) contenenti una batofenantrolina. In questo caso, nonostante i complessi mostrino una apparentemente non elevata solubilità in ambiente acquoso, le superiori proprietà fotoluminescenti che derivano dalla sostituzione di Ru(II) con Ir(III) costituiscono un aspetto di fondamentale importanza per configurare un eventuale utilizzo di questi composti di Ir(III) nell'ambito della tecnica SDS-PAGE.²

Al contrario, nel medesimo contesto, non risultano studi dedicati all'applicazione di complessi tris carbonil -diiminici di Re(I) come agenti colorimetrici. Questa considerazione introduce lo scopo del presente lavoro sperimentale. Infatti, il gruppo di ricerca presso cui è stata svolta questa attività di tirocinio è coinvolto da molti anni nella tematica legata alla progettazione, alla sintesi e all'applicazione di complessi luminescenti di Ru(II), Ir(III) e Re(I) accomunati dalla presenza di leganti tetrazolici coordinati allo ione metallico. Come ulteriore sviluppo di questa ricerca, l'attività di tirocinio è stata focalizzata alla preparazione di nuovi complessi luminescenti di Re(I)

con formulazione generale ***fac*-[Re(N[^]N)(CO)₃L]** (dove (N[^]N) = legante diiminico, (L) = derivati 5-aril tetrazolici), da impiegare come coloranti per l'identificazione delle proteine su gel SDS-PAGE. A tale scopo, i leganti diiminici sono stati decorati con gruppi solfonici e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli relativi agli analoghi complessi privi delle funzionalità SO₃²⁻.

ELETTROFORESI SDS-PAGE E COLORANTI

La tecnica SDS-PAGE è un metodo analitico ampiamente utilizzato per separare proteine, facendole migrare in seguito all'applicazione di un campo elettrico, generato applicando una differenza di potenziale tra due elettrodi. In questo modo le proteine, precedentemente denaturate, migrano con velocità diversa, proporzionale alla loro massa (Figura 1).

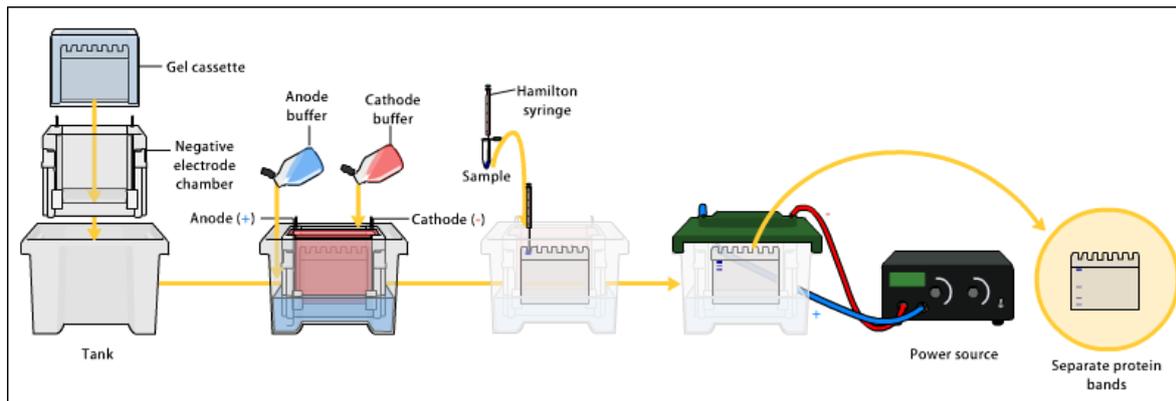


Figura 1: schema generale per la tecnica SDS-PAGE.

I gel polimerici per elettroforesi sono composti da una matrice inerte di acrilammide e N,N'-metilenbisacrilammide, la cui polimerizzazione viene innescata da un iniziatore e un catalizzatore (TEMED - tetrametiletilendiammina e ammonio persolfato). Queste due specie formano radicali liberi capaci di attaccare i monomeri ed innescare la reazione di polimerizzazione radicalica. Nella composizione del gel sono necessari anche H₂O e un tampone costituito da glicina, SDS (sodio dodecilsolfato) e tris-HCl per consentire il passaggio di corrente. Il sodio dodecilsolfato è un elemento essenziale nella composizione del gel e del tampone impiegato nell'elettroforesi poiché, in quanto detergente anionico, si lega alle catene polipeptidiche spezzando tutte le interazioni non covalenti presenti. Il complesso SDS-proteina assume quindi una carica netta formale proporzionale alla massa della proteina.

Per la corsa elettroforetica, sono necessari due gel a diversa composizione: lo *stacking gel* e il *running gel*. La differenza consiste nel pH del tampone utilizzato: la glicina nello *stacking gel* è a pH 6,8 mentre per il *running gel* il pH è basico e si attesta a un valore di 8,8. La differenza di acidità dei due tamponi utilizzati comporta una differenza nella velocità di corsa delle proteine; nel primo tratto, infatti, le proteine

procedono lentamente, avendo quindi il tempo per depositarsi sul fronte dei due tipi di gel, per poi percorrere il *running gel* con una velocità maggiore, contemporaneamente. I campioni, prima di essere caricati nei pozzetti, vengono trattati con un tampone di solubilizzazione contenente tris, glicerolo, SDS, e blu di bromofenolo, un marcatore colorato per seguire l'avanzamento dell'elettroforesi. La scelta di questo tipo di colorante viene fatta per la sua carica negativa e le sue piccole dimensioni, che gli permettono di avanzare con il fronte. Una volta terminata la corsa elettroforetica, la visualizzazione delle proteine viene effettuata colorando il gel con opportuni agenti colorimetrici che ne agevolano la rilevazione.

Allo stato dell'arte, i metodi più diffusi e consolidati per la rilevazione delle bande proteiche discrete che si sono formate in seguito alla corsa elettroforetica sono la colorazione via Coomassie Brilliant Blue e Silver staining.

Il Coomassie Brilliant Blue, è una molecola organica complessa (Figura 2) che si lega alle proteine mediante interazioni elettrostatiche (forze di Van der Waals) tra i gruppi solfonici, acidi e con carica negativa, e il gruppo amminico delle proteine, con carica complessiva positiva.

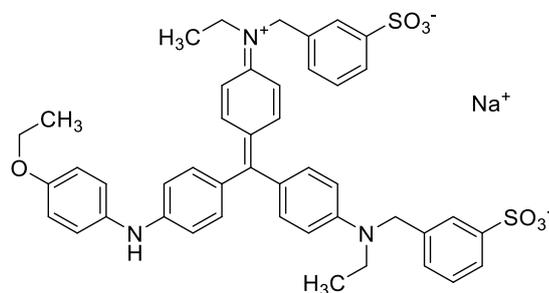


Figura 2: struttura del colorante Coomassie Brilliant Blue.

Il Coomassie Brilliant Blue ha riscosso un grande successo in questo ambito in quanto ha un costo abbastanza contenuto ed è possibile riutilizzarlo per più colorazioni. Presenta però lo svantaggio di essere poco sensibile a piccole quantità di campione. ³

Per ovviare a questo problema, si è sviluppata la colorazione con argento o *Silver Staining*, per la quale sono noti due protocolli diversi, uno alcalino e uno acido. Il metodo alcalino utilizza una soluzione ammoniacale a pH=13 contenente un complesso diamminico di argento nitrato e idrossido di sodio. In queste condizioni le proteine,

cariche negativamente, si legano al complesso di argento tramite interazioni elettrostatiche. A tali valori di pH, il gel di poliacrilammide è però parzialmente idrolizzato, rendendo disponibili gruppi COO^- ai quali gli ioni argento possono legarsi, colorando anche il substrato. Il problema viene aggirato sottoponendo il gel ad un lavaggio prima dello sviluppo della colorazione. Lo *staining* è quindi effettuato con una soluzione diluita di formaldeide contenente una piccola quantità di acido citrico. La formaldeide funge da agente riducente e influenza la velocità di reazione dell'argento con le proteine, aumentandola. A questo proposito, l'acido citrico va a diminuire l'attività del riducente, che sarebbe altrimenti eccessivamente rapida per una corretta visualizzazione delle bande proteiche.

Lo *staining* acido avviene a pH 6, condizioni in cui l'argento si lega ai gruppi nucleofili degli amminoacidi Cys (cisteina), Lys (lisina) e Asp (aspartato) che costituiscono la struttura primaria delle proteine. L'argento nitrato, presente in soluzione con nitrati d'ammonio, viene lavato prima dello sviluppo della colorazione vera e propria, in maniera però più blanda rispetto al metodo alcalino. Come succede nel metodo alcalino, si procede quindi con la reazione di riduzione per opera della formaldeide, calmierata dalla presenza di carbonati di sodio o potassio, che ne riducono l'attività. In entrambe i casi, il difetto principale dello *staining* con argento risiede nelle interferenze che causa in sede di identificazione proteica tramite spettrometria di massa.⁴

Con l'intento di evitare questa serie di problematiche, negli ultimi anni, sono stati sintetizzati e studiati altre tipologie di coloranti per gel SDS-PAGE, tra cui i complessi polipiridinici Ru (II). Questi sistemi, grazie alle loro proprietà fotoluminescenti, consentono la rilevazione delle bande proteiche cui si legano mediante opportuni sostituenti sui leganti che compongono la sfera di coordinazione del metallo. Il complesso più noto, appartenente a questa classe di coloranti, è lo SYPRO-Ruby (Figura 3).

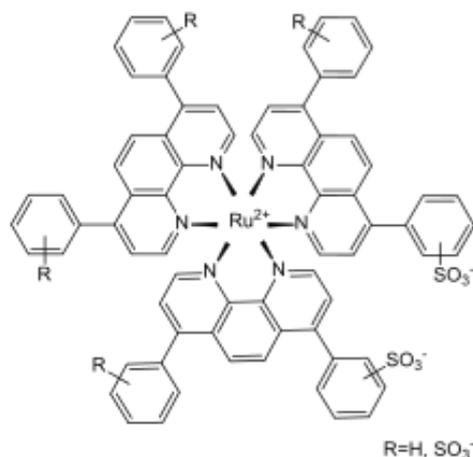


Figura 3: struttura del colorante SYPRO-Ruby.

Il colorante SYPRO-Ruby presenta una sensibilità molto elevata rispetto al Coomassie Blue Brilliant e allo *staining* con argento (sensibilità tecnica: 1-2 ng di proteina), rispetto al quale, inoltre, non dà problemi di colorazione del background, evitando di interferire con il riconoscimento delle proteine nelle analisi di massa. Il profilo di emissione del complesso SYPRO-Ruby è quello tipico dei complessi polipiridinici di Ru(II), allargato e non strutturato, ascrivibile a processi ³MLCT ($d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{N}^{\wedge}\text{N})$, $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$), rendendolo facilmente identificabile con la maggior parte degli strumenti transilluminatori e lampade UV utilizzate nella visualizzazione dello *staining* proteico.¹

Basandosi su un design simile a quello del complesso SYPRO-Ruby, incorporando quindi nella sfera di coordinazione del metallo leganti dimminici sostituiti con gruppi SO₃⁻, sono stati sintetizzati e studiati complessi ciclometallati di Ir(III), emissivi e non, in grado di legarsi alle bande proteiche separate mediante elettroforesi su gel.^{5,6,7} Anche in questo caso però, le problematiche relative alla purificazione dei complessi, dovute principalmente alla formazione di regioisomeri dei leganti solfonati e alla tipologia di interazioni che questi danno con le bande proteiche, hanno limitato considerevolmente la loro diffusione a livello commerciale. Recentemente, per aggirare queste complicazioni, Zhou *et. al.*, hanno presentato uno studio in cui complessi ciclometallati di Ir(III), con formulazione generale $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^{0/+}$,⁸ contengono leganti con sistemi π molto estesi (Figura 4). Secondo questo studio, anche se non è ancora stato chiarificato il meccanismo d'azione, l'interazione complesso-proteina è attribuibile all'aumento della coniugazione sul legante dimminico coordinato al centro metallico.

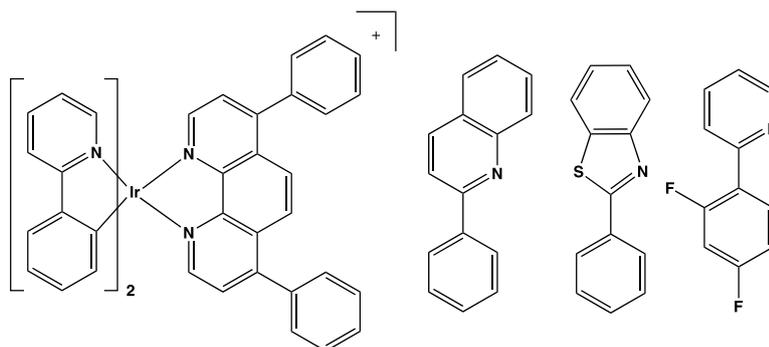


Figura 4: Complessi ciclometallati di Ir(III) presentati da Zhou et. al.

Oltre ai complessi polipiridinici di Ru(II) e ciclometallati di Ir(III), sono stati riportati alcuni esempi di complessi planari quadrati di Pt(II) con leganti (C[^]N[^]N) opportunamente funzionalizzati, in grado di interagire con i residui amminoacidici delle proteine.⁹ La natura polare dello stato eccitato dei complessi [Pt(C[^]N[^]N)Cl] (³MLCT), implica una sensibilità maggiore ad eventuali modificazioni del loro intorno chimico (come ad esempio l'interazione complesso-proteina), cambiamenti che si traducono in variazioni del loro output luminescente.

Un comportamento fotoemissivo simile è osservabile nei complessi triscarbonilici di Re(I), il cui stato eccitato polare ³MLCT è responsivo verso le modificazioni apportate all'intorno chimico.¹⁰ Nonostante le loro caratteristiche siano promettenti, sono ancora pochi però gli esempi di complessi di Re(I) impiegati per lo *staining* delle proteine.

Sulla base di queste indicazioni, si è deciso quindi di progettare e sintetizzare una nuova classe di complessi triscarbonilici di Re(I) con formulazione generale **fac-[Re(N[^]N)(CO)₃L]^{0/-}** da utilizzare come coloranti per lo *staining* proteico.

In particolare, i complessi tetrazolici di Re(I) sono oggetto di studio da parte del gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta questa attività di tesi sperimentale. In generale, i complessi triscarbonilici di Re(I) hanno caratteristiche uniche, sia in termini proprietà fotoemittive, collocandosi in posizione intermedia tra forti emettitori come i complessi ciclometallati di Ir(III) ed i derivati più scarsamente emissivi come i complessi polipiridinici di Ru(II), che come caratteristiche chimiche e reattività, riconducibili al Tecnezio.

Tecnezio e Renio rappresentano, infatti, una coppia di radionuclidi ampiamente utilizzati in campo biomedico. Attualmente la grande maggioranza dei radiofarmaci utilizzati si basa su complessi di coordinazione contenenti l'isotopo metastabile ^{99m}Tc . L'interesse verso il renio, congenere del tecnezio nel gruppo 7, è cresciuto per le notevoli similitudini chimiche, che si traducono, per complessi stabili aventi stessa geometria molecolare, in un analogo comportamento all'interno di un sistema biologico.

Nei complessi tetrazolici di Re(I) con formulazione generale $\text{fac-}[\text{Re}(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{CO})_3\text{L}]^{0/-}$ presentati in questo elaborato, si hanno due posizioni di coordinazione occupate da un legante dimminico $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ che reca due gruppi solfonici, necessari per aumentare la solubilità in ambiente acquoso e per interagire con i residui proteici, tre posizioni facciali occupate da gruppi carbonilici e nella posizione assiale (L) si trova il legante tetrazolico. Nei complessi triscarbonilici di renio, possono avvenire svariate transizioni elettroniche che coinvolgono stati eccitati relativi al campo dei leganti, in particolare transizioni di tipo MLCT e LC. Andando infatti a valutare il comportamento dei complessi tetrazolici nei confronti di diversi tipi di elettrofili (H^+ , CH_3^+), è stato possibile confermare come il legante tetrazolico influenzi significativamente le proprietà luminescenti dei complessi, in quanto in seguito a modificazioni operate sul legante si hanno cambiamenti sostanziali nella lunghezza d'onda del massimo di emissione (λ_{max}), resa quantica (Φ) e tempo di vita (τ) delle emissioni del complesso.¹¹

RISULTATI E DISCUSSIONE

Un aspetto comune dei coloranti impiegati per il riconoscimento delle bande proteiche ottenute mediante separazione elettroforetica su gel SDS-PAGE, è la presenza di almeno un gruppo solfonico (SO_3^-) che, mediante interazioni elettrostatiche, si lega al gruppo amminico (NH_2) delle proteine.² Un altro vantaggio che deriva dalla presenza di gruppi solfonici è quello di rendere il colorante solubile in ambiente fisiologico acquoso, background caratteristico delle separazioni elettroforetiche su gel SDS-PAGE. Seguendo un approccio del tipo “*design to application*” è stata quindi selezionata una libreria di leganti contenenti residui solfonici in posizioni diverse (Figura 5) in particolare **bcds**, **bcds*** (*Batocuproina disolfone – sale sodico idrato*) e **bfds** (*Batofenantrolina disolfone – sale sodico idrato*), da coordinare, come leganti dimminici (N^2N), ad un frammento triscarbonilico di Re(I) . Per verificare l'essenzialità del residuo solfonico ai fini desiderati, è stato utilizzato anche il legante **bat** (*batocuproina*), che non presenta gruppi SO_3^- .

