

Alma Mater Studiorum

---

---

Università di Bologna

---

---

FACOLTA' DI CHIMICA INDUSTRIALE  
Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

Dipartimento di Chimica Organica "A. Mangini"

**Complessi metallici come "probes"  
luminescenti per avidina: design e sintesi di  
leganti bifunzionali piridinotriazolo-biotina**

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

*Presentato da: Marcello Frazzoni*

*Relatore: Dr. Letizia Sambri*

*Co-Relatori: Dr. Stefano Stagni  
Dr. Andrea Baschieri*

*III sessione*

---

---

*Anno Accademico 2010-2011*



## *Indice*

<b>1. Introduzione.....</b>	<b>pagina 3</b>
1.1. Imaging.....	pagina 3
1.2. Marcatori luminescenti per bioconiugazione .....	pagina 6
1.3. Fluorofori organici.....	pagina 9
1.4. Marcatori organometallici.....	pagina 11
1.5 “CLICK CHEMISTRY” lo stato dell’arte.....	pagina 15
<b>2. Scopo della tesi.....</b>	<b>pagina 23</b>
<b>3. Risultati e discussione.....</b>	<b>pagina 25</b>
3.1. Sintesi dei leganti <b>L1</b> e <b>L2</b> .....	pagina 26
3.2. Sintesi e caratterizzazione dei complessi [(ppy) <sub>2</sub> Ir-L1][Cl] ( <b>11</b> ) e [(ppy) <sub>2</sub> Ir-L2][Cl] ( <b>12</b> ).....	pagina 33
3.3. Interazione avidina-complessi di iridio <b>11</b> e <b>12</b> .....	pagina 42
3.4. Sintesi e caratterizzazione dei complessi Re-L1(CO) <sub>3</sub> Br ( <b>13</b> ) e Re-L2(CO) <sub>3</sub> Br ( <b>14</b> ).....	pagina 46
3.5. Interazione avidina complesso Re-L1(CO) <sub>3</sub> Br ( <b>13</b> ).....	pagina 52
<b>4. Conclusioni.....</b>	<b>pagina 53</b>
<b>5. Parte sperimentale.....</b>	<b>pagina 57</b>
5.1. Informazioni generali.....	pagina 57
5.2. Sintesi di 11-azido-undecan-1-olo ( <b>2</b> ).....	pagina 58
5.3. Sintesi di 11-(4-Piridin-2-il[1,2,3]triazol-1-il)-undecan-1-olo ( <b>4</b> ).....	pagina 59
5.4. Sintesi di 11-[4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3triazol-1-il]-undecil 4metil benzen solfonato ( <b>5</b> ).....	pagina 60

5.5. Sintesi di 11-[4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-undec-1-azide ( <b>6</b> ).....	pagina 61
5.6. Sintesi di 11-[4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-undec-1-ammina ( <b>7</b> ).....	pagina 62
5.7. Sintesi di 2,5-Diossopirrolidin-1-il 5-((3aS,4S,6aS)-2-ossa-esaidro-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-il)- pentanoato ( <b>9</b> ).....	pagina 63
5.8. Sintesi di 5-((3aS,4S,6aR)-2-ossa-esaidro-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-il)-N-(11-(4-(Piridin-2-il)-1H- 1,2,3-triazol-1-il)undecil)pentanamamide ( <b>L1</b> ).....	pagina 64
5.9. Sintesi di (11-(4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)undecil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-ossa-esaidro-1H-tieno- [3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato ( <b>L2</b> ) .....	pagina 66
5.10. Sintesi di [(ppy) <sub>2</sub> Ir-L1][Cl] ( <b>11</b> ).....	pagina 68
5.11. Titolazione avidina con il complesso [(ppy) <sub>2</sub> Ir-L1][Cl] ( <b>11</b> ).....	pagina 69
5.12. Sintesi di [(ppy) <sub>2</sub> Ir-L2][Cl] ( <b>12</b> ).....	pagina 70
5.13. Titolazione avidina con il complesso [(ppy) <sub>2</sub> Ir-L2][Cl] ( <b>12</b> ).....	pagina 71
5.14 Sintesi di Re-L1(CO) <sub>3</sub> Br ( <b>13</b> ).....	pagina 72
5.15 Titolazione avidina con il complesso Re-L1(CO) <sub>3</sub> Br ( <b>13</b> ).....	pagina 73
5.16 Sintesi di Re-L2(CO) <sub>3</sub> Br ( <b>14</b> ).....	pagina 74
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>pagina 77</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 *Imaging*

Con il termine “imaging” ci si riferisce ad un generico processo che permette di acquisire, in maniera non invasiva, immagini di un campione target contenuto all’interno di un organismo vivente. Le immagini possono essere ottenute a vari scopi, quali l’individuazione di eventuali anomalie, il comprendere il funzionamento biologico della parte studiata oppure per dedurre informazioni sulla distribuzione e sulla concentrazione di particolari analiti presenti in quel campione.



*Figura 1: Radiografia della mano della moglie, eseguita da Roentgen.*

Quando Wilhelm Roentgen, nel 1896, ottenne la prima immagine a raggi X di un tessuto vivo, ebbe inizio una nuova era per la diagnosi medica basata sull’indagine non invasiva (Figura 1). Negli ultimi anni, grazie alla scoperta di nuovi agenti di contrasto altamente selettivi verso determinati eventi biologici, si è potuta migliorare la sensibilità e l’efficienza delle tecniche di indagine non invasive.<sup>1</sup> Per rendere l’idea di quanto questo campo sia continuamente in via di sviluppo, si pensi che la vendita di agenti di contrasto per l’imaging ha raggiunto 2.58 miliardi di dollari nel 2009 e si prevede che questo mercato possa raggiungere 7.69 miliardi di dollari entro il 2015.

Recentemente sono state sviluppate diverse tecniche di imaging non invasivo, quali la Tomografia Computerizzata (CT), la Risonanza Magnetica (MR), la Tomografia per Emissione di Positroni (PET), la Tomografia Computerizzata ad Emissione di Singoli

Fotoni (SPECT), gli Ultrasuoni (US) e l'Imaging Ottico (OI). Queste tecniche differiscono per sensibilità, risoluzione, tempo di acquisizione dei dati e costi; esse però sono, più che competitive, complementari tra di loro e la scelta dell'una piuttosto dell'altra deve essere eseguita in base alle specifiche esigenze del laboratorio.<sup>1</sup>

L'imaging su campioni biologici, sia in vivo che in vitro, è stato per parecchi anni svolto mediante microscopia ottica (imaging ottico di fluorescenza e fosforescenza) che sfrutta diversi effetti dell'interazione della luce con i tessuti.<sup>1</sup> La radiazione elettromagnetica nel campo Vis-NIR, in particolare, è estremamente utile nell'imaging, in quanto non è dannosa ed è in grado di creare un netto contrasto di colore, ed in più permette di fare studi di dinamica molecolare nella scale dei microsecondi, polarizzando la sorgente di eccitazione.

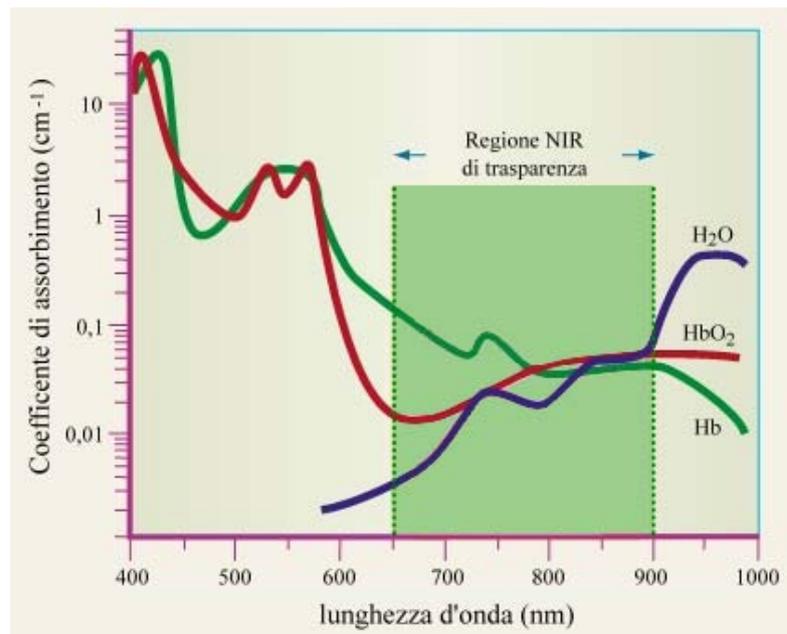
Tra le tecniche di imaging ottico disponibili, la microscopia in fluorescenza è risultata una delle più potenti, perché consente di osservare la luminescenza del campione con una migliore risoluzione.<sup>2,3</sup> Le tecniche di imaging ottico difficilmente sfruttano la fluorescenza intrinseca al campione biologico, ma fanno uso di composti luminescenti, solitamente composti organici o complessi organo-metallici.<sup>1</sup>

Nelle applicazioni di imaging ottico l'energia proveniente da una sorgente esterna di luce UV o Vis è assorbita da un agente di contrasto iniettato vicino alla zona di tessuto da monitorare e, quasi immediatamente, la luce viene emessa ad una lunghezza d'onda maggiore che viene rilevata selettivamente dal detector. La differenza tra la lunghezza d'onda richiesta per l'eccitazione e la lunghezza d'onda della luce emessa è conosciuta come "shift di Stokes", ed è essenziale in tutti i metodi di imaging basati sulla luminescenza.

I principali problemi nell'imaging ottico di un tessuto derivano dalla presenza di fenomeni di scattering della radiazione incidente, dall'eventuale autofluorescenza tipica dei tessuti in questione, nonché dall'elevato assorbimento dell'emoglobina (Hb) nella regione fra 500 e 600 nm. In base alla lunghezza d'onda della luce (energia della radiazione) impiegata, che dipende dal fluoroforo utilizzato, si possono raggiungere differenti profondità di penetrazione. Per esempio, i fotoni nel range spettrale UV-Visibile sono fortemente assorbiti dai più importanti cromofori, quali la deossiemoglobina e la ossiemoglobina (HbO<sub>2</sub>), che si trovano negli strati più superficiali (profondità fino a ... $\mu\text{m}$ ) dei tessuti.

Al contrario, radiazioni meno energetiche, ossia con lunghezza d'onda compresa tra 650 e 900 nm vengono assorbite molto meno efficacemente dai principali cromofori del

tessuto, perciò i fotoni caratterizzati da tale energia possono raggiungere gli strati più profondi del campione. Infatti, l'emoglobina (il principale assorbitore della luce visibile) insieme all'acqua ed ai lipidi (assorbitori primari della luce infrarossa) presentano coefficienti di assorbimento più bassi nella regione del Vicino Infrarosso (NIR). Le aree più profonde diventano così accessibili, permettendo la visualizzazione tomografica anche di strati non superficiali, (Figura 2).



**Figura 2:** Contributi di assorbimento di Ossiemoglobina, Deossiemoglobina e acqua in funzione della lunghezza d'onda.<sup>1</sup>

Le tecniche di imaging di fluorescenza avanzate, come la Tomografia Molecolare in Fluorescenza (FMT) e l'Imaging di Riflettanza in Fluorescenza Libera (FRI), impiegano comunemente lunghezze d'onda nel vicino infrarosso e, recentemente, sono state impiegate per applicazioni di imaging molecolare in vivo.<sup>1</sup>

Il microscopio intravitale (IVM) è un altro strumento molto potente che utilizza sonde fluorescenti per studiare i processi molecolari: contrariamente alle altre tecniche di imaging ottico, l'IVM permette di monitorare continuamente e in modo non invasivo i processi molecolari e cellulari sui tessuti in vivo con una risoluzione spaziale di 1-10  $\mu\text{m}$ .

## ***1.2 Marcatori luminescenti per la bioconiugazione.***

Negli ultimi anni, l'importanza dei coloranti luminescenti per la determinazione qualitativa e quantitativa di analiti è notevolmente cresciuta.

Il processo di coniugazione fra una sonda molecolare e un determinato recettore biologico consiste nell'interazione di un opportuno gruppo funzionale presente sul fluoroforo con un gruppo recettore presente sull'analita da evidenziare. A causa della complessità dei sistemi trattati, garantire la selettività di questa reazione è molto difficile.

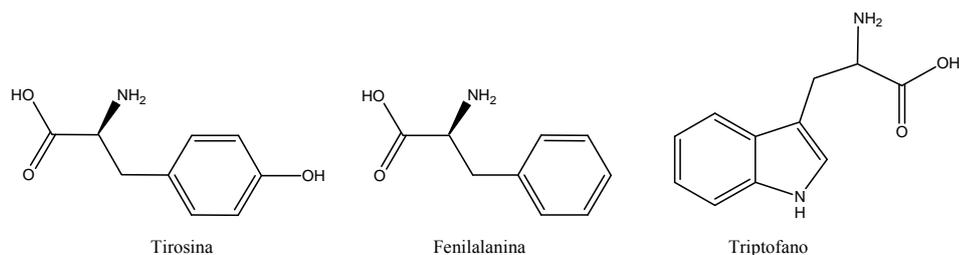
Normalmente questo problema viene affrontato in tre modi:

- 1- Funzionalizzazione dei fluorofori: il fluoroforo viene funzionalizzato con gruppo capace di reagire soltanto con il recettore desiderato, ad esempio le funzioni maleimmide reagiscono principalmente con i solfuri;
- 2- sfruttando la via del metabolismo. Questa tecnica, molto usata nell'imaging cellulare, consiste nell'equipaggiare la sonda con una molecola come il glucosio, che entrando nei cicli cellulari, porterà il fluoroforo ad accumularsi in determinati organelli e non in altri;
- 3- utilizzare il cosiddetto approccio "chiave - serratura" messo in atto dagli enzimi. Ciò consiste nello sfruttare le particolari affinità biologiche che hanno alcune proteine verso determinate molecole organiche. Uno svantaggio di questo metodo è che il fluoroforo legato a quella molecola-"chiave" è affine solo per quella determinata proteina-"serratura".

Risulta inoltre fondamentale che il fluoroforo sia in grado di legarsi al target desiderato mantenendo inalterate le sue capacità emissive a seguito della coordinazione. Quindi è spesso necessario distanziare i gruppi responsabili dell'emissione e della coordinazione mediante l'impiego di opportuni spaziatori per limitare al minimo le interazioni tra biomolecola e marcatore.

In biochimica i fluorofori possono essere divisi in due categorie:

- 1) INTRINSECI, tra cui alcuni amminoacidi presenti naturalmente in alcune proteine, che emettono spontaneamente, (Figura 3).
- 2) ESTRINSECI, ossia le molecole aggiunte al campione per indurre luminescenza.



**Figura 3:** amminoacidi aromatici fluorescenti.

Per quanto riguarda i fluorofori intrinseci, fra i gruppi funzionali presenti quello con le proprietà fotoemissive più rilevanti è quello indolico del triptofano, che assorbe a 280 nm ed emette intorno a 340 nm. I tessuti biologici però presentano autofluorescenza nella regione dell'UV, che rende difficoltosa la rilevazione di questa tipologia di analiti; per questo motivo, è spesso necessario ricorrere a sonde luminescenti o fluorofori estrinseci. Queste sostanze presentano tempi di vita e lunghezze d'onda di emissione diverse rispetto alle molecole precedentemente citate, garantendo con elevata sensibilità di rivelazione, selettività e semplicità di utilizzo.

Per i motivi appena esposti, i marcatori luminescenti sono largamente impiegati in campo bioanalitico per studi sugli acidi nucleici, nei saggi immunochimici, in chimica clinica e nello studio delle interazioni proteina-ligando.<sup>4</sup>

Le sonde marcate con i fluorofori vengono rivelate mediante misure spettroscopiche alle lunghezze d'onda di assorbimento e di emissione tipiche del fluoroforo stesso. La sensibilità ottenuta con un marcatore fluorescente è direttamente proporzionale al coefficiente di estinzione molare e alla resa quantica di fluorescenza. I fluorofori organici possono presentare valori del coefficiente di estinzione ( $\epsilon$ ) fino a  $\approx 10^5 \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  e rese quantiche percentuali prossime al 100%.

Per essere efficienti le sonde fluorescenti devono possedere caratteristiche essenziali per la rivelazione dell'analita. Innanzitutto, è fondamentale che i valori delle lunghezza d'onda relativi ai massimi di assorbimento e di emissione del colorante cadano in una regione dello spettro in cui siano minimi i fenomeni di interferenza con la matrice biologica. Questo parametro condiziona in modo significativo la sensibilità della rivelazione. E' infatti importante ricordare che l'autofluorescenza delle molecole biologiche, oltre ad essere difficilmente rivelabile e correlabile alla concentrazione della biomolecola stessa, genera un segnale di fondo che può andare a compromettere la sensibilità della rivelazione del segnale di fluorescenza del marker.

Inoltre, è necessario minimizzare il fenomeno dello scattering, effetto che influisce fortemente sulla sensibilità del metodo e che deriva principalmente dalla presenza di proteine ed altre macromolecole in campioni di origine biologica, come ad esempio il siero. È da porre in rilievo come i fenomeni di autofluorescenza e scattering risultano particolarmente evidenti nella regione visibile dello spettro.

Alla luce dei fattori elencati, risulta importante scegliere una classe di fluorofori le cui caratteristiche spettrali possano essere modulate facilmente mediante piccole variazioni strutturali, siano fotochimicamente stabili, possiedano un elevato valore di resa quantica, non diano legami specifici con le altre molecole presenti nel campione e siano solubili nel solvente in cui si effettuato il processo di coniugazione. Inoltre la solubilità è un fattore cruciale anche per prevenire fenomeni di auto-aggregazione che diminuirebbero le rese quantiche di luminescenza.

### ***1.3 Fluorofori organici***

Degli oltre 2000 coloranti organici descritti nel Color Index, meno di 200 sono fluorescenti. Di questi la maggioranza appartiene a due classi: i derivati dello xantene e quelli delle fenazina.

Fra queste tre classi i derivati dello xantene sono il gruppo più numeroso. Questi composti sono caratterizzati da tre anelli aromatici legati ad un atomo di carbonio a ponte ibridato  $sp^2$ . L'estesa delocalizzazione e la coplanarità della struttura conferiscono a queste molecole ottime proprietà fotofisiche, come alti coefficienti di estinzione molare (vicini a  $80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e rese quantiche prossime al 100%. In questa classe, la fluoresceina, la rodamina e i loro derivati rivestono un particolare interesse teorico e applicativo. Tuttavia rispetto ad altri derivati dello xantene, queste presentano un ponte etero che lega tra loro due dei tre anelli aromatici,<sup>5</sup> e questa caratteristica strutturale rende lo spettro di queste molecole molto sensibile al pH: ciò permette a questi fluorofori di essere utilizzati come indicatori di pH, ma ne limita l'uso come marker da utilizzare in vivo o in vitro su matrici cellulari in cui si trovano compartimenti a diversi pH.

In termini generali per utilizzare un fluoroforo organico come un marcatore luminescente è necessario modificarne la struttura con gruppi capaci di legarsi alle funzioni amminiche e tioliche presenti nello specifico target biologico.<sup>6</sup>

Questi gruppi oltre a permettere la bioconiugazione fra il marcatore e il target, possono alterare le proprietà fisiche e fotofisiche della sonda luminescente, permettendo:

- di regolare le  $\lambda$  di assorbimento ed emissione;
- di migliorare la solubilità in acqua;
- di diminuire la dipendenza delle proprietà fotofisiche dall'ambiente;
- di aumentare la stabilità di queste molecole nell'ambiente biologico.

La facilità con cui queste molecole possono essere modificate ha generato una grande varietà di fluorofori utilizzabili come marcatori biologici. Per decidere quale tipo di fluoroforo è meglio utilizzare bisogna considerare che la lunghezza d'onda, la resa quantica, il tempo di risposta e l'energia emessa non dipendono strettamente dal colorante, ma sono in gran parte legate al modo in cui lo stato eccitato della molecola interagisce con l'ambiente circostante.

Il parametro fisico che maggiormente viene preso in considerazione per questa scelta è l'energia necessaria per eccitare la molecola, ossia la lunghezza d'onda di eccitazione

perché definisce la zona spettrale dove la molecola andrà a emettere, dato che la banda di emissione cade su lunghezze d'onda più alte di quelle della sorgente di eccitazione.

Nonostante i fluorofori organici siano comunemente utilizzati nell'imaging biologico per via della loro versatilità strutturale, queste molecole presentano una fotodegradazione molto veloce in presenza di ossigeno, oltre ad una notevole sensibilità alle variazioni dell'ambiente circostante e ciò non li rende adatti per lunghe osservazioni dei tessuti biologici. In più la maggior parte dei coloranti organici presenta una banda di emissione larga, che può facilmente sovrapporsi con quella di altri fluorofori; in alcuni casi l'emissione del fluoroforo, come la rodamina e la fluorescina, può sommarsi all'autofluorescenza del tessuto rendendo indistinguibile il segnale del marcatore da quello del fondo. Per limitare alcuni di questi difetti sono stati sviluppati coloranti organici come le cianine, che presentano fluorescenza nel campo del vicino infrarosso.<sup>5</sup>

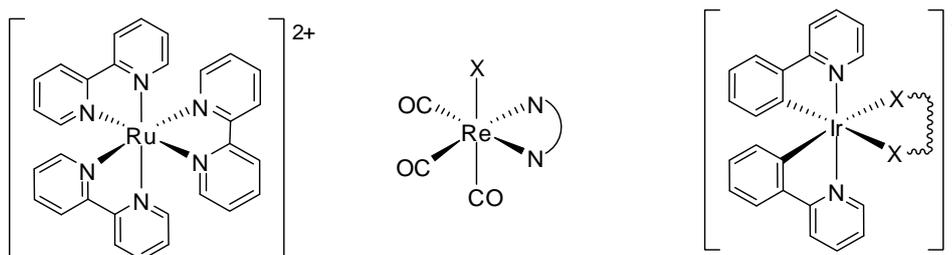
Più recentemente è stata sviluppata una nuova classe di agenti di contrasto in grado di superare le limitazioni dei fluorofori organici: i complessi dei lantanidi e dei metalli di transizione chelati.

### 1.4 Marcatori organometallici

I fluorofori organici presentano anche un altro svantaggio, quello di avere tempi di vita brevi, dell'ordine di alcuni nanosecondi. Per avere tempi di vita più lunghi, ed effettuare quindi nuovi tipi di esperimenti, si possono utilizzare complessi di lantanidi e di metalli di transizione.

I lantanidi mostrano fluorescenza nelle soluzioni acquose e tempi di decadimento compresi tra 0.5 e 3 ms.<sup>7,8</sup> A causa però del loro debole assorbimento essi vengono utilizzati sotto forma di metalli chelati da leganti organici e mostrano emissioni del tipo LMCT. Questi complessi sono stati ampiamente usati per rilevazioni ad alta sensibilità in campioni biologici:<sup>9</sup> infatti sebbene i campioni biologici mostrino autofluorescenza, questa ha tempi di vita brevi (ordine del nanosecondo) e quindi l'uso dei lantanidi che possiedono stati emittenti a lunga vita permette di effettuare misure risolte nel tempo nelle quali viene minimizzata l'interferenza di fondo e il "light-scattering". I complessi di Eu(III) e Tb(III) in particolare hanno emissioni nel visibile e bande strette che si differenziano dall'emissione di fondo (bande larghe che cadono nell'UV) delle molecole biologiche. Per questo motivo sono ampiamente usati come traccianti in immunochimica. Per quanto attiene ai complessi di metalli di transizione, gli esempi più rappresentativi sono dati da composti coordinativamente saturi in cui il centro metallico è coordinato a leganti chelanti aromatici. In particolare, il composto capostipite è rappresentato da un complesso polipiridinico di Ru(II) quale  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (Figura 4) e dai suoi derivati. Gli studi effettuati su questa classe di complessi hanno costituito la base fondamentale per la loro estensione verso derivati simili contenenti altri metalli di transizione, come ad esempio i complessi ciclometallati di Ir(III) ed i derivati tris-carbonilici di Re(I) (Figura 4).

In particolare, i complessi ciclometallati di Iridio(III), figura 4, hanno suscitato negli ultimi anni un interesse sempre crescente, in quanto mostrano ottime caratteristiche in termini di resa quantica e tempi di vita di luminescenza.



**Figura 4:** Struttura dei complessi:  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  *fac*- $\text{Re}(\text{CO})_3\text{X}$  e sistemi ciclometallati ottenuti dal dimero Tetrakis(2-fenilpiridinato- $\text{C}^2, \text{N}$ )( $\mu$ -dicloro)diIridio. X indica atomi di O, N o S. il legante X-X non è carico.

Le proprietà luminescenti dei complessi polipiridinici di Ir (III) hanno attratto molto l'attenzione già dallo studio delle caratteristiche emissive del complesso  $\text{cis-}[\text{Ir}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$ .<sup>10</sup> Da allora numerosi complessi ciclometallati di Ir (III) con formula generale  $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{C})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$  sono stati sintetizzati e presentano un'intensa banda di emissione nel visibile nella zona fra il blu e il verde, con un lungo tempo di vita.<sup>11,12</sup>

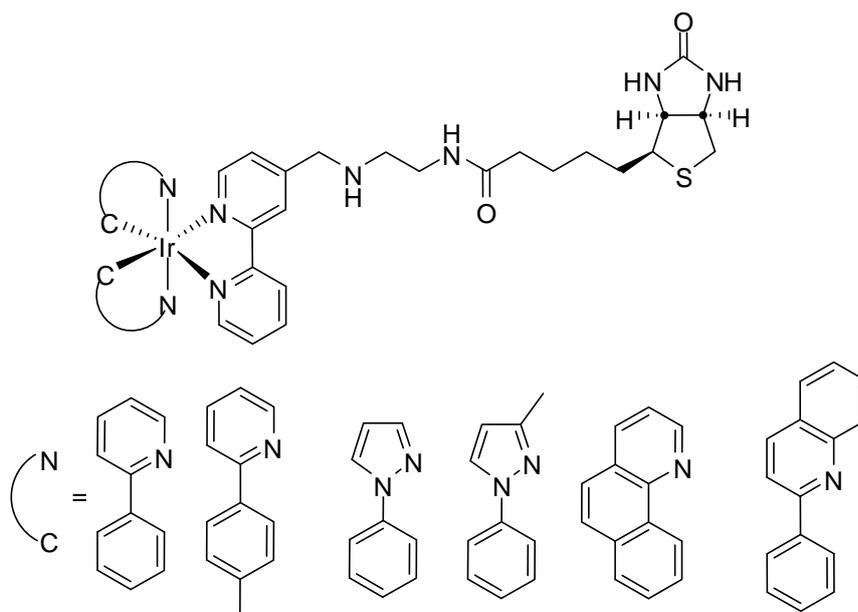
In tal senso, uno dei primi composti considerati è rappresentato dal complesso  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]^+$  che presenta una debole emissione in soluzione acquosa. Quando però questo complesso si trova in presenza di istidina (His) o di proteine con un'alta concentrazione di questo aminoacido, manifesta un'intensa banda di emissione, che presenta un'intensità pari a 180 volte quella del suo analogo in assenza di istidina. La causa di questo fenomeno è dovuta alla formazione di un legame covalente fra il metallo e il gruppo imidazolico dell'aminoacido. La formazione di questo nuovo legame altera la simmetria del sistema e offre al complesso la giusta struttura per valorizzare a pieno le sue caratteristiche fotofisiche.<sup>13</sup>

Questo risultato ha permesso di accedere ad una nuova classe di composti organometallici che in presenza di un determinato target modificano le loro proprietà fotofisiche.