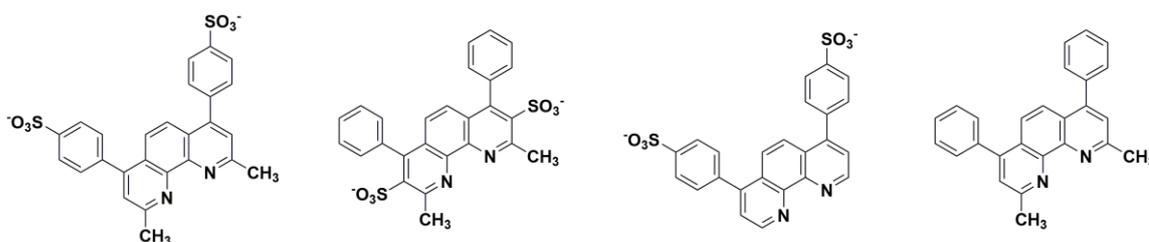


Figura 5: da sinistra a destra – struttura dei leganti N^2N utilizzati in questo elaborato **bcds***, **bcds**, **bfds** e **bat**.

Sulla base degli interessi del gruppo di ricerca, la sfera di coordinazione del centro di Re(I) è stata quindi completata inserendo un legante aromatico azotato appartenente alla classe dei 5-aryl tetrazoli (Figura 6). Studi effettuati nel corso degli ultimi anni,^{11,12,13} hanno dimostrato come questi leganti partecipino attivamente alla composizione dello stato eccitato dei complessi triscarbonilici di Re(I) e, inoltre, siano responsivi ad eventuali modificazioni apportate all'intorno chimico dei complessi in cui prendono parte.¹³ Per questi motivi, la scelta è ricaduta sui leganti 5-fenil-1H-tetrazolo (**Tph**) e 2-(1H-tetrazol-5-il)piridina (**PTZ**), con l'intento di verificare se l'eventuale interazione proteina-colorante possa dipendere dalla diversa natura del legante tetrazolico impiegato.

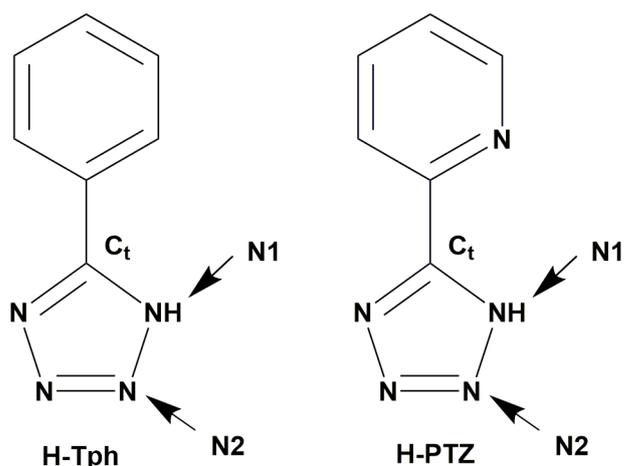
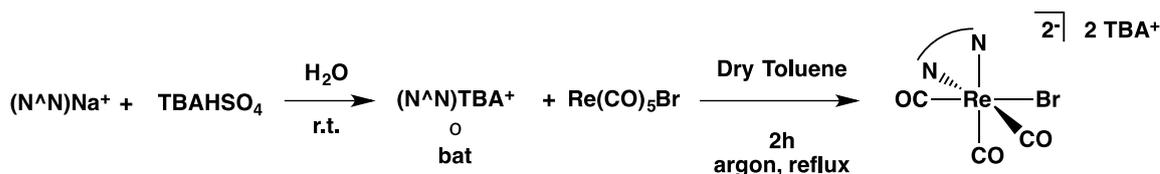


Figura 6: struttura, acronimi e numerazione adottata per i derivati 5-aril tetrazolici impiegati in questo elaborato.

I leganti tetrazolici H-Tph e H-PTZ sono stati ottenuti mediante una procedura riportata in letteratura,¹⁴ che consiste nella reazione di ciclizzazione 1,3-dipolare ad opera di NaN_3 sul nitrile corrispondente. Viste le loro proprietà acide, la complessazione dei leganti tetrazolici H-Tph e H-PTZ al centro di Re(I) è stata fatta in seguito a trattamento con base debole (Et_3N).

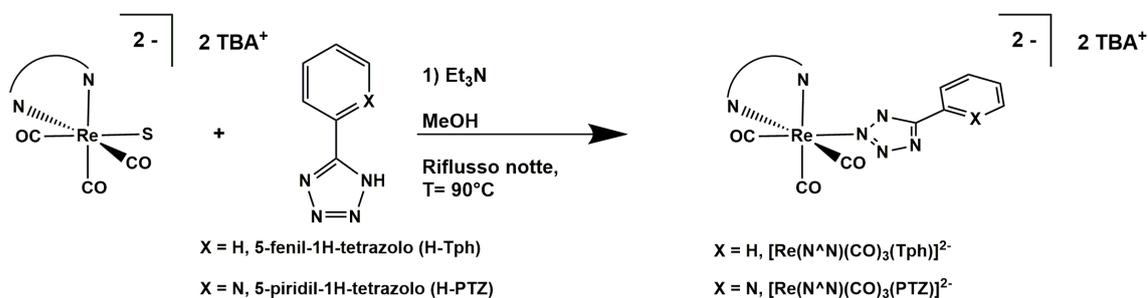
Sintesi di complessi di Re(I)

La sintesi dei complessi con formulazione generale $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{L})]$ è stata eseguita modificando una procedura riportata in letteratura.¹⁵ Il precursore $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ è stato fatto reagire con l'opportuno legante diiminico solfonato (**bcds**, **bcds*** o **bfd**s) precedentemente sottoposto a scambio del controione mediante reazione con tetrabuttilammonio idrogeno solfato (Schema 1). Il loro impiego sotto forma di sale sodico, infatti, è possibile solo in ambiente acquoso, poiché insolubili in tutti i più comuni solventi organici. Questo passaggio non è stato necessario per il legante diiminico **bat**, che è stato fatto reagire con il precursore di Re(I) senza ulteriori passaggi.



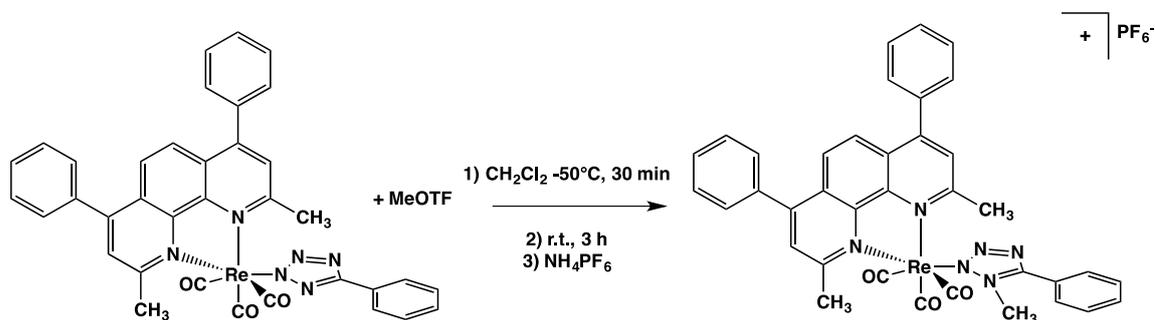
Schema 1: procedura sintetica utilizzata per $fac-[Re(CO)_3(N^N)Br]^{2-} 2[TBA]^+$.

Una volta sintetizzati, i complessi $fac-[Re(CO)_3(N^N)Br]^{2-} 2[TBA]^+$ sono stati sottoposti ad alogeno-estrazione ed in seguito, è stato aggiunto l'anione tetrazolato desiderato (**Tph**, **PTZ**, Schema 2).



Schema 2: procedura sintetica utilizzata per la sintesi dei complessi $fac-[Re(CO)_3(N^N)(L)]^{2-} 2[TBA]^+$.

Seguendo invece una procedura sintetica messa a punto dal gruppo di ricerca,¹³ è stato ottenuto il complesso neutro $fac-[Re(CO)_3(bat)Tph]$ e, sfruttando la peculiare reattività verso gli elettrofili mostrata dal gruppo $[R-CN_4]$, è stato sintetizzato il corrispondente complesso cationico $fac-[Re(CO)_3(bat)Tph-Me]^+$ (Schema 3).



Schema 3: reazione di metilazione sul complesso $fac-[Re(CO)_3(bat)Tph]$.

Tutti i complessi ottenuti sono stati purificati mediante cromatografia su gel di silice o allumina secondo i casi.

In prima battuta, la conferma dell'avvenuta formazione dei complessi **fac**- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{L})]^{2-} \cdot 2[\text{TBA}]^+$ è stata fornita dall'analisi di spettrometria di massa ESI-MS, da cui è stato possibile osservare la presenza del pattern caratteristico relativo allo ione molecolare $[\text{M}/2]^-$ (m/z) nella scansione in ioni negativi (in Figura 7 a titolo di esempio si riporta lo spettro di massa del complesso **fac**- $[\text{Re}(\text{bcds})^*(\text{CO})_3\text{PTZ}]^{2-}$).

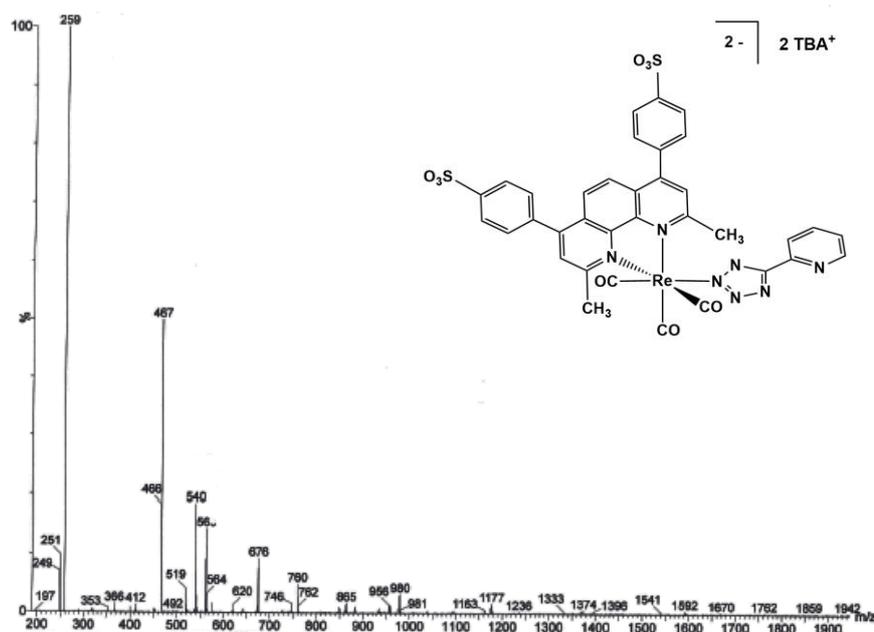


Figura 7: spettro di massa ESI-MS (regione degli ioni negativi) del complesso $[\text{Re}(\text{bcds})^*(\text{CO})_3\text{PTZ}]^{2-} \cdot 2[\text{TBA}]^+$, $[\text{M}/2]^- = 467 m/z$, MeOH.

La caratterizzazione IR conferma, in tutti i casi, la natura ionica dei complessi di tipo **fac**- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{L})]^{2-}$: le bande relative ai carbonili (1900 , 1920 e 2022 cm^{-1}) traslano a numeri d'onda più alti rispetto a quelle dei complessi neutri di partenza confermandone, inoltre, la loro disposizione facciale. Si osserva inoltre la presenza della banda a 1606 cm^{-1} ascrivibile al gruppo SO_3^- . A titolo di esempio si riportano, in Figura 8, gli spettri IR riguardanti i complessi **fac**- $[\text{Re}(\text{bfds})(\text{CO})_3\text{PTZ}]^{2-}$ (linea rossa) e al suo precursore **fac**- $[\text{Re}(\text{bfds})(\text{CO})_3\text{Br}]^{2-}$ (linea nera).

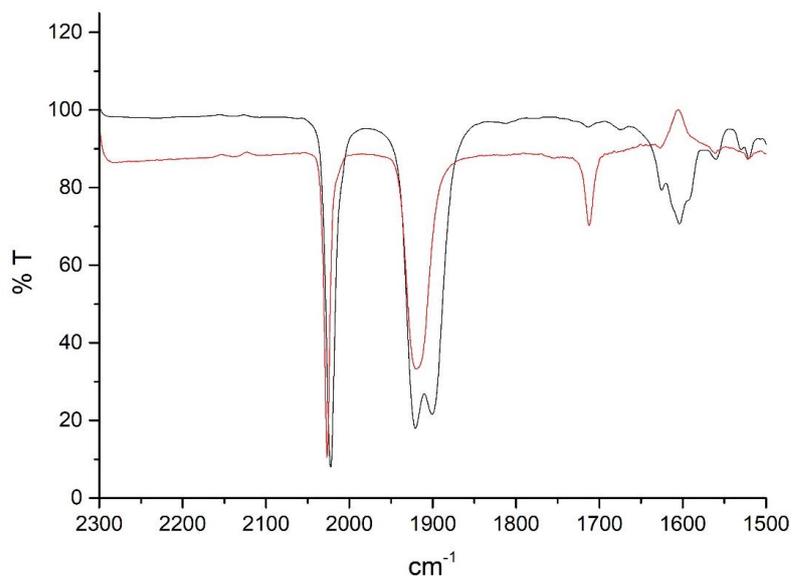


Figura 8: spettri IR relativi ai complessi $[Re(bfds)(CO)_3PTZ]^{2-}$ (linea rossa) e al suo precursore $[Re(bfds)(CO)_3Br]^{2-}$ (linea nera).

L'analisi 1H -NMR è stata difficoltosa a causa della difficile maneggiabilità dei prodotti ottenuti, sommata alle scarse informazioni reperibili in merito alla posizione del gruppo $-SO_3^-$ nella struttura dei leganti dimminici. Nella regione aromatica (6 -11 ppm) dello spettro che si riferisce al complesso $fac-[Re(bfds)(CO)_3Br]^{2-}$ riportato in Figura 9 si osservano i segnali caratteristici del legante **bfds**, che si spostano a campi leggermente più bassi in seguito alla coordinazione dell'anione **Tph** sul centro metallico (Figura 9).

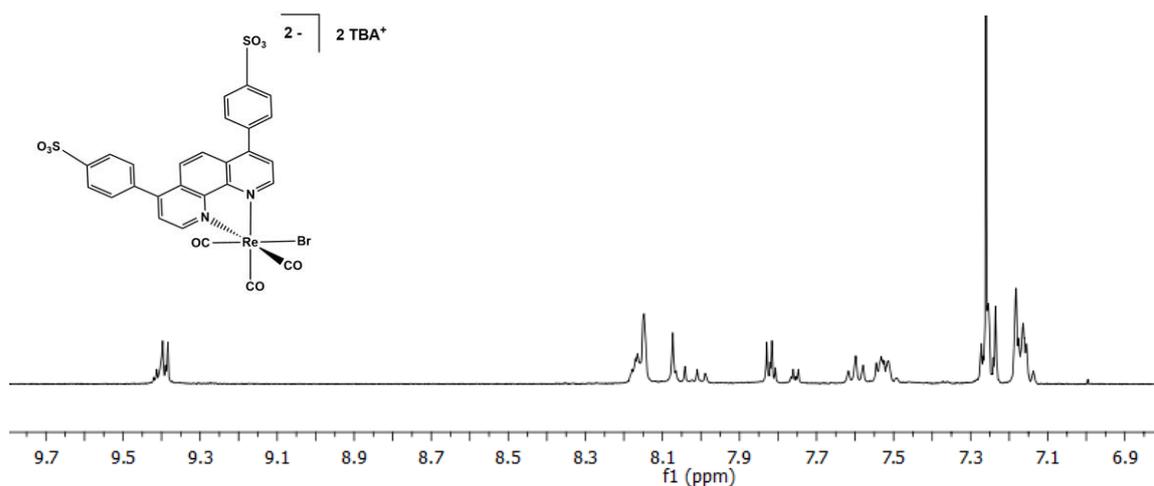


Figura 9: (a) spettro 1H -NMR del complesso $fac-[Re(bfds)(CO)_3Br]^{2-}$.

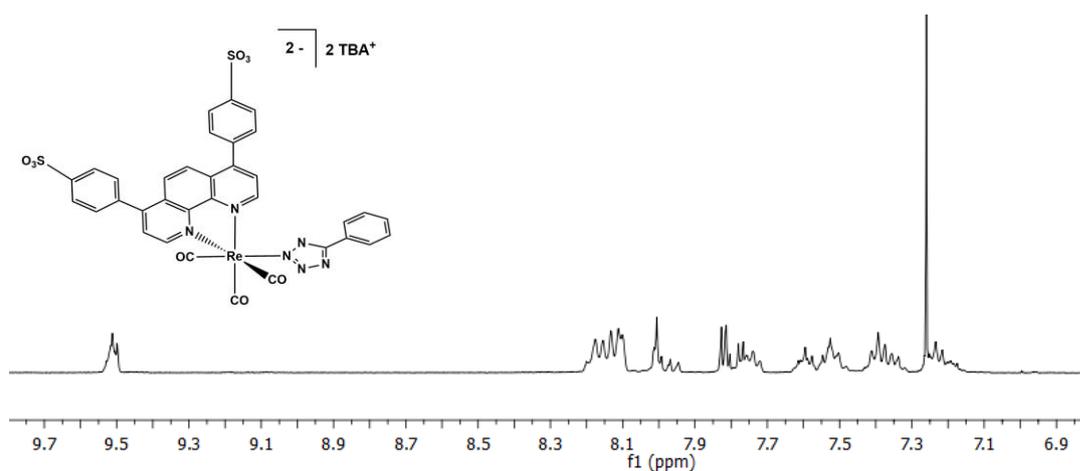


Figura 9: (b) spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bfd})_2(\text{CO})_3\text{Tph}]^{2-}$, CDCl_3 400 MHz.