La strategia seguita è quella di sintetizzare molecole organiche polifunzionalizzate, aventi sia unità capaci di formare complessi con opportuni metalli, sia unità, come biotina, estradiolo e glucosio, in grado di coordinare siti specifici di particolari proteine, quali ormoni e vitamine. In questo modo si ottengono complessi organometallici luminescenti capaci di interagire direttamente con composti target variando le loro proprietà fotoemissive a seconda che la coniugazione sia presente od assente.

Tra le possibili strutture capaci di formare interazioni specifiche con opportuni recettori la biotina riveste una notevole importanza. Questa molecola è una vitamina e viene utilizzata in molti cicli energetici cellulari come cofattore di decarbossilasi ATP-dipendenti, ma la sua caratteristica più interessante risiede nella sua capacità di formare un'interazione non covalente con una specifica glicoproteina, l'avidina.<sup>14c</sup>

Un esempio di applicazione della biotina nel campo dei marcatori organometallici viene dalla sintesi di una nuova serie di complessi di iridio polipiridinici ciclometallati (Figura 5); tutte queste molecole hanno in comune un legante bis piridinico a cui è stato attaccato un pendaglio ammidico della biotina. Questi complessi in presenza di avidina mostrano un aumento della risposta di emissione da 1.5 a 3.3 volte rispetto alle intensità misurate in assenza della proteina bersaglio, oltre a presentare un incremento del tempo di vita.<sup>15</sup>



**Figura 5:** complessi ciclometallati di Ir (III), funzionalizzati con la biotina.

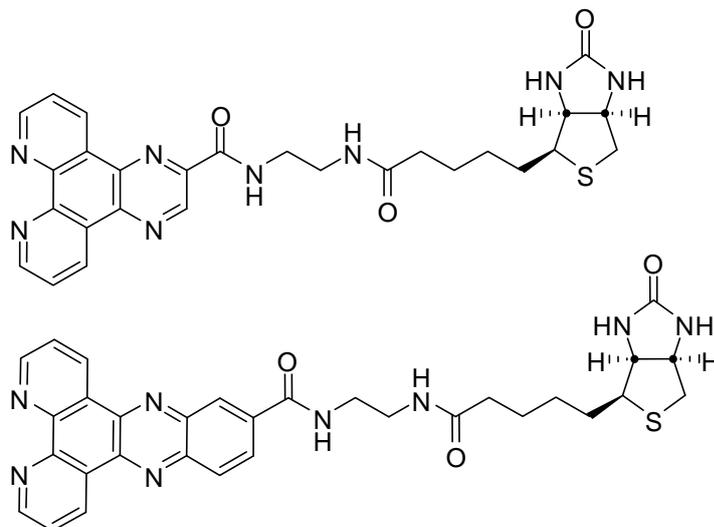
In questo esempio la differenza di intensità di luminescenza fra la forma coordinata e quella libera è troppo piccola per utilizzare questi marcatori su una matrice reale, perché il segnale di fondo renderebbe difficile distinguere l'emissioni di queste due specie. Perciò per utilizzare questa tipologia di marcatori durante delle prove *in vitro* o *in vivo* è necessario trovare il modo per massimizzare la differenza di intensità fra la forma di complesso coordinato e la forma libera.

Per trovare una soluzione a questo problema sono stati proposti due metodi:

1. sintetizzare una nuova serie di complessi che presentino un legante capace di migliorare i benefici dovuti alla coordinazione fra il marcatore e il target;
2. trovare la maniera di reticolare il marcatore in una macrostruttura che presenti proprietà fotofisiche migliori dell'insieme dei monomeri che l'ha generato.

Un esempio che applica il primo metodo viene dalla sintesi di due complessi ciclometallati di iridio contenenti due leganti dimminici con struttura planare e rigida, dipiridoquixaline e dipiridofenazide, dotati di un'unità periferica biotinica (Figura 6). La caratterizzazione fotofisica dei complessi ottenuti in presenza di avidina evidenzia la formazione di una banda di emissione con massimo a 490 nm e di una spalla intorno a 520 nm, non presenti nelle misure in assenza di analita. E' la differenza di intensità fra la forma di complesso coordinata e quella libera che costituisce il risultato più importante di questo esempio. Infatti con questi leganti il sistema organometallico presenta una

intensità di emissione quasi 30 volte maggiore in presenza della coordinazione rispetto a quella misurata in assenza di analita.



**Figura 6:** leganti dipiridochixaline (sopra) e dipiridofenazide (sotto).

Il motivo di questo notevole aumento di intensità è legato alla struttura rigida del legante: quando il complesso si coordina con l'avidina limita i suoi movimenti molecolari, favorendo i decadimenti radiativi. Con chelanti aromatici come la dipiridoquixaline e dipiridofenazide la rigidità di tutto il sistema viene amplificata, quindi l'intensità di emissione cresce molto rispetto all'esempio con i classici leganti bis piridinici.<sup>16</sup>

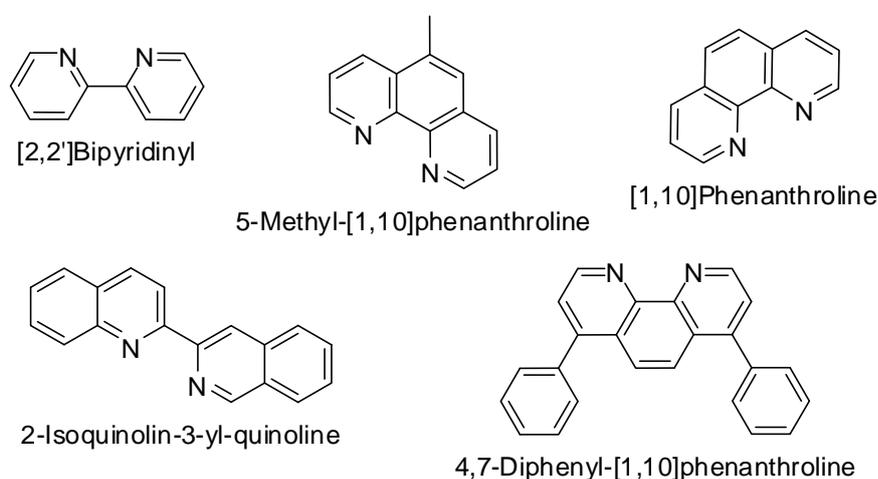
Per il secondo metodo di valorizzazione dell'intensità è opportuno considerare che l'avidina presenta una struttura costituita da quattro sottoblocchi ognuno in grado di interagire con la biotina,<sup>14</sup> ed quindi è in grado di legare più marcatori insieme, migliorando le loro proprietà fotofisiche, come dimostrato dagli esempi precedenti. Per valorizzare al massimo i quattro siti di coordinazione dell'avidina ed amplificare il segnale di risposta del marcatore coordinato, si potrebbe utilizzare un sensore funzionalizzato con più biotine per ottenere, invece di una semplice coordinazione, la reticolazione fra analita e sensore. Il materiale finale presenterà proprietà fotofisiche migliori delle unità che lo hanno generato, perché i complessi possono godere dei miglioramenti foto-fisici relativi alla coordinazione con l'avidina, oltre a concentrarsi nel piccolo volume della macrostruttura ottenuta. Per provare questa teoria sono stati sintetizzati una serie complessi polipiridinici di iridio, che presentano due o tre leganti funzionalizzati con la biotina. Incubando questi complessi con l'avidina sono state ottenute delle strutture polimeriche di marcatore-avidina, che mostrano notevoli aumenti

di intensità di emissione, molto maggiori rispetto agli esperimenti con i marcatori monobiotinici.<sup>17,18</sup>

Come accennato in presenza, un'altra classe importante è data dai complessi tricarbonilici di Re(I), complessi che presentano alcune caratteristiche peculiari come la facilità di sintesi, la grande stabilità chimica e fotochimica rispetto agli analoghi di rutenio e quindi risultano molto interessanti per applicazioni di imaging.

Partendo da complessi pentacarbonilici alogenati quali  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$  ed  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ , ottenuti da  $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ ,<sup>19</sup> è facile ottenere con buone rese di reazione, complessi con formula generale  $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{L}(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^{+0}$  che opportunamente irradiati presentano fosforescenza, in seguito ai decadimenti dagli stati di tripletto.<sup>20,21</sup>

Tali composti hanno due posizioni di coordinazione occupate da un legante diiminico e una in cui è presente un gruppo mono-dentato (L). Variando la natura di L o quella del legante diazotato, attraverso dei passaggi sintetici relativamente semplici, è possibile ottenere una grande varietà di complessi. Negli esempi apparsi finora in letteratura,<sup>22</sup> la specie L può essere un legante anionico (alogenuro o cianuro) o neutro (fosfinico, piridinico o alchilico), mentre il legante diiminico può presentare variazioni sostanziali dal punto di vista strutturale come illustrato nella Figura 7.



**Figura 7:** Esempi di possibili leganti diiminici utilizzati in letteratura come complessanti del renio.<sup>23</sup>

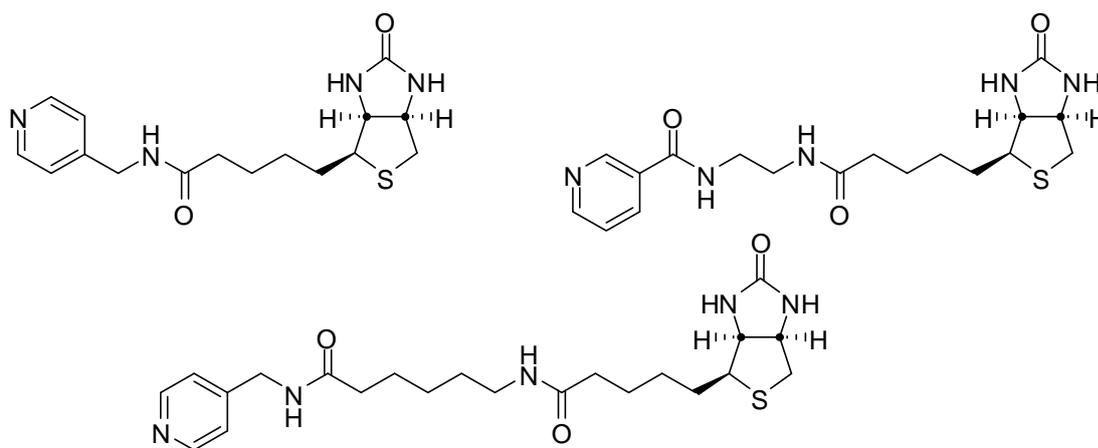
Anche in questa categoria di complessi la funzionalizzazione dei leganti con funzionalità capaci di interagire con substrati biologici è diventato un tema di ricerca di grande interesse. Fra le possibili derivatizzazioni sono da sottolineare il gruppo indolico, capace di coordinare la BSA (albumina serica bovina), una proteina in grado d'interagire con un grosso numero di molecole,<sup>24</sup> e, come visto nei complessi di iridio, la biotina, che

costituisce un substrato di grande valore nella funzionalizzazione dei leganti per ottenere dei marcatori organometallici sensibili alla presenza dell'avidina.

Nei pochi esempi presenti in letteratura, il legante del Re(I) solitamente coinvolto in queste modifiche è la piridina (L), perché può essere inserita nel complesso sostituendo l'alogeno nella sfera di coordinazione. Il motivo di questo forte interesse verso questi composti è giustificato da una serie di caratteristiche peculiari, quali la fotostabilità, lunghi tempi di vita degli stati eccitati (tra i 10 ns e i 10  $\mu$ s),<sup>25</sup> possibilità di coniugazione con biomolecole, elevata stabilità chimica e fotochimica, "Stokes shifts" grandi, tali da evitare fenomeni di autoassorbimento incontrati in bioconiugazione oppure interazioni sonda - sonda (*self-quenching*) e la possibilità di ottenere emissioni polarizzate (quindi rendendo possibile lo studio di dinamiche molecolari nella scala dei microsecondi).

Un esempio viene dallo sviluppo di una nuova serie di marcatori luminescenti a base di Re (I) che sono stati ottenuti dalla reazione fra il solvato-complesso  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{solv})]^+$  e tre piridine funzionalizzate con la biotina, differenziate dalla lunghezza della catena alifatica fra la parte aromatica del legante e la parte in grado di interagire con l'analita, riportate in Figura 8.<sup>26,27,28,29</sup>

In presenza di avidina, questi complessi mostrano un responso fotofisico peculiare, dal momento che l'intensità di emissione dell'addotto complesso biotinilato-avidina è marcatamente differente, in genere superiore, rispetto al complesso biotinilato "libero". Inoltre, è possibile notare che l'incremento di intensità sia dipendente, anche se non sempre direttamente correlabile, dalla lunghezza della catena dello spaziatore.

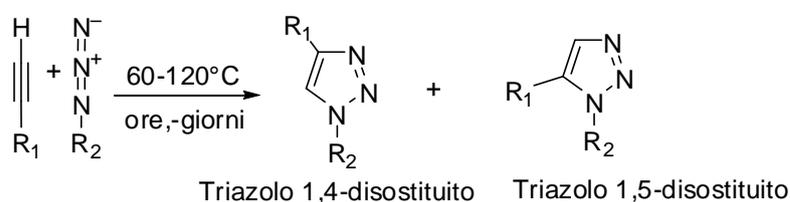


**Figura 8:** leganti piridinici-biotinilati con differente spaziatore per i complessi di Re(I).

## 1.5 “CLICK CHEMISTRY” lo stato dell’arte

Le reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolare sono state oggetto di intenso studio. Nel 1960 fu Rolf Huisgen a conferire il nome cicloaddizioni 1,3-dipolari a tali reazioni, ora anche note come cicloaddizioni 1,3-dipolari di Huisgen.<sup>30,31,32</sup> La reazione fra azidi (1,3-dipoli) e alchini (dipolarofili) appartiene alla grande classe delle reazioni pericicliche [3+2].<sup>33</sup> Si tratta di processi esoergonici che portano all’unione di due reagenti insaturi per fornire una grande varietà di eterocicli a cinque termini, rendendo il potenziale di questa reazione estremamente elevato. E’ importante sottolineare che le azidi presentano grande affinità per gli alchini (chemoselettività), ma sono invece inerti verso la maggior parte dei gruppi presenti nelle strutture delle biomolecole (bio-ortogonalità). Lo stesso nucleo triazolico risulta essere stabile alla degradazione chimica ed enzimatica, in più è in grado di fornire legami ad idrogeno e interazioni dipolari, favorendo quindi la solubilità ed il legame con un dato target biologico.<sup>34</sup>

Il processo di cicloaddizione risulta estremamente favorito dal punto di vista termodinamico ( $\Delta H$  da -45 a -55 kcal/mol), ma possiede un’alta energia di attivazione:<sup>35</sup> ciò rende la reazione molto lenta a temperatura ambiente e porta all’ottenimento di una miscela di regioisomeri 1,4- e 1,5-disostituiti (Schema 1).<sup>36,37</sup>



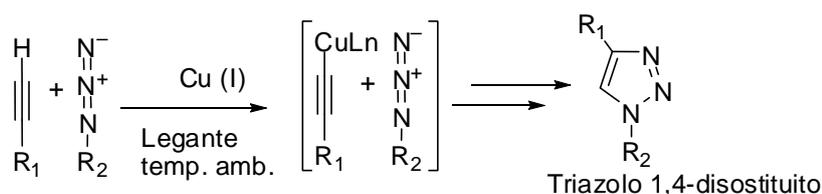
**Schema 1:** Cicloaddizione 1,3-dipolare di Huisgen.

Il termine “*click chemistry*” venne coniato nel 2001 da Sharpless in riferimento ad un nuovo approccio alla sintesi di composti organici basato su reazioni di formazione di legami carbonio-eteroatomo definite “*near-perfect*”.<sup>38</sup>

Tali reazioni presentano caratteristiche comuni con la “*green chemistry*”, come formulato da Sharpless, devono possedere particolari caratteristiche: “*essere versatili, avere alte rese, generare sottoprodotti facilmente rimovibili ed essere stereo-specifiche (non necessariamente enantiospecifiche). Il processo deve richiedere condizioni blande di reazione, impiegare reagenti e prodotti di partenza a basso costo, deve poter evitare l’utilizzo di solventi, o impiegare solventi come l’acqua ed i prodotti finali devono essere facilmente isolabili*”.

Più nello specifico questa tipologia di reazioni permettono di condensare due o più molecole organiche in sistemi ciclici multifunzionalizzati, attraverso passaggi sintetici semplici, dal punto di vista operativo, senza la formazione di sottoprodotti, perché il numero di atomi di carbonio dei prodotti è la somma esatta dei carboni che costituivano i reagenti. Questo concetto viene normalmente espresso col termine “*atom economy*” e ha acquisito grandissima importanza nella chimica applicata ai processi industriale; in questa gruppo di processi cade la grande classe delle reazioni pericicliche tra le quali è opportuno ricordare le Diels-Alder.

Uno dei primi esempi di “*click reaction*” è rappresentato dalla reazione di cicloaddizione catalizzata da Cu(I). Nel 2002, infatti, venne descritta una variante della cicloaddizione di Huisgen in cui quantità catalitiche di Cu(I) consentivano di aumentare la velocità di reazione,<sup>39,40</sup> tanto da non richiedere un prolungato riscaldamento e controllare efficacemente la regioselettività, portando alla formazione del solo isomero 1,4-disostituito (Schema 2).<sup>41</sup>



**Schema 2:** Cicloaddizione azide-alchino catalizzata da Cu(I) (CuAAC).

La versione ottimizzata della reazione di cicloaddizione di Huisgen rappresenta un chiaro esempio di processo efficiente e funzionale: si tratta di una reazione semplice dal punto di vista operativo, in grado di essere condotta in condizioni di pressione e temperatura ambiente, permettendo la rapida trasformazione dei reattivi in un solo prodotto, in alta resa e con il massimo livello di “*atom economy*”.

In pochi anni dalla sua scoperta la reazione di cicloaddizione azide-alchino catalizzata da rame (CuAAC) è divenuta uno dei processi più utilizzati per assemblare covalentemente molecole complesse. Tale reazione, infatti, è dotata di grandi applicazioni nella sintesi organica, nella chimica medicinale, in campo biologico e in chimica dei materiali.<sup>42,43</sup>

Tale reazione consente di ottenere un’ampia gamma di diversi prodotti attraverso l’utilizzo di trasformazioni chimiche semplici e selettive. Azidi e alchini sono reattivi relativamente facili da preparare e modificare, di elevata stabilità e d’inerzia nei confronti di ulteriori gruppi funzionali eventualmente presenti.<sup>39</sup>

La reazione di cicloaddizione azide-alchino catalizzata da rame possiede caratteristiche uniche, che possono essere così schematizzate:

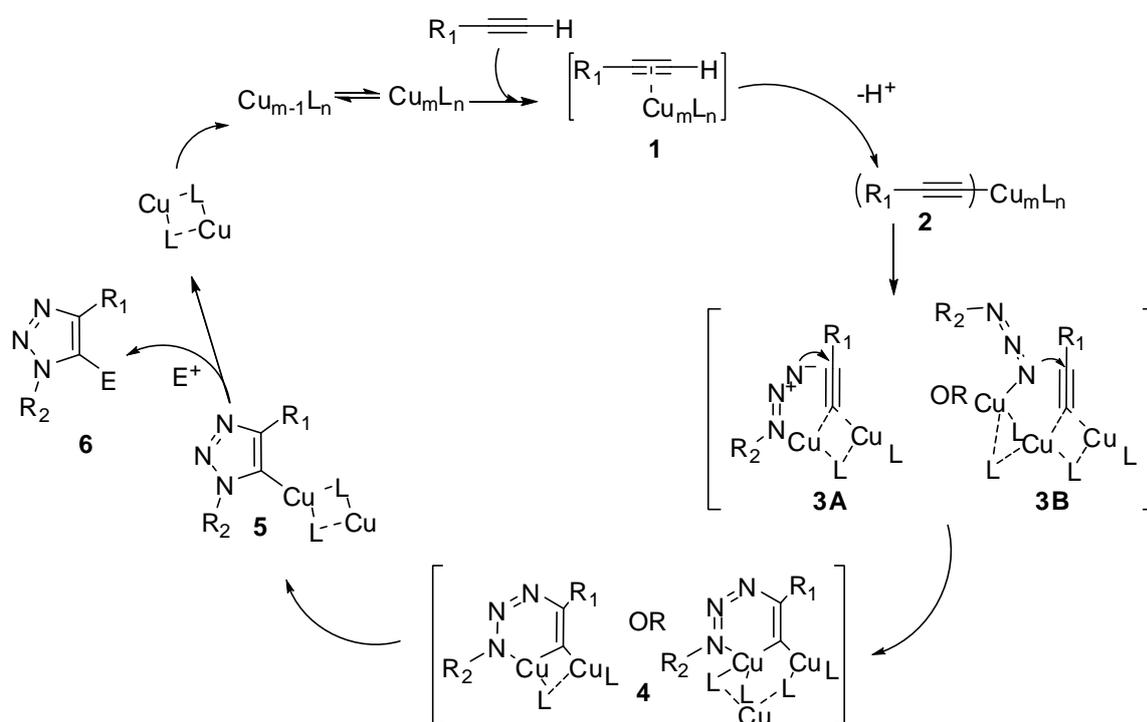
- 1- La velocità della reazione catalizzata da rame è circa  $10^7$  volte superiore rispetto al processo termico non catalizzato.<sup>38</sup> La spiegazione risiede nell'elevato  $\Delta G$  di reazione in combinazione alla scarsa polarità del dipolo nella reazione non catalizzata che si traduce in un'elevata barriera di attivazione. La reazione di cicloaddizione azide-alchino catalizzata da rame procede velocemente in un intervallo di temperature tra 0 e 25°C.
- 2- Le proprietà steriche ed elettroniche dei gruppi funzionali legati ai centri reattivi di azide e alchino non influenzano l'andamento della reazione. Tuttavia la velocità di reazione delle azidi primarie è maggiore rispetto alle azidi secondarie, come conseguenza della difficoltà di coordinazione dell'azide con il Cu(I) nello stato di transizione. In generale le azidi risultano essere piuttosto reattive: solo carbonil-azidi o solfonil-azidi richiedono particolare attenzione a causa dell'instabilità del substrato.<sup>44</sup>
- 3- La maggior parte dei gruppi funzionali è inerte nelle condizioni di reazione e in genere non è richiesta la presenza di gruppi protettori.
- 4- Non sono necessari solventi anidri.
- 5- L'unità 1,2,3-triazolica risultante presenta carattere aromatico e gode di elevata stabilità chimica, di un forte momento dipolare (pari a 5.2-5.6 D),<sup>45</sup> e della capacità di accettare legami a idrogeno, grazie agli atomi di azoto in posizione 2 e 3 che possono fungere da deboli accettori.<sup>34,46</sup> In più tale eterociclo funge da importante unità rigida di connessione, con una distanza di circa 5.0 Å tra le posizioni 1 e 4.

Il ruolo catalitico del rame nella reazione di formazione dell'anello 1,2,3-triazolico è stato oggetto di numerose dispute e revisioni in seguito alla scoperta di questa potente reazione di cicloaddizione catalizzata. Recenti calcoli DFT hanno dimostrato che la catalisi è mediata da più di un atomo di rame.<sup>47</sup>

E' possibile affermare che l'elevato aumento della velocità della reazione catalizzata sia dovuto ad un processo non concertato in grado di diminuire l'energia dello stato di transizione di 11 kcal/mol rispetto alla reazione "one-step" non catalizzata.<sup>35</sup>

In primo luogo il Cu(I) coordina gli elettroni  $\pi$  dell'alchino: ciò provoca la diminuzione della  $pK_a$  del protone terminale che può essere rimosso anche in condizione acquose blande. Si ha così la formazione esotermica (11.7 kcal/mol) dell'acetiluro di rame **2**

(Schema 3). Successivamente il complesso Cu(I)-acetiluro coordina l'azide portando alla formazione dell'intermedio **3**.



**Schema 3:** Meccanismo della cicloaddizione azide-alchino catalizzata da Cu(I).

E' importante sottolineare che alchino e azide non sono necessariamente coordinati allo stesso atomo di rame nello stato di transizione: l'intermedio **3B** risulta essere quello favorito, mantenendo la coordinazione preferenziale con il catalizzatore. Inoltre, tale intermedio chiarisce con certezza l'assoluta regioselettività del processo. Tuttavia, il legame chiave viene formato soltanto nel passaggio successivo, quando il complesso **3** subisce un riarrangiamento, formando il metallociclo **4** a sei termini. Si tratta di una reazione endotermica ( $\Delta H = 12.6$  kcal/mol) con una barriera energetica di 18.7 kcal/mol. Successivamente, in seguito a contrazione del nucleo a sei termini, si ha la formazione all'anello triazolico **5** a cinque termini coordinato con un solo atomo di rame.

Il complesso Cu-triazolo, infine, rilascia il nucleo triazolico libero **6** e la specie L-Cu(I) in seguito a protonazione o reazione con altri elettrofili.

Uno dei fattori critici più importanti della reazione rame-catalizzata risulta essere il mantenimento di una quantità sufficiente di Cu(I) (0.01 equivalenti) durante tutto il processo. Spesso, infatti, all'utilizzo del Cu(I) si predilige l'impiego di una sorgente di Cu(II) con l'aggiunta di un agente riducente. La presenza dell'agente riducente rende

questa reazione meno sensibile all'ossigeno e perciò può essere condotta liberamente in condizioni "open-air".

Le fonti di Cu(I) utilizzate a partire dal 2002 sono molteplici. Le condizioni di reazione più comuni prevedono l'utilizzo di CuSO<sub>4</sub> in soluzione acquosa e di differenti agenti riducenti quali NaAsc (ascorbato di sodio), Asc-H (acido ascorbico), TCEP (tris(2-carbossietil)fosfina).

L'utilizzo di CuSO<sub>4</sub> o di un alogenuro di Cu(I), quale CuI e CuBr, comporta una sostanziale differenza nelle condizioni di reazione da utilizzare. Mediante l'impiego di CuSO<sub>4</sub> la specie catalitica attiva Cu(I) viene direttamente generata dalla riduzione con ascorbato e forma l'acetiluro di rame, mentre i sali CuI e CuBr richiedono la presenza di alte temperature per la formazione del complesso Cu(I)-acetiluro. Tale differenza è principalmente dovuta al fatto che CuI/CuBr si trovano sotto forma di "clusters" stabili, privi di attività catalitica, che richiedono un'alta temperatura o un'elevata concentrazione di anioni acetiluro, per formare il complesso reattivo.

Le speciali caratteristiche di stabilità ed efficienza della reazione di cicloaddizione azide-alchino Cu-catalizzata ne consentono notevoli manipolazioni e variazioni in termini di solvente e temperatura utilizzati. Le condizioni di reazione più comuni prevedono l'utilizzo di CuI in solventi quali THF, CH<sub>3</sub>CN, DMSO o toluene oppure di CuSO<sub>4</sub>/ascorbato di sodio in miscele acqua/alcol. Non esiste una correlazione diretta tra il metodo utilizzato e la resa del prodotto. In alcune reazioni si predilige l'utilizzo di CuSO<sub>4</sub>, per la maggiore semplicità del work-up e della successiva purificazione, mentre in altre reazioni si preferisce l'impiego di CuI o CuBr che generalmente assicurano rese superiori.



## 2. Scopo della tesi

Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il tirocinio ha di recente indirizzato la sua attenzione verso un possibile impiego della “*click chemistry*” per la sintesi di molecole organiche capaci di fungere da leganti per lantanidi e metalli di transizione per ottenere complessi organometallici aventi proprietà fotoemissive.

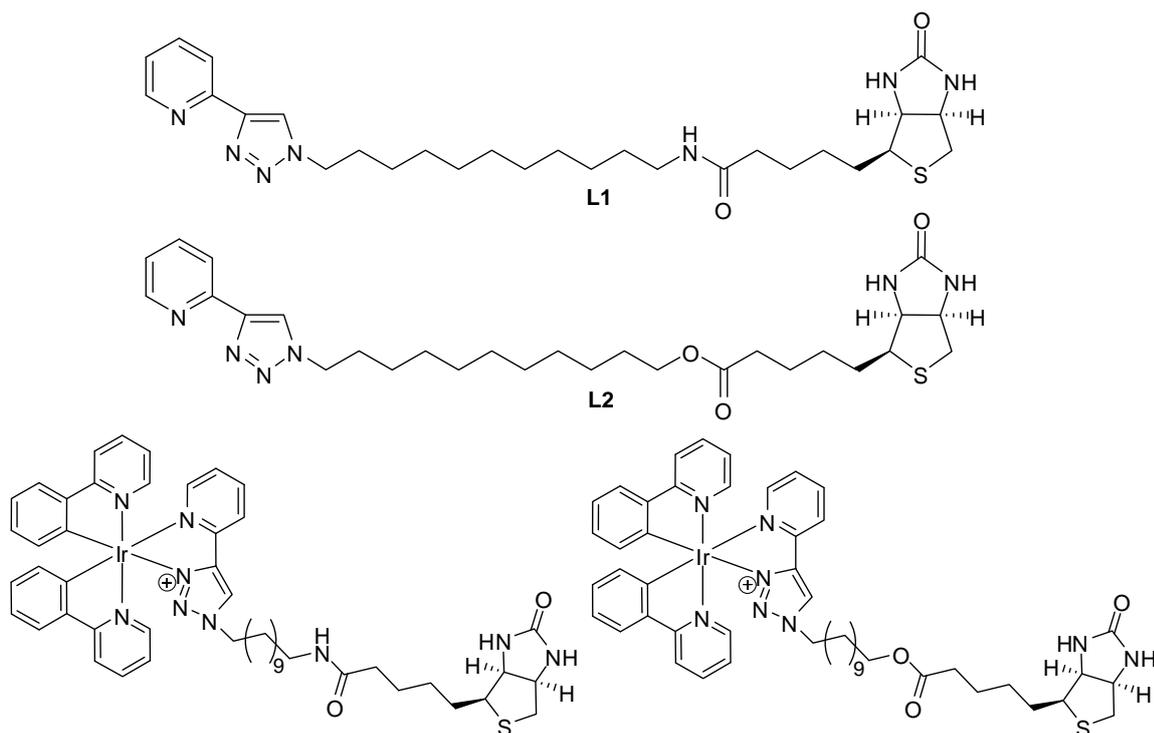
Questi leganti rispetto ai classici sistemi dimminici aromatici presentano una sintesi più semplice e tutti i vantaggi della presenza del gruppo 1,2,3-triazolo:

- grande stabilità ed inerzia chimica, specialmente nei sistemi biologici;
- elevato momento di dipolo;
- possibilità di formare legami a idrogeno e quindi favorire la solubilità del sistema a cui sono vincolati, specialmente in soluzione acquose.

Le caratteristiche appena riassunte rispecchiano alcuni dei requisiti fondamentali che deve possedere un marcatore luminescente.

Tra i metalli di transizione chelati studiati spiccano l'iridio ed il renio. La progettazione di buoni candidati per le applicazioni nel campo della luminescenza richiede una scelta accurata dei metalli e dei leganti: solamente una combinazione appropriata degli orbitali  $\pi$  dei leganti organici con gli orbitali  $d$  del centro metallico porta a transizioni elettroniche che coinvolgono trasferimenti di carica. Recentemente negli studi legati a questi marcatori sia organici che metallo-organici si evidenzia l'uso di una particolare proteina, l'avidina, per la sua capacità di coordinarsi selettivamente con una particolare molecola organica, la biotina.

Durante la mia tesi mi sono occupato della sintesi di due leganti bifunzionali, **L1** e **L2** contenenti sia un'unità piridin-triazolica capace di fungere da legante per un opportuno metallo,<sup>48</sup> che un'unità di biotina in grado di legarsi all'avidina.<sup>14</sup> La differenza fra i due leganti risiede nello spaziatore che collega le due unità funzionali della molecola: un'ammide nel caso di **L1** e un estere per **L2** (Figura 9).



**Figura 9:** Leganti Piridin-1,2,3-triazolo funzionalizzati con la biotina e complessi di iridio ottenuti con **L1** ed **L2**.

Una volta ottenuti i leganti progettati, sono stati sintetizzati i corrispondenti complessi di Ir (III) e Re (I). Le proprietà fotofisiche sono state misurate sia in solvente organico che in soluzione acquosa, con lo scopo di indagare l'alterazione delle caratteristiche luminescenti dei complessi con questi leganti piridin-triazolici. Infine l'avidina è stata titolata con soluzioni acquose a titolo noto dei complessi sintetizzati, con il fine di comprendere quali proprietà luminescenti vengono acquisite dai sistemi metallo organici sintetizzati quando sono coordinati con la proteina in esame.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per poter adempiere agli obiettivi della tesi è stato necessario elaborare la strategia di sintesi del legante organico progettato, che contiene sia una parte capace di chelare un metallo (per ottenere un complesso metallico luminescente), come un 4-piridin-1,2,3-triazolo, sia una parte capace di legarsi selettivamente all'avidina, come la biotina.

L'avidina è una glicoproteina basica (peso molecolare 68.000 D) tetramerica, quindi costituita da quattro sub-unità identiche. Circa il 10% del suo peso molecolare è attribuito al contenuto di carboidrati. Prodotta negli ovidotti di uccelli, rettili ed anfibi, viene depositata nel bianco delle uova. Rappresenta lo 0,05% della frazione proteica complessiva dell'albume d'uovo di gallina; ogni uovo contiene all'incirca 190 mg di avidina.

Il nome avidina deriva dalla particolare "avidità" di questa molecola nei confronti di una vitamina, la B<sub>7</sub>, detta biotina o vitamina H. Ogni sub-unità di avidina possiede un sito di legame per la biotina. Quando la biotina interagisce col sito dell'avidina, queste due molecole si legano in maniera così tenace da formare un complesso che non è assorbito neanche dall'intestino umano.

L'interazione fra avidina e biotina non è di tipo covalente, ma è estremamente forte (la costante di dissociazione  $K_D$  è dell'ordine di  $10^{-15}$  M). Inoltre, il legame si forma in maniera assai rapida e risulta praticamente irreversibile.<sup>14</sup>

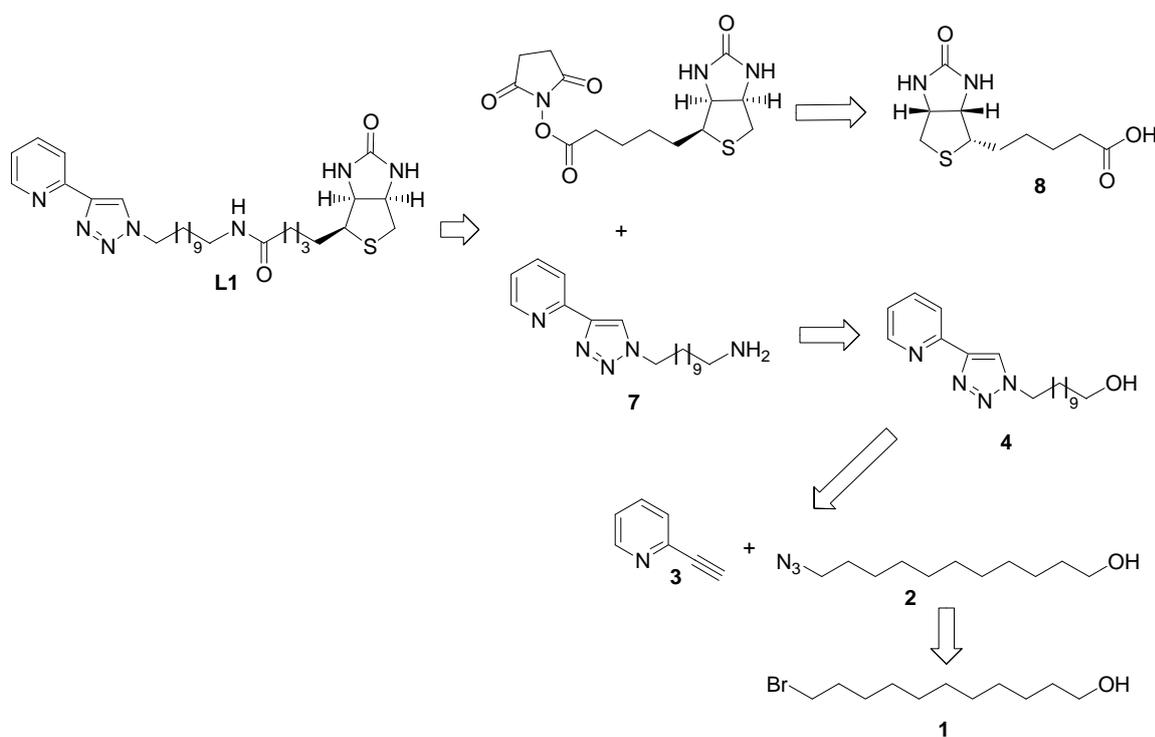
Il fatto che ogni molecola di avidina possa legare a sé quattro diverse molecole di biotina con particolare tenacità ha reso questo sistema di estrema utilità in biochimica, immunologia, chimica bioanalitica e nell'immunoistochimica, in vivo, per il "targeting" dei tumori.

Le proprietà dell'avidina di coordinare la biotina vengono perse in seguito ad un eventuale denaturazione termica. Riguardo alla funzione biologica, si ipotizza che uccelli, rettili ed anfibi sintetizzino l'avidina nei propri ovidotti per inibire la crescita batterica, privando i microrganismi patogeni della biotina necessaria al loro sviluppo.

Dal 1970 il sistema avidina-biotina ha creato un potente strumento nelle scienze biologiche. I ricercatori, consapevoli della forza e della specificità del complesso avidina-biotina, hanno iniziato ad utilizzare l'avidina come una sonda e una matrice di affinità per numerosi progetti di ricerca che sfruttano il suddetto sistema per una vasta gamma di applicazioni biotecnologiche.

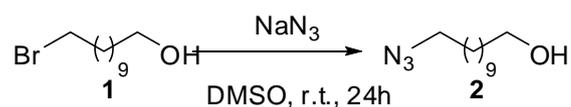
### 3.1 Sintesi dei leganti L1 e L2

La sintesi del legante **L1** risulta articolata in sei stadi successivi, due per ottenere la parte aromatica chelante voluta e quattro per introdurre il ponte ammidico con la biotina, mentre la sintesi di **L2** richiede tre passaggi in meno. La strategia retrosintetica per ottenere **L1** è rappresentata nel seguente schema 5:



*Schema 4: Strategia retrosintetica di L1.*

Il primo stadio della sintesi ha riguardato la sostituzione dell'alogeno del 11-Br-undecan-1-olo con un gruppo azido, per ottenere l'azide **2**, che insieme all'opportuno alchino rappresenta lo starting material per formare il gruppo triazolico del legante. Per creare la funzione richiesta viene utilizzata una reazione di sostituzione nucleofila (Schema 6).

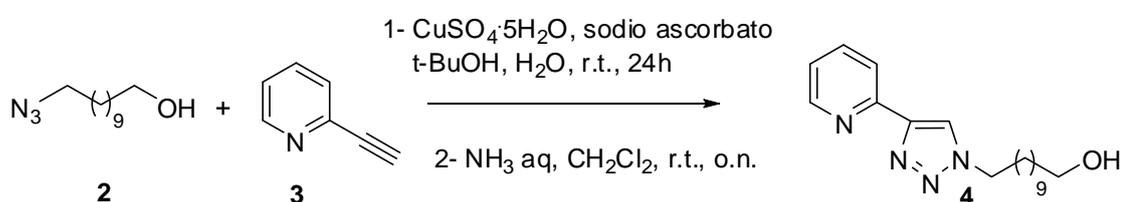


*Schema 5*

L'1-azide-undecan-11-olo viene preparato con resa quantitativa facendo reagire il Br-undecanolo con la sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ) in DMSO a temperatura ambiente. La caratterizzazione  $^1\text{H-NMR}$  mostra due segnali un doppio tripletto a 3.58 ppm e un

tripletto a 3.22 ppm, che costituiscono gli indicatori dell'avvenuta reazione e verranno evidenziati anche sui prossimi stadi delle sintesi, perché rappresentano i protoni dei CH<sub>2</sub> direttamente leganti alle funzioni reattive della molecola.

Nello stadio successivo della sintesi del legante viene formata la prima funzione caratteristica del prodotto finale, ossia il piridin-triazolo, utilizzando una reazione di tipo click. Questo passaggio consiste nel far reagire l'azide **2** con 2-etinil-piridina a temperatura ambiente in una miscela di *t*-butanolo e acqua, utilizzando il solfato di rame (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) come catalizzatore (Schema 6). Dopo evaporazione del solvente ed eliminazione del catalizzatore per trattamento con NH<sub>3</sub> acquosa e diclorometano si ottiene il prodotto **4** che risulta un intermedio chiave del mio lavoro di tesi.



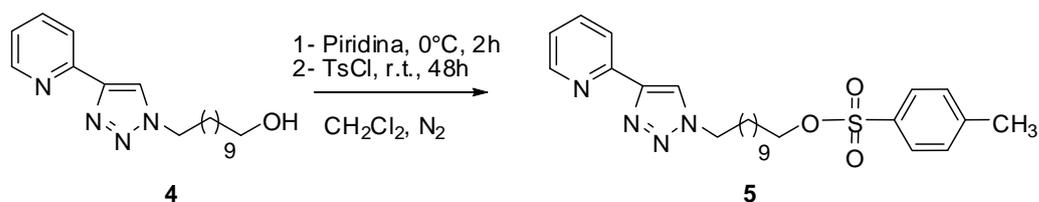
Schema 6

Il prodotto **4** è stato ottenuto con una resa del 85% e si presenta come un solido di colore giallino molto tenue. La caratterizzazione <sup>1</sup>H-NMR evidenzia cinque nuovi segnali nella zona aromatica imputabili ai quattro idrogeni della piridina e al singolo protone sull'anello triazolico, che appare come un singoletto a 8.13 ppm. Questo ultimo segnale in particolare rappresenta la conferma della formazione del prodotto voluto, perché è imputabile ad una funzione assente sui reagenti e formata durante la reazione.

La caratterizzazione <sup>13</sup>C-NMR mette in luce l'alta economia atomica del processo perché il numero dei segnali corrisponde alla somma dei carboni dei prodotti di partenza. Lo spettro conferma le osservazioni fatte sul protone infatti sono ben visibili sette segnali aromatici, cinque CH e due quaternari. I rimanenti segnali rappresentano i CH<sub>2</sub>, tra i quali si distinguono due segnali a 63.1 e 50.7 ppm, che rappresentano i carboni in alfa al gruppo -OH e al triazolo.

Durante il secondo passaggio della sintesi oltre a creare una delle due funzioni principali del legante è stata preservata sulla catena alifatica la funzione alcolica terminale suscettibile di ulteriori trasformazioni.

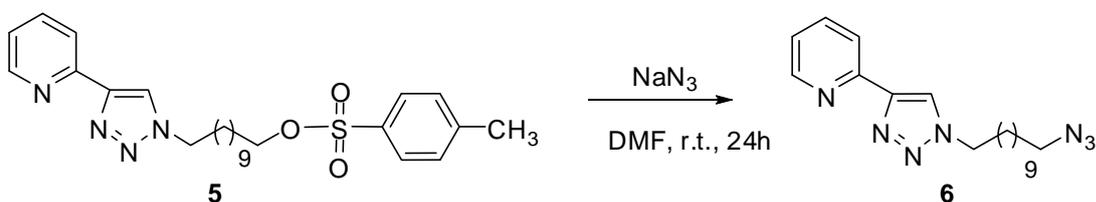
Al fine di ottenere un buon gruppo uscente, l'alcol **4** viene trasformato nel corrispondente tosilato per reazione con tosilcloruro in condizioni basiche (Schema 7).



*Schema 7*

Il prodotto **5** si presenta come un solido polverulento di colore giallo-arancione ed è stato ottenuto con una resa del 84%. La caratterizzazione  $^1\text{H-NMR}$  di questo prodotto mostra nella zona aromatica la comparsa di due nuovi doppietti, che corrispondono ai quattro protoni dell'anello aromatico del toluene. La presenza di questi due segnali insieme al singoletto a 2.43 ppm del metile benzilico, rappresentano la conferma dell'avvenuta reazione; un'altra prova dell'avvenuta sostituzione è lo spostamento a campi più bassi del segnale del  $-\text{CH}_2\text{-O}$ , da 3.58 a 4.00 ppm, che appare come un tripletto a causa dell'assenza di accoppiamenti con i protoni mobili dell'-OH.

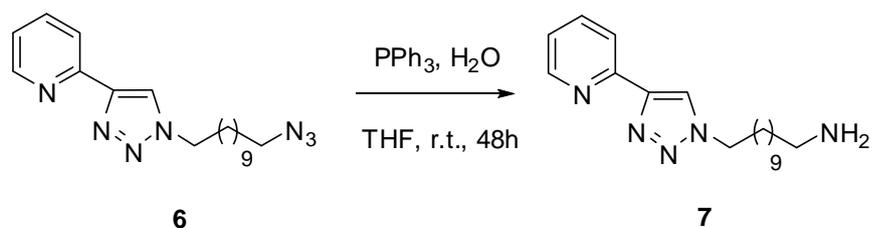
Ora sul carbonio-11 della catena alifatica di **5** è presente un ottimo gruppo uscente che permette di effettuare una reazione di sostituzione nucleofila con  $\text{NaN}_3$ , per ottenere l'azide **6** suscettibile di ulteriori trasformazioni (Schema 8).



*Schema 8*

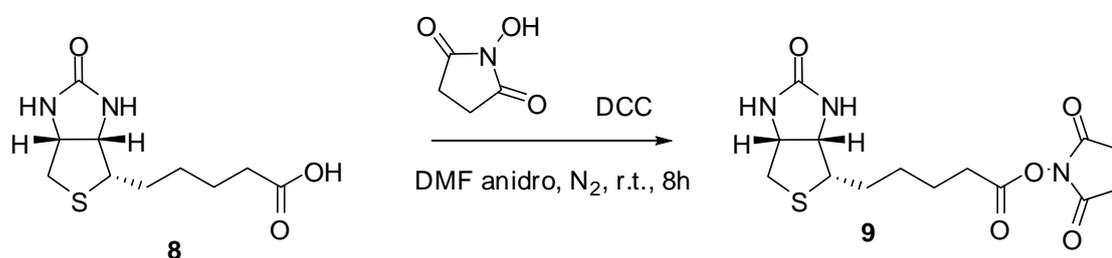
Il prodotto **6** è stato ottenuto con una resa del 98% e si presenta come un solido di colore giallo. Nella parte aromatica dello spettro  $^1\text{H-NMR}$  è ben evidente la scomparsa dei segnali del gruppo tosilico; un'ulteriore conferma dell'avvenuta reazione viene dallo spostamento del tripletto corrispondente ai protoni del C-11, da 4.00 a 3.24 ppm.

L'azide **6** viene quindi ridotta ad ammina, funzione necessaria nel prossimo step per introdurre la biotina nel legante finale. Il prodotto **6** è fatto reagire con trifetilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) e acqua in THF per effettuare una riduzione altamente selettiva dell'azide ad ammina (Schema 9). Il prodotto **7** si presenta come un solido di colore bianco giallastro ed è stato ottenuto con una resa del 75%.



*Schema 9*

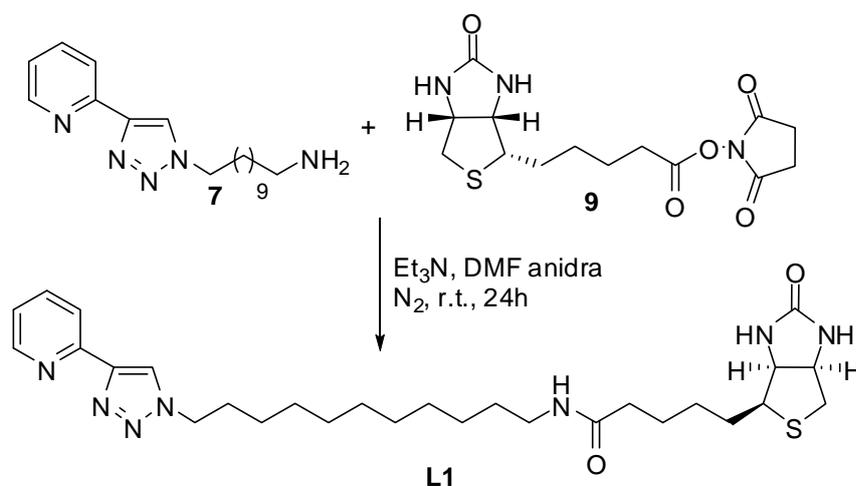
Per poter ottenere l'ammide **L1**, a questo punto dobbiamo far reagire l'ammina **7** con la biotina. A questo scopo è stato necessario attivare la biotina trasformandola nel corrispondente succinimino-derivato **9** per reazione con idrossisuccimmide in presenza di dicicloesilcarbodimmide (DCC), come attivatore.



*Schema 10*

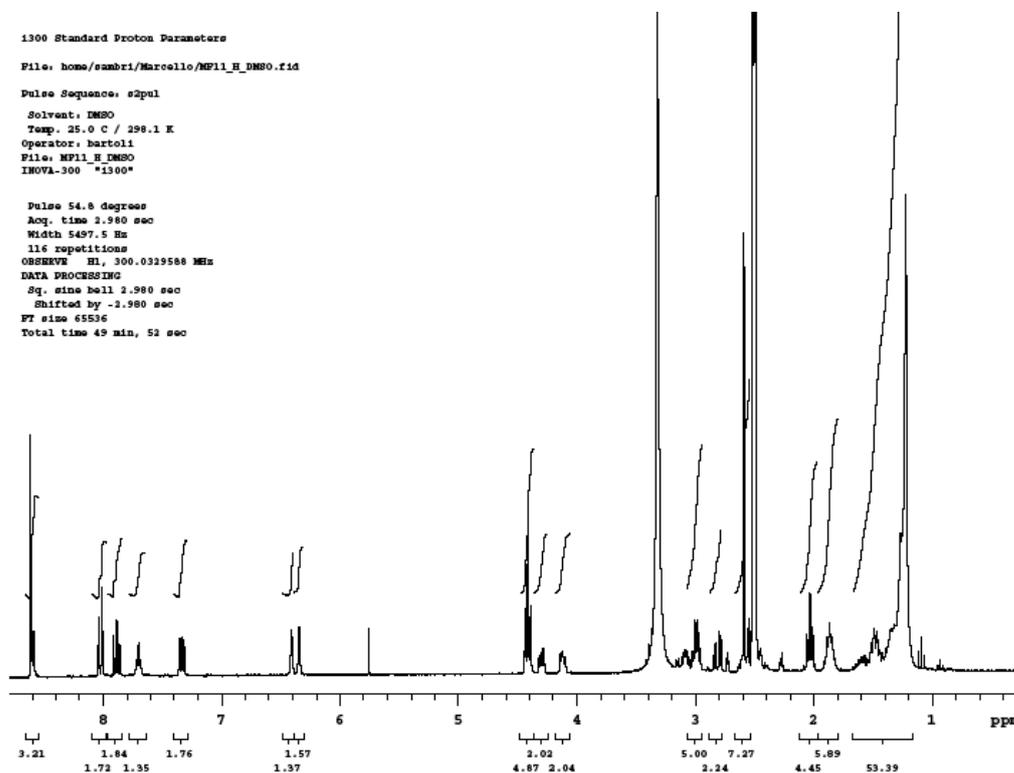
Il prodotto **9** è stato ottenuto con una resa del 87% e si presenta come una polvere bianca molto fine solubile solo in solventi molto polari come DMF e DMSO.

Quindi per l'ultimo stadio della sintesi del legante **L1** si è fatto reagire l'ammina **7** con il composto **9**, in presenza di trietilammina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ). Il legante **L1** contiene entrambe le funzioni richieste all'inizio di questa sintesi: il piridin-triazolo come chelante di un metallo e la biotina in grado di interagire specificatamente con l'avidina.