La stessa situazione è riscontrabile dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ del complesso $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bcds})(\text{CO})_3\text{Tph}]^{2-}$ e del suo precursore $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bcds})(\text{CO})_3\text{Br}]^{2-}$ (Figura 10).

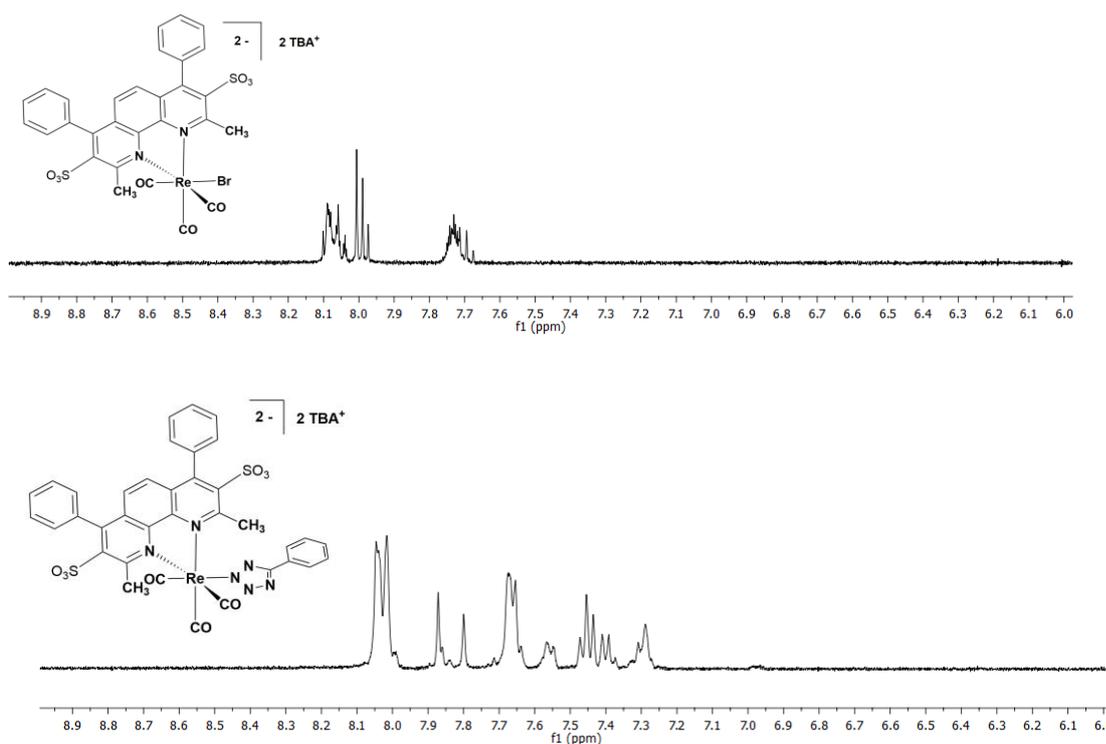


Figura 10: (alto) spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bcds})(\text{CO})_3\text{Br}]^{2-}$ (basso) del complesso $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bcds})(\text{CO})_3\text{Tph}]^{2-}$, CDCl_3 , 400 MHz.

La regioselettività delle reazioni è stata verificata mediante spettroscopia $^{13}\text{C-NMR}$, grazie alla quale è possibile osservare il segnale riguardante il Ct (carbonio tetrazolico) risuonare a 164 ppm, segnale diagnostico dell'avvenuta coordinazione del legante **Tph** al centro di Re(I) mediante l'azoto N-2 (Figura 11, numerazione in Figura 6).¹¹

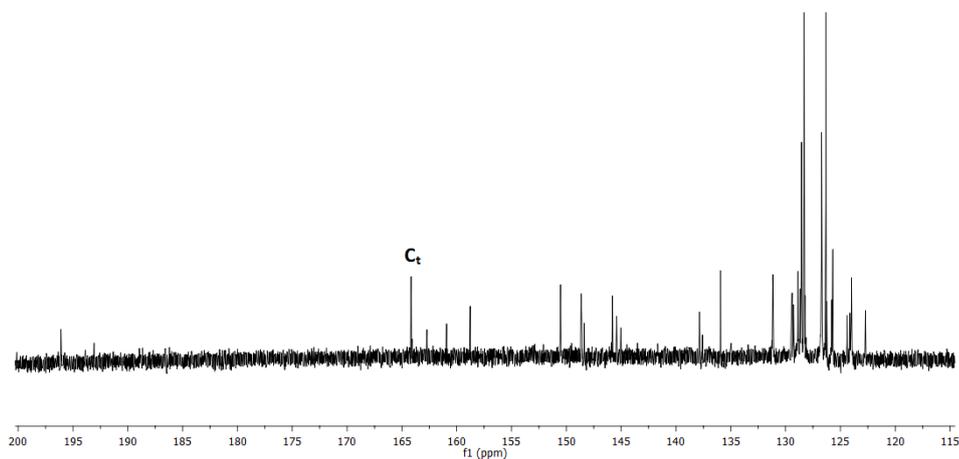


Figura 11: ^{13}C -NMR del complesso $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bcds})\text{Tph}]^{2-}$, CDCl_3 , 400 MHz.

Per quanto riguarda i complessi neutro e cationico avente come legante ($\text{N}^{\wedge}\text{N}$) la batocuproina, sono stati riportati di seguito (figura 12) gli spettri ^1H -NMR per avere il confronto. Si nota l'aumento dei segnali nello spettro del complesso metilato e si deduce la perdita di simmetria del complesso. Nel complesso neutro lo spettro mostra a 3.57 ppm un unico segnale con integrale di valore 6 per entrambi i metili della batocuproina, passando al complesso metilato compaiono 2 segnali entrambi integranti 3, uno a 3.56 e l'altro a 3.71 ppm, uno per ogni metile diiminico ed un terzo segnale a 3.23 ppm riferito al metile legato a N_2 del tetrazolo.

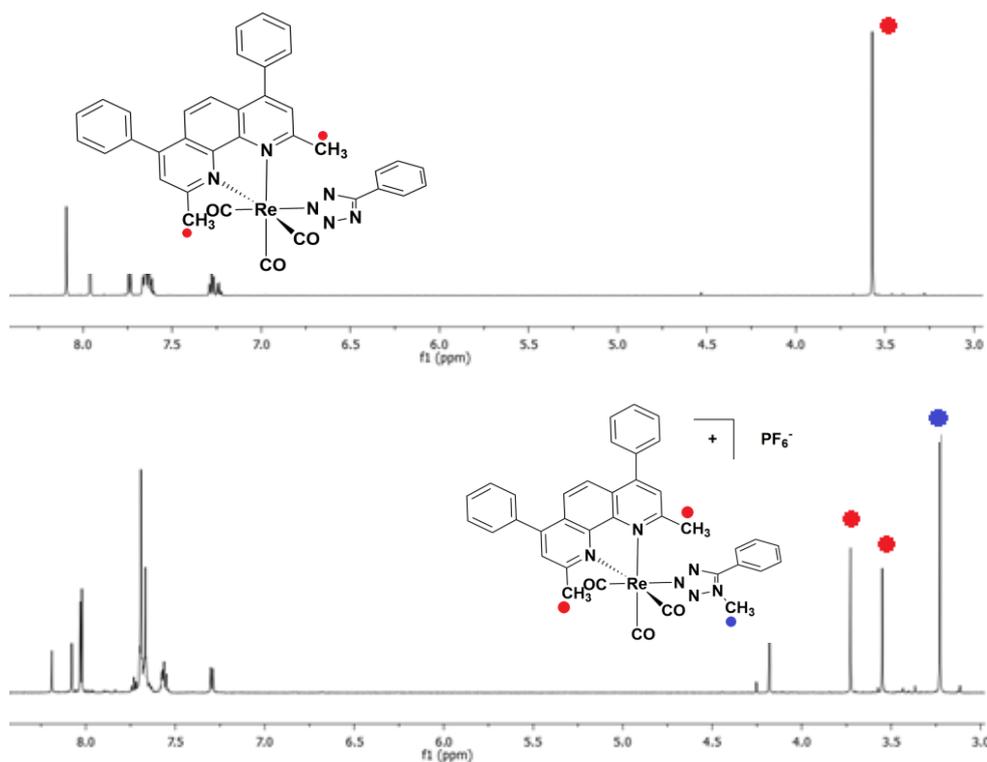


Figura 12: spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso $[\text{Re}(\text{bat})(\text{CO})_3\text{Tph}]$ (sopra) e del complesso $[\text{Re}(\text{bat})(\text{CO})_3\text{Tph-Me}]^+$ (sotto), Acetone- d_6 , 298K.

L'insieme delle indicazioni ottenute dalle caratterizzazioni spettroscopiche ha trovato conferma dall'analisi della struttura molecolare del complesso **fac-[Re(CO)₃(bat)Tph]** (Figura 13) ottenuta mediante diffrazione raggi X su cristallo singolo. Si nota, in particolare, la geometria facciale dei leganti carbonilici e l'attesa connettività del legante tetrazolico **Tph**.

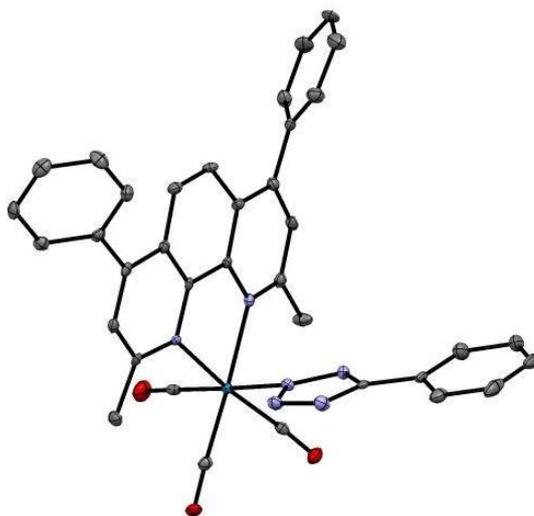


Figura 13: struttura ai Raggi X del complesso **fac-[Re(CO)₃(bat)Tph]**.

Caratterizzazione Fotofisica

Ultimata la preparazione dei nuovi complessi di Re(I) tetrazolici, è stato intrapreso lo studio delle loro caratteristiche fotofisiche, intese come proprietà di assorbimento ed emissione. In quest'ultimo caso, sono stati registrati gli spettri di fotoluminescenza "steady state" e sono state stimate le rese quantiche di emissione. Inoltre, avvalendosi della tecnica del "Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)" è stata condotta l'analisi risolta nel tempo dei fenomeni di luminescenza, con cui sono stati determinati i tempi di vita dei processi radiativi.

Spettroscopia di assorbimento

Gli spettri di assorbimento dei nuovi complessi tetrazolici sono stati ottenuti da soluzioni diluite (10^{-5} M) in diclorometano (DCM), metanolo (MeOH) o acetonitrile (CH_3CN) (Tabella 1) mantenute a temperatura ambiente. I profili risultano tutti simili tra loro e sono riconducibili a quelli tipici dei complessi di metalli di transizione con geometria ottaedrica. In particolare, nella regione spettrale compresa tra 250 e 350 nm si osservano intense transizioni legando centrate (LC), mentre i processi a trasferimento di carica di tipo MLCT (*Metal to Ligand Charge Transfer*) sono stati localizzati a valori di energia inferiori ($\lambda_{\text{max}} = 370\text{-}450$ nm, Figura 14).

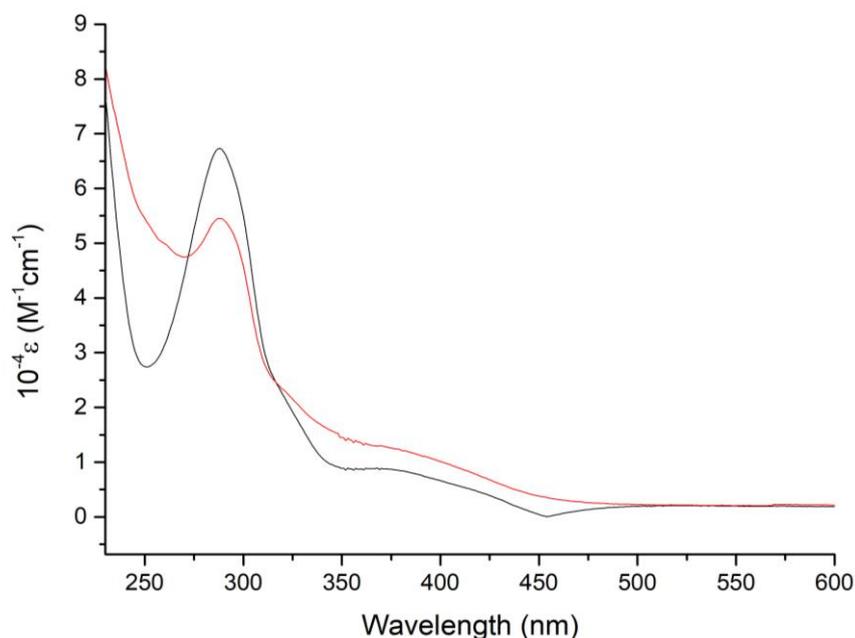


Figura 14: spettri di assorbimento di $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bfd}s)(\text{CO})_3\text{Tph}]^{2-}$ (linea rossa) e $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bfd}s)(\text{CO})_3\text{Br}]^{2-}$ (linea nera).

Spettroscopia di Emissione

In seguito ad eccitazione del massimo di assorbimento MLCT ($\lambda = 370$ nm), le soluzioni diluite (10^{-5} M) in solvente organico (Tabella 1) dei complessi mostrano luminescenza. In particolare, gli spettri di emissione mostrano un caratteristico profilo allargato, non strutturato, il cui aspetto è tipico di emissioni risultanti da stati eccitati di tipo MLLCT, centrate a circa 602 nm (Figura 15 per il complesso *fac*-[Re(bcds)^{*}(CO)₃Tph]²⁻).

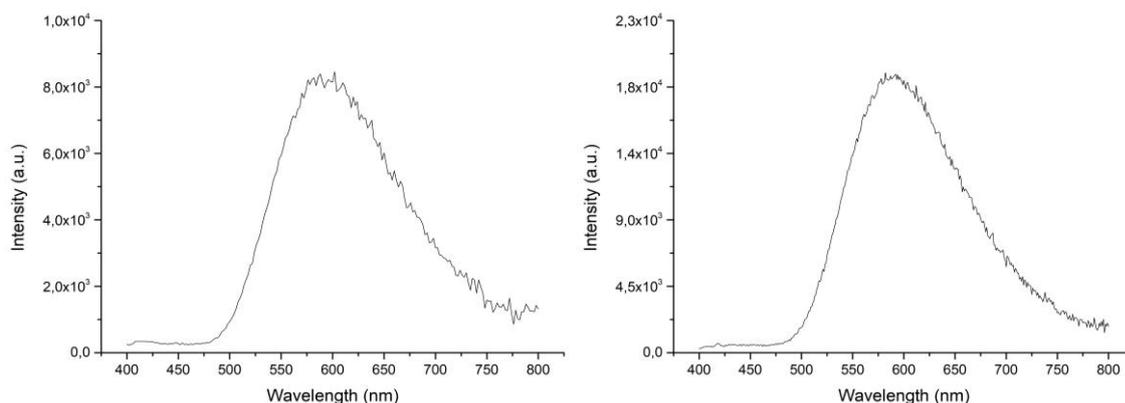


Figura 15: profilo di emissione del complesso *fac*-[Re(bcds)^{*}(CO)₃Tph]²⁻, 298 K, MeOH. (sinistra) e *fac*-[Re(bfds)(CO)₃PTZ]²⁻, 298 K, DCM (destra).

Il carattere fosforescente dei processi radiativi è confermato dall'analisi dei tempi di vita e dall'incremento dell'intensità di emissione che si osserva in seguito all'allontanamento dell'O₂ disciolto nelle soluzioni (Tabella 1). La natura polare degli stati eccitati da cui si origina la fosforescenza è stata inoltre evidenziata registrando gli spettri di emissione a 77K. In tali condizioni si osserva, infatti, un marcato spostamento verso il blu (*rigidochromic blue-shift*) del massimo di emissione (Figura 16).¹⁰

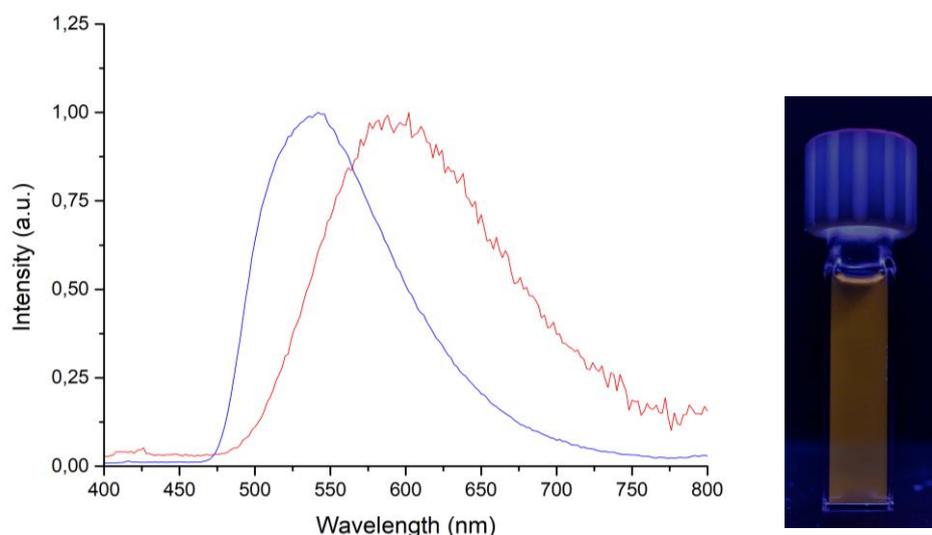


Figura 16: confronto tra spettro di emissione di $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]^2-$, MeOH, 298 K (linea rossa) e 77 K (linea blu).

In tutti i casi, passando da solvente organico all'ambiente acquoso (Figura 17 per il complesso $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]$), si nota un forte solvatocromismo dei processi radiativi. In soluzione acquosa, si osserva la comparsa di una nuova emissione centrata a 492 nm caratterizzata da tempi di vita riconducibili a processi fluorescenti. Tale comportamento può essere, in prima analisi, attribuito alla differente stabilizzazione degli stati eccitati polari (MLCT) rispetto alla componente apolare dovuta a processi centrati sui leganti coordinati (LC).

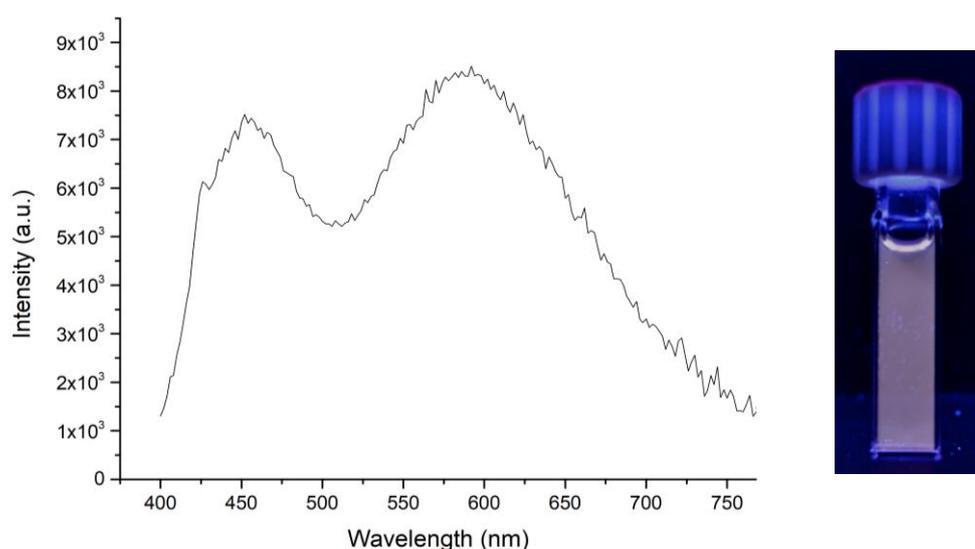


Figura 17: profilo di emissione del complesso $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]^2-$, 298 K, H₂O.

Analizzando i dati raccolti in Tabella 1 si evince come, a parità di legante diimminico solfonato e di solvente impiegato, la presenza di un anello piridinico sul legante tetrazolico (**PTZ**) produca uno spostamento del massimo di emissione verso energie maggiori di 10-20 nm rispetto a quanto osservato per il legante **Tph**. Tale andamento è riscontrabile, seppur in maniera meno marcata, anche variando la natura del legante N^N solfonato sul frammento di Re(I), modificazione che comporta un *blue shift* del massimo di emissione di circa 10 nm nella serie da **bcds*** a **bcds** e **bfds**.

Tabella 1: Dati fotofisici relativi ai complessi di Re(I) presentati in questo elaborato.

Complesso	Assorbimento		Emissione 298 K				Emissione 77 K		
	λ_{abs} (nm)	$(10^{-4}\epsilon)$ ($M^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	$\tau_{\text{air}}(\mu\text{s})$	$\tau_{\text{Ar}}(\mu\text{s})$	$\phi_{\text{air}}(\%)*$	$\phi_{\text{Ar}}(\%)*$	λ_{em} (nm)	$\tau(\mu\text{s})$
solvente: DCM									
<i>fac</i> -[Re(<i>bat</i>)(CO) ₃ Tph]	/	/	592	0.33	0.87	1.97	6.35	534	2.41
<i>fac</i> -[Re(<i>bat</i>)(CO) ₃ Tph-Me] ⁺	/	/	546	1.03	17.3	2.96	15.01	514	27.4 63.2
<i>fac</i> -[Re(<i>bfds</i>)(CO) ₃ Tph] ²⁻	288, 392	3.6200, 0.7048	600	0.58	1.54	4.08	4.26	550	1.54
<i>fac</i> -[Re(<i>bfds</i>)(CO) ₃ PTZ] ²⁻	287, 392	2.7025, 0.4258	591	0.60	0.95	4.83	6.50	544	0.94
solvente: CH₃CN									
<i>fac</i> -[Re(<i>bcds</i>)(CO) ₃ PTZ] ²⁻	264, 371	5.8434, 0.6252	574	0.15	0.77	2.47	5.26	574	3.02
solvente: CH₃OH									
<i>fac</i> -[Re(<i>bcds</i>)*(CO) ₃ Tph] ²⁻	285, 383	4.9106, 0.5686	602	0.24	0.82	0.66	2.40	542	4.98
<i>fac</i> -[Re(<i>bcds</i>)*(CO) ₃ PTZ] ²⁻	285, 380	5.8169, 0.5707	584	0.22	0.56	0.38	2.41	542	2.09
<i>fac</i> -[Re(<i>bcds</i>)(CO) ₃ Tph] ²⁻	294, 380	3.2515, 0.5637	592	0.53	1.16	0.23	1.34	538	2.44
solvente: H₂O									
<i>fac</i> -[Re(<i>bcds</i>)*(CO) ₃ Tph] ²⁻	240, 286, 389	4.1534, 2.8813, 0.0714	492 592	0.074 0.25	0.58	2.7	2.73	/	/
<i>fac</i> -[Re(<i>bcds</i>)*(CO) ₃ PTZ] ²⁻	/	/	454 582	0.075 0.56	0.56	3.06	2.39	/	/
<i>fac</i> -[Re(<i>bcds</i>)(CO) ₃ Tph] ²⁻	/	/	456 590	0.072 0.71	1.24	1.37	1.22	/	/

* /= non misurato; calcolate rispetto al complesso Ru(bpy)₃²⁺ in acqua ($\phi = 0.028$).¹⁶

Da studi precedenti, è emerso come la partecipazione dei leganti tetrazolici nel determinare le proprietà di emissione, ossia la loro influenza sul gap HOMO-LUMO dei corrispondenti complessi di Re(I), si traduca in una considerevole influenza nella

composizione del livello HOMO.¹⁷ Tale peculiarità è stata evidenziata sperimentalmente osservando come l'aggiunta di specie elettrofile (*i.e.* H⁺, CH₃⁺) produca variazioni sostanziali nello spettro di emissione dei complessi di Re(I) corrispondenti. Nel caso del complesso ***fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph]** ($\lambda_{\text{max}} = 592 \text{ nm}$) riportato in questo lavoro di tesi, la reazione di metilazione porta a un risultato simile. Il metile, infatti, produce una perturbazione dell'intorno chimico del complesso localizzata sul legante tetrazolico, risultando nello spostamento del massimo di emissione verso energie maggiori di circa 40 nm ($\lambda_{\text{max}} = 546 \text{ nm}$ per ***fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph-Me]⁺**) e, contestualmente, in valori di resa quantica aumentata e allungamento dei tempi di vita (Figura 18, Tabella 1).

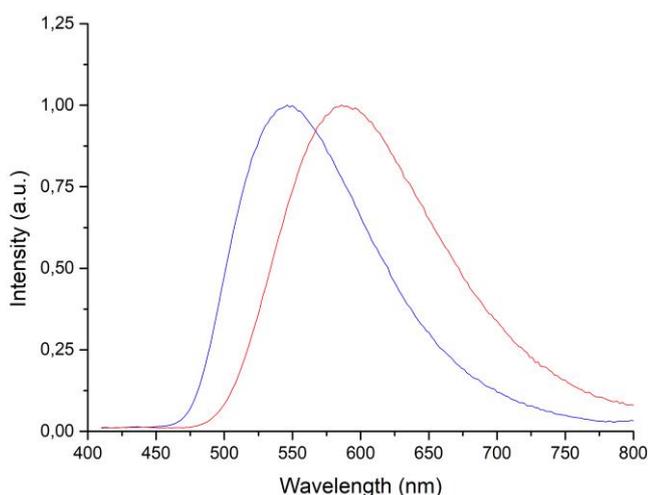


Figura 18: confronto spettri di emissione del complesso *fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph] (linea rossa) e *fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph-Me]⁺ (linea blu).

SDS-PAGE

Una volta terminata la caratterizzazione fotofisica dei complessi di Re(I), si è voluto verificare se essi potessero essere utilizzati come coloranti per substrati proteici, con particolare riferimento alle proteine che vengono differenziate in base al loro peso molecolare tramite la tecnica elettroforetica SDS-PAGE. Nello specifico, i complessi di Re(I) sono stati dapprima testati nei confronti di diverse concentrazioni di una singola proteina quale la BSA (Bovine Serum Albumine). In seconda istanza, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un "marker" (*protein molecular weight marker*), ossia una miscela proteica standard costituita da sei proteine pure, tra cui la stessa BSA, a peso molecolare noto compreso tra 116 e 14 kDa. Dal punto di vista sperimentale, le analisi sono state condotte separando in gel diverse concentrazioni della proteina pura (a partire da una soluzione 1 mg/mL) o della miscela proteica con concentrazione compresa tra 0.1 e 0.2 mg/mL. Conclusa la corsa elettroforetica, i gel sono stati fissati per 2h in agitazione in una soluzione di etanolo al 30% e acido acetico al 10%. Dopo avere eseguito tre lavaggi in etanolo al 20%, i gel sono stati colorati overnight (15h), in agitazione, con una soluzione contenente il complesso in esame (soluzione di etanolo al 20%, 1 μ M finale). Il giorno successivo i gel sono stati lavati tre volte con H₂O e poi visualizzati mediante transilluminatore UV (λ exc =254 nm).

Il primo esperimento è stato effettuato utilizzando il complesso *fac*-[Re(bcds)*(CO)₃Tph]²⁻ come colorante nei confronti della proteina pura BSA presente a diverse concentrazioni (da 1 μ g a 10 ng) nelle corsie del gel di poliacrilammide. (Figura 19)

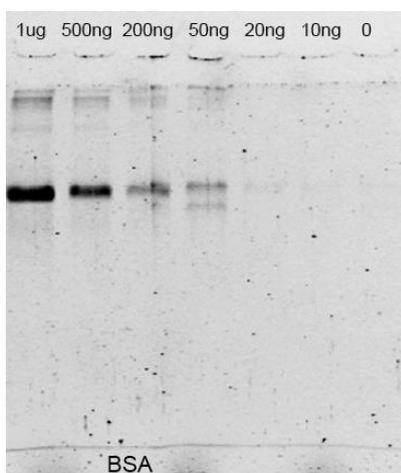


Figura 19: corsa elettroforetica, in gel di poliacrilammide al 12%, di proteina pura BSA, rilevazione fino a 50 ng di proteina. Staining con *fac*-[Re(bcds)*(CO)₃Tph]²⁻.

Il risultato di questa prova iniziale è stato senza dubbio soddisfacente. Infatti, il complesso $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]^{2-}$ mostra una notevole affinità per la proteina BSA e appare in grado di rilevarne la presenza fino a un valore di concentrazione corrispondente a una quantità di proteina pari a 50 ng (Figura 19).

Seguendo l'approccio descritto in precedenza, l'esperimento è stato ripetuto nei confronti del marker proteico. A tale scopo, i pozzetti sono stati caricati con diversi volumi (6, 3, 1.5 e 0.5 μ L) della miscela proteica, così da poterla diluire e testare la sensibilità del complesso sintetizzato.

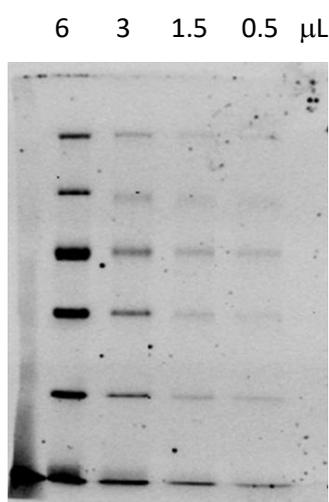


Figura 20: corsa elettroforetica di una miscela di proteine a peso molecolare noto (marker).

L'analisi del gel così ottenuto ha fornito un responso del tutto in linea con quanto osservato nel caso della proteina pura BSA, mostrando come il complesso di Re(I) $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]^{2-}$ possa riconoscere le proteine presenti nella corsia corrispondente a un volume di 0,5 μ L (50-100 ng di proteina per banda) del marker stesso (Figura 20).

A questo punto, l'efficacia del complesso $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]^{2-}$ come agente colorante è stata paragonata a due classiche colorazioni proteiche, il Coomassie e il Silver Staining. A tale scopo, sono stati preparati tre gel di poliacrilammide nei quali sono state separate uguali concentrazioni del marker proteico (volumi pari a 6, 3, 1.5 e 0.5 μ L). Conclusa la corsa elettroforetica, i gel sono stati colorati separatamente con il complesso $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]^{2-}$, il Coomassie e il Silver Staining (Figura 21).

Tipicamente, uno dei coloranti più utilizzati per evidenziare le proteine in gel è il Coomassie Brilliant Blue R-250, che interagisce con gli amminoacidi basici ed è in grado di rilevare fino a 0.2 µg di proteina. Un'alternativa è la colorazione con sali di Ag(I), nota anche come Silver staining, che presenta una sensibilità 10-20 volte superiore al Coomassie staining.

Come si può dedurre dalla Figura 21, tale analisi comparativa mostra come l'utilizzo del nuovo complesso di Re(I), porti a risultati paragonabili, se non superiori, rispetto al Silver Staining e, in particolare, al Coomassie Staining.

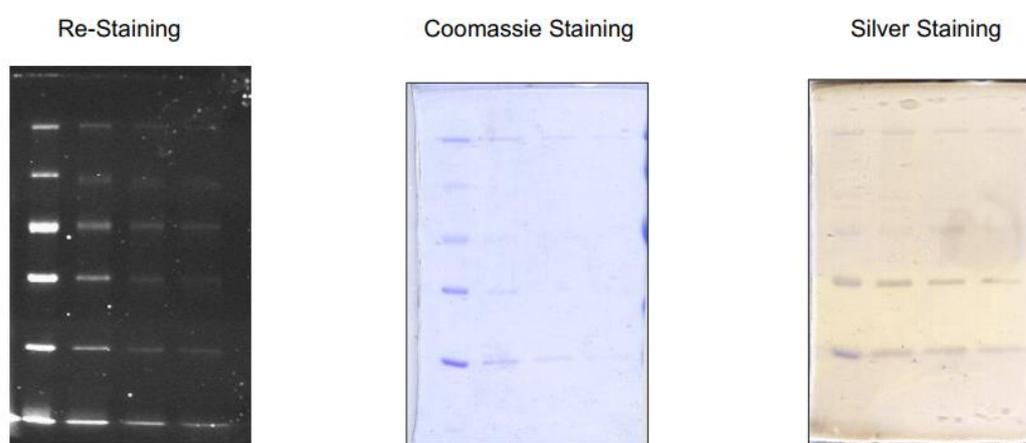


Figura 21: confronto tra elettroforesi di Marker MW a diluizioni successive (da 6 a 0.5 µL), colorati con $fac-[Re(bcds)(CO)_3Tph]^{2-}$, Coomassie e Silver staining.

La stessa procedura applicata per il complesso $fac-[Re(bfds)(CO)_3Tph]^{2-}$ mostra risultati assolutamente paragonabili a quelli ottenuti con il primo complesso considerato. In particolare, il complesso $fac-[Re(bfds)(CO)_3Tph]^{2-}$ (Figura 22) è in grado di riconoscere sino a circa 50 ng di proteina pura BSA e il marker proteico nel suo più basso valore di concentrazione (0,5 µL ovvero 50-100 ng proteina/banda).

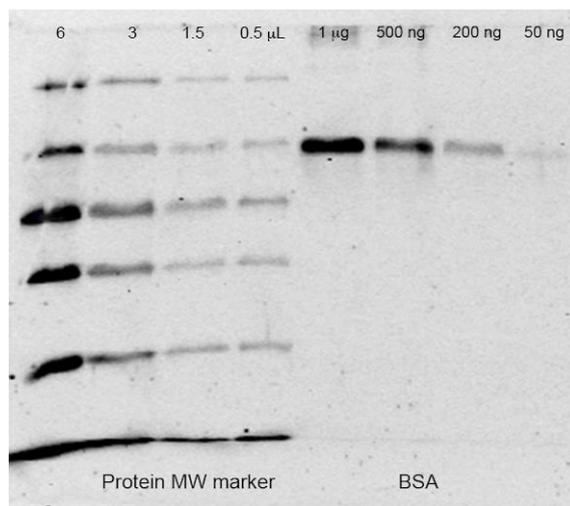


Figura 22: corsa elettroforetica in gel dello standard proteico, marker MW (da 6 a 0.5 μ L) e della proteina pura BSA (da 1 μ g a 50 ng). Staining effettuato con $fac-[Re(bfds)(CO)_3Tph]^2$.

A titolo di confronto, si riporta l'immagine dei gel in cui i due complessi sono stati utilizzati come coloranti per il medesimo marker proteico (Figura 23).