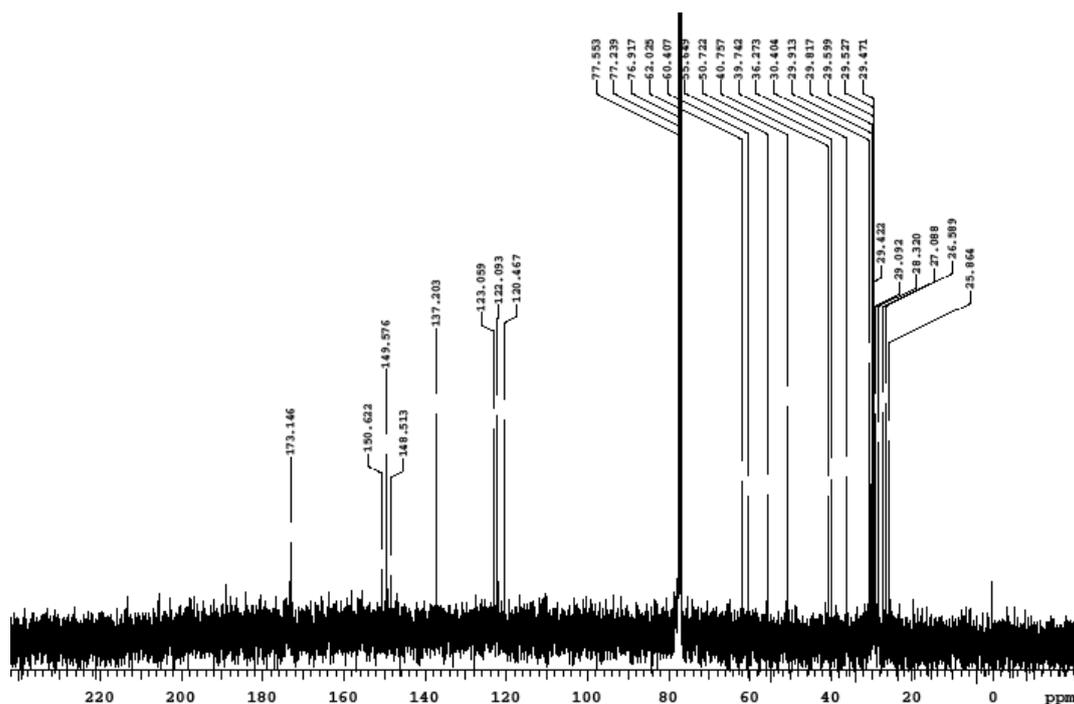


*Schema 11*

Il prodotto **L1** è stato ottenuto con una resa del 92% e si presenta come un solido di colore giallo-verde. Per l'attribuzione completa dei segnali su  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  sono stati utilizzati gli spettri bidimensionali COSY, HSQC ed HMBC. Vengono di seguito riportati gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

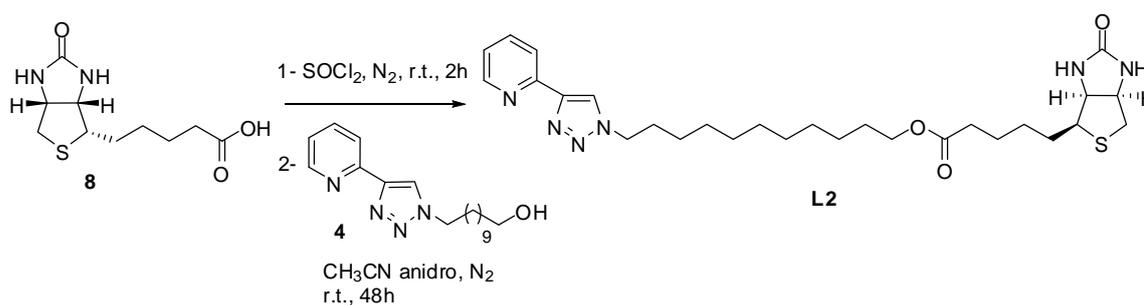


**Figura 10:** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto 5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-ossa-esaidro-1*H*-tieno-[3,4-*d*]imidazol-4-il)-*N*-(11-(4-(Piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)undecil)-pentanammide in  $\text{D}_6\text{-DMSO}$ .



**Figura 11:** Spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR del composto 5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-ossa-esaidro-1*H*-tieno-[3,4-*d*]imidazol-4-il)-*N*-(11-(4-(Piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)undecil)-pentanammide in  $\text{D}_6$ -DMSO.

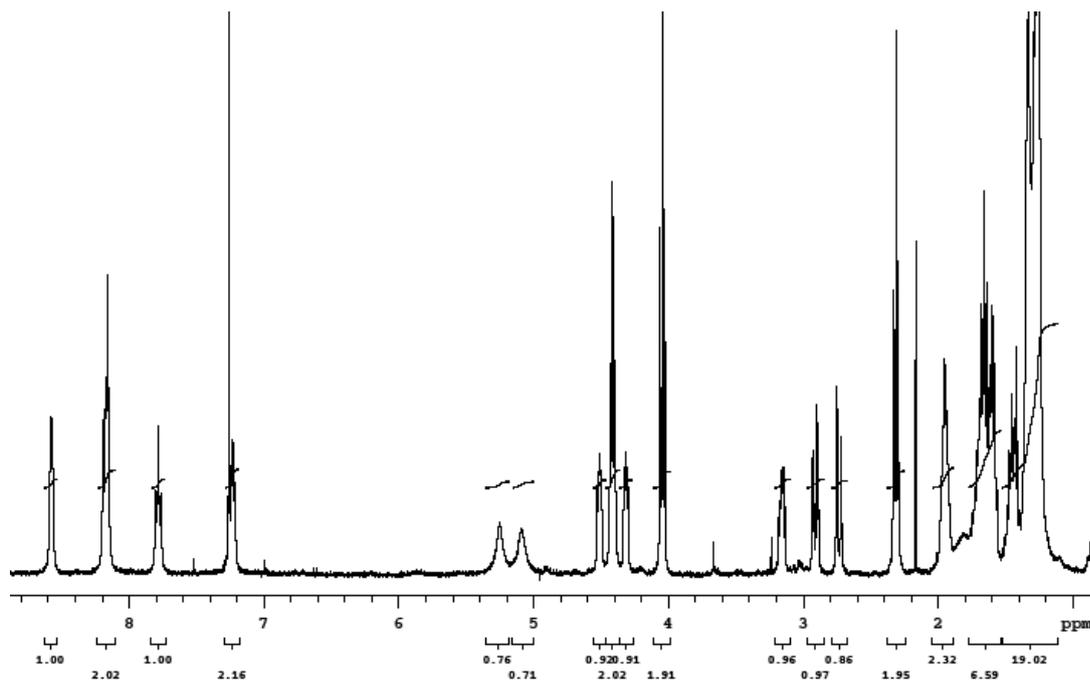
Per ottenere l'estere **L2** è stata effettuata l'acilazione dell'alcol **4** con l'acilcloruro della biotina. Per questa sintesi la biotina viene fatta reagire con il tionilcloruro ( $\text{SOCl}_2$ ) a temperatura ambiente per due ore, quindi l'eccesso di  $\text{SOCl}_2$  viene rimosso per evaporazione in vuoto per dare un olio di colore marroncino, che viene fatto reagire con l'alcol **4** in acetonitrile (Schema 12).



**Schema 12**

Il prodotto **L2** è stato ottenuto con una resa del 60% e si presenta come un solido di colore giallo-marrone. La caratterizzazione  $^1\text{H}$ -NMR mostra nella parte aromatica dello spettro la presenza del pattern caratteristico della funzione piridin-triazolica, rimasta invariata per il prodotto **L2** rispetto al legante **L1**.

Altri due segnali importanti sono i tripletti 4.41 e 4.05 ppm che descrivono i protoni dei gruppi  $-N-CH_2$  e  $CH_2-O-C=O$ . In particolar modo questo secondo chemical shift permette di distinguere il legante **L2** dal **L1**, perché la presenza di O al posto di NH fa risuonare questo chemical shift a campi decisamente più bassi. Un'ulteriore segnale di distinzione è rappresentato dal tripletto a 2.31 ppm imputabile al gruppo  $-CH_2C=O-O$  che risulta più deschermato rispetto al suo analogo sul legante **L1** (Figura 12).

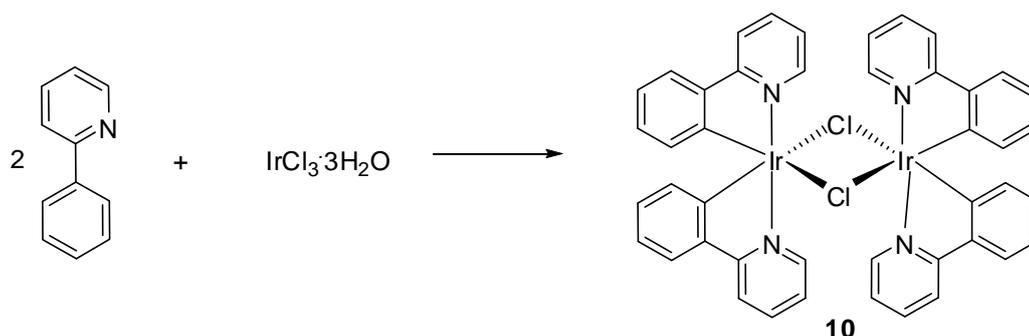


**Figura 12:** Spettro <sup>1</sup>H-NMR del composto (11-(4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)undecil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-ossa-esaidro-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato in CDCl<sub>3</sub>.

Le proprietà luminescenti di **L1** ed **L2** sono state misurate allo spettrofluorimetro ed entrambi i composti presentano una emissione poco intensa dovuta a decadimenti fra gli orbitali  $\pi^* \rightarrow \pi$  (N<sup>^</sup>N).

### 3.2 Sintesi e caratterizzazione dei complessi [(ppy)<sub>2</sub>Ir-L1][Cl] (11) e [(ppy)<sub>2</sub>Ir-L2][Cl] (12)

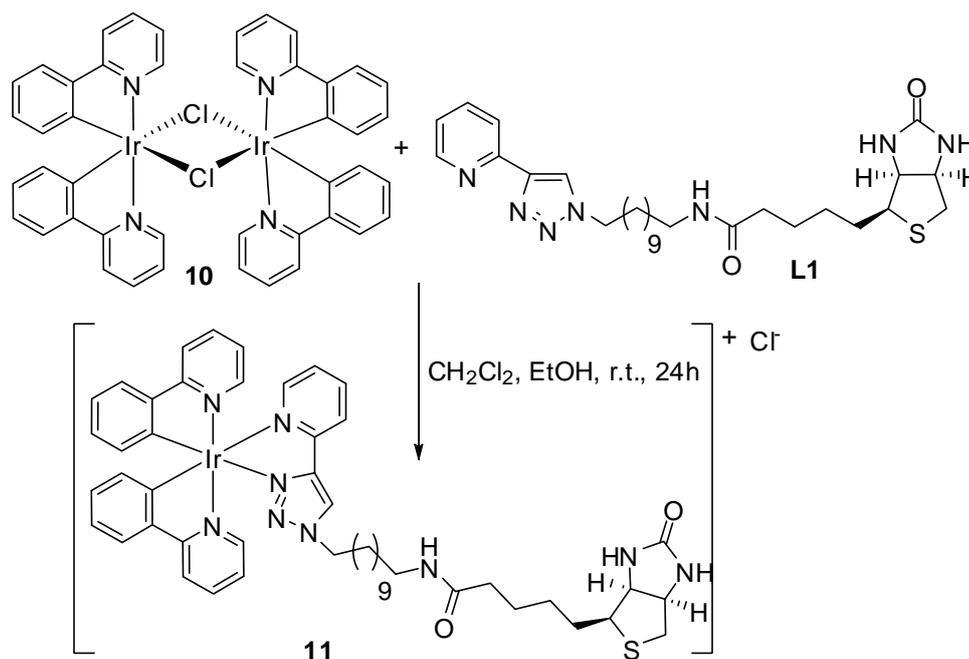
Il reagente normalmente utilizzato per la sintesi dei complessi dell'iridio è IrCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O, da cui si ottiene il dimero corrispondente attraverso una reazione di ciclometallazione con un legante C<sup>^</sup>N (es. la 2-fenilpiridina), come mostrato nello Schema 13:<sup>49,50,51,52,53</sup>



**Schema 13:** Reazione di sintesi del dimero Tetrakis(2-fenilpiridinato-C<sup>2</sup>,N)(μ-dicloro)di Iridio;

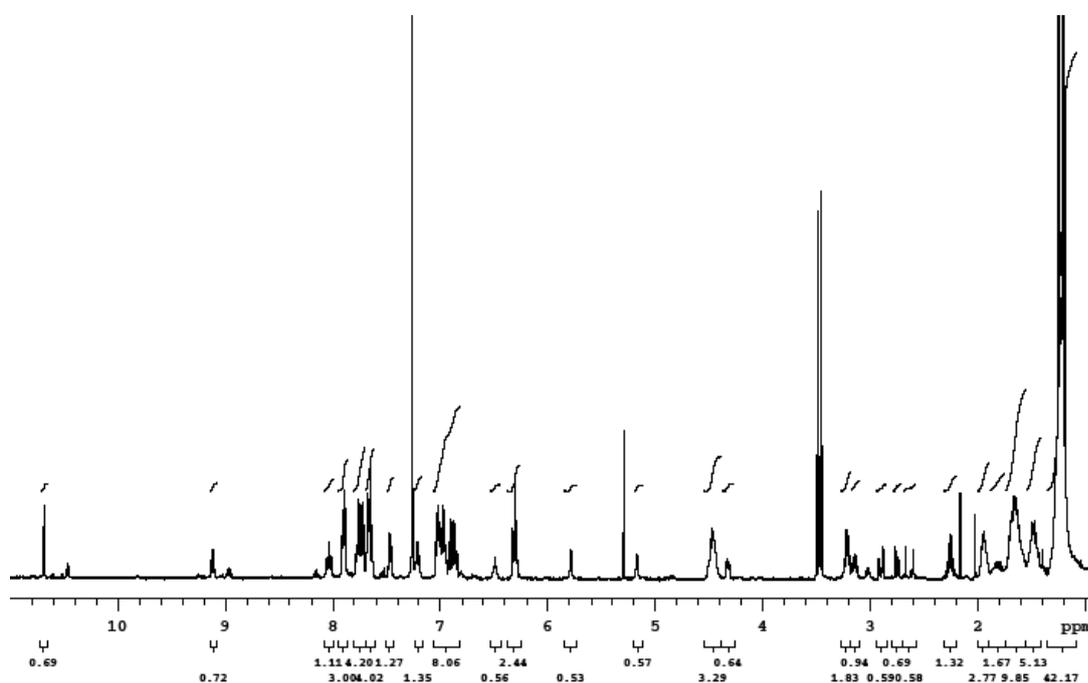
Entrambi gli atomi di iridio del dimero presentano coordinazione ottaedrica, inoltre la molecola presenta la più alta simmetria possibile, tale da rendere ogni fenilpiridina equivalente alle altre tre.

Per ottenere il complesso **11**, il legante **L1** viene fatto reagire con il dimero di iridio **10** a temperatura ambiente in una miscela di diclorometano ed etanolo, secondo una procedura riportata in letteratura (Schema 14).<sup>54,55</sup>



**Schema 14**

Il complesso **11**, un solido di colore giallo molto acceso, è stato ottenuto con una resa del 60%. La caratterizzazione  $^1\text{H-NMR}$  mostra una zona aromatica molto complessa a causa della presenza dei due leganti fenil-piridinici non equivalenti. Sono comunque individuabili i segnali dei protoni del piridin-triazolo: singoletto a 10.68 ppm, doppietto a 9.11 ppm, doppio tripletto a 8.04 ppm, doppietto a 7.47 ppm e dal multipletto fra 7.23 - 7.18 ppm. Lo shift di questi ultimi cinque segnali verso campi decisamente più bassi, rispetto allo spettro del legante **L1**, costituisce la conferma dell'avvenuta formazione del complesso.



*Figura 13: Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto  $[(ppy)_2\text{Ir-L1}][\text{Cl}]$  in  $\text{CDCl}_3$ .*

Lo spettro di assorbimento del complesso **11** (Figura 14) in diclorometano presenta due bande con massimi a 255 e 381 nm. La prima banda scaturisce da transizioni legando centrate (LC), mentre l'assorbimento ad energia inferiore è in generale attribuito a transizioni a trasferimento di carica di tipo MLCT (Metal-to-Ligand-Charge Transfer) spin permesse ( $^1\text{MLCT}$ ) e, a causa della presenza di un metallo della terza serie di transizione, spin proibite ( $^3\text{MLCT}$ )

Sono stati registrati due spettri di emissione, eccitando il complesso su entrambi i massimi di assorbimento. Entrambi gli spettri di emissione presentano due massimi a 476 e a 508 nm con andamenti analoghi, ma otteniamo una maggiore intensità con

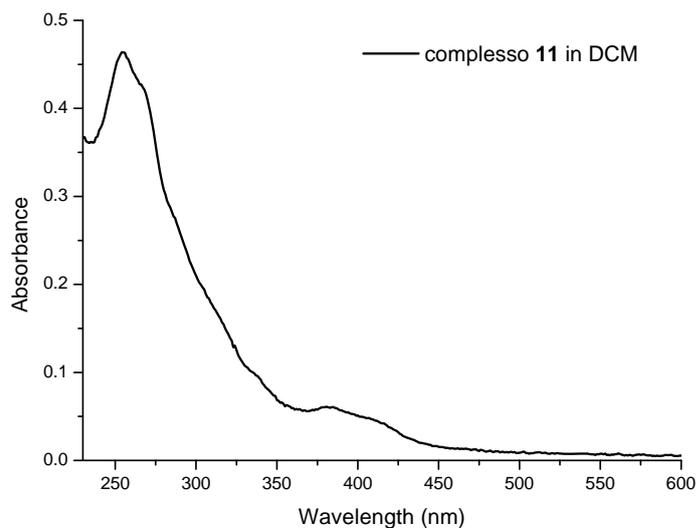
l'eccitazione a 290 nm (in Figura 15 è riportato lo spettro normalizzato). Questa emissione presenta un decadimento bi-esponenziale descritto da due tempi di vita pari a 143.8 ns per il 90% e 55.4 ns per il 10%.

Il complesso presenta una resa quantica percentuale pari a 4.75% misurata contro il riferimento Rodamina 101 in etanolo.

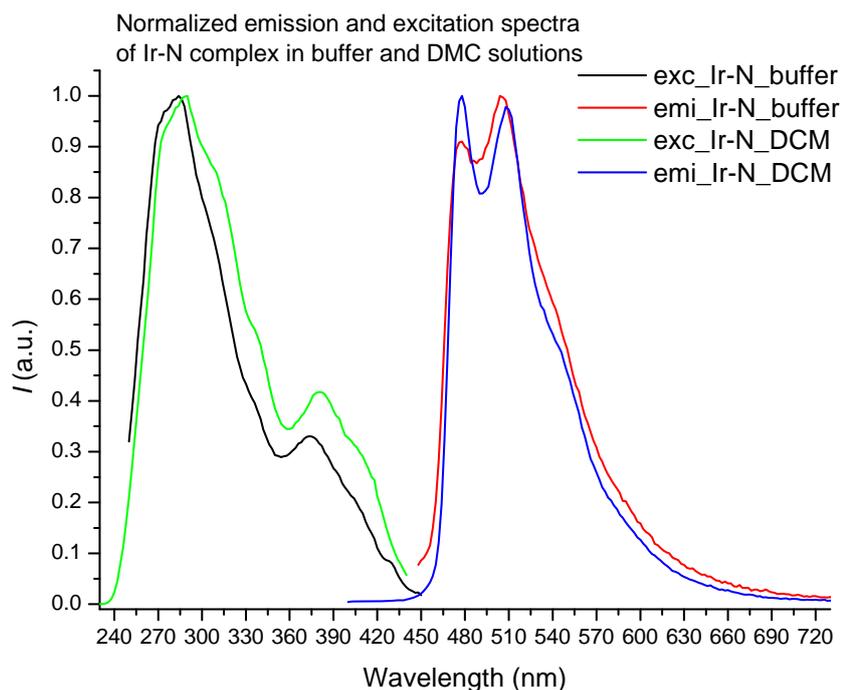
Con lo scopo di verificare se l'emissione del complesso deriva da uno stato eccitato di tripletto (FOSFORESCENZA) o di singoletto (FLUORESCENZA), ne sono state misurate le proprietà luminescenti in assenza di ossigeno, degasando la soluzione con Ar. Gli spettri di emissione acquisiti in questo caso, presentano gli stessi andamenti, ma il complesso **11** mostra un tempo di vita e una resa quantica incrementate ( $\tau = 419$  ns e QY = 13.8%). Congelando la soluzione di complesso a 77°K si misura un tempo di vita aumentato di circa dieci volte (4.16  $\mu$ s), e in più gli spettri di emissione mostrano un'ulteriore massimo a 545 nm, visibile sugli spettri a temperatura ambiente come una spalla.

Nell'ottica dello studio dell'interazione di questo complesso con avidina in soluzione acquosa (sezione successiva), le proprietà fotofisiche del complesso **11** sono state analizzate in tampone fosfato 50 mM (pH = 7.4).

Lo spettro di assorbimento del complesso nel tampone ("buffer") presenta due bande ben evidenti con massimi a 284 e 375 nm. Lo spettro di emissione in questo solvente è stato ottenuto eccitando a 375 nm e mostra un'intensa luminescenza verde-azzurra, che preserva i massimi e l'andamento delle prove in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{max}} = 478$  nm,  $\lambda_{\text{max}} = 504$  nm) con un tempo di vita più lungo ( $\tau = 569$  ns). Confrontando i tempi di vita fra le prove in diclorometano e il "buffer" si deduce che questo complesso risente leggermente della polarità della soluzione, probabilmente a causa della natura cationica del complesso, che comunque preserva in soluzione acquosa ottime proprietà luminescenti.

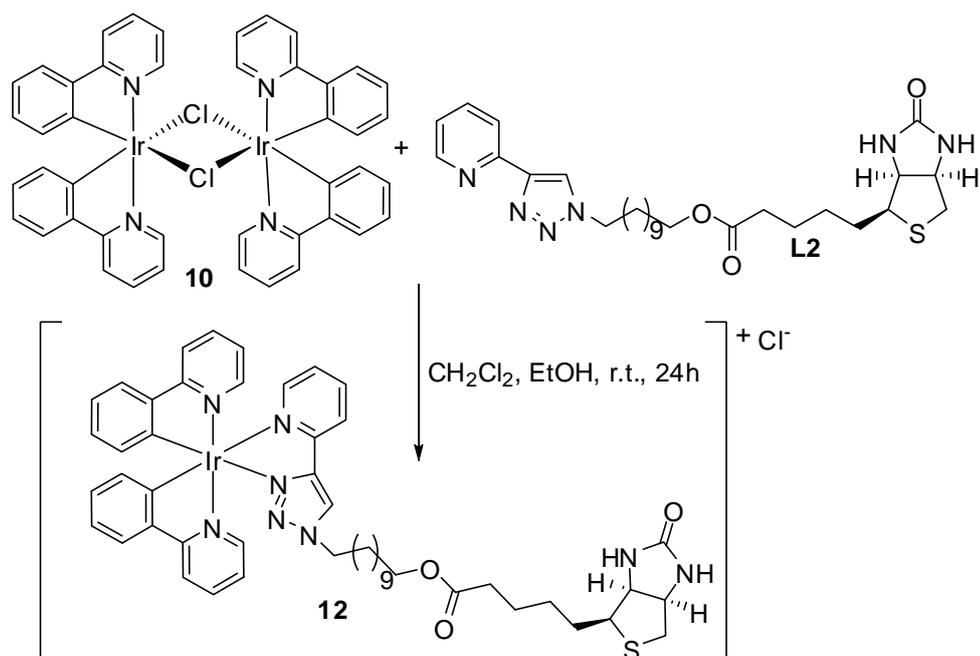


**Figura 14:** Spettro di assorbimento UV-Vis del complesso  $[(ppy)_2Ir-L1][Cl]$  (**11**) in  $CH_2Cl_2$ .

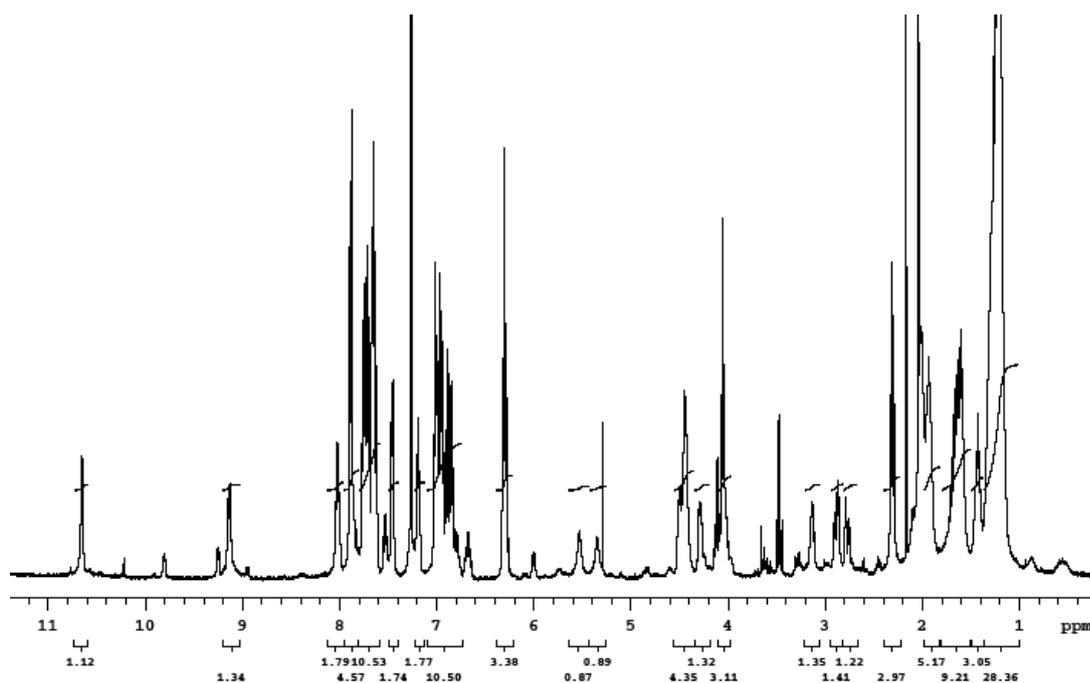


**Figura 15:** Spettro di emissione del complesso  $[(ppy)_2Ir-L1][Cl]$  (**11**).

Con lo scopo di ottenere il complesso **12** così da evidenziare eventuali differenze delle proprietà fotofisiche per la sostituzione di un gruppo ammidico con uno estereo nella catena laterale, il legante **L2** viene fatto reagire con il dimero **10** a temperatura ambiente in una miscela di diclorometano ed etanolo.<sup>54,55</sup>



Il complesso **12**, un solido di colore giallo molto acceso, è stato ottenuto con una resa del 80% ed è stato caratterizzato all’NMR. Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  come per il complesso **11**, presenta una zona aromatica molto ricca di segnali. Nella zona fra 5 e 6 ppm si osservano due segnali di singoletto allargati che descrivono i due protoni mobili del gruppo ureico della biotina. Il segnale corrispondente ai due protoni del  $\text{CH}_2$  adiacenti al triazolo, come per il complesso **11**, si presenta come un multipletto fra 4.54 - 4.36 ppm: il motivo viene ascritto alla configurazione ottaedrica dell’iridio, che costituendo un centro chirale, rende questi H diastereotopici.



**Figura 16:** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto  $[(\text{ppy})_2\text{Ir-L2}][\text{Cl}]$  in  $\text{CDCl}_3$ .

Lo spettro di assorbimento del complesso **12** in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Figura 17) presenta due bande con massimi a 255 e 381 nm, che mantengono una descrizione del tutto analoga alle bande di assorbimento osservate per il complesso **11**.