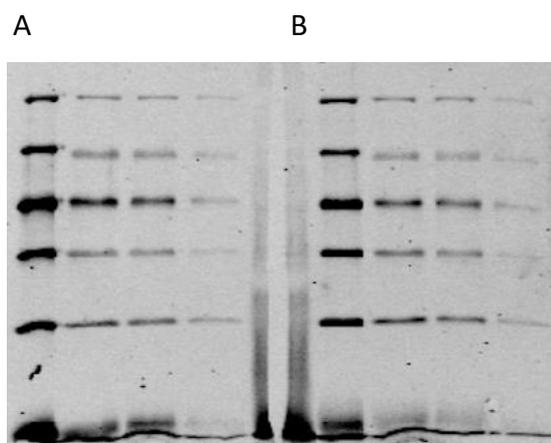


Figura 23: confronto tra staining di standard proteico, marker MW con complesso A) $fac-[Re(bcads)*(CO)_3Tph]^2$ e B) $fac-[Re(bfds)(CO)_3Tph]^2$.

Giunti a questi risultati positivi è stata condotta una prova per valutare l'eventuale aspecificità dei coloranti alle proteine; lo staining è stato quindi effettuato su un gel contenente un estratto proteico di *Escherichia coli* (Figura 24).

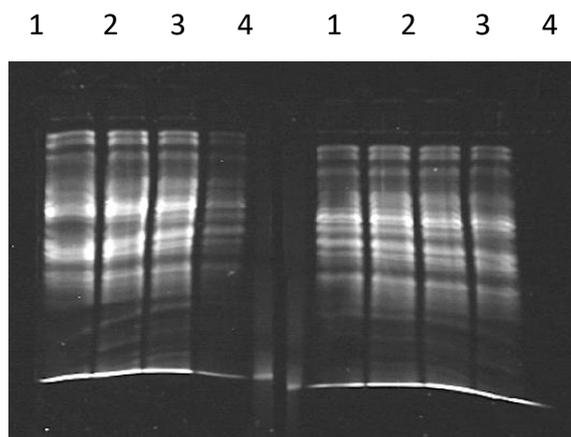


Figura 24: prova di aspecificità con un estratto proteico totale di *E. coli*. caricati in gel 10, 7.5, 5 e 2 μg (corsie 1-2-3-4). Staining effettuato utilizzando $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bcds})^*(\text{CO})_3\text{Tph}]^{2-}$ (sinistra) e $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bfd})_3(\text{CO})_3\text{Tph}]^{2-}$ (destra).

Prendendo spunto da uno studio presente in letteratura⁸ dove alcuni complessi luminescenti di Ir(III) non solfonati sono stati utilizzati per lo staining di proteine in gel, è stata eseguita la colorazione di nuovi gel utilizzando complessi di Re(I) triscarbonilici con leganti (N^N) non solfonati, $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bat})(\text{CO})_3\text{Tph}]$ e $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bat})(\text{CO})_3\text{Tph-Me}]^+$. I due complessi differiscono per la carica netta, il primo è neutro mentre il secondo è cationico. Come visibile in Figura 25, l'analisi dei gel ottenuti ha evidenziato il drastico calo della capacità di rilevazione delle proteine, mettendo quindi in evidenza come la presenza dei gruppi solfonati rivesta un ruolo fondamentale per questa applicazione.

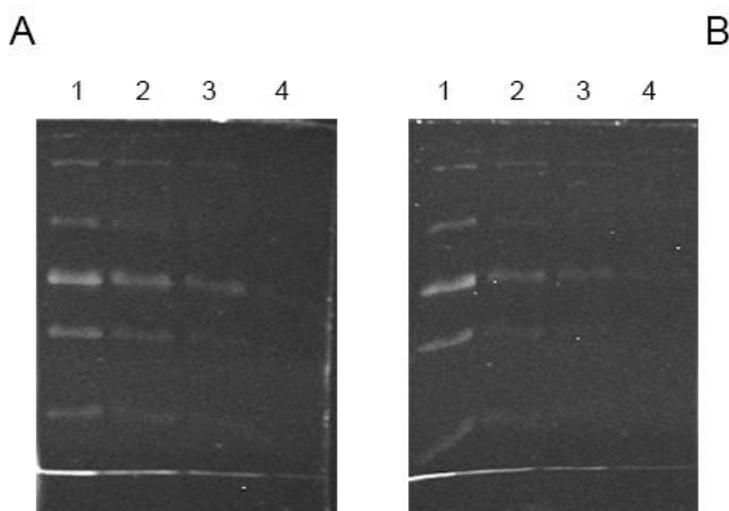


Figura 25: prova di elettroforesi su standard proteico MW. Confronto tra staining con $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bat})(\text{CO})_3\text{Tph}]^{2-}$ (a) e $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bat})(\text{CO})_3\text{Tph-Me}]^+$ (b).

Il risultato ottenuto non è comunque completamente negativo: sebbene il limite di rilevabilità sia inferiore rispetto ai casi precedenti, i complessi ***fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph]** e ***fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph-Me]⁺** non solfonati si mostrano comunque competitivi rispetto al Coomassie, come evidenziato dalla Figura 26, in cui tale colorazione è stata effettuata sugli stessi gel precedentemente colorati con i due complessi non solfonati. Come in precedenza, le corsie dei gel contengono concentrazioni decrescenti del marker proteico.

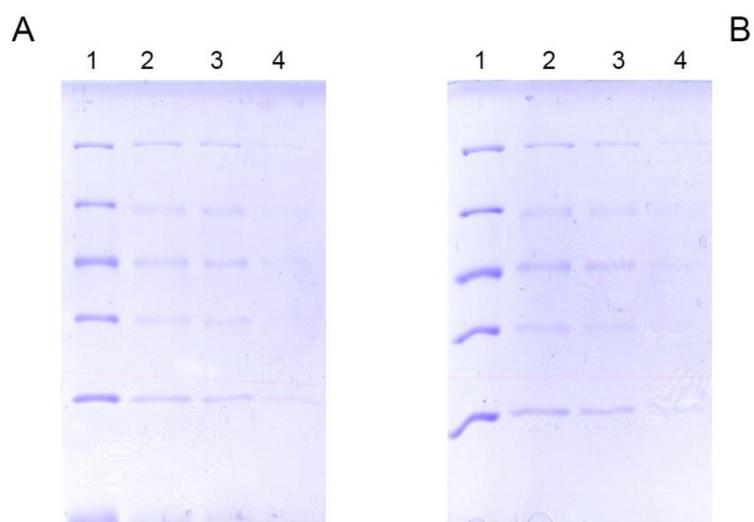


Figura 26: staining con Coomassie sui gel precedentemente colorati con *fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph] (a) e *fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph-Me]⁺ (b).

CONCLUSIONI

Durante questo lavoro sperimentale sono stati sintetizzati e caratterizzati una nuova classe di complessi triscarbonilici di Re(I)-tetrazolici con formulazione generale **fac-[Re(N^N)(CO)₃L]^{+/-/0}** il cui design è stato volto all'instaurare una interazione dei complessi in questione con substrati proteici mediante l'inserimento di un residuo solfonico all'interno della loro struttura. Tali complessi si sono dimostrati intensamente luminescenti, con caratteristiche fotoemittive variabili al variare delle combinazioni dei leganti coordinati al centro metallico. In particolare si è osservato come a parità di legante (N^N), impiegando l'anione **Tph** per completare la coordinazione del centro di Re(I), il massimo di emissione dei complessi risultanti subisce un blue shift di circa 20 nm rispetto a quelli osservati per i complessi recanti l'anione **PTZ**. Al variare del legante diminuito impiegato, si è osservato uno spostamento del massimo di emissione di circa 10 nm verso energie maggiori. Data la natura polare dello stato eccitato da cui si origina l'emissione di questi complessi (MLCT) è stato appurato come la luminescenza dei derivati Re(I) tetrazolici sia strettamente legata alla natura del solvente in cui sono disciolti. La presenza del residuo SO₃⁻, infatti, ha consentito l'impiego di questi complessi anche in ambiente acquoso, dove presentano due massimi di emissione distinti: una componente fluorescente, e una fosforescente. In solvente organico, invece, questa differenziazione sparisce in favore di un unico massimo di emissione centrato nella regione compresa tra 590 e 600nm.

Sulla base di queste indicazioni, si è quindi proceduto all'utilizzo di questi complessi come coloranti per lo staining di proteine, precedentemente separate mediante il metodo SDS-PAGE. I complessi **fac-[Re(bcds)^{*}(CO)₃L]²⁻**, **fac-[Re(bcds)(CO)₃L]²⁻** e **fac-[Re(bfds)(CO)₃L]²⁻** si sono dimostrati in grado di rilevare intensamente le bande proteiche relative alla proteina pura BSA (Bovine Serum Albumin) e allo standard proteico. La sensibilità della colorazione è paragonabile allo stesso campione colorato con ioni Ag(I) (Silver Staining) e superiore a quello in cui è stato impiegato il colorante Coomassie Blue Brilliant, i due agenti più noti per lo staining proteico. Le stesse prove effettuate con i complessi non solfonati **fac-[Re(bat)(CO)₃Tph]** o **fac-[Re(bat)(CO)₃Tph-Me]⁺**, hanno mostrato come i gruppi solfonici siano necessari per ottenere un'interazione elettrostatica tra complesso-colorante e proteina abbastanza forte da

rendere intensa la colorazione rilevando fino a 50 ng di substrato proteico caricato. In generale, i risultati ottenuti si possono definire molto promettenti. Innanzitutto, l'utilizzo di questa classe di complessi di Re(I) come coloranti per gel SDS-PAGE costituisce una novità assoluta nel panorama scientifico applicativo di tali derivati. Inoltre, è ancora più importante notare come le performances evidenziate dai complessi di Re(I) siano state ragguardevoli, sia in termini di affinità verso le proteine che di sensibilità di rilevazione. In futuro, l'attività di ricerca verrà sviluppata modificando ulteriormente il design dei complessi presentati in questo elaborato, con l'obiettivo di aumentarne la sensibilità e la specificità verso diversi substrati proteici.

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: metanolo (Sigma Aldrich), trietilammina (Alfa Aesar), dimetilformammide (Fluka) sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni ad esclusione di toluene, anidrificato su lega Na/K. I reagenti: cianobenzene, cianopiridina, litio cloruro, ammonio cloruro, sodio azide, batocuproina, batofenantrolina disolfonata, batocuproina disolfonata, batocuproina disolfonata, tetrabuttilammonio idrogenosolfato (Sigma Aldrich), $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ (Strem Chemicals), sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Il gel di silice utilizzato nelle cromatografie (40-63 μm , Merck) e Al_2O_3 (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, ^{13}C , 100.6 MHz) e Varian Mercury Plus VX600 (^1H , 599.7 MHz, ^{13}C , 150.8 MHz). Tutti i valori di chemical shift sono riportati in ppm (scala δ) ricorrendo, come standard interno, alla risonanza del residuo protonico non deuterato:), $\text{DMSO}-d^6$ (1.93 ppm), $\text{Acetone}-d^6$ (2.05 ppm), CD_3CN (1.93 ppm), CD_3OD (3.31 ppm). I solventi deuterati utilizzati (Euriso-top) sono stati impiegati senza ulteriori purificazioni. Gli spettri IR sono stati registrati con lo strumento FT-IR Perkin Elmer–Spectrum One utilizzando una cella di NaCl (spessore 1mm) in DCM. 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 CH_3CN dei composti impiegando uno spettrometro di massa WATERS ZQ 4000. Gli spettri di emissione sono stati registrati con uno spettrofluorimetro Edinburgh FLS920P dotato di una lampada ad arco di xeno, un monocromatore a doppia eccitazione e singola emissione, un tubo fotomoltiplicatore Hamamatsu R928P (185-850 nm) con raffreddamento Peltier. Gli spettri di eccitazione ed emissione sono stati corretti per intensità della sorgente (lampada e reticolo) e risposta spettrale di emissione (detector e reticolo) mediante una curva di calibrazione dello strumento. I tempi di vita sono stati determinati con lo stesso strumento mediante

la tecnica Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC), usando come fonte di eccitazione dispositivi LED (ELED 369, FWHM <800 ps, repetition rate compreso tra 10 kHz e 1 MHz) ed il tubo fotomoltiplicatore come detector. Le misure effettuate in assenza di ossigeno sono effettuate dopo aver degasato le soluzioni per 10 minuti in atmosfera di Ar utilizzando una cuvetta in quarzo dotata di setto in silicone. Gli spettri di emissione a 77K sono stati registrati impiegando un tubo portacampione in quarzo posto all'interno di un apposito dewar contenente azoto liquido. Le rese quantiche di emissione (Φ_s) sono state determinate mediante il metodo delle soluzioni otticamente diluite riportato da Crosby e Demas,¹⁶ impiegando una soluzione madre avente assorbanza >0.1; sono state quindi ottenute due soluzioni diluite con fattori 1:20 ed 1:10, corrispondenti a valori di assorbanza prossimi rispettivamente a 0,02 e 0,08. La legge di Lambert-Beer è stata considerata quindi rientrante nell'intervallo di linearità alle concentrazioni delle soluzioni utilizzate.

Una soluzione di $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}[\text{Cl}]^-/\text{H}_2\text{O}$ ($\Phi_r = 0.028$)¹⁶ è stata utilizzata come riferimento. La resa quantica di emissione è stata quindi calcolata utilizzando la relazione:

$$\phi_s = \phi_r \left[\frac{A_r(\lambda_r)}{A_s(\lambda_s)} \right] \left[\frac{I_r(\lambda_r)}{I_s(\lambda_s)} \right] \left[\frac{n_s^2}{n_r^2} \right] \left[\frac{D_s}{D_r} \right]$$

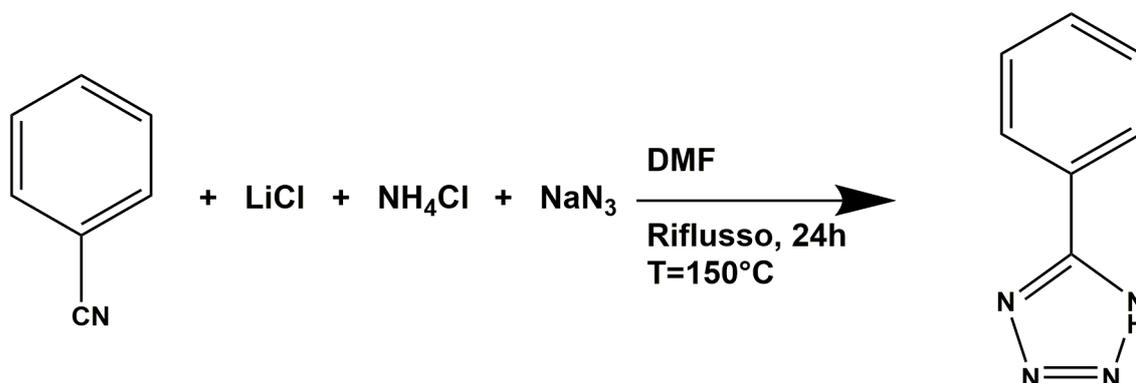
dove A è il valore di assorbanza alla lunghezza d'onda di eccitazione λ , I è l'intensità della sorgente di eccitazione alla lunghezza d'onda di eccitazione λ , n è l'indice di rifrazione del solvente, D il valore dell'integrale dello spettro di emissione steady-state registrato a parità di condizioni strumentali. I pedici r ed s si riferiscono rispettivamente a riferimento e campione. La resa quantica è stata determinata usando la medesima λ_{exc} sia per il riferimento che per il campione, rendendo quindi nullo il termine $I(\lambda_r)/I(\lambda_s)$ all'interno dell'equazione riportata.

ABBREVIAZIONI UTILIZZATE

DCM	Diclorometano
MeOH	Metanolo
DMF	Dimetilformammide
Tph	5-fenil-1H-tetrazolo
PTZ	5-piridil-1H-tetrazolo
Bat	Batocuproina
Bfds	Batofenantrolina disolfonata
Bcds	Batocuproina disolfonata
Bcds*	Batocuproina disolfonata
TBA	Tetrabuttilammonio
DMSO	Dimetilsolfossido
CDCl₃	Cloroformio deuterato
CD₃OD	Metanolo deuterato
APS	Ammonio persolfato
TEMED	Tetrametiletildiammina

SINTESI DEI LEGANTI TETRAZOLICI

Sintesi di 5-fenil-1H-tetrazolo, TPh

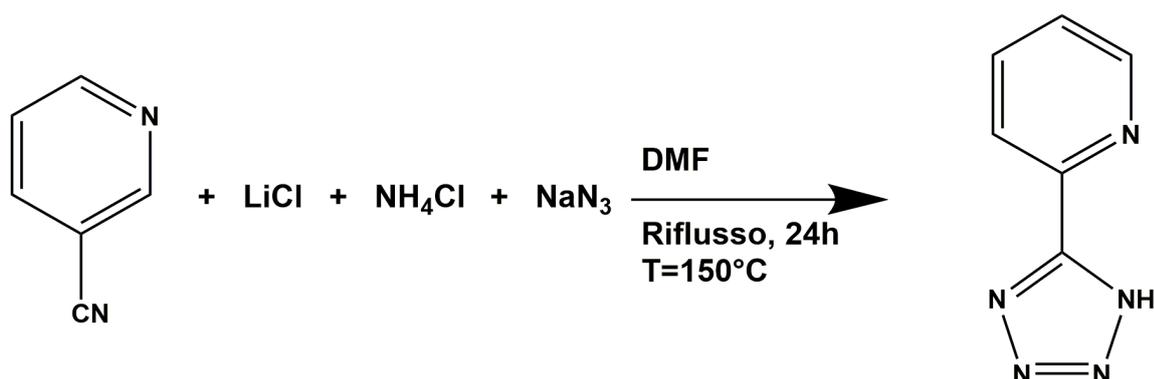


In un pallone a due colli da 100 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.98 mL (9.71 mmol) di benzonitrile, 0.694 g (10.68 mmol) di sodio azide, 0.843 g (19.42 mmol) di litio cloruro, 0.571 g (10.68 mmol) di ammonio cloruro in 30 mL di DMF. Si scalda la soluzione alla temperatura di riflusso per 24 ore. Al termine si porta a secco il grezzo di reazione e si aggiungono 10 mL di H₂O. Si aggiungono quindi piccole aliquote di una soluzione H₂O/HCl 37% v/v in rapporto 3:1, controllando il pH dopo ogni aggiunta, sino alla formazione di un precipitato bianco. Il solido ottenuto viene filtrato mediante filtro a due vie, lavato con H₂O ed asciugato.

Resa 5-fenil-1H-tetrazolo [TPh] = 9.11% (0.129 g, 0.884 mmol)

¹H-NMR (DMSO-*d*⁶, 400 MHz) δ (ppm) = 7.57 (m, 3H), 8.03 (m, 2H).

Sintesi di 5-piridil-1H-tetrazolo, PTZ

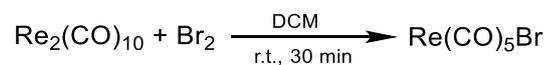


In un pallone a due colli da 100 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 1 g (9.61 mmol) di 3-cianopiridina, 0.688 g (10.57 mmol) di sodio azide, 0.834 g (19.21 mmol) di litio cloruro, 0.565 g (10.57 mmol) di ammonio cloruro in 30 mL di DMF. Si scalda la soluzione alla temperatura di riflusso per 24 ore. Al termine si porta a secco il grezzo di reazione e si aggiungono 10 mL di H₂O. Si aggiungono qui-di piccole aliquote di una soluzione H₂O/HCl 37% v/v in rapporto 3:1, controllando il pH dopo ogni aggiunta, sino alla formazione di un precipitato bianco. Il solido ottenuto viene filtrato mediante filtro a due vie, lavato con H₂O ed asciugato.

Resa 5-piridil-1H-tetrazolo, PTZ = 54.7% (0.773 g, 5.26 mmol)

¹H-NMR (DMSO-*d*⁶, 400 MHz) δ (ppm) = 7.63 (m, 1H), 8.08 (m, 1H), 8.22 (m, 1H), 8.79 (m, 1H).

Sintesi di Re(CO)₅Br

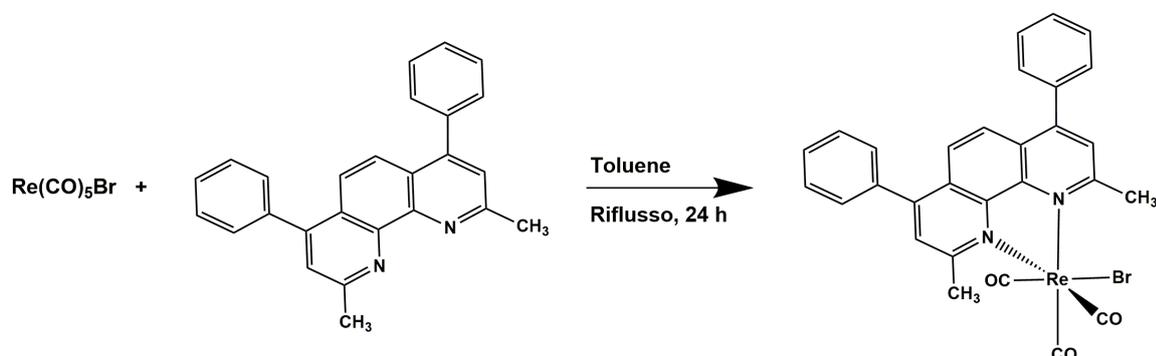


In un pallone a due colli da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e in atmosfera inerte, si disciolgono 1g (1.53 mmol) di **Re₂(CO)₁₀** e 1mL di **Br₂** in 30 mL di DCM. La soluzione viene lasciata reagire per 30 minuti a temperatura ambiente. Al termine della reazione si filtra il precipitato, un solido di colore bianco, che viene lavato con esano.

Resa = 94%, 1.180 g, 2.88 mmol.

SINTESI DEI PRECURSORI di Re(I)

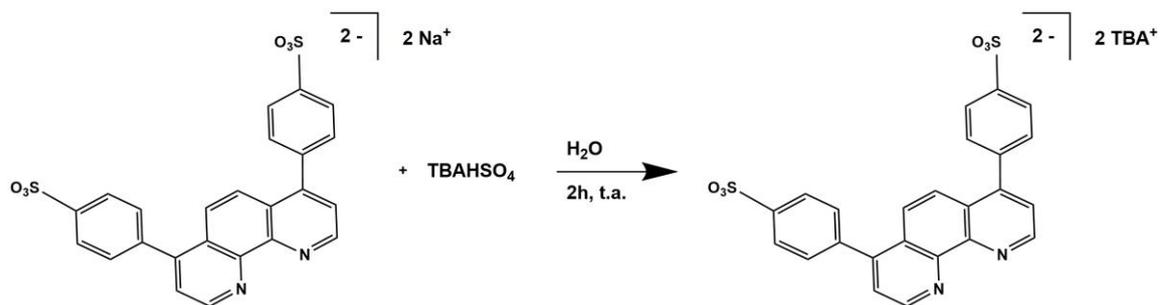
Sintesi di *fac*-[Re(bat)(CO)₃Br]



In un pallone a due colli da 100 mL, dotato di ancoretta magnetica e in atmosfera inerte, si pongono 0.200 g (0.210 mmol) di *fac*-[Re(CO)₅Br] e 0.224 g (0.624 mmol) di batocuproina in rapporto 1:1.3. Si sciolgono i solidi in 45 mL di toluene e si lascia reagire per 24 ore, scaldando alla temperatura di riflusso. Al termine si porta il grezzo di reazione a temperatura ambiente. Si filtra il solido giallo e si lava con Et₂O.

Resa = 94% (0.140 g, 0.197 mmol).

Sintesi di [(TBA)₂(bfd_s)]

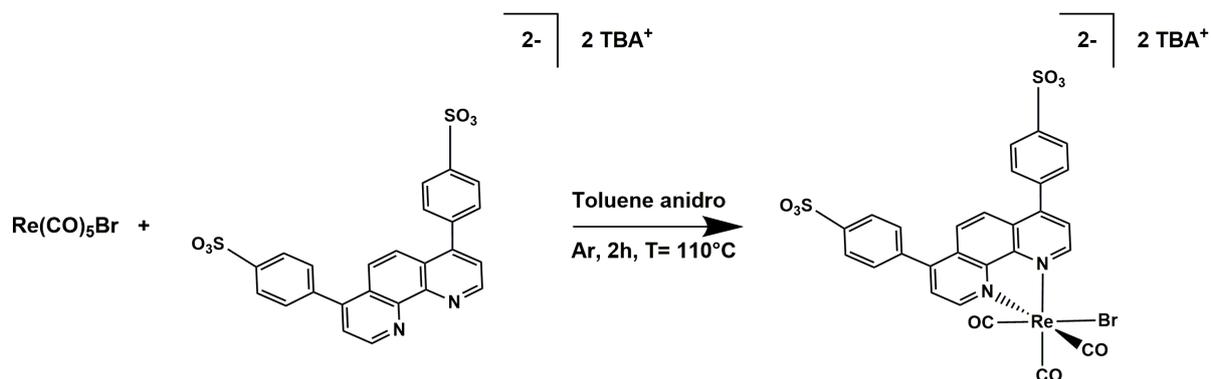


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.120 g (0.22 mmol) di $[\text{Na}_2(\text{bfd}_s)]$ e 0.169 g (0.49 mmol) di $[\text{TBA}]^+[\text{HSO}_4]^-$ in rapporto 1:2.3. Si sciolgono i solidi in 2 mL di H_2O e si lasciano sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore.

Al termine si estrae la soluzione con DCM (3 x 3 mL) e si anidrifca la fase organica con Na_2SO_4 . Si rimuove il solvente al rotavapor, ottenendo un solido di colore rosa.

Resa = 95.4% (0.206 g, 0.21 mmol).

Sintesi di fac -[Re(bfds)(CO)₃Br]²⁻ 2[TBA]⁺

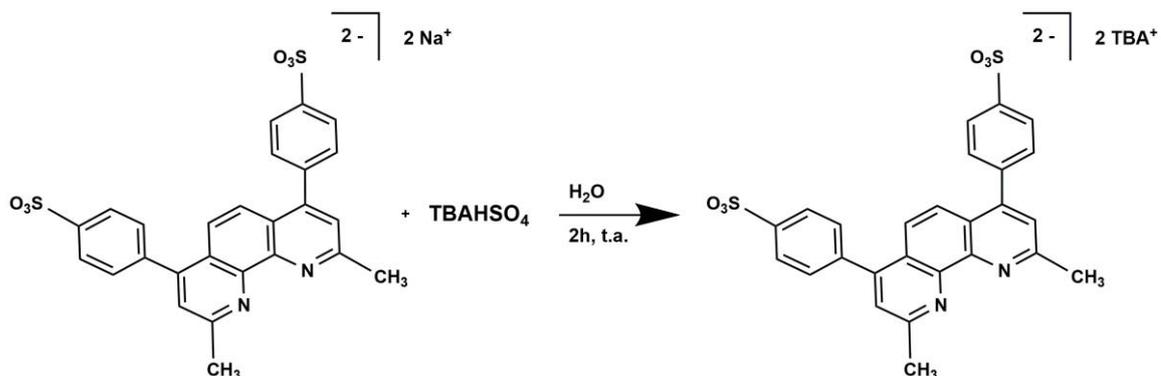


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica e in atmosfera inerte, si pongono 0.084 g (0.210 mmol) di fac -[Re(CO)₅Br]²⁻ 2[TBA]⁺ e 0.206 g (0.210 mmol) di [(TBA)₂(bfd)] in rapporto 1:1. Si sciolgono i solidi in 5 mL di toluene anidro e si lascia reagire per 2 ore, scaldando alla temperatura di riflusso. Al termine si porta il grezzo di reazione a temperatura ambiente e si lascia depositare il solido ottenuto sul fondo del pallone di reazione. Si rimuove il surnatante e si aggiunge Et₂O, lasciandolo agitare per 16 ore. Si rimuove l'Et₂O e si recupera il prodotto, solido di colore giallo/arancio.

Resa = 66.7% (0.191 g, 0.14 mmol).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) = 0.95 (m, 16H), 1.33 (m, 12H), 1.57 (m, 12H), 3.20 (m, 12H), 7.12 (m, 4H), 7.47 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.72 (m, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.96 (m, 2H), 8.16 (d, J_{H-H} = 6.8 Hz, 4H), 9.36 (m, 2H).

Sintesi di [(TBA)₂(bcds)*]

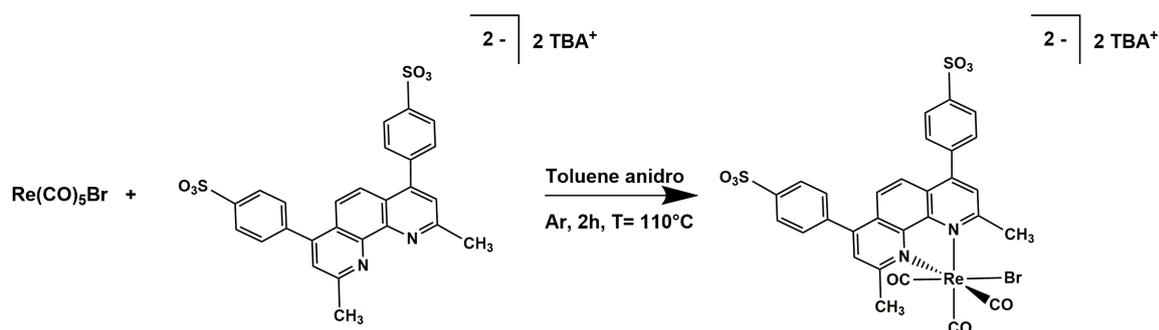


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.102 g (0.18 mmol) di **[Na₂(bcds)*]** e 0.140 g (0.42 mmol) di **[TBA]⁺[HSO₄]⁻** in rapporto 1:2.3. Si sciolgono i solidi in 2 mL di H₂O e si lasciano sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore.

Al termine si estrae la soluzione con DCM (3 x 3 mL) e si andirifica la fase organica con Na₂SO₄. Si rimuove il solvente al rotavapor, ottenendo un solido di colore bianco.

Resa = 88.8% (0.164 g, 0.16 mmol).

Sintesi di $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Br]^{2-} \cdot 2[TBA]^+$

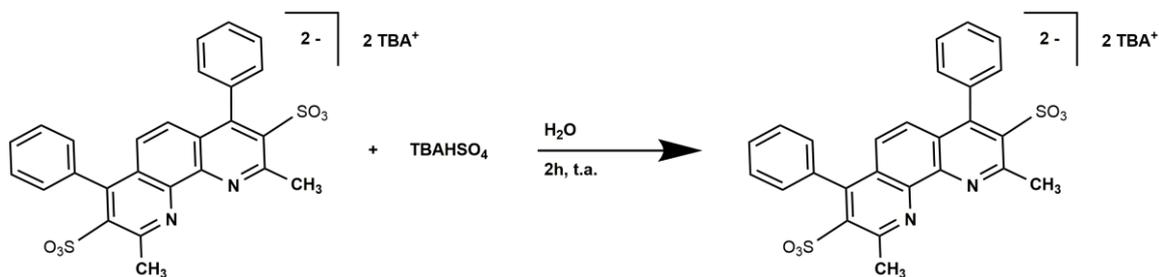


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica e in atmosfera inerte, si pongono 0.066 g (0.16 mmol) di $fac-[Re(CO)_5Br]^{2-} \cdot 2[TBA]^+$ e 0.164 g (0.16 mmol) di $[(TBA)_2(bcds)^*]$ in rapporto 1:1. Si sciolgono i solidi in 5 mL di toluene anidro e si lascia reagire per 2 ore, scaldando alla temperatura di riflusso. Al termine si porta il grezzo di reazione a temperatura ambiente e si lascia depositare il solido ottenuto sul fondo del pallone di reazione. Si rimuove il surnatante e si aggiunge Et₂O, lasciandolo agitare per 16 ore. Si rimuove l'Et₂O e si recupera il prodotto, solido di colore giallo.

Resa = 62.5% (0.145 g, 0.10 mmol).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) = 7.66 (m, 4H), 7.96 (m, 3H), 8.03 (m, 5H)

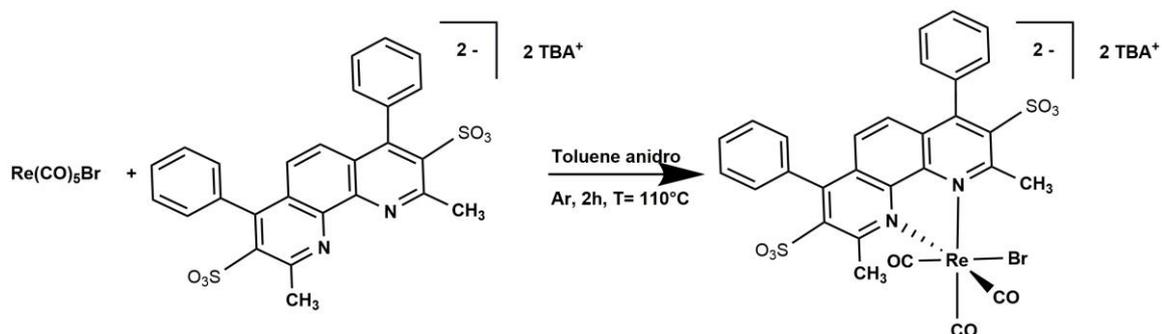
Sintesi di [(TBA)₂(bcds)]



In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.102 g (0.18 mmol) di **[Na₂(bcds)]** e 0.140 g (0.42 mmol) di **[TBA]⁺[HSO₄]⁻** in rapporto 1:2.3. Si sciolgono i solidi in 2 mL di H₂O e si lasciano sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore. Al termine si estrae la soluzione con DCM (3 x 3 mL) e si andirifica la fase organica con Na₂SO₄. Si rimuove il solvente al rotavapor, ottenendo un solido di colore bianco.

Resa = 57.8% (0.104 g, 0.10 mmol).

Sintesi di *fac*-[Re(bcds)(CO)₃Br]²⁻ 2[TBA]⁺



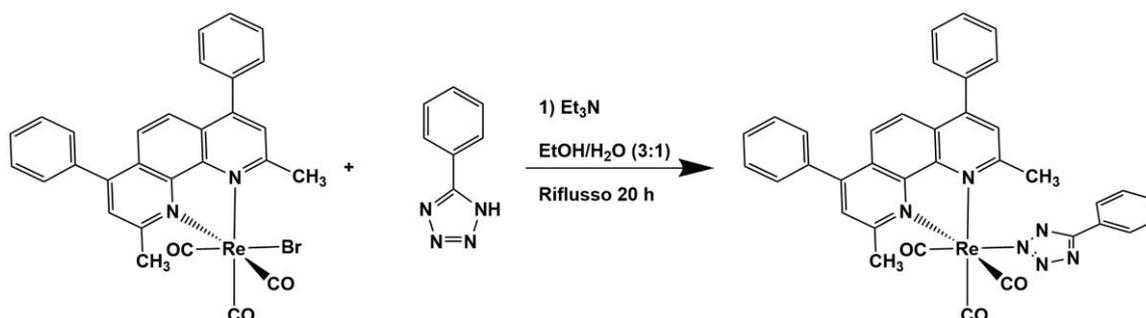
In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica e in atmosfera inerte, si pongono 0.042 g (0.10 mmol) di **[Re(CO)₅Br]** e 0.104 g (0.10 mmol) di **[(TBA)₂(bcds)]** in rapporto 1:1. Si sciolgono i solidi in 5 mL di toluene anidro e si lascia reagire per 2 ore, scaldando alla temperatura di riflusso. Al termine si porta il grezzo di reazione a temperatura ambiente e si lascia depositare il solido ottenuto sul fondo del pallone di reazione. Si rimuove il surnatante e si aggiunge Et₂O, lasciandolo agitare per 16 ore. Si rimuove l'Et₂O e si recupera il prodotto, solido di colore bianco.