Sono stati registrati due spettri emissione, eccitando il complesso a entrambi i massimi di assorbimento. In entrambi i casi otteniamo un'emissione intorno a 500 nm (verde-azzurro): gli spettri presentano due massimi a 476 e a 508 nm, però otteniamo una maggiore intensità di emissione eccitando il complesso a 290 nm. Il complesso ha un tempo di vita pari a 143.8 ns, registrato eccitando a 367.8 nm.

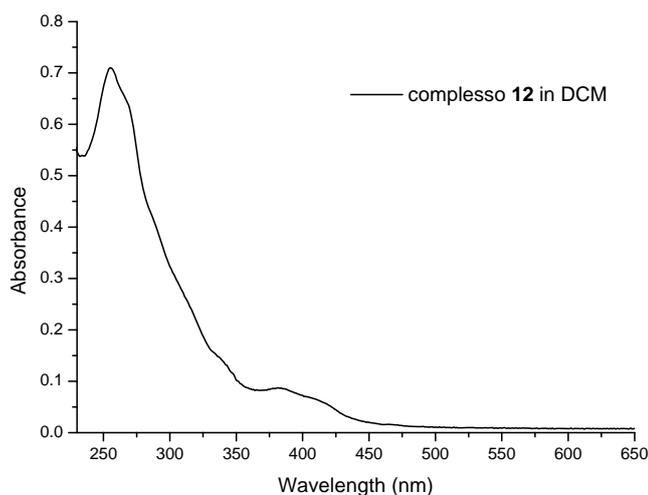
Il complesso **12** in diclorometano presenta una resa quantica percentuale pari a 6.4%, valore ottenuto utilizzando come riferimento la Rodamina 101 in etanolo. Per evidenziare la fosforescenza di questo complesso, la soluzione viene degasata con Ar, e le misure fotofisiche vengono ripetute. Lo spettro di assorbimento presenta sempre due bande ma uno dei due massimi si sposta da 250 a 300 nm, mentre gli spettri di emissione non mostrano significative variazioni. Tuttavia il complesso in questo caso mostra un tempo di vita e una resa quantica incrementate di circa dieci volte rispetto alla misura precedente ( $\tau = 1100$  ns e  $\text{QY} = 60.3\%$ ). Congelando la soluzione del complesso **12** a 77 °K, si osserva un'emissione che presenta un decadimento bi esponenziale descritto da due lunghi tempi di vita pari a 2.12  $\mu\text{s}$  per il 30% e 4.90  $\mu\text{s}$  per il 70%. Questi due  $\tau$

probabilmente sono imputabili al rapido congelamento del campione, processo che porta ad una disomogeneità della struttura della matrice stessa.

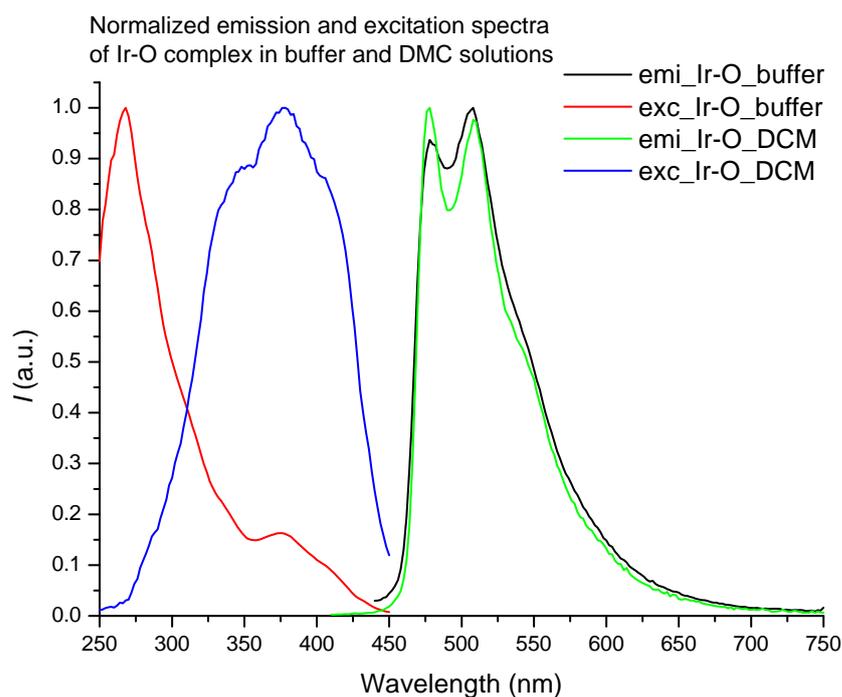
Analogamente al complesso **11**, si osserva sullo spettro di emissione la presenza della spalla a 545 nm notevolmente accentuata.

Anche per questo complesso è stato necessario definire il suo comportamento fotofisico in soluzione acquosa, quindi è stata preparata una soluzione di complesso in tampone fosfato 50 mM (pH = 7.4).

Lo spettro di assorbimento del complesso nel “buffer” presenta due bande ben evidenti con massimi a 268 e 376 nm. Lo spettro di emissione in questo solvente è stato ottenuto eccitando a 375 nm e si osserva un’intensa luminescenza verde-azzurra, con un tempo di vita considerevole ( $\tau = 590$  ns). Lo spettro preserva i massimi e l’andamento delle prove in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\lambda_{\text{max}} = 478$  nm,  $\lambda_{\text{max}} = 508$  nm). Confrontando i tempi di vita fra le prove in diclorometano e in “buffer” si deduce che questo complesso risente leggermente della polarità della soluzione, a causa di una carica positiva netta presente sul complesso.



**Figura 17:** Spettro di assorbimento UV-Vis del complesso  $[(ppy)_2Ir-L2][Cl]$  (**12**) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



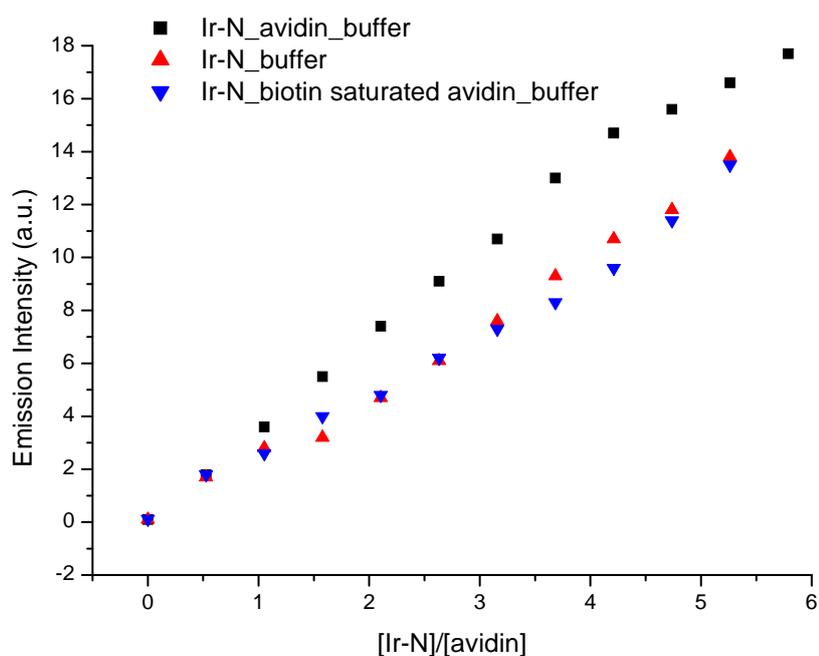
**Figura 18:** Spettro di emissione del complesso  $[(ppy)_2Ir-L2][Cl]$  (**12**).

Gli spettri di eccitazione del complesso **12** in diclorometano e in “buffer” presentano due andamenti diversi. In diclorometano il complesso **12** mostra uno spettro con massimo a circa 380 nm, probabilmente imputabile ai trasferimenti di carica fra il metallo ed il legante (MLCT), mentre quando **12** è sciolto nel tampone l’andamento del grafico diventa analogo allo spettro di assorbimento (Figura 17). Questi risultati dimostrano la sensibilità dello spettro di eccitazione di questo complesso verso la polarità del solvente. Quindi, l’analisi degli spettri di eccitazione mostra come l’emissione del complesso disciolto in solvente acquoso derivi da uno stato eccitato essenzialmente di tipo MLCT, mentre in diclorometano la natura dello stato eccitato risente maggiormente di un contributo Legando Centrato (LC). infatti quando **12** è sciolto in un mezzo poco polare come il  $CH_2Cl_2$ , presenta un forte assorbimento della banda MLCT, ma quando si trova nel tampone, questa banda viene stabilizzata dall’interazione con l’acqua, rendendo prevalente il contributo di assorbimento legato agli orbitali centrati sui leganti (LC). In sintesi, facendo reagire i leganti **L1** ed **L2** col dimero **10** sono stati ottenuti due complessi luminescenti. Questi sistemi presentano un’intensa emissione verde-azzurra, descritta dagli andamenti riportati nelle figure 15 (complesso **11**) e 18 (complesso **12**), sia in diclorometano che in “buffer”, in più la caratterizzazione dei tempi di vita e degli

spettri di eccitazione nei due solventi, ci ha permesso di capire che la risposta fotofisica di questi complessi è influenzata dalla polarità del mezzo. Tuttavia sono state riscontrate anche delle discrepanze nel comportamento foto-fisico di questi due sistemi, infatti il complesso **12** presenta una resa quantica e un tempo di vita notevolmente più alti (misure in assenza di ossigeno) del suo analogo col ponte ammidico, il motivo di questa differenza risiede proprio nella diversa funzione che collega la parte chelante con la parte responsabile della bioconiugazione. A prima vista si potrebbe pensare, che la presenza di un estere in una catena di atomi di carbonio renda il sistema più flessibile rispetto alla presenza di un'amide, ma le misure sperimentali dimostrano una migliore emissione da parte del complesso **12**, funzionalizzato col legante **L2**; l'unica giustificazione di questo dato sperimentale è che **L2** presenti una struttura più rigida del suo analogo **L1**, e quindi limiti le vibrazioni del complesso risultante, incrementando la quantità di luce emessa.

### 3.3 Interazione avidina-complessi di iridio 11 e 12

La capacità dei complessi  $[(ppy)_2Ir-L1]^+$  e  $[(ppy)_2Ir-L2]^+$  di legarsi all'avidina è stata indagata misurando la variazione dell'emissione dei complessi in diversi esperimenti. In particolare una soluzione di avidina in tampone fosfato 50 mM (pH = 7.4), è stata titolata con una soluzione del complesso **11** (0.40 mM) e si sono registrati gli spettri di emissione ad ogni aggiunta (10  $\mu$ L). La prova viene svolta eccitando a 375 nm, una lunghezza d'onda più tollerabile dal materiale biologico. I risultati di questo esperimento sono riportati nel seguente grafico, insieme agli andamenti spettroscopici delle due titolazioni di controllo: uno dove l'avidina è assente, uno dove l'avidina è stata presaturata da un largo eccesso di biotina non modificata.

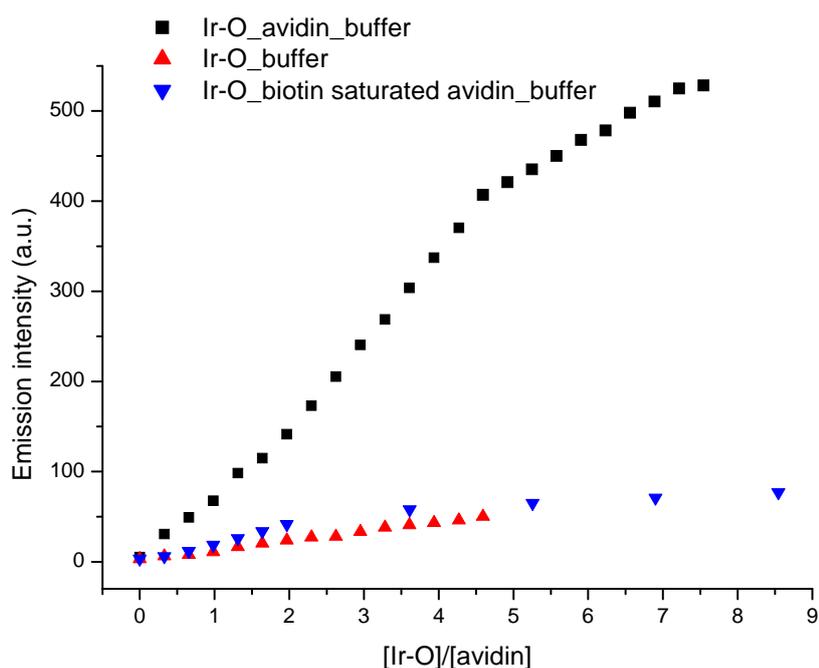


**Figura 19:** Curve della titolazione di emissione di una soluzione di avidina 3.8  $\mu$ M (■), una soluzione di avidina 3.8  $\mu$ M e biotina  $4.75 \cdot 10^{-5}$  M (▼), e una soluzione di tampone fosfato 50 mM (▲), con una soluzione di complesso **11**.

Dalla prova sull'avidina non saturata si osserva come l'intensità di emissione del complesso titolante aumenti di due e tre volte, rispetto all'intensità di emissione degli esperimenti di controllo, specialmente nelle prime quattro aggiunte. Questo comportamento è probabilmente dovuto alla coordinazione del complesso biotina sulla

proteina. La bio-coniugazione infatti può limitare i movimenti molecolari di tutto il complesso favorendo i decadimenti radiativi. Un comportamento analogo è stato dedotto dalla caratterizzazione fotofisica dei complessi **11** e **12** alla temperatura di 77°K; nella soluzione congelata le singole molecole perdono libertà di movimento e questo causa un forte aumento di intensità della luminescenza. L'aumento di rigidità dovuto alla bio-coniugazione ha perciò l'effetto di limitare i fenomeni non radiativi dovuti ai movimenti molecolari, causando un incremento dell'intensità di emissione. L'analisi dei tempi di vita depone a favore di una simile interpretazione: infatti, anche il tempo di vita delle emissioni è molto maggiore rispetto a quello determinato durante le caratterizzazioni del solo complesso **11** in "buffer": 812 ns (prova avidina) contro 614 ns e 368 ns (prove solo buffer e avidina saturata).

Nel grafico della titolazione complesso-avidina è visibile una sorta di flesso dopo l'aggiunta di una certa quantità di complesso; dopo quel punto l'andamento dell'intensità di emissione cambia pendenza e diventa analogo al comportamento riscontrato negli esperimenti di controllo. Si può pensare che il cambio di pendenza rappresenti il momento in cui il complesso di biotina ha saturato tutti i siti di coordinazione disponibili sull'avidina: in corrispondenza di tale "punto equivalente" la concentrazione del complesso **11** è circa quattro volte quella dell'avidina. L'ulteriore complesso aggiunto non beneficia dei cambiamenti dovuti alla coordinazione, come accade nell'esperimento di controllo con l'avidina saturata da un grande eccesso biotina. Successivamente sono state indagate le proprietà di associazione del complesso **12** nei confronti dell'avidina, analogamente al complesso **11**. Ma a differenza della titolazione precedente l'esperimento principale è stato condotto con aggiunte da 5 µL, per meglio cogliere il comportamento del complesso di biotina. A parte questa differenza la procedura generale è rimasta invariata e tutti i risultati sono stati riportati nel seguente grafico, insieme agli andamenti spettroscopici delle due titolazioni di controllo: uno dove l'avidina è assente, uno dove l'avidina è stata presaturata da un largo eccesso di biotina.



**Figura 20:** Curve della titolazione di emissione di una soluzione di avidina  $3.8 \mu\text{M}$  (■), una soluzione di avidina  $3.8 \mu\text{M}$  e biotina  $4.75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (▼), e una soluzione di tampone fosfato  $50 \text{ mM}$  (▲), con una soluzione di complesso **12**.

Gli spettri di emissione presentano degli andamenti molto simili a quelli della prova eseguita con il complesso **11**. Però in questa titolazione la diversità di intensità di emissione fra la forma di complesso coordinata con l'avidina e quella libera è notevolmente accentuata rispetto alla differenza di risposta d'emissione fra le due forme del complesso **11**, nella prova precedente. Il motivo di questo comportamento è probabilmente dovuto ad una maggiore rigidità che il complesso **12** trova, quando coordina l'avidina, evidentemente questo sistema soffre di un maggiore impedimento ai suoi movimenti molecolari, rispetto al complesso **11**, quindi le intensità di emissione vengono molto accentuate, rispetto alla prova precedente.

Gli andamenti delle intensità sono alterati fino a quando l'avidina non è completamente saturata, dove è possibile osservare incrementi di intensità pari a 3 o 4 volte, rispetto alle intensità riscontrate sulle prove di controllo. Dopo il viraggio la pendenza si assesta su quella di questi esperimenti.

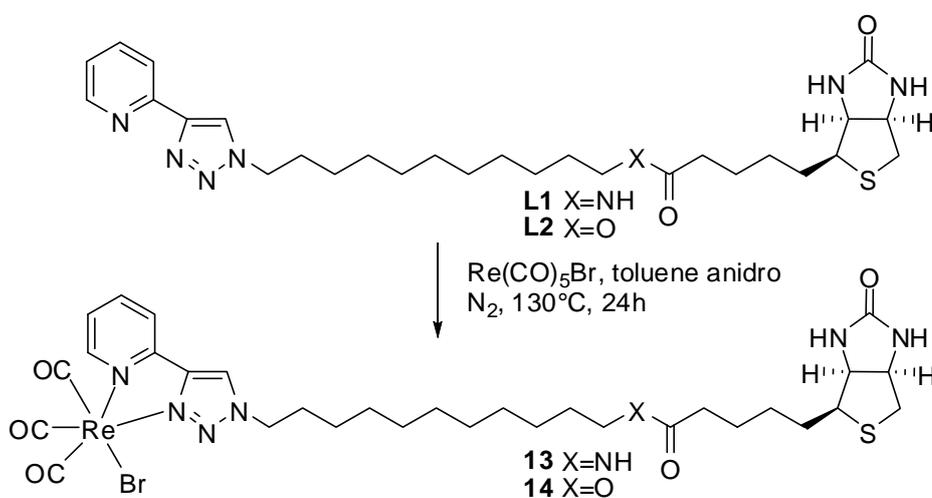
Durante questa titolazione è stato misurato il tempo di vita del complesso in due momenti diversi della titolazione: subito prima dell'aggiunta a cui si sarebbe osservato il viraggio (ossia il cambiamento di pendenza), dove  $\tau$  risulta pari a  $1023 \text{ ns}$  e alla fine della

titolazione dove il tempo di vita è pari a 1058 ns. Questi due tempi di vita, molto simili, permettono di dimostrare che le aggiunte di complesso dopo il momento di saturazione non beneficiano dei miglioramenti delle proprietà fotofisiche, infatti la lieve differenza fra questi due  $\tau$  è semplicemente dovuta alla normale incertezza di misura relativa alla determinazione dei tempi di vita e non alla presenza di nuovo complesso coordinato sull'avidina. Quindi il primo tempo di vita è stato misurato sull'aggiunta dove il complesso **12** aveva saturato tutta l'avidina.

Mentre il confronto fra i  $\tau$  appena citati e quelli misurati sugli esperimenti di controllo pari a 512 ns (solo buffer) e a 603 ns (avidina saturata), conferma le considerazioni relative alla titolazione con complesso **11**, valide anche per questa prova.

### 3.4 Sintesi e caratterizzazione dei complessi *Re-L1(CO)<sub>3</sub>Br* (**13**) e *Re-L2(CO)<sub>3</sub>Br* (**14**)

Avendo a disposizione i leganti **L1** e **L2** si sono preparati i corrispondenti complessi di Re(I), perché anche derivati di questo metallo presentano buone caratteristiche fotofisiche e sono ampiamente impiegati come sonde luminescenti per i target biologici. La via di sintesi dei composti generali *fac*-*Re*(CO)<sub>3</sub>LX, X = Cl, Br, è nota in letteratura e prevede il riscaldamento a riflusso in toluene del legante desiderato con *Re*(CO)<sub>5</sub>Br.<sup>56</sup> Seguendo questa procedura sono stati ottenuti i complessi **13** e **14** (Schema 16).



Schema 16

Il complesso **13**, un solido verdastro, è stato ottenuto con una resa del 80% ed è stato caratterizzato via NMR con spettri al protone e al carbonio e spettri bidimensionali COSY e HSQC.

Rispetto allo spettro <sup>1</sup>H del legante **L1** il pattern caratteristico dei segnali aromatici viene alterato dalla presenza del renio (Figura 10 e Figura 21); lo spettro al carbonio fornisce una conferma di questa differenza, perché i segnali di CH correlabili con il piridin-triazolo si spostano a chemical shift più alti, (Figura 11 e Figura 22). Un'ulteriore prova della formazione del complesso viene fornita dai tre segnali in più comparsi nella zona carbonilica dello spettro al carbonio a 197.2, 195.7 e 188.6 ppm, che rappresentano i -CO sul metallo.

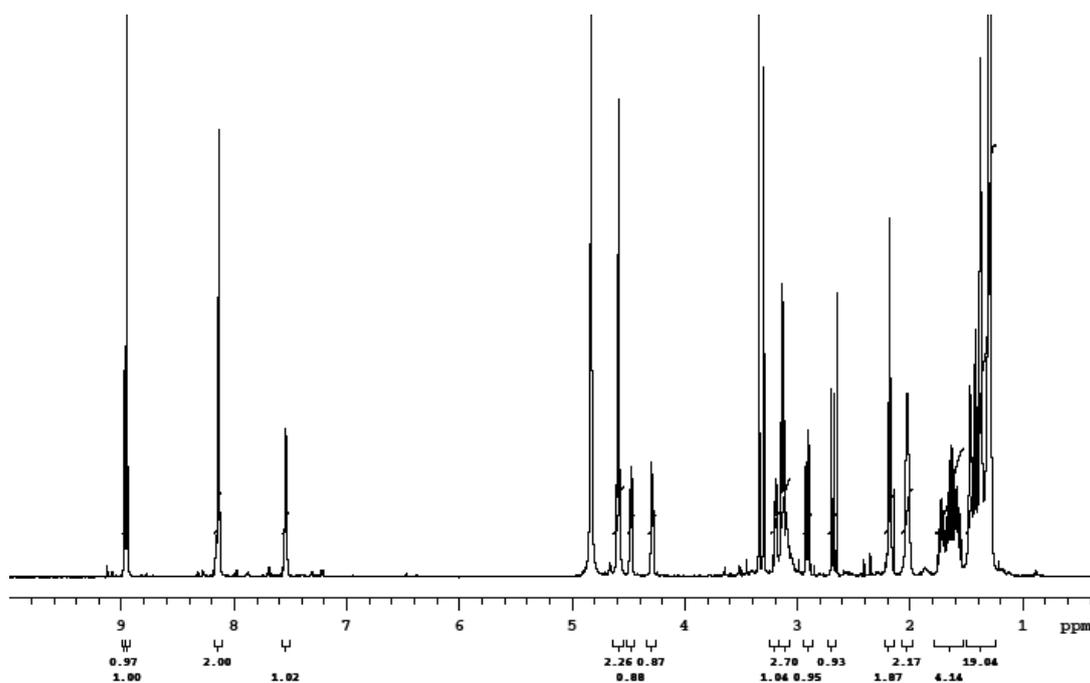


Figura 21: Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto  $\text{Re-L1}(\text{CO})_3\text{Br}$  in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

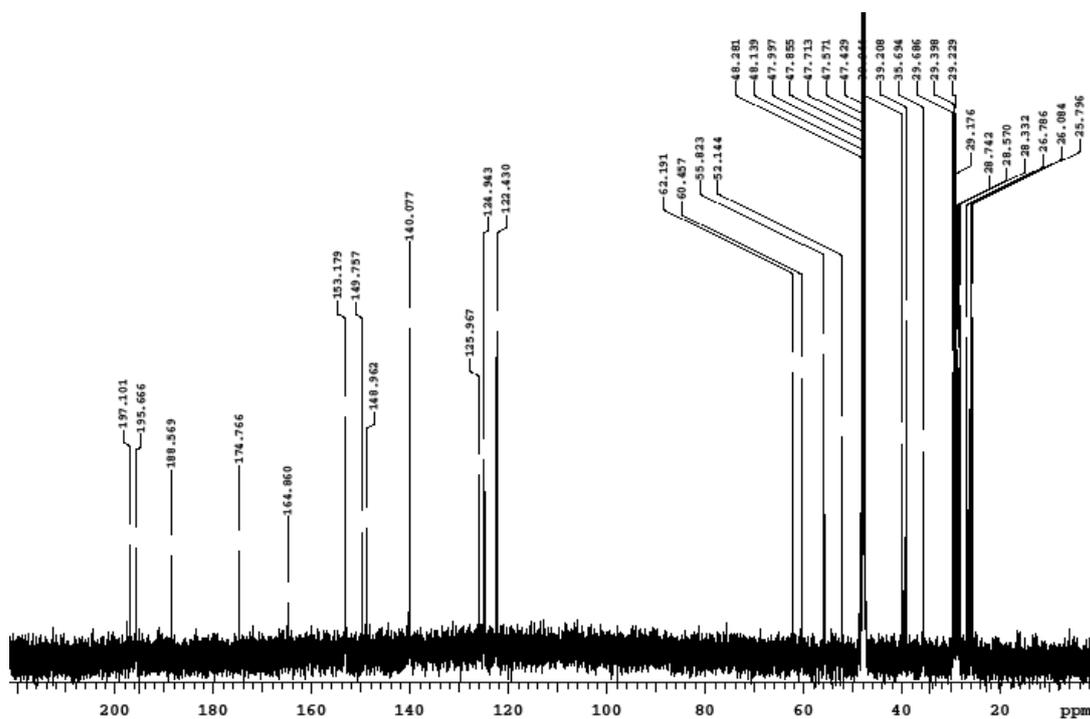
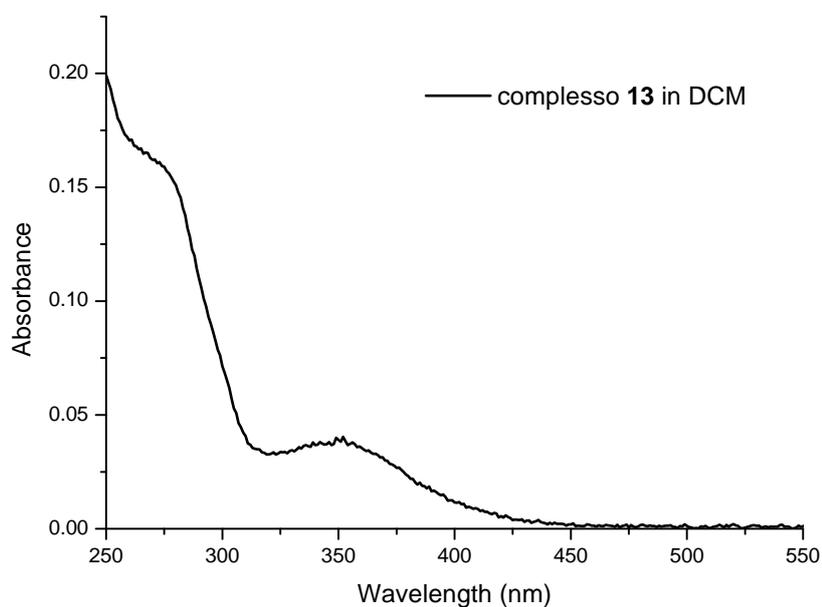


Figura 22: Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  del composto  $\text{Re-L1}(\text{CO})_3\text{Br}$  in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

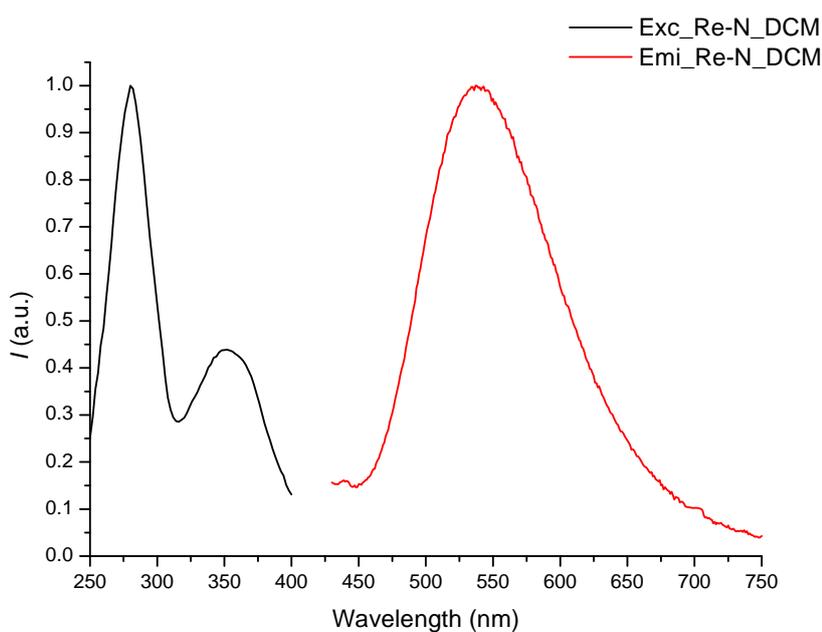
Lo spettro di assorbimento del complesso in diclorometano presenta due bande ben evidenti con massimi a 237 e 352 nm e d una spalla a 274 nm, come riportato nella Figura 23. Lo spettro di emissione in diclorometano è stato ottenuto eccitando la

soluzione di complesso a 350 nm e mostra un'intensa banda di emissione molto allargata con un massimo a 543 nm, che presenta un tempo di vita di 0.5  $\mu$ s.

Il complesso **13** presenta una resa quantica percentuale pari al 4.8% in diclorometano utilizzando come riferimento il complesso Ru(bpy)<sub>2</sub> in acqua.



**Figura 23:** Spettro di assorbimento UV-Vis del complesso  $Re-L1(CO)_3Br(13)$  in  $CH_2Cl_2$ .



**Figura 24:** Spettro di emissione ed eccitazione del complesso  $Re-L1(CO)_3Br(13)$  in  $CH_2Cl_2$ .

Le proprietà fotofisiche del complesso **13** sono state misurate anche in soluzione acquosa di tampone fosfato 50 mM (pH = 7.4).

Lo spettro di assorbimento e di emissione non presentano significative variazioni rispetto a quelli in solvente organico. Tuttavia nello spettro di emissione si osserva un lieve spostamento ipsocromico del massimo da 543 a 520 nm. Le variazioni fra le misure in acqua ed in solvente organico sono meno accentuate rispetto alle differenze osservate sulle misure dei complessi **11** e **12**, quindi è possibile dedurre che le proprietà fotofisiche di **13** risentono meno della polarità del mezzo.

Il complesso **14** è stato ottenuto con una resa del 48 % e si presenta come un solido di colore verde marroncino.

Dalla caratterizzazione  $^{13}\text{C}$ -NMR è possibile dedurre la formazione del complesso **14** per la comparsa di tre segnali aggiuntivi a 197.8, 196.7 e 189.2 ppm assenti sullo spettro del legante **L2** che rappresentano i tre CO coordinati al Re. Ulteriore conferma viene dallo spettro al protone, più precisamente dal pattern assunto dai segnali imputabili al piridin-triazolo coordinato al metallo, già osservato nella caratterizzazione del complesso **13**.

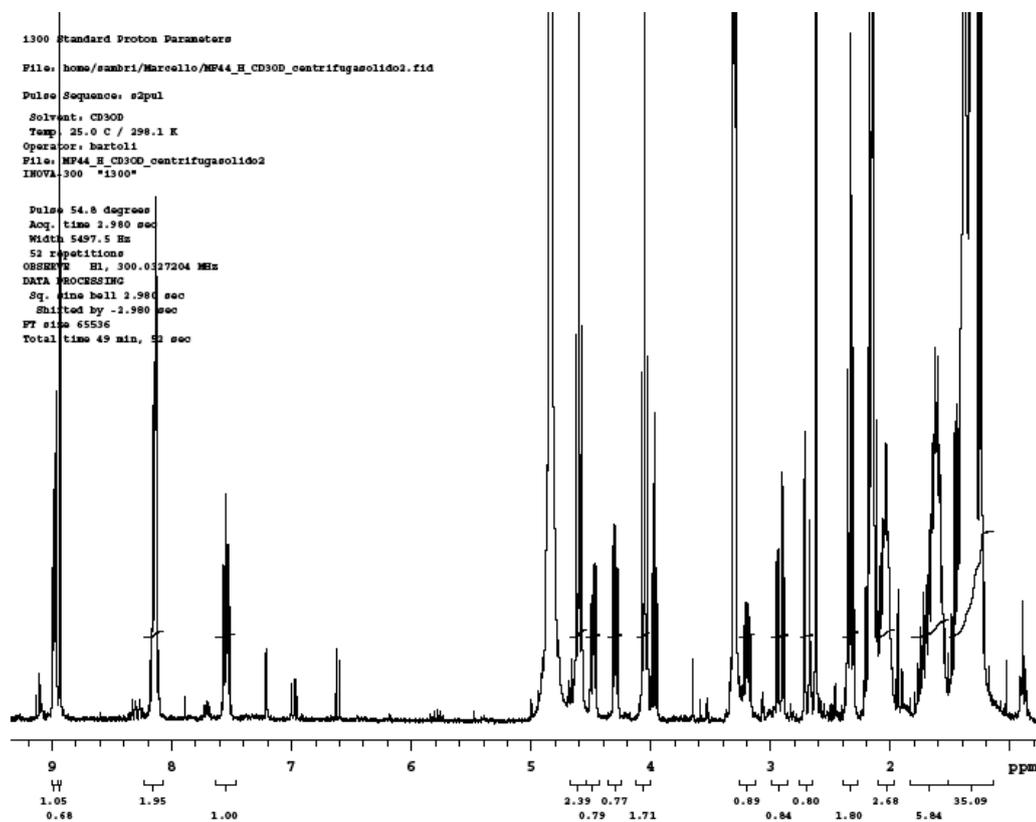
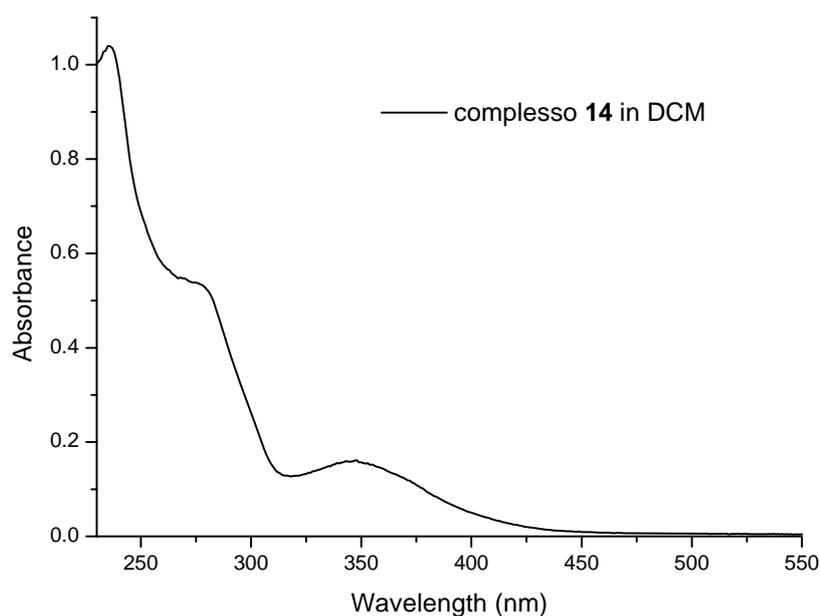


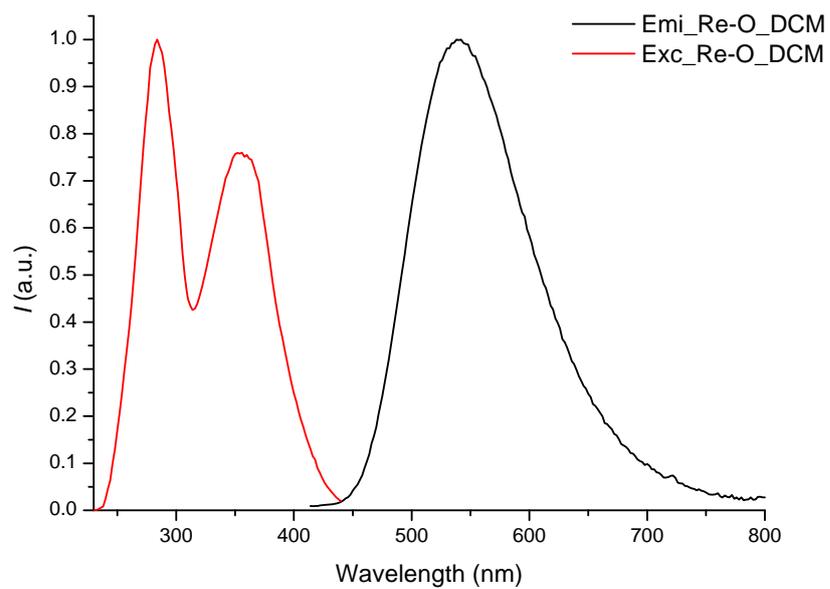
Figura 25: Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del composto  $\text{Re-L2}(\text{CO})_3\text{Br}$  in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Lo spettro di assorbimento del complesso **14** in diclorometano presenta due bande con massimi a 236 e 360 nm ed una spalla a 275 nm. Sono stati registrati due spettri di emissione, eccitando il complesso a entrambi i massimi di assorbimento. Entrambi gli spettri presentano una larga banda di emissione con un massimo a 540 nm, però quello acquisito eccitando a 236 nm presenta una maggiore intensità. Questa emissione mostra un tempo di vita pari a 139.9 ns.

Il complesso presenta una resa quantica percentuale pari a 3.4% misurata utilizzando come riferimento la Rodamina 101 in etanolo. Per esaltare la fosforescenza del complesso anche in questo caso le misure sono state ripetute su una soluzione di  $\text{Re-L2}(\text{CO})_3\text{Br}$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  degasata con Ar. Gli spettri di emissione mantengono un andamento del tutto analogo alle prove precedenti, tuttavia il complesso presenta un tempo di vita e una resa quantica percentuale aumentata di circa tre volte ( $\tau = 534$  ns e  $\text{QY} = 14.9\%$ ). Congelando la soluzione del complesso in analisi a 77 °K, il campione presenta un decadimento biesponenziale descritta da due tempi di vita pari a 9.61  $\mu\text{s}$  per il 86% e 2.25  $\mu\text{s}$  per il 14%.



**Figura 26:** Spettro di assorbimento UV-Vis del complesso  $\text{Re-L2}(\text{CO})_3\text{Br}$  (**14**) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



**Figura 27:** Spettro di emissione ed eccitazione del complesso  $\text{Re-L2}(\text{CO})_3\text{Br}$  (**14**) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

### ***3.5 Interazione avidina complesso Re-L1(CO)<sub>3</sub>Br***

Secondo un approccio del tutto analogo a quello usato per i complessi di Ir(III), è stata studiata l'interazione tra i complessi di Re(I) e l'avidina.

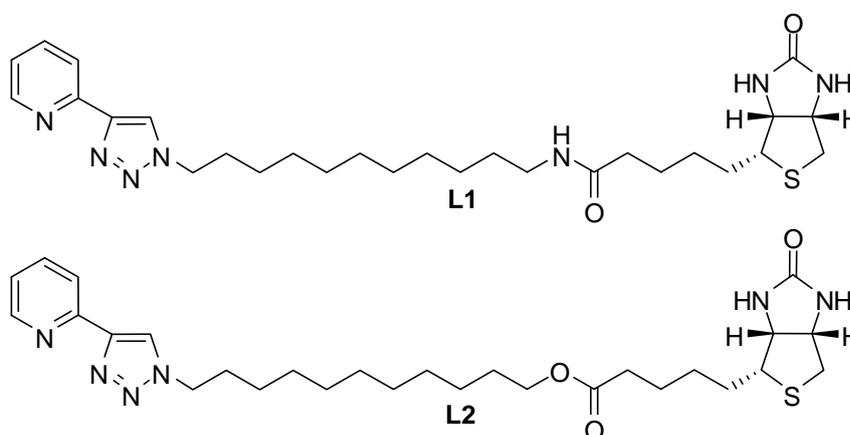
In questo caso però sono state riscontrate notevoli difficoltà a causa scarsa solubilità dei complessi neutri di Re(I) **13** e **14** nel tampone fosfato. Per cercare di preparare una soluzione titolante omogenea, il complesso **13** è stato sciolto nella minima quantità di DMSO (circa 1 ml) poi portato ad un volume di 25 ml con tampone fosfato. Però per restare in linea con la quantità di materia titolante dei precedenti esperimenti siamo stati costretti ad utilizzare aliquote da 25  $\mu$ L. Gli spettri delle varie aggiunte sono stati acquisiti eccitando il complesso a 372 nm.

In questo esperimento durante le aggiunte gli spettri di emissione mostrano un comportamento particolare. Durante la somministrazione delle aliquote iniziali di titolante si osserva un aumento di intensità, superiore a quella negli esperimenti di controllo, ma non costante ed incoerente con il numero di aggiunte. Inoltre negli spettri di queste aggiunte si osserva uno spostamento del massimo di emissione, verso lunghezze d'onda più alte. Il motivo di questo comportamento potrebbe risiedere nel tipo di struttura che questo complesso presenta. Il legante a causa delle coordinazione con l'avidina, potrebbe alterare i livelli degli orbitali molecolari causando variazioni nel gap fra HOMO e LUMO. Un'ulteriore causa potrebbe essere imputabile al bromo presente nella sfera di coordinazione, il legame metallo bromo per sua natura è molto labile e suscettibile di sostituzione, quindi il doppietto elettronico presente sul DMSO, utilizzato per cercare di sciogliere il complesso, potrebbe sostituire il bromo nella sfera di coordinazione alterando "l'energy gap" e quindi la posizione del massimo di emissione. Allo stadio attuale non è quindi possibile trarre conclusioni definitive, e saranno necessari studi più approfonditi per determinare il comportamento dei complessi di Renio **13** e **14** nei confronti dell'avidina.

## 4. CONCLUSIONI

Durante questo periodo di tesi è stato possibile sintetizzare e caratterizzare una nuova classe di complessi di iridio e renio utilizzabili come possibili sonde luminescenti grazie alla presenza di un'unità biotinica su un legante capace di coniugare l'avidina, una proteina caratteristica dell'albumina d'uovo.

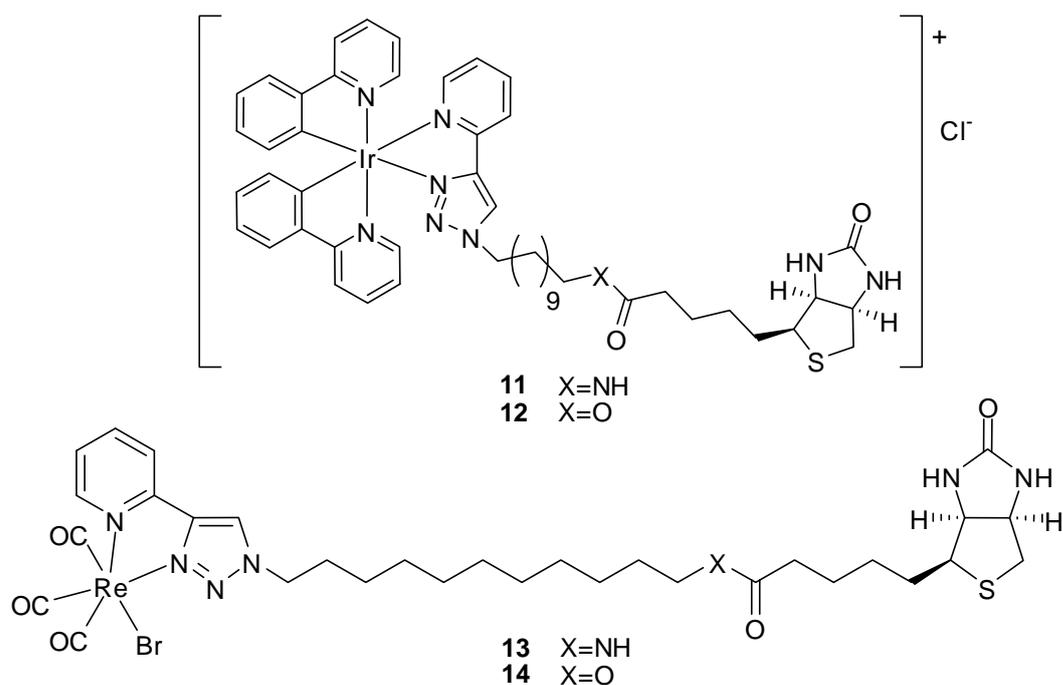
Durante la prima parte del mio lavoro è stato messo a punto un metodo di sintesi dei leganti piridin triazolici **L1** (5-((3aS,4S,6aR)-2-ossa-esaidro-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-il)-N-(11-(4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)undecil)-pentanammide) e **L2** ((11-(4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)undecil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-ossa-esaidro-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato), riportati in Figura 28.



*Figura 28: Leganti piridin-triazolici L1 ed L2.*

L'ammide **L1** e l'estere **L2** sono stati utilizzati come leganti di Ir (III) e Re (I) facendoli reagire con  $\text{Ir}_2(\text{bpy})_4\text{Cl}_2$  e  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ , per formare nuovi complessi esacoordinati **11**, **12**, **13** e **14** riportati nella seguente Figura 29.

I leganti **L1** e **L2** sono stati efficacemente coordinati ai metalli, ottenendo quattro complessi, che sono stati completamente caratterizzati mediante spettroscopia NMR (mono e bidimensionale) e massa.



**Figura 29:** Struttura dei complessi di Ir (III) e Re (I) con leganti piridin triazolici.

Le caratterizzazioni fotofisiche dei complessi sintetizzati sono state fatte sia in solvente organico che in soluzione acquosa. I complessi di Ir (III) **11** e **12** mostrano in diclorometano un'intensa emissione verde-azzurra con due massimi a 476 e 508 nm e presentano in soluzione degasata alte rese quantiche pari a 13.8 % (**11**) e 60.3 % (**12**). In soluzione acquosa si riscontra un aumento del tempo di vita per entrambi i complessi da circa 150 ns a più di 500 ns e questa variazione dimostra il legame fra le proprietà emissive di questi sistemi e la polarità del mezzo.

I complessi di Re (I) **13** e **14** presentano un'emissione sul verde-giallo con massimo a 540 nm ed un tempo di vita pari a 0.5  $\mu$ s. In soluzione acquosa non sono state riscontrate grandi variazioni delle proprietà fotofisiche, come nel caso dell'iridio, a parte un lieve spostamento ipsocromico del massimo di emissione da 543 a 520 nm, perciò questi complessi risentono meno della polarità del solvente in cui sono sciolti.

Il comportamento dei complessi di iridio in presenza di avidina rappresenta il risultato più importante ottenuto durante il mio lavoro di tesi. I complessi **11** e **12** in presenza di avidina mostrano un notevole incremento dell'intensità di emissione oltre a manifestare tempi di vita superiori a quelli misurati durante la caratterizzazione fotofisiche. Dalle misure è possibile evidenziare un punto comune: quando la concentrazione del titolante è circa quattro volte quella dell'avidina, la retta di titolazione cambia pendenza, che

diventa analoga a quella ricavata dalle prove in assenza della proteina. Ciò permette di concludere che sono necessari quattro equivalenti di complesso di Iridio per arrivare a saturare l'avidina.

Nonostante il complesso **13** non presenti una elevata solubilità in soluzione acquosa, solvente in cui vengono effettuate le misure delle proprietà emissive in presenza di avidina, è comunque stato possibile ottenere dei risultati parziali da cui è possibile dedurre che questo sistema organometallico riesce a interagire con la proteina bersaglio. Purtroppo a causa della bassa solubilità di **13** in soluzione acquosa non è possibile ottenere soluzioni a concentrazione nota e quindi non è stato possibile definire con precisione il comportamento di questo complesso nei confronti dell'avidina.

Per quel che riguarda le prospettive future di questo studio, si potranno sintetizzare leganti piridin triazolici differenti, con il ponte di collegamento fra il gruppo responsabile della chelazione e la biotina di tipo aromatico invece che alifatico, per cercare di valutare l'impatto della rigidità del sistema sulla coordinazione all'avidina.

Ulteriori studi saranno focalizzati sulla sintesi e la caratterizzazione di una nuova classe di complessi cationici luminescenti a base di renio, con lo scopo di migliorare la solubilità di queste molecole in soluzione acquosa, per meglio definirne il comportamento in presenza dell'avidina.

Questo sarà possibile facendo reagire i complessi ottenuti con derivati azotati che potranno sostituire il  $\text{Br}^-$  come legante del Re (I).



## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 Informazioni generali

Tutta la vetreria utilizzata per le reazioni sotto atmosfera inerte di azoto è stata lavata con acetone tecnico la sera prima, fatta asciugare in stufa ( $T = 70^{\circ}\text{C}$ ) e prima dell'uso è stata fatta raffreddare sotto costante flusso di  $\text{N}_2$ .

Tutti i solventi impiegati sia anidri che convenzionali sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

Il  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}^{19}$  e il dimero di iridio<sup>49,50</sup> sono stati precedentemente preparati dai corrispondenti cloruri seguendo i metodi noti.

I reagenti Etilpiridina, piridina, Br-undecanolo, trifenil fosfina  $\text{PPh}_3$ , trietilammina  $\text{Et}_3\text{N}$ , tosilcloruro, sodio azide, ascorbato di sodio, N,N-idrossisuccimmide, N,N-Dicicloesancarbodimmide, biotina (Sigma Aldrich), e  $\text{SOCl}_2$  (Fluka) sono stati impiegati senza ulteriore purificazione, mentre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Fluka) prima dell'uso è stato seccato in stufa a  $100^{\circ}\text{C}$  per qualche giorno fino a fargli assumere l'aspetto di una polvere molto fine e senza grumi.

Tutte le reazioni sono state seguite attraverso spettroscopia NMR e i prodotti ottenuti sono stati caratterizzati tramite metodi spettroscopici (NMR e MASSA).

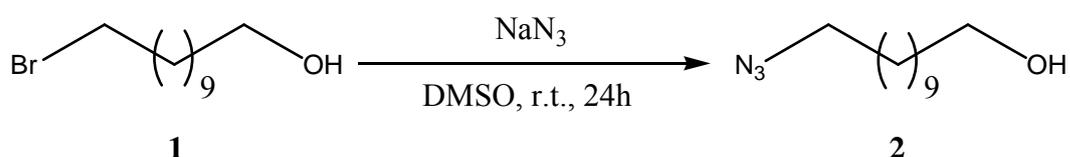
Gli spettri NMR sono stati registrati a 298 K impiegando gli strumenti Varian Gemini XL 300 ( $^1\text{H}$ , 300.1 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 75.5 MHz), Varian Mercury Plus VX 400 ( $^1\text{H}$ , 399.9 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100.6 MHz) e Varian Mercury Plus VX 600 ( $^1\text{H}$ , 599.9 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 150 MHz). I valori di Chemical Shift sono riportati in ppm: per gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR, si è ricorso, come standard interno, al tetrametilsilano (TMS) o alla risonanza del residuo protonico non deuterato del solvente ( $\text{CDCl}_3$ : 7.25 ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ : 4.78 ppm e 3.32 ppm; D6-DMSO: 2.51 ppm; D6-Acetone: 2.06 ppm); per gli spettri  $^{13}\text{C}$ -NMR, si è ricorso, come standard interno, alla risonanza del solvente ( $\text{CDCl}_3$ : 77.0 ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$ : 49.2 ppm, D6-DMSO: 39.5 ppm, D6-Acetone: 206.7 ppm, 29.9 ppm).

Gli spettri ESI-MS sono stati eseguiti per diretta iniezione di soluzioni di metanolo dei complessi metallici usando uno spettrometro WATERS ZQ 4000, i campioni sono stati iniettati con un flusso di  $40 \mu\text{L}/\text{min}$ .

Tutti gli spettri di assorbimento UV/Vis sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro Varian Cary 4 a doppio raggio con correzione di linea di fondo. Tutti

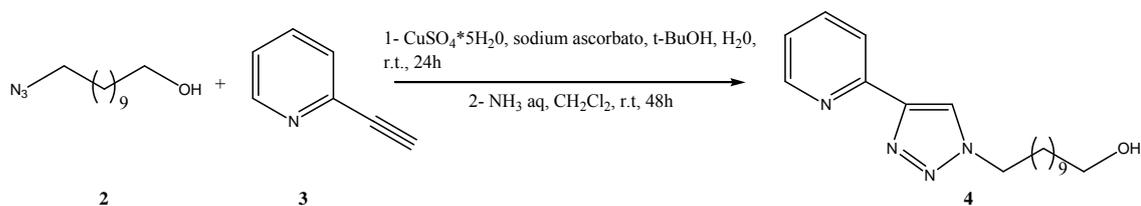
gli spettri di emissione, i tempi di vita e le rese quantiche dei complessi prodotti sono state misurate utilizzando un spettrofluorimetro Edimburgh FLSP920. Tutte le rese quantiche di luminescenza dei complessi sono state determinate utilizzando il riferimento di Rodamina 101 in soluzione di etanolo ( $\Phi = 1$ ) ad eccezione del prodotto  $\text{Re-L2}(\text{CO})_3\text{Br}$  che è stata misurata contro il riferimento di  $\text{Ru}(\text{bpy})_3$  in soluzione di acquosa ( $\Phi = 0.028$ ).