Resa = 58.0% (0.079 g, 0.058 mmol).

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) = 1.01 (m, 16H), 1.35 (m, 12H), 1.59 (m, 12H), 3.23 (m, 12H), 7.61 (m, 4H), 7.92 (m, 8H)

SINTESI DEI COMPLESSI DI Re(I)

Sintesi di *fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph]

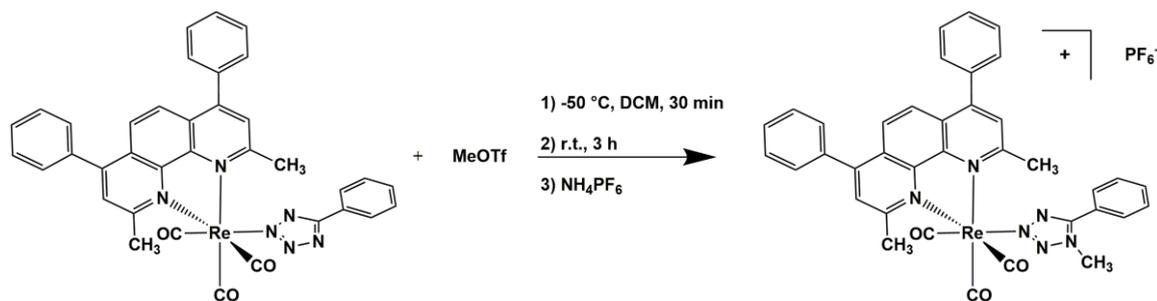


In un pallone a due colli da 50 mL, munito di ancoretta magnetica, si disciogliono 100 mg (0.140 mmol) di ***fac*-Re(bat)(CO)₃Br** in 15 mL di EtOH. In un vial si sciolgono 33 mg (0.22 mmol) di Tph in 5 mL di H₂O e 1 mL di Et₃N, sino alla completa dissoluzione; si aggiunge quindi quest'ultima al pallone di reazione con un imbuto sgocciolatore, nell'arco di 30 minuti. Si lascia reagire la soluzione alla temperatura di riflusso per 20 ore. Al termine, si riduce il volume del grezzo di reazione e si osserva quindi la formazione di un precipitato giallo. Il solido viene filtrato e lavato con Et₂O.

Resa: 56%

IR ν (cm⁻¹) = 2022.71 (CO), 1918.04 (CO), 1898.22 (CO). **¹H NMR** (Acetone-d⁶, 600 MHz) δ (ppm) = 3.57 (s, 6H), 7.21 (m, 3H), 7.59 (m, 10H), 7.72 (m, 2H), 7.96 (s, 2H), 8.09 (s, 2H).

Sintesi di fac -[Re(bat)(CO)₃Tph-Me]⁺[PF₆]⁻



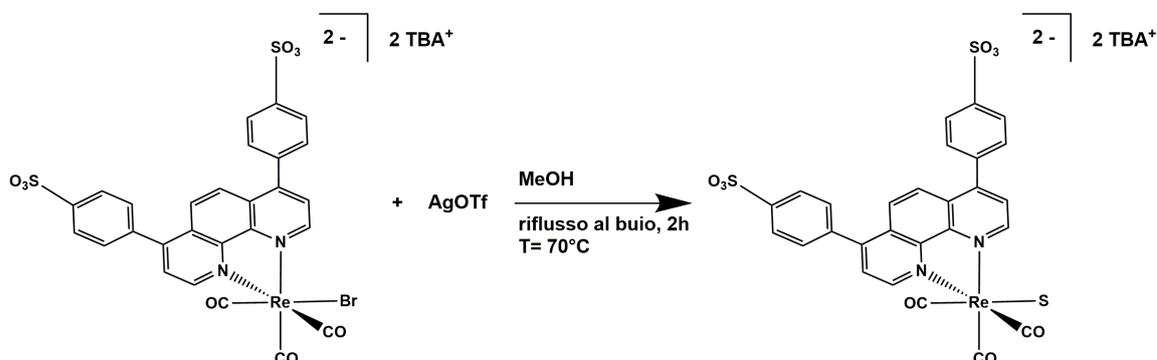
In un pallone a 2 colli da 50 mL, immerso in un bagno di EtOH e N₂(l), si sciolgono, con 15 mL di DCM, 0.030 g di ***fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph]** (0.039 mmol) e si aggiunge CF₃SO₃CH₃ (ρ=1.496 Kg/L) (0.0358 g, 0.035 mmol) in rapporto 1:0.9. Dopo 30 minuti di agitazione, si porta il sistema a temperatura ambiente, lasciandolo quindi reagire per 3h. Al termine si discioglie nel grezzo di reazione un eccesso di NH₄PF₆ e si lascia sotto agitazione per 5 minuti, al termine dei quali vengono aggiunti 10 mL di H₂O. Mediante l'utilizzo di un imbuto separatore viene poi recuperata la fase organica, la quale viene anidrificata con Na₂SO₄. Il grezzo viene poi fatto precipitare tramite aggiunte di Et₂O e il prodotto viene purificato mediante colonna su Al₂O₃, eluendo con una miscela DCM/Acetone in rapporto 9:1.

Resa: 65% (0.022 g, 0.022 mmol)

ESI-MS (m/z): [M]⁺ = 791, [M]⁻ = 145 (PF₆). **¹H NMR** (Acetone-d₆, 600 MHz) δ (ppm) = 3.23 (s, 4H), 3.56 (d, J_{H-H} = 14.4 Hz, 2H), 3.71 (d, J_{H-H} = 17.6 Hz, 2H), 4.16 (d, J_{H-H} = 18.8 Hz, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.65 (m, 10H), 8.03 (d, J_{H-H} = 4.9 Hz, 3H), 8.08 (s, 1H), 8.19 (s, 1H).

Sintesi di fac -[Re(bfds)(CO)₃TPZ]²⁻ 2[TBA]⁺ e fac -[Re(bfds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺

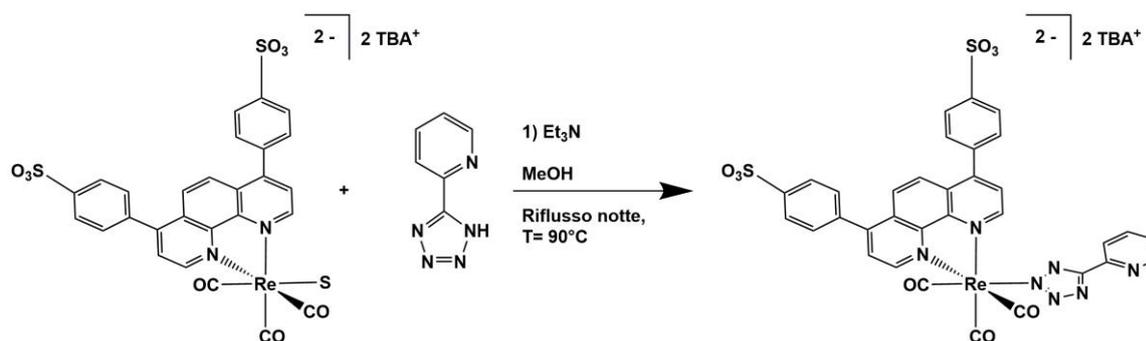
Alogeno estrazione



In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica e protetto dalla luce, si pongono 0.191 g (0.14 mmol) di fac -[Re(bfds)(CO)₃Br]²⁻ 2[TBA]⁺ e 0.048 g (0.18 mmol) di AgOTf. Si sciolgono i reagenti in 12 mL di MeOH e si lascia reagire alla temperatura di riflusso per 2h.

Al termine si lascia raffreddare il grezzo di reazione e si filtra la soluzione su celite per rimuovere l'AgBr. Si utilizza la soluzione per il passaggio successivo, senza ulteriori purificazioni.

Sintesi di fac -[Re(bfds)(CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺

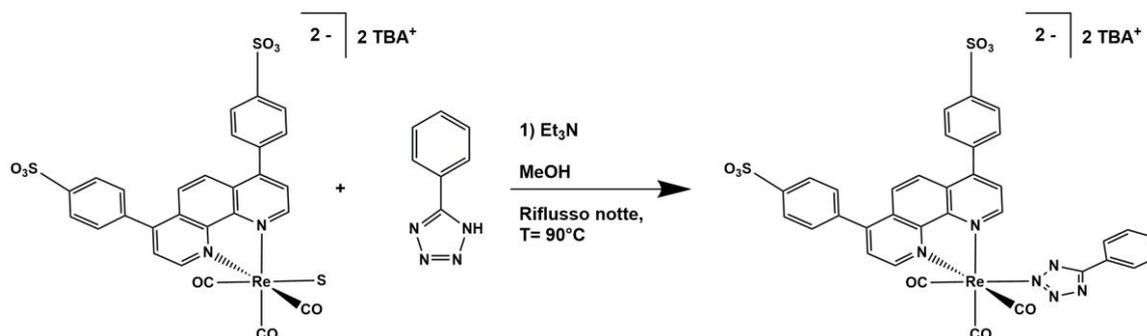


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.191 g (0.14 mmol) di fac -[Re(bfds)(CO)₃S]²⁻ 2[TBA]⁺ ed 8 mL di MeOH. In un vial, si sciolgono 0.030 g (0.21 mmol) di 5-piridil-1H-tetrazolo, 29 μ L (0.21 mmol) di Et₃N in 4 mL di MeOH. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione preparata precedentemente. La soluzione così ottenuta viene portata alla temperatura di riflusso per 16 h. Al termine si rimuove il solvente, ed il grezzo di reazione viene lavato con etere etilico. Si purifica il prodotto mediante colonna cromatografica su SiO₂, eluita con CH₃CN a gradiente crescente di MeOH (prodotto: terza frazione).

Resa = 7.5% (0.015g, 0.01mmol).

ESI-MS [M/2]⁻ = 453 m/z, [M+Na]²⁻ = 930 m/z (MeOH). **IR** ν (cm⁻¹) = 2024.8 (CO), 1894.8 (CO), 1606.9 (SO₃⁻). **¹H-NMR** (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) = 7.11 (m, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.62 (m, 2H), 7.74 (m, 3H), 7.95 (m, 2H), 8.08 (m, 3H), 8.55 (m, 2H), 9.56 (m, 2H). **¹³C NMR** (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 197.72 (CO), 194.43 (CO), 166.58 (C_t), 155.19, 152.34, 150.12, 149.26, 148.42, 141.64, 138.66, 137.09, 132.58, 131.02, 130.39, 129.93, 128.59, 128.04, 126.80, 123.39, 120.22.

Sintesi di fac -[Re(bfds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺



In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.150 g (0.11 mmol) di fac -[Re(bfds)(CO)₃S]²⁻ 2[TBA]⁺ ed 8 mL di MeOH. In un vial, si sciolgono 0.024 g (0.16 mmol) di Tph, 23 μ L (0.16 mmol) di Et₃N in 4 mL di MeOH. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione preparata precedentemente. Si scalda alla temperatura di riflusso per 16 h. Al termine si rimuove il solvente, ed il grezzo di reazione viene lavato con etere.

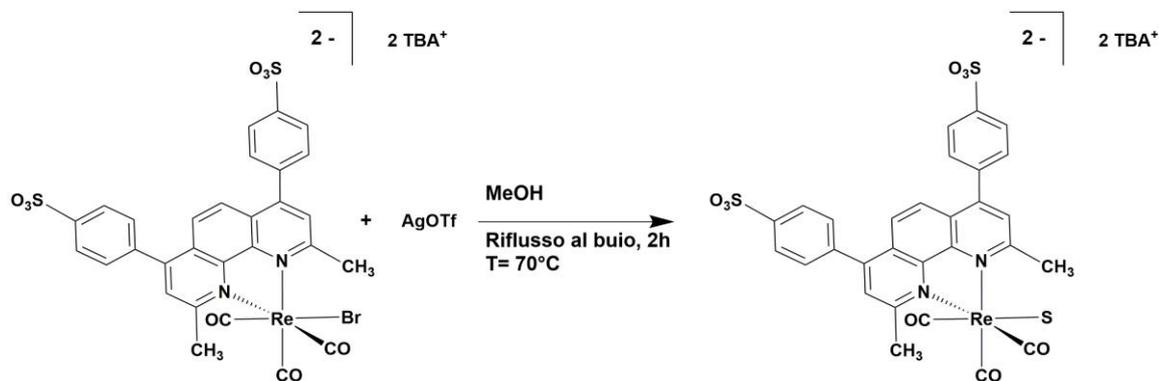
Si purifica il prodotto mediante precipitazione del precursore non reagito con Et₂O.

Resa = 50.03%, (0.076g, 0.055 mmol).

ESI-MS [AgOTf] = 149 m/z, [M/2]⁻ = 452 m/z, [bfdS] = 536 m/z, [TBA⁺] = 242 m/z, (MeOH). **IR** ν (cm⁻¹) = 2026.4 (CO), 1918.7 (CO), 1712.2 (SO₃⁻), 1605.3 (SO₃⁻), (DCM). **¹H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) = 0.95 (m, 16H), 1.30 (m, 18H), 1.51 (m, 12H), 3.17 (m, 12H), 7.31 (m, 3H), 7.51 (m, 2H), 7.59 (M, 2H), 7.71 (m, 2H), 7.82 (m, 1H), 7.93 (m, 2H), 8.08 (m, 5H), 9.51 (m, 2H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) = 197.086 (CO), 193.876 (CO), 163.455 (Ct), 153.303, 151.294, 148.340, 147.915, 147.615, 136.524, 135.204, 131.099, 130.784, 130.022, 129.692, 129.399, 129.223, 128.761, 128.483, 128.013, 127.772, 127.427, 127.207, 126.474, 126.247, 125.807, 125.682, 122.538, 119.349.

Sintesi di fac -[Re(bcds)^{*}(CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺ e fac -[Re(bcds)^{*}(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺

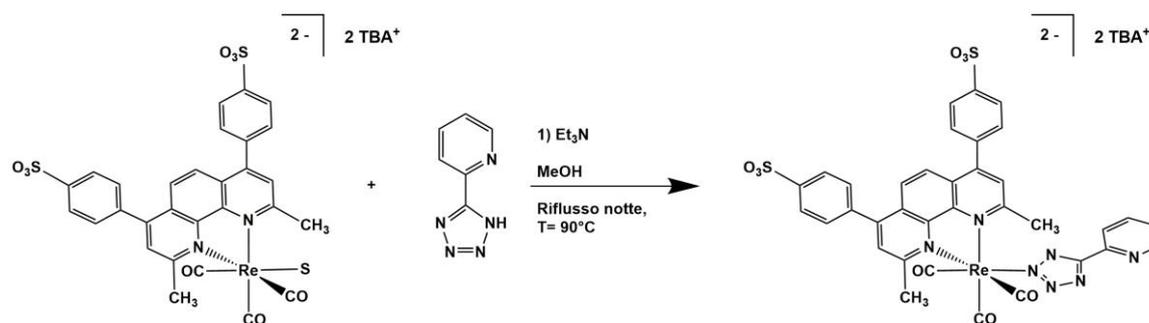
Alogeno estrazione



In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica e protetto dalla luce, si pongono 0.148 g (0.11 mmol) di fac -[Re(bcds)^{*}(CO)₃Br]²⁻ 2[TBA]⁺ e 0.028 g (0.11 mmol) di AgOTf. Si sciolgono i reagenti in 12 mL di MeOH e si lascia reagire alla temperatura di riflusso per 2h.

Al termine si lascia raffreddare il grezzo di reazione e si filtra la soluzione su celite per rimuovere l'AgBr. Si utilizza la soluzione per il passaggio successivo, senza ulteriori purificazioni.

Sintesi di $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3PTZ]^{2-} 2[TBA]^+$

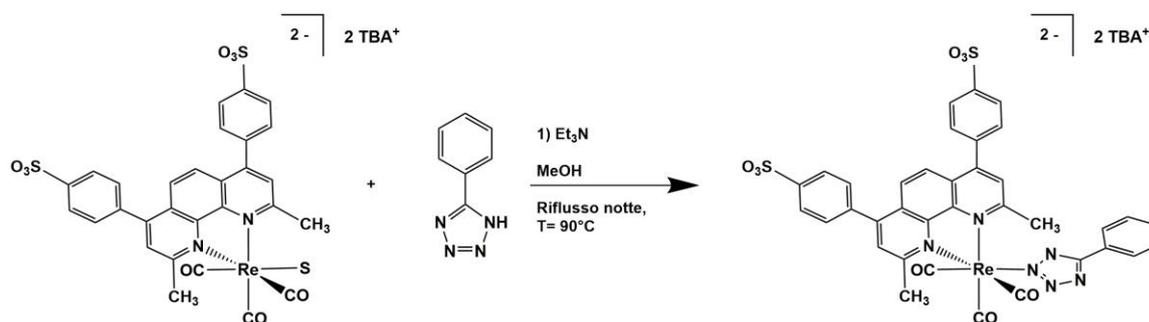


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.148 g (0.18 mmol) di $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3S]^{2-} 2[TBA]^+$ ed 8 mL di MeOH. In un vial, si sciolgono 0.031 g (0.21 mmol) di PTZ, 28 μ L (0.21 mmol) di Et_3N in 4 mL di MeOH. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione preparata precedentemente. Si scalda alla temperatura di riflusso per 16 h. Al termine si rimuove il solvente, ed il grezzo di reazione viene lavato con etere. Si purifica il prodotto mediante colonna cromatografica su SiO_2 , eluita con DCM/MeOH (3:1) a gradiente crescente di MeOH (prodotto: prima frazione).