## 5.2 Sintesi di 11-azido-undecan-1-olo.(2)



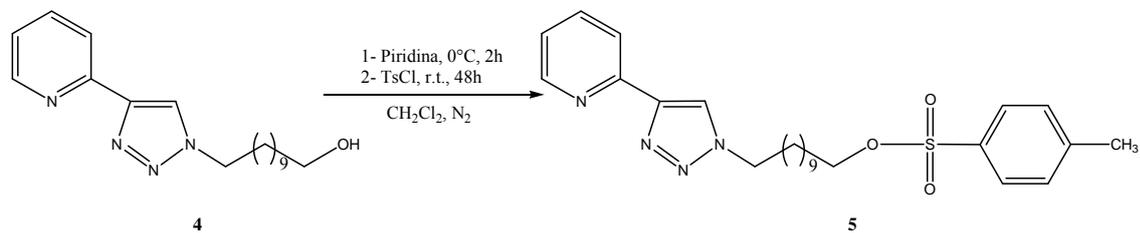
L' 11-bromo-undecanolo (0.75 g, 3.0 mmol) e la sodio azide (0.39 g, 6.0 mmol) sono stati sciolti in 10 ml di dimetilsolfossido. Questa miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Concluso questo periodo di reazione alla miscela sono stati aggiunti 15 ml di acqua distillata e 15 ml di etilacetato. La miscela bifasica risultante è stata separata e la fase acquosa estratta con etilacetato (3 x 10 ml). Le fasi organiche sono state riunite, anidificate con  $\text{MgSO}_4$  e portate a secco al rotavapor. Il prodotto si presentava come un olio di colore marroncino, puro all'analisi NMR: non è stata necessaria una purificazione ed è stato ottenuto con una resa del 98%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  3.58 (dt,  $J_{\text{T}} = 6.5$  Hz,  $J_{\text{D}} = 1.4$  Hz, 2H), 3.22 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.62 - 1.47 (m, 4H), 1.39 - 1.21 (m, 14H).

### 5.3 Sintesi di 11-(4-Piridin-2-il[1,2,3]triazol-1-il)-undecan-1-olo (4)



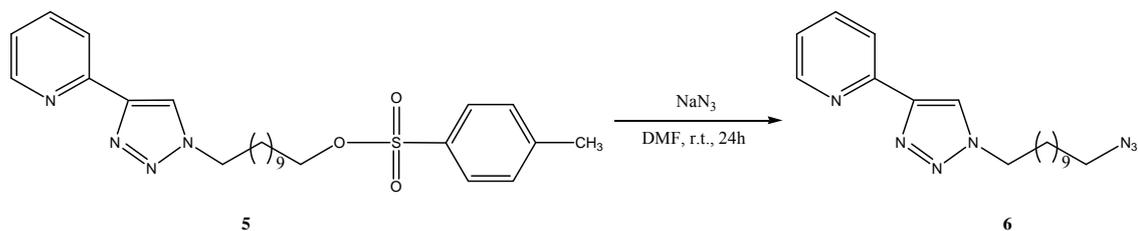
Il composto **2** viene sciolto in 20 ml di una miscela di  $t\text{-BuOH}$  e acqua (1 : 1). La soluzione risultante viene trattata con rame solfato pentaidrato (0.30 g, 1.2 mmol), 2-etinilpiridina (**3**) (0.45 g, 4.4 mmol) e ascorbato di sodio (86 mg, 0.4 mmol). Questa miscela di reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Dopo questo tempo il solvente è stato evaporato in vuoto e il solido ottenuto è stato sciolto in 35 ml di diclorometano e 35 ml di una soluzione acquosa di ammoniaca al 33%. La miscela bifasica ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 48 h. Concluso questo periodo la fase acquosa è stata separata ed estratta con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 ml). Le fasi organiche sono state riunite, anidificate con  $\text{MgSO}_4$  e portate a secco in vuoto. Il residuo è stato purificato per cromatografia su colonna di silice utilizzando all'inizio una miscela etilacetato/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  = 6 / 4 e poi una metanolo/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  = 1 / 9. Il prodotto si presenta come un solido giallino, che presenta un punto di fusione tra 99 e 100°C, ed è stato ottenuto con una resa del 85%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.57 (dq,  $J_D = 5.0$  Hz,  $J_Q = 0.9$  Hz, 1H), 8.19 (dt,  $J_D = 8.0$  Hz,  $J_T = 1.13$  Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.78 (td,  $J_T = 7.7$  Hz,  $J_D = 1.9$  Hz, 1H), 7.23 (ddd,  $J = 6.1$  Hz,  $J = 4.9$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 4.41 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.68 - 3.60 (m, 2H), 2.01 - 1.90 (m, 2H), 1.60 - 1.50 (m, 2H), 1.40 - 1.22 (m, 14H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz)  $\delta$  150.6 (C), 149.5 (CH), 148.4 (C), 137.2 (CH), 123.0 (CH), 122.1 (CH), 120.5 (CH), 63.1 ( $\text{CH}_2$ ), 50.7 ( $\text{CH}_2$ ), 33.0 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.50 ( $\text{CH}_2$ ), 29.48 ( $\text{CH}_2$ ), 29.42 ( $\text{CH}_2$ ), 29.08 ( $\text{CH}_2$ ), 26.6 ( $\text{CH}_2$ ), 25.9 ( $\text{CH}_2$ ).

#### 5.4 Sintesi di 11-[4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3triazol-1-il]-undecil 4metil benzen solfonato (5)



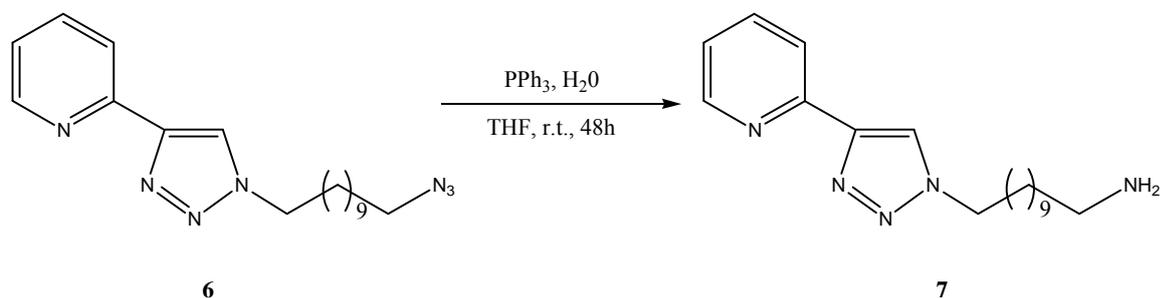
Il composto **4** (0.40 g, 1.27 mmol) è stato sciolto in 15 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. La soluzione ottenuta è stata trattata con 150  $\mu$ L di piridina (1.90 mmol) a 0°C sotto atmosfera di azoto e lasciata in agitazione per 2 ore. Concluso questo periodo alla miscela di reazione è stato aggiunto il tosilcloruro (0.72 g, 3.80 mmol). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 48 ore mantenendo l'atmosfera inerte con azoto. Al termine di questo periodo il diclorometano è stato evaporato in vuoto e il residuo è stato purificato per cromatografia su colonna di silice utilizzando inizialmente una miscela etilacetato/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1 / 1 e poi una metanolo/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1 / 9. Il prodotto si presenta come un solido giallo arancione ed è stato ottenuto con una resa del 84%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  8.57 (dq, J<sub>D</sub> = 4.9 Hz, J<sub>Q</sub> = 0.9 Hz, 1H), 8.18 (dt, J<sub>D</sub> = 8.0 Hz, J<sub>T</sub> = 1.0 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.81 - 7.74 (m, 3H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.22 (ddd, J = 7.5 Hz, J = 4.9 Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 4.41 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.00 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.00 - 1.88 (m, 2H), 1.67 - 1.56 (m, 2H), 1.44 - 1.13 (m, 14H).

### 5.5 Sintesi di 11-[4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3triazol-1-il]-undec-1-azide (6)



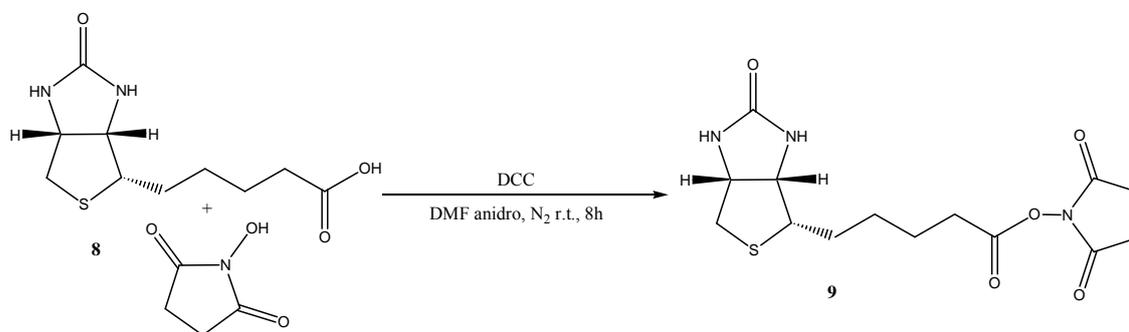
Il  $\text{NaN}_3$  (0.21 g, 3.19 mmol) e il composto **5** (0.50 g, 1.07 mmol) sono stati sciolti in 15 ml di dimetilformammide. La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Al termine di questo periodo la DMF è stata eliminata in vuoto, portando la miscela alla temperatura di  $40^\circ\text{C}$  per favorirne l'evaporazione. Il residuo è stato sciolto in 40 ml di etilacetato e acqua = 1 / 1, la miscela bifasica risultante è stata separata e la fase acquosa è stata estratta con etilacetato (3 x 10 ml). Le fasi organiche sono state riunite, anidificate con  $\text{MgSO}_4$  ed evaporate in depressione. Il solido ottenuto si presenta di colore giallo ed è stato ottenuto con una resa del 98%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.57 (dq,  $J_D = 4.8$  Hz,  $J_Q = 0.9$  Hz, 1H), 8.18 (dt,  $J_D = 7.9$  Hz,  $J_T = 1.1$  Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.77 (td,  $J_T = 7.8$  Hz,  $J_D = 1.8$  Hz, 1H), 7.22 (ddd,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 4.9$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 4.41 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.24 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.01 - 1.87 (m, 2H), 1.64 - 1.51 (m, 2H), 1.42-1.19 (m, 14H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz)  $\delta$  150.6 (C), 149.6 (CH), 148.5 (CH), 137.1 (CH), 123.0 (CH), 122.0 (CH), 120.4 (CH), 51.6 ( $\text{CH}_2$ ), 50.7 ( $\text{CH}_2$ ), 30.40 ( $\text{CH}_2$ ), 29.56 ( $\text{CH}_2$ ), 29.52 ( $\text{CH}_2$ ), 29.47 ( $\text{CH}_2$ ), 29.26 ( $\text{CH}_2$ ), 29.13 ( $\text{CH}_2$ ), 29.00 ( $\text{CH}_2$ ), 26.86 ( $\text{CH}_2$ ), 26.60 ( $\text{CH}_2$ ).

## 5.6 Sintesi di 11-[4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3triazol-1-il]-undec-1-ammina (7)



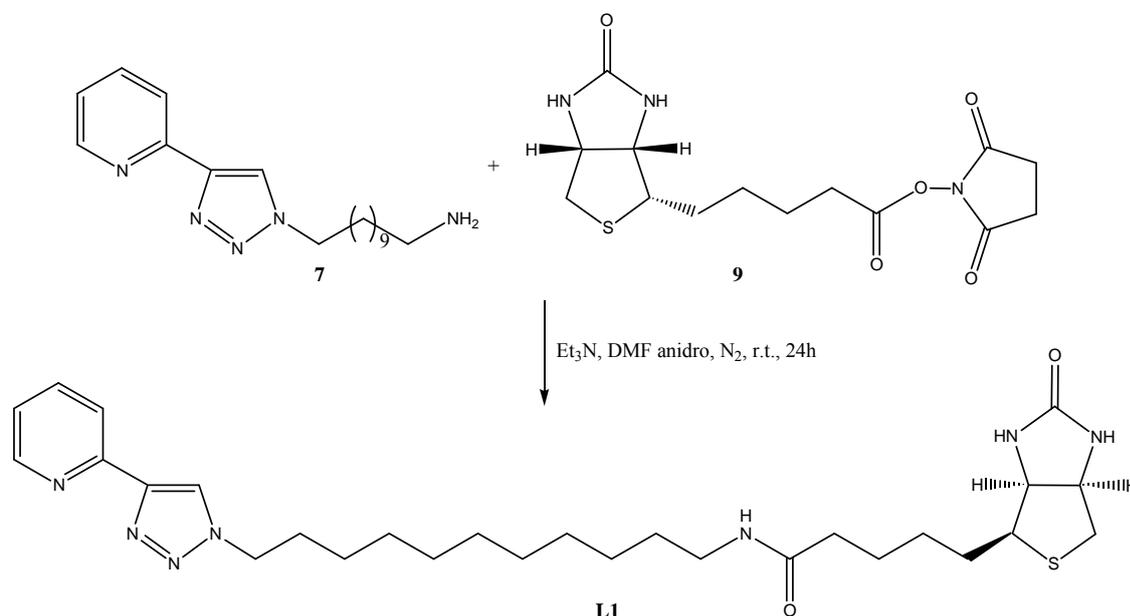
La trifenilfosfina (0.33 g, 1.26 mmol) e il composto **6** (0.36 g, 1.05 mmol) sono stati sciolti in 10 ml di THF. Alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O (2.7 mmol). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 48 ore. Concluso questo periodo il solvente è stato evaporato in vuoto e il residuo è stato purificato tramite cromatografia su colonna di silice utilizzando inizialmente una miscela etilacetato/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 6 / 4 poi una metanolo/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 2 / 8, ottenendo un solido di colore bianco giallo con una resa del 75%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  8.55 (dq, J<sub>D</sub> = 4.8 Hz, J<sub>Q</sub> = 0.8 Hz, 1H), 8.16 (dt, J<sub>D</sub> = 8.0 Hz, J<sub>T</sub> = 1.0 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.75 (td, J<sub>T</sub> = 7.7 Hz, J<sub>D</sub> = 1.9 Hz, 1H), 7.20 (ddd, J = 7.5 Hz, J = 4.9 Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 4.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.66 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.00 - 1.86 (m, 2H), 1.50 - 1.15 (m, 16H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz)  $\delta$  150.6 (C), 149.6 (CH), 148.5 (C), 137.1 (CH), 123.0 (CH), 122.0 (CH), 120.4 (CH), 64.3 (CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH<sub>2</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>), 33.6 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>).

### 5.7 Sintesi di 2,5-Diossopirrolidin-1-il 5-((3a*S*,4*S*,6a*S*)-2-ossa-esaidro-1*H*-tieno-[3,4-*d*]imidazol-4-il)-pentanoato (9)



La biotina **8** (0.20 g, 0.82 mmol), N,N-idrossisuccinimide (0.19 g, 1.64 mmol) e N,N-Dicicloesancarbodimmide (DCC) (0.33 g, 1.64 mmol) sono stati sciolti in 10 ml di DMF anidro sotto atmosfera inerte di azoto. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 8 ore. Terminato questo periodo il solvente è stato evaporato sotto vuoto. Il residuo è stato lavato più volte con metanolo per eliminare i reagenti di partenza fino a ottenere un solido bianco con una resa del 87%. <sup>1</sup>H NMR (DMSO d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 6.39 (bs, 1H), 6.34 (bs, 1H), 4.29 (dd, J = 7.7 Hz, J = 5.2 Hz, 1H), 4.16 - 4.10 (m, 1H), 3.15 - 3.04 (m, 1H), 2.86 - 2.77 (m, 5H), 2.65 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.56 (d, J = 12.4, 1H), 1.71 - 1.58 (m, 3H), 1.56 - 1.33 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO d<sub>6</sub>, 101 MHz) δ 170.9 (C), 169.6 (C), 163.3 (C), 61.7 (CH), 59.8 (CH), 55.9 (CH), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (CH<sub>2</sub>), 28.3 (CH<sub>2</sub>), 26.1 (CH<sub>2</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>). ESI - MS: 364 [M<sup>+</sup> + Na].

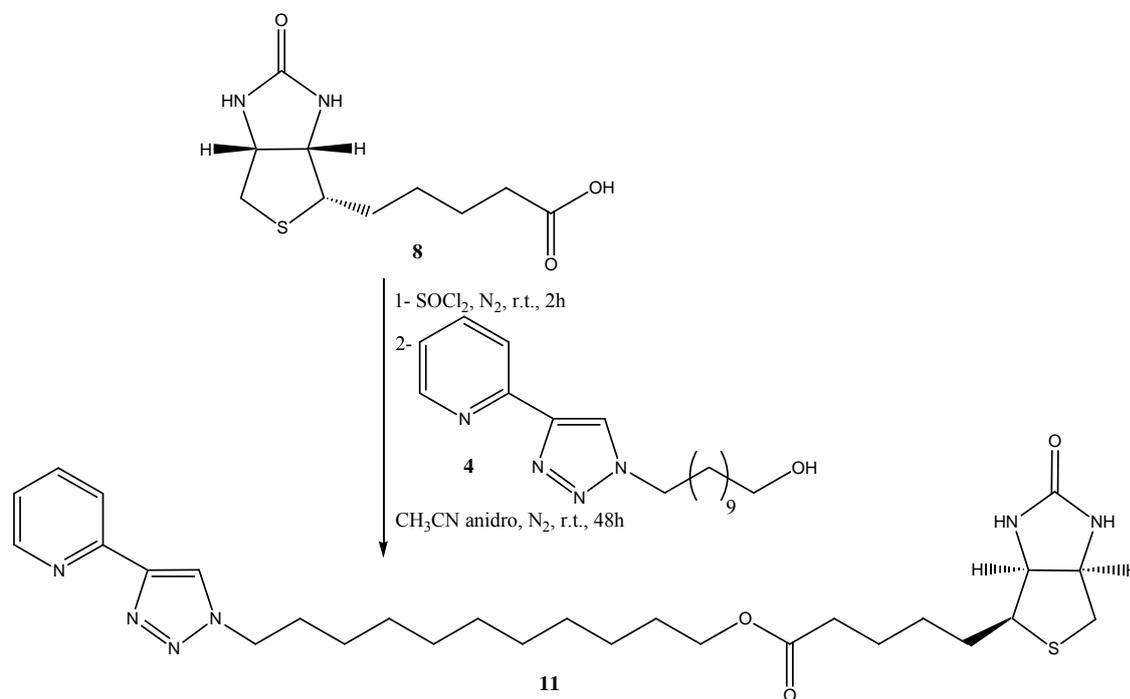
**5.8 Sintesi di L1 [5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-ossa-esaidro-1*H*-tieno-[3,4-*d*]imidazol-4-il)-*N*-(11-(4-(Piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)undecil)pentanammidel]**



Il composto **9** (0.21 g, 0.61 mmol) e il composto **7** (0.25 g, 0.79 mmol) sono stati sciolti in 10 ml di DMF anidro. La soluzione ottenuta è stata trattata con Et<sub>3</sub>N (250 μL, 1.83 mmol) e lasciata in agitazione a temperatura ambiente sotto azoto per 24 ore. Al termine di questo periodo la DMF è stata evaporata in vuoto portando la miscela a 40°C, per favorire l'evaporazione del solvente. Il residuo è stato lavato con etere etilico (3 x 15 ml). Per la purificazione, il grezzo ottenuto viene sciolto nel minimo volume di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e la soluzione ottenuta viene trattata con etere etilico (15 ml) per causare la precipitazione del solido prodotto che infine è stato separato per centrifugazione. Il prodotto è un solido di colore giallo verdino ed è stato ottenuto con una resa del 92%. <sup>1</sup>H NMR (DMSO d<sub>6</sub>, 300 MHz) δ 8.60 (s, 1H), 8.58 (dq, J<sub>D</sub> = 4.8 Hz, J<sub>Q</sub> = 0.9 Hz, 1H), 8.01 (dt, J<sub>D</sub> = 7.9 Hz, J<sub>T</sub> = 1.1 Hz, 1H), 7.87 (td, J<sub>T</sub> = 7.6 Hz, J<sub>D</sub> = 1.8 Hz, 1H), 7.69 (bt, J = 5.5 Hz, 1H), 7.32 (ddd, J = 7.6 Hz, J = 4.8 Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 6.39 (bs, 1H), 6.33 (bs, 1H), 4.40 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 4.28 (dd, J = 7.7 Hz, J = 5.3 Hz, 1H), 4.14 - 4.07 (m, 1H), 3.11 - 3.03 (m, 1H), 3.02 - 2.92 (m, 2H), 2.80 (dd, J = 12.2 Hz, J = 5.1 Hz, 1H), 2.56 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 2.02 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.91 - 1.79 (m, 2H), 1.66 - 1.12 (m, 23H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz) δ 173.1 (C), 163.4 (C), 150.6 (C), 149.6 (CH), 148.5 (C), 137.9 (CH), 124.0 (CH), 123.7 (CH), 120.3 (CH), 61.9 (CH), 60.3 (CH), 56.6 (CH), 50.3 (CH<sub>2</sub>), 41.3 (CH<sub>2</sub>), 39.7 (CH<sub>2</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.47 (CH<sub>2</sub>),

29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 28.3 (CH<sub>2</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>) . ESI - MS: 542 [M<sup>+</sup>], 564 [M<sup>+</sup> + Na].

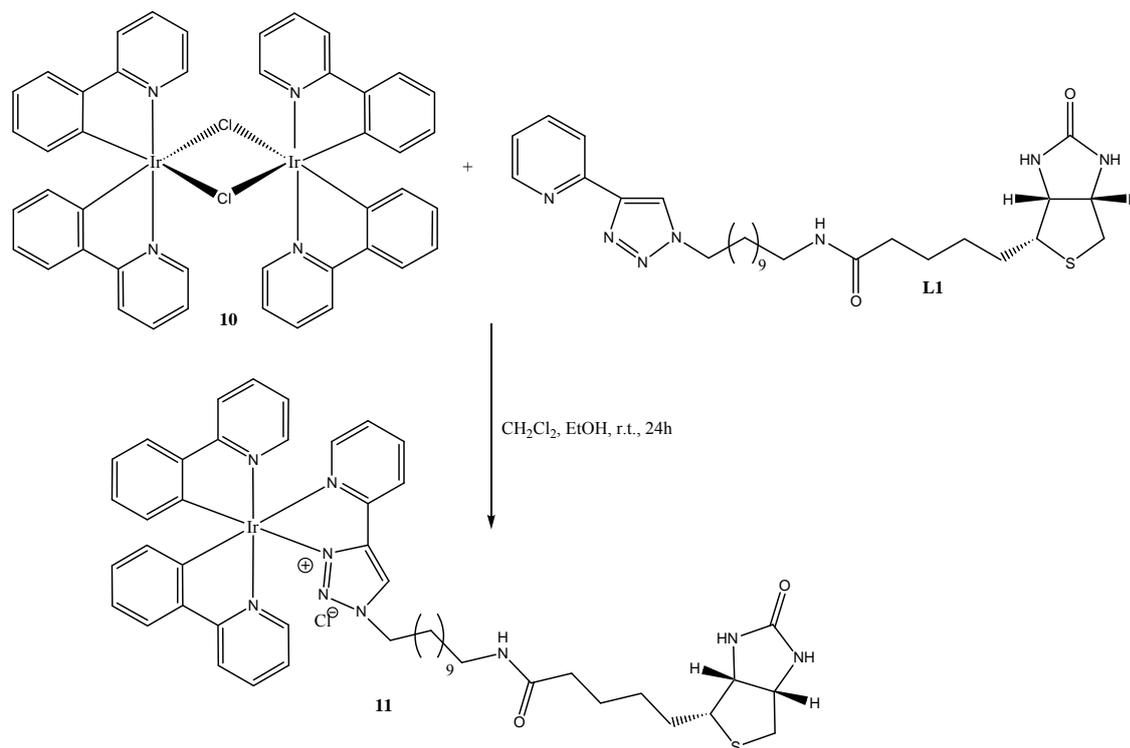
**5.9 Sintesi di L2 [(11-(4-(Piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)undecil)-5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-ossa-esaidro-1H-tieno-[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanoato]**



La biotina **8** (0.19 g, 0.76 mmol) è stata sciolta in  $\text{SOCl}_2$  (6 ml). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente sotto azoto per due ore. Al termine di questo periodo il tionilcloruro viene eliminato dall'ambiente di reazione in vuoto. L'olio bruno rimanente è stato sciolto in  $\text{CH}_3\text{CN}$  anidro (10 ml) e alla soluzione è stato aggiunto il composto **4** (0.12 g, 0.38 mmol) sciolto il  $\text{CH}_3\text{CN}$  (5 ml). Questa nuova miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente sotto atmosfera di azoto per 48 ore. Quindi il solvente è stato evaporato in vuoto e il residuo è stato sciolto in una miscela di etilacetato e una soluzione acquosa  $\text{NaHCO}_3$  satura (1 : 1). La miscela bifasica è stata separata e la fase acquosa è stata estratta con etilacetato (3 x 10 ml) e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 10 ml). Le fasi organiche sono state riunite, anidificate con  $\text{MgSO}_4$  ed il solvente è stato eliminato in vuoto. Il solido ottenuto è stato sciolto nel minimo volume di cloroformio e trattato con esano (30 ml). Questo causa la precipitazione del prodotto che è stato isolato per centrifugazione con una resa del 60%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.58 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 8.22 - 8.13 (m, 2H), 7.78 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.26 - 7.20 (m, 1H), 5.25 (bs, 1H), 5.09 (bs, 1H), 4.54 - 4.48 (m, 1H), 4.41 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 4.34 - 4.29 (m, 1H), 4.05 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 3.19 - 3.12 (m, 1H), 2.91 (dd,  $J = 12.9$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 2.73 (d,  $J =$

12.9 Hz, 1H), 2.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.00 -1.90 (m, 2H), 1.77 - 1.14 (m, 24H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz) δ 173.6 (C), 163.1 (C), 150.4 (C), 149.3 (C), 148.2 (CH), 137.0 (CH), 122.8 (CH), 121.9 (CH), 120.3 (CH), 64.5 (CH<sub>2</sub>), 61.9 (CH), 60.1 (CH), 55.3 (CH), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 33.9 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.35 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 28.31 (CH<sub>2</sub>), 28.26 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub>), 24.8 (CH<sub>2</sub>). ESI - MS: 543 [M<sup>+</sup>], 565 [M<sup>+</sup> + Na].

### 5.10 Sintesi di $[(ppy)_2Ir-L1][Cl]$ (**11**)



Il legante **L1** (5.0 mg , 0.1 mmol) è stato sciolto in 15 ml di una miscela costituita da  $CH_2Cl_2$  e etanolo (3 : 1). Alla soluzione ottenuta è stato aggiunto il complesso **11** (5.4 mg, 0.05 mmol), e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Concluso questo periodo il solvente è stato eliminato in vuoto e il residuo è stato sciolto nella minima quantità di  $CH_2Cl_2$  e trattato con etere etilico per causare la precipitazione del prodotto che viene isolato per filtrazione. Il prodotto si presenta come un solido di colore giallo ed è stato ottenuto con una resa del 60%. Il complesso **11** presenta un punto di fusione fra 229 e 230°C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  10.68 (s, 1H), 9.11 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.04 (td,  $J_T = 7.7$  Hz,  $J_D = 1.5$  Hz, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.80 -7.70 (m, 3H), 7.69 -7.62 (m, 3H), 7.47 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.23 - 7.18 (m, 1H), 7.06 - 6.83 (m, 6H), 6.49 (bt,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 6.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 5.78 (bs, 1H), 5.17 (bs, 1H), 4.53 - 4.39 (m, 3H), 4.36 - 4.30 (m, 1H), 3.28 - 3.11 (m, 3H), 2.90 (dd,  $J = 12.8$  Hz,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 2.75 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H), 2.31 -2.21 (m, 2H) 2.00 - 1.06 (m, 24H). ESI -MS: 1042 [ $M^+$ ]. I risultati delle misure fotofisiche relative a questo complesso sono state riassunte nella seguente tabella 1.