Resa = 36.5% (0.093g, 0.065mmol).

ESI-MS [$AgOTf$] = 149 m/z, [$M/2$] $^-$ = 467 m/z, [TBA^+] = 242 m/z (MeOH). **IR** ν (cm^{-1}) = 2025.6 (CO), 1913.2 (CO), 1606.0 (SO_3^-). **1H -NMR** (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) = 2.95 (d, $J_{H-H}=2.4$ Hz, 3H), 3.5 (d, $J_{H-H}=1.6$ Hz, 3H), 7.34 (m, 1H), 7.60 (m, 6H), 7.76 (m, 1H), 7.87 (m, 1H), 7.97 (m, 5H), 8.49 (m, 1H). **^{13}C -NMR** (CD_3OD , 100MHz) δ (ppm) = 164.265 (C_t), 158.750, 150.594, 145.397, 137.891, 136.000, 131.132, 128.625, 126.741, 126.023, 125.796, 124.059, 122.820, 58.101, 58.079, 58.050.

Sintesi di $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3Tph]^{2-} 2[TBA]^+$



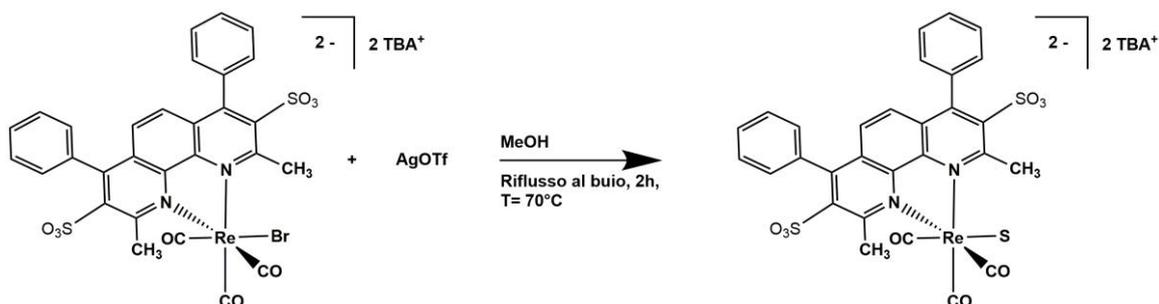
In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.148 g (0.11 mmol) di $fac-[Re(bcds)^*(CO)_3S]^{2-} 2[TBA]^+$ ed 8 mL di MeOH. In un vial, si sciolgono 0.019 g (0.13 mmol) di 5-fenil-1H-tetrazolo, 18 μL (0.13 mmol) di Et_3N in 4 mL di MeOH. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione preparata precedentemente. Si scalda alla temperatura di riflusso per 16 h. Al termine si rimuove il solvente, ed il grezzo di reazione viene lavato con etere. Si purifica il prodotto mediante colonna cromatografica su SiO_2 , eluita con DCM/MeOH (3:1) a gradiente crescente di MeOH (prodotto: seconda frazione).

Resa = 35.0% (0.055g 0.038mmol).

ESI-MS $[M/2]^- = 467$ m/z, $[M+Na]^{2-} = 957$ m/z, $[M]^- = 1176$ m/z, $[TBA]^+ = 242$ m/z (MeOH)
IR ν (cm^{-1}) = 2029.0 (CO), 2015.5 (CO), 1914.3 (CO), 1606.0 (SO_3^-), (DCM). **1H -NMR** (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) = 2.96 (s, 2H), 3.50 (s, 3H), 7.29 (m, 2H), 7.40 (d, $J_{H-H}=7.5$ Hz, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.57 (m, 2H), 7.66 (m, 4H), 7.80 (s, 1H), 7.87 (m, 1H), 8.03 (d, $J_{H-H}=11.8$ Hz, 6H). **^{13}C -NMR** (CD_3OD , 100MHz) δ (ppm) = 164.177, 162.726, 160.937, 158.782, 150.535, 148.659, 148.380, 145.815, 145.419, 145.045, 137.869, 135.948, 131.176, 129.417, 129.285, 128.889, 128.684, 128.596, 128.559, 128.347, 128.288, 128.237, 126.727, 126.338, 126.265, 125.811, 125.737, 125.708, 124.410, 124.147, 124.007, 122.732

Sintesi di fac -[Re(bcds)(CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺ e fac -[Re(bcds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺

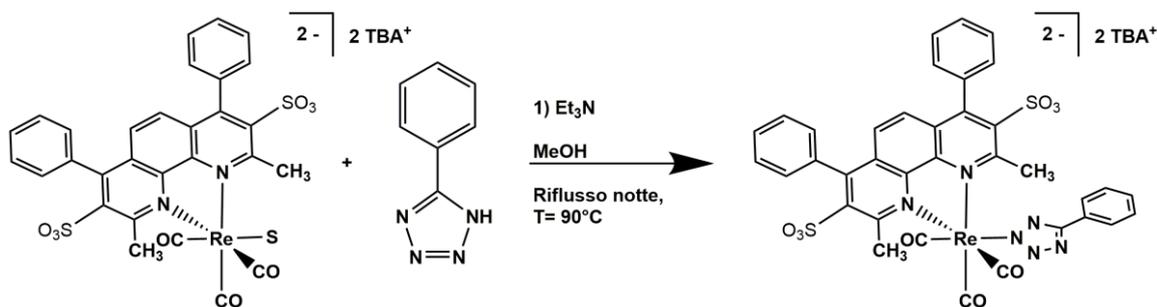
Alogeno estrazione



In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica e protetto dalla luce, si pongono 0.132 g (0.09 mmol) di fac -[Re(bcds)(CO)₃Br]²⁻ 2[TBA]⁺ e 0.025 g (0.09 mmol) di AgOTf. Si sciolgono i reagenti in 12 mL di MeOH e si lascia reagire alla temperatura di riflusso per 2h.

Al termine si lascia raffreddare il grezzo di reazione e si filtra la soluzione su celite per rimuovere l'AgBr. Si utilizza la soluzione per il passaggio successivo, senza ulteriori purificazioni.

Sintesi di fac -[Re(bcds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺

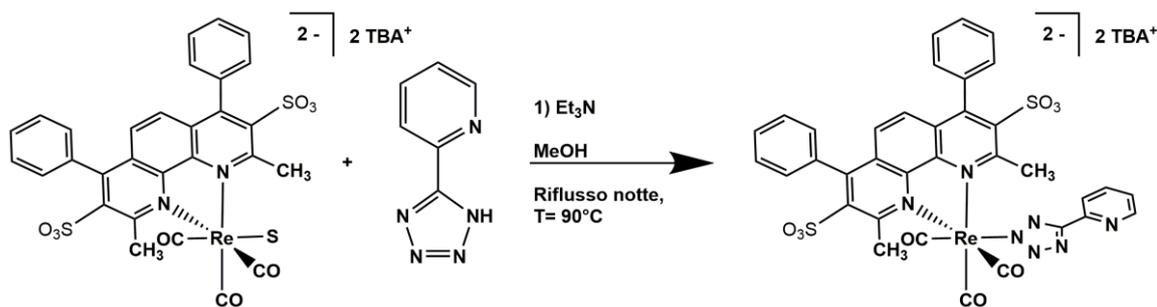


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.132 g (0.09 mmol) di fac -[Re(bcds)(CO)₃S]²⁻ 2[TBA]⁺ ed 8 mL di MeOH. In un vial, si sciolgono 0.018 g (0.12 mmol) di Tph, 16 μ L (0.12 mmol) di Et₃N in 4 mL di MeOH. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione preparata precedentemente. Si scalda alla temperatura di riflusso per 16 h. Al termine si evapora il solvente, ed il grezzo di reazione viene lavato con etere. Si purifica il prodotto mediante colonna cromatografica su SiO₂, eluita con DCM/MeOH (7:3) a gradiente crescente di MeOH (prodotto: terza frazione).

Resa = 40.9% (0.055g, 0.039mmol).

ESI-MS [AgOTf] = 149 m/z, [M/2]⁻ = 467 m/z, [M+Na]²⁻ = 957 m/z, [M]⁻ = 1176 m/z, [TBA]⁺ = 242 m/z (MeOH) **IR** ν (cm⁻¹) = 2071.9 (CO), 2029.1 (CO), 1922.2 (CO), 1742.7 (SO₃⁻), 1725.8 (SO₃⁻). **¹H-NMR** (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) = 2.95 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 7.24 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.52 (m, 1H) 7.66 (m, 4H), 7.82 (m, 2H), 7.96 (m, 6H). **¹³C-NMR** (CD₃OD, 100MHz) δ (ppm) = 164.14 (C_t), 150.62, 146.06, 135.96, 131.15, 129.40, 128.76, 128.68, 128.28, 128.23, 126.73, 126.26, 125.74, 125.71, 124.05

Sintesi di fac -[Re(bcds)(CO)₃PTZ]²⁻ 2[TBA]⁺

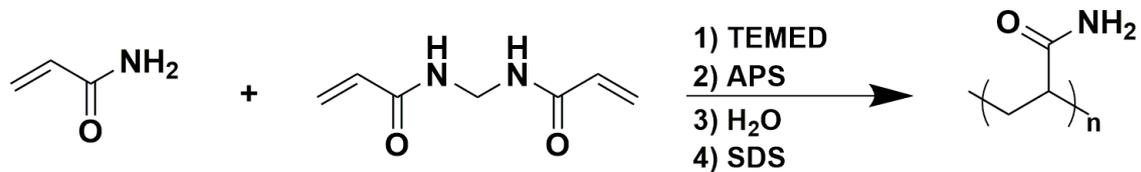


In un pallone a due colli da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, si pongono 0.079 g (0.06 mmol) di fac -[Re(bcds)(CO)₃S]²⁻ 2[TBA]⁺ ed 8 mL di MeOH. In un vial, si sciolgono 0.01 g (0.07 mmol) di PTZ, 9.6 μL (0.07 mmol) di Et₃N in 4 mL di MeOH. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione preparata precedentemente. Si scalda alla temperatura di riflusso per 16 h. Al termine si evapora il solvente, ed il grezzo di reazione viene lavato con etere. Si purifica il prodotto mediante colonna cromatografica su SiO₂, eluita con DCM/MeOH (3:1) a gradiente crescente di MeOH (prodotto: seconda frazione).

Resa = 27.6% (0.019g, 0.016mmol)

ESI-MS [AgOTf] = 148 m/z, [M/2]⁻ = 467 m/z, [Re(bcds)^{*}(CO)₂TPZ]²⁻ = 574 m/z, [M+Na]²⁻ = 957 m/z, [TBA]⁺ = 242 m/z (MeOH) **IR v** (cm⁻¹) = 2026.4 (CO), 1910.8 (CO), 1606.0 (SO₃⁻), (DCM). **¹H-NMR** (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) = 2.93 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 7.34 (s, 1H), 7.63 (m, 5H), 7.81 (m, 1H), 7.90 (m, 2H), 7.97 (m, 6H), 8.45 (s, 1H). **¹³C-NMR** (CD₃OD, 100MHz) δ (ppm) = 164.24 (C_t), 158.78, 150.62, 150.14, 148.58, 146.40, 146.21, 146.16, 146.06, 146.01, 142.75, 138.76, 137.49, 137.40, 137.09, 135.89, 131.08, 131.06, 129.42, 128.83, 128.75, 128.71, 126.84, 126.77, 126.72, 126.66, 126.26, 126.19, 125.23, 124.06, 123.47, 121.99, 118.82

Preparazione running gel (12%) e stacking gel (4%) per SDS-PAGE



In una falcon si inseriscono 4 mL di una miscela al 30% di acrilammide e N,N'-metilenbisacrilammide (37.5:1) insieme a 10 µL di TEMED, 50 µL di APS (10%), 100 µL di SDS (10%), 2.5 mL di tampone Tris-HCl a pH = 8,8 e 3.38 mL di acqua. In una seconda falcon si pongono 665 µL della miscela al 30% di acrilammide e N,N'-metilenbisacrilammide (37.5:1), 5 µL di TEMED, 25 µL di APS (10%), 50 µL di SDS (10%), 1.25 mL di tampone Tris-HCl a pH = 6,8 e 3.05 mL di acqua. Con l'aiuto di una pipetta monouso si inserisce la prima miscela (running gel) tra due vetrini distanti circa 1 mm lasciandola polimerizzare per circa 1 ora. Successivamente si inserisce anche la seconda miscela (stacking gel) e si posiziona il pettine in plastica per la formazione dei pozzetti. Si lascia gelificare per 1 ora al termine della quale i gel sono pronti per l'utilizzo. I gel vengono sistemati nell'apposita camera elettroforetica, in cui all'interno è presente la soluzione tampone composta da 2.22 mL di Tris-HCl, 8.69 mL di glicina, 0.91 mL di SDS e acqua. In microprovette a parte si preparano i campioni, ai quali viene aggiunto il sample buffer contenente 250 mmol di tris-HCl a pH=6.8, 40% glicerolo, 10% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0.1% Blu di bromofenolo e acqua. Con l'ausilio delle micropipette si caricano le miscele contenenti i campioni nei pozzetti (20 µL). La cella elettroforetica viene chiusa e viene collegata ad un alimentatore, si applica un voltaggio costante (120 V) per circa due ore.

Colorazione con CBB

Terminata la corsa elettroforetica, i gel vengono lasciati in agitazione in una soluzione di acido acetico (10%), etanolo (30%) e Coomassie Blue (0.25%) per 3 ore in agitazione e poi decolorati in una soluzione di acido acetico (10%) ed etanolo (30%) per eliminare la colorazione del background e mettere quindi in evidenza solo le bande proteiche. Infine si esegue un lavaggio con acqua distillata.

Colorazione con complessi di Re(I) tetrazolici

Terminata la corsa elettroforetica, i gel vengono lasciati in agitazione in una soluzione di acido acetico (10%) ed etanolo (30%) per 2 ore nelle quali avviene il fissaggio delle proteine; si procede quindi con tre lavaggi (10 minuti) in una soluzione di etanolo al 20%. I gel vengono depositati in un contenitore di plastica contenente una soluzione in etanolo 20% 1 μ M del complesso *fac*-[Re(bcds)^{*}(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺, *fac*-[Re(bfds)(CO)₃Tph]²⁻ 2[TBA]⁺, *fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph] o *fac*-[Re(bat)(CO)₃Tph-Me]⁺ per 15 ore in agitazione. Infine si eseguono tre lavaggi con acqua distillata.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Steinberg T. H., Chernokalskaya E., Berggren K., Lopez M. F., Diwu Z., Haugland R. P., Patton W. F.; *Electrophoresis*, **2000**, 21, 486-496
- [2] Jia J., Fei H. and Zhou M.; *Electrophoresis*, **2012**, 33, 1397-1401
- [3] Sasse J., Gallagher S. R.; *Analysis of Protein*, 10.6, 1-27
- [4] Rabilloud T.; *Electrophoresis*, **1990**, 11, 785-794
- [5] Ma D. L., Wong W. L., Chung W. H., Chan F. Y., So P. K., Lai T. S., Zhou Z. Y., Leung Y. C. Wong K. Y.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 3735-3739
- [6] Wong C. Y., Chung L. H., Lin S., Chan D. S. C., Leung C. H. Ma D. L.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 120, 3795-3799
- [7] Rabilloud T., Strub J. M., Luche S., van Dorsselaer A. Lunardi J.; *Proteomics*, **2001**, 1, 699-704
- [8] Zhou Y., Jia J., Wang X., Guo W., Wu Z., Xu N.; *Chem. Eur. J.*, **2016**, 22, 16796-16800
- [9] Wu P., Wong E. L. M, Ma D. L., Tong G. S. M., Ng K. M., Che C. M.; *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 3652-3656
- [10] Kirgan R. A., Sullivan B. P., Rillema D. P.; *Top. Curr. Chem.*, **2007**, 281, 45-100
- [11] Werrett M. V., Huff G. S., Muzzioli S., Fiorini V., Zacchini S., Skelton B. W., Maggiore A., Malicka J. M., Cocchi M., Gordon K. C., Stagni S., Massi M.; *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 8379-8393
- [12] Bader C. A., Brooks R. D., Ng Y. S., Sorvina A., Werrett M. V., Wright P. J., Anwer A. G., Brooks D. A., Stagni S., Muzzioli S., Silberstein M., Skelton B. W., Goldys E. M., Plush S. E., Shandala T., Massi M.; *RSC Adv.*, **2014**, 4, 16345-16351
- [13] Fiorini V., Ranieri A. M., Muzzioli S., Magee K. D. M., Zacchini S., Akabar N., Stefan A., Ogden M. I., Massi M., Stagni S.; *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 20597-20608
- [14] Finnegan W. G., Henry R. A., Lofquist R.; *Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 3908
- [15] Amoroso A. J., Coogan M. P., Dunne J. E., Fernández-Moreira V., Hess J. B., Hayes A. J., Lloyd D., Millet C., Pope S. J. A., Williams C.; *Chem. Commun.*, **2007**, 3066-3068
- [16] Crosby G. A., Demas J. N.; *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991
- [17] Werrett M. V., Chartrand D., Gale J. D., Hanan G. S., MacLellan J. G., Massi M., Muzzioli S., Raiteri P., Skelton B. W., Silberstein M., Stagni S.; *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 1229-1241