**Tabella 1: proprietà fotoluminescenti complesso 11;**

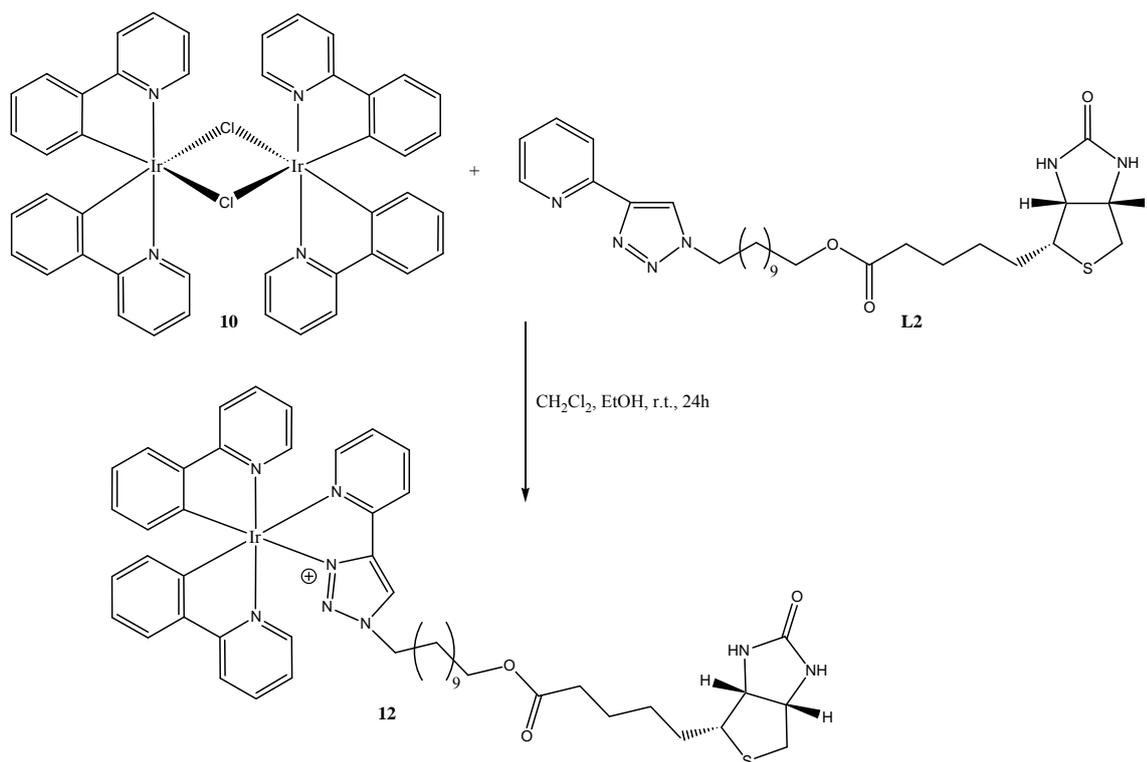
	$\lambda_{\text{ABS}} \text{ (nm)} : \epsilon$ $10^4(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm)	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ), air	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ), deair	$\Phi$ Air	$\Phi$ Deair	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm) 77 °K	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ) 77 °K
<b>11</b> DCM	255 (4.50), 381 (0.66)	476, 508	0.144 90% 0.055 10%	0.419	0.048	0.148	474, 506, 545 sh	4.160
<b>11</b> H <sub>2</sub> O	284, 375	478, 504	0.569	/	/	/	/	/

### **5.11 Titolazione avidina con il complesso [(ppy)<sub>2</sub>Ir-L1][Cl] (11)**

Un'aliquota di 0,2 ml di avidina in acqua (38  $\mu\text{M}$ ) è stata diluita in 1.8 ml di tampone fosfato pH = 7.4 (50 mM). Il complesso **11** (2.6 mg, 0.002 mmol) è stato sciolto in 0.5 ml di DMSO e 4.5 ml di tampone. La soluzione di avidina diluita in tampone fosfato (3.8  $\mu\text{M}$ ) è stata titolata con aggiunte successive da 10  $\mu\text{L}$  da complesso **11** in tampone fosfato (0.40 mM) a intervalli di due minuti. Le soluzioni sono state eccitate a 375 nm e le intensità di emissione sono state monitorate sul massimo di emissione a 504 nm. Infine al termine delle aggiunte è stato determinato il tempo di vita della soluzione risultante.

La procedura di titolazione viene ripetuta su una soluzione di solo tampone e su una di avidina (3.8  $\mu\text{M}$ ) saturata da biotina in tampone fosfato pH = 7.4 (0.475 mM).

## 5.12 Sintesi di $[(ppy)_2Ir-L2][Cl]$ (12)



Il legante L2 (18.3 mg , 0.034 mmol) è stato sciolto in 4 ml una miscela costituita da CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e etanolo (3 : 1). Alla soluzione ottenuta è stato aggiunto il complesso 10 (18.0 mg, 0.017 mmol), e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Concluso questo periodo il solvente è stato eliminato in vuoto e il residuo è stato sciolto nella minima quantità di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e trattato con etere etilico per causare la precipitazione del prodotto che viene isolato per decantazione. Il prodotto si presenta come un solido di colore giallo ed è stato ottenuto con una resa del 80%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 10.65 (s, 1H), 9.14 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.02 (t, J<sub>T</sub> = 7.0 Hz, 1H), 7.89 (d, J<sub>D</sub> = 8.0 Hz, 2H), 7.79 -7.60 (m, 6H), 7.46 (d, J<sub>D</sub> = 5.5 Hz, 1H), 7.19 (t, J<sub>T</sub> = 6.4 Hz, 1H), 7.06 - 6.72 (m, 6H), 6.30 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 5.53 (bs, 1H), 5.34 (bs, 1H), 4.54 - 4.36 (m, 3H), 4.33 - 4.26 (m, 1H), 4.05 (t, J<sub>T</sub> = 6.7 Hz, 2H), 3.18 - 3.09 (m, 1H), 2.88 (dd, J<sub>D</sub> = 12.6 Hz, J<sub>D</sub> = 4.7 Hz, 1H), 2.77 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.31 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.97 - 1.86 (m, 2H), 1.78 - 1.53 (m, 3H), 1.50 - 1.37 (m, 3H), 1.36 - 1.06 (m, 16H). I risultati delle misure fotofisiche relative a questo complesso sono state riassunte nella seguente tabella 2.

**Tabella 2: proprietà fotoluminescenti complesso 12;**

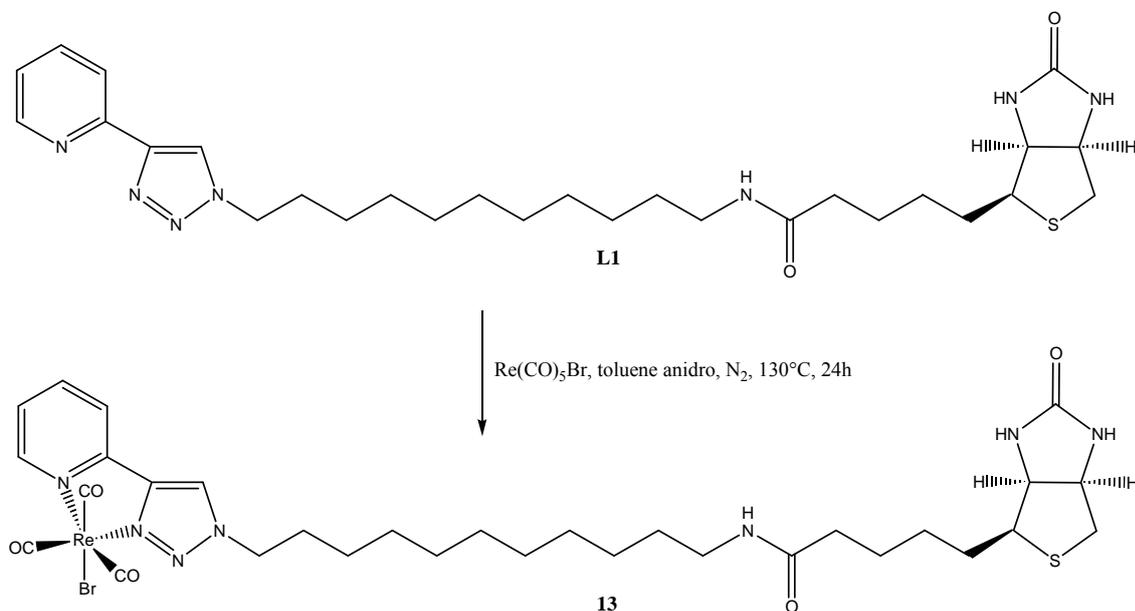
	$\lambda_{\text{ABS}} \text{ (nm)} : \epsilon$ $10^4(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm)	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ), air	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ), deair	$\Phi$ Air	$\Phi$ deair	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm) 77 °K	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ) 77 °K
<b>12</b> DCM	255 (4.51), 381 (0.55)	476, 508	0.148 97% 0.017 3%	1.1	0.064	0.603	470, 505, 532 sh	2.13 20% 4.90 80%
<b>12</b> H <sub>2</sub> O	268, 376	478, 508	0.591 97% 0.017 3%	/	/	/	/	/

### **5.13 Titolazione avidina con il complesso [(ppy)<sub>2</sub>Ir-L2][Cl] (12)**

Un'aliquota di 0,2 ml di avidina in acqua (38  $\mu\text{M}$ ) è stata portata ad un 2 ml con tampone fosfato pH = 7.4 (50 mM). Una soluzione titolante è stata preparata sciogliendo 3 mg di complesso **12** in 0.5 ml di DMSO e 4.5 ml di tampone. La soluzione di avidina diluita in tampone fosfato (3.8  $\mu\text{M}$ ) è stata titolata con aggiunte successive da 5  $\mu\text{L}$  da complesso **12** in tampone fosfato (0.56 mM) a intervalli di due minuti. Le soluzioni sono state eccitate a 375 nm e le intensità di emissione sono state monitorate sul massimo di emissione a 508 nm. Infine al termine delle aggiunte è stato determinato il tempo di vita della soluzione risultante.

La procedura di titolazione viene ripetuta su una soluzione di solo tampone e su una di avidina (3.8  $\mu\text{M}$ ) saturata da biotina in tampone fosfato pH = 7.4 (0.475 mM).

### 5.14 Sintesi di *Re-L1(CO)<sub>3</sub>Br* (**13**)



Il complesso di  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$  (0.117 g, 0.228 mmol) e il legante **L1** (0.120 g, 0.221 mmol) sono stati sciolti in toluene anidro (15 ml). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione alla temperatura di  $130^\circ\text{C}$  in atmosfera inerte di azoto per 24 ore. Alla fine di questo periodo si osserva la formazione di un precipitato che viene separato dalla soluzione di toluene per decantazione. Il precipitato è stato lavato con metanolo (3 x 15 ml). I lavaggi di metanolo sono stati riuniti e portati a secco in vuoto. Il residuo è stato sciolto nel minimo volume di acetone e trattato con etere etilico (20 ml). Questo causa la precipitazione del prodotto che viene isolato per centrifugazione con una resa del 80%. Il complesso **13** presenta un punto di fusione fra  $169$  e  $171^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz)  $\delta$  8.97 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.18 - 8.11 (m, 2H), 7.54 (td,  $J_{\text{T}} = 8.7$  Hz,  $J_{\text{D}} = 2.6$  Hz, 1H), 4.59 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 4.48 (dd,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.29 (dd,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 3.22 - 3.16 (m, 1H), 3.13 ( $J_{\text{T}} = 7.0$  Hz,  $J_{\text{D}} = 1.7$  Hz, 2H), 2.91 (dd,  $J = 12.8$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 2.69 (d,  $J = 12.7$  Hz, 1H), 2.18 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.06 - 1.98 (m, 2H), 1.76 - 1.25 (m, 25H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz)  $\delta$  197.2 (C), 195.7 (C), 188.6 (C), 174.8 (C), 164.9 (C), 153.2 (CH), 149.8 (C), 149.0 (C), 140.1 (CH), 126.0 (CH), 125.0 (CH), 122.5 (CH), 62.3 (CH), 60.5 (CH), 55.9 (CH), 52.2 (CH), 40.0 ( $\text{CH}_2$ ), 39.3 ( $\text{CH}_2$ ), 35.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.2 ( $\text{CH}_2$ ), 28.8 ( $\text{CH}_2$ ), 28.6 ( $\text{CH}_2$ ), 28.4 ( $\text{CH}_2$ ), 26.9 ( $\text{CH}_2$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$ ), 25.9 ( $\text{CH}_2$ ). ESI - MS: 892 [ $\text{M}^+$ ], 914

[M<sup>+</sup> + Na]. I risultati delle misure fotofisiche relative a questo complesso sono state riassunte nella seguente tabella 3.

**Tabella 3: proprietà fotoluminescenti complesso 13;**

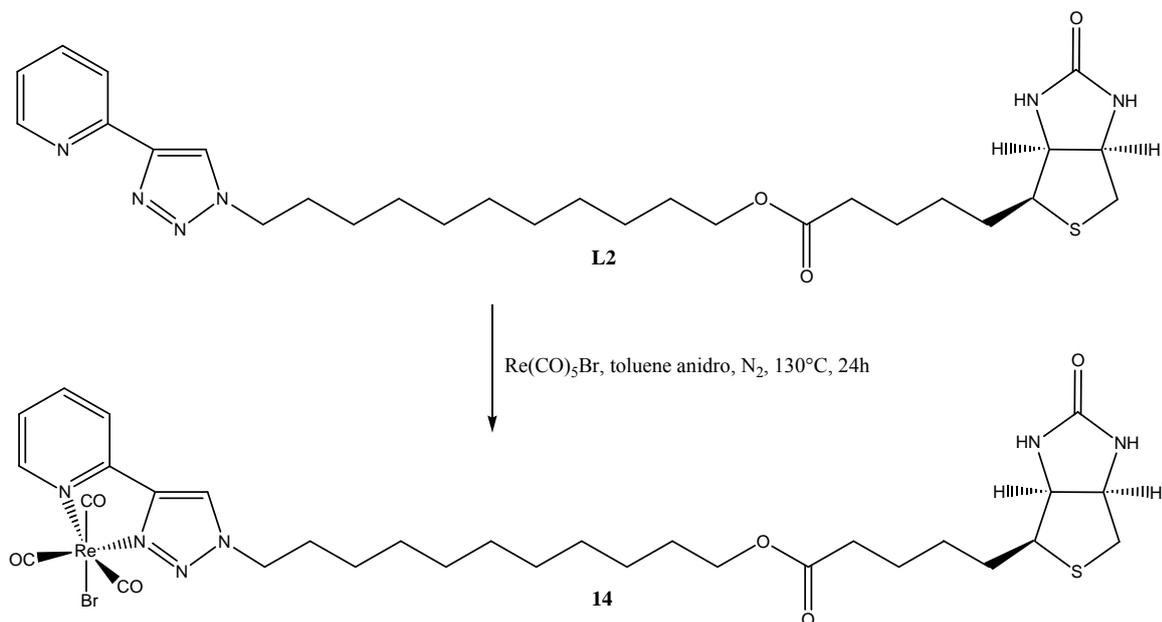
	$\lambda_{\text{ABS}}$ (nm) : $\epsilon \cdot 10^4$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm)	$\tau$ ( $\mu$ s), deair	$\Phi$ Air
<b>13</b> DCM	237 (1.72), 274 sh (1.25), 352 (0.26)	545	0.55	0.048
<b>13</b> H <sub>2</sub> O	280, 350	520	/	/

### **5.15 Titolazione avidina con il complesso *Re-L1(CO)<sub>3</sub>Br (13)***

0,2 ml di una soluzione di avidina in acqua (38  $\mu$ M) è stata portata ad un volume di 2 ml con tampone fosfato pH = 7.4 (50 mM). Il complesso **15** (2.4 mg) è stato sciolto in 1 ml di DMSO e 4 ml di tampone. Infine il titolante è stato ottenuto portando la soluzione di complesso **13** appena descritta ad un volume di 25 ml con tampone fosfato pH = 7.4 (50 mM). La soluzione di avidina diluita in tampone fosfato (3.8  $\mu$ M) è stata titolata con aggiunte successive da 25  $\mu$ L della soluzione diluita di complesso **13** in tampone fosfato (0.11 mM) a intervalli di due minuti. Le soluzioni sono state eccitate su 372 nm e le intensità di emissione sono state monitorate sul massimo di emissione a 520 nm.

La procedura di titolazione viene ripetuta su una soluzione di solo buffer e su una di avidina (3.8  $\mu$ M) saturata da biotina in tampone fosfato pH = 7.4 (0.475 mM).

## 5.16 Sintesi di *Re-L2(CO)<sub>3</sub>Br* (**14**)



Il legante **L2** (0.11 g, 0.20 mmol) e il complesso  $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$  (0.11 g, 0.26 mmol) sono stati sciolti in toluene anidro (15 ml). La miscela di reazione è stata lasciata a riflusso ( $T = 130^\circ\text{C}$ ) in atmosfera inerte di azoto per 24 ore. Concluso questo periodo il solvente è stato evaporato in vuoto. Il residuo è stato estratto con  $\text{CH}_3\text{OH}$  (3 x 20 ml). Le frazioni di metanolo sono state riunite ed evaporate e il residuo è stato sciolto nella minima quantità di acetone e trattato con etere etilico (20 ml) per causare la precipitazione del prodotto. Il prodotto è stato infine isolato dalla soluzione per centrifugazione con una resa del 48%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)  $\delta$  8.98 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.19 - 8.10 (m, 2H), 7.59 - 7.51 (m, 1H), 4.60 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 4.48 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.29 (dd,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.05 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 3.24 - 3.15 (m, 1H), 2.92 (dd,  $J = 12.6$  Hz,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 2.69 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H), 2.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.11 - 1.97 (m, 2H), 1.80 - 1.24 (m, 24H).  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone  $d_6$ , 101 MHz)  $\delta$  197.8 (C), 196.7 (C), 189.2 (C), 173.1 (C), 153.4 (CH), 149.7 (C), 148.9 (C), 140.4 (CH), 126.3 (CH), 125.4 (C), 125.3 (CH), 122.7 (CH), 64.0 ( $\text{CH}_2$ ), 62.0 (CH), 62.4 (CH), 52.3 ( $\text{CH}_2$ ), 40.4 ( $\text{CH}_2$ ), 33.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 28.9 ( $\text{CH}_2$ ), 28.8 ( $\text{CH}_2$ ), 28.7 ( $\text{CH}_2$ ), 28.6 ( $\text{CH}_2$ ), 26.3 ( $\text{CH}_2$ ), 26.0 ( $\text{CH}_2$ ), 25.1 ( $\text{CH}_2$ ). ESI - MS: 915 [ $\text{M}^+ + \text{Na}$ ]. I risultati delle misure fotofisiche relative a questo complesso sono state riassunte nella seguente tabella 4.

**Tabella 4: proprietà fotoluminescenti complesso 14;**

	$\lambda_{\text{ABS}}$ (nm)	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm)	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ), air	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ), deair	$\Phi$ Air	$\Phi$ deair	$\lambda_{\text{EM}}$ (nm) 77 °K	$\tau$ ( $\mu\text{s}$ ) 77 °K
<b>14</b> DCM	236, 275 sh, 348	540	0.140	0.533	0.034	0.149	496	2.245 14% 9.607 86%



## 6. BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, and B. Moudgil. Nanoparticles for bioimaging, *Advances in Colloid and Interface Science*, 123, (2006), 471-485.
- <sup>2</sup> R. Weissleder & M. J. Pittet, "Imaging in the era of molecular oncology", *Nature*, 452, 7187, (2008), 580-589.
- <sup>3</sup> Petty, Howard R, "Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology", *Microscopy research and technique*, 70, 8, (Aug 2007), 687-709.
- <sup>4</sup> Rahul P. Bagwe, Xiaojun Zhao, and Weihong Tan., "Bioconjugated Luminescent Nanoparticles for Biological Applications", *Journal of Dispersion. Science and Technology*, 24, 3, (2003), 453-464.
- <sup>5</sup> Y. T. Lim, O. O. Park, and H. T. Jung., "Gold nanolayer-encapsulated silica particles synthesized by surface seeding and shell growing method: near infrared responsive materials", *Journal of Colloid and Interface Science*, 263, 2, (2003), 449-453.
- <sup>6</sup> A. Waggoner, *Methods Enzymol.*, 246, (1995), 362.
- <sup>7</sup> Sabbatici, N. Guardagli, J. M. Lehn, *Coord.Chem.Rev.*, 123, (1993), 201.
- <sup>8</sup> V. Balzani, R. Ballardini, *Photochem. Photobiol.*, 52, (1990), 409.
- <sup>9</sup> F. S. Richardson, *Chem.Rev.*, 82, (1982), 541-552.
- <sup>10</sup> S.C. Rasmussen, M.M. Richter, E. Yi, H. Place, K.J. Brewer, *Inorg. Chem.*, 29, (1990), 3926.
- <sup>11</sup> I. M. Dixon, J.-P. Collin, J.-P. Sauvage, L. Flamigni, S. Encinas, F. Barigelletti, *Chem. Soc. Rev.*, 29, (2000), 385.
- <sup>12</sup> J. A. G. Williams, A. J. Wilkinson, V. L. Whittle, *Dalton Trans.*, (2008), 2081.
- <sup>13</sup> D.-L. Ma, W.-L. Wong, W.-H. Chung, F.-Y. Chan, P.-K. So, T.-S. Lai, Z.-Y. Zhou, Y.-C. Leung, K.-Y. Wong, *Angew., Chem. Int. Ed.*, 47, (2008), 3735.
- <sup>14</sup> (a) N. M. Green, L. Konieczny, E. J. Toms, R. C. Valentine, *Biochem. J.*, 125, (1971), 781. (b) N. M. Green, *Adv. Protein Chem.*, 29, (1975), 85. (c) N. M. Green, *Methods Enzymol.*, 184, (1990), 51-67.
- <sup>15</sup> K.K.-W. Lo, J.S.-W. Chan, L.-H. Lui, C.-K. Chung, *Organometallics*, 23, (2004), 3108.
- <sup>16</sup> K.K.-W. Lo, C.-K. Chung, N. Zhu, *Chem. Eur. J.*, 12, (2006), 1500.

- <sup>17</sup> D.S. Wilbur, P.M. Pathare, D.K. Hamlin, S.A. Weerawarna, *Bioconjugate Chem.*, 8, (1997), 819.
- <sup>18</sup> D.S. Wilbur, P.M. Pathare, D.K. Hamlin, K.R. Buhler, R.L. Vessella, *Bioconjugate Chem.*, 9, (1998), 813.
- <sup>19</sup> S. P. Schmidt, W. C. Trogler, F. Basolo, "Pentacarbonylrhenium Halides", *Inorganic Syntheses*, 28, (1990), 154–159.
- <sup>20</sup> K. Kalyanasundaram, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 82, (1986), 2401-2415.
- <sup>21</sup> A. J. Lees, *Chem Rev*, 87, (1987), 711-743.
- <sup>22</sup> K. S. Schanze, D. B. MacQueen, T. A. Perkins, L. A. Cabana, *Coord Chem. Rev.*, 122, (1993), 63-89.
- <sup>23</sup> M. Wrighton, D. L. Morse, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, (1974), 998-1003.
- <sup>24</sup> K.K.-W. Lo, K.-S. Sze, K.H.-K. Tsang, N. Zhu, *Organometallics*, 26, (2007), 3440.
- <sup>25</sup> J. N. Demas, B. A. DeGraff, *Macromol.chem., Macromol.Symp.*, 59, (1992), 35.
- <sup>26</sup> K.K.-W. Lo, W.-K. Hui, D.C.-M. Ng, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, (2002), 9344.
- <sup>27</sup> K.K.-W. Lo, K.H.-K. Tsang, *Organometallics*, 23, (2004), 3062.
- <sup>28</sup> K.K.-W. Lo, W.-K. Hui, *Inorg. Chem.*, 44, (2005), 1992.
- <sup>29</sup> K.K.-W. Lo, K.H.-K. Tsang, K.-S. Sze, *Inorg. Chem.*, 45, (2006), 1714.
- <sup>30</sup> R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2, (1963), 565.
- <sup>31</sup> R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.*, 61, (1989), 613.
- <sup>32</sup> R. Huisgen, G. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.*, 100, (1967), 2494.
- <sup>33</sup> R. B. Woodward, R. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 8, (1969), 781.
- <sup>34</sup> W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, (2004), 15366.
- <sup>35</sup> F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, (2005), 210.
- <sup>36</sup> K. V. Gothelf, K. A. Jorgensen, *Chem. Rev.*, 98, (1998), 863.
- <sup>37</sup> A. R. Katritzky, S. K. Singh, *J. Org. Chem.*, 67, (2002) 9077.
- <sup>38</sup> a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.*, 113, (2001), 2056. b) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today*, 8, (2003), 1128.

- <sup>39</sup> V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, (2002), 2596.
- <sup>40</sup> C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **67**, (2002), 3057.
- <sup>41</sup> a) V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, (2005), 2211.  
b) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* (2006), 51.
- <sup>42</sup> A E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, (2003), 4686.
- <sup>43</sup> P. L. Golas, N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **39**, (2006), 6451.
- <sup>44</sup> E. J. Yoo, M. Ahlquist, S. H. Kim, I. Bae, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, S. Chang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, (2007), 1730.
- <sup>45</sup> P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrich Chimica Acta*, **40**, (2007), 7.
- <sup>46</sup> M. H. Palmer, R. H. Findlay, A. J. Gaskell, *J. Chem. Soc. Perkins Trans. 2*, **4**, (1974), 420.
- <sup>47</sup> M. Meldal, C. W. Tornoe, *Chemical Reviews*, **108**, (2008), 2952.
- <sup>48</sup> B. M. J. M. Sujikerbuijk, B. N. H. Aerts, H. P. Dijkstra, M. Luts, A. L. Spek, G. van Koten and R. J. M. Klein Gebbink, *Dalton Trans.*, (2007), 1273-1276.
- <sup>49</sup> S. Lamansky, P. Djurovich, D. Murphy, F. Abdel-Razzaq, R. Kwong, I. Tsyba, M. Bortz, B. Mui, R. Bau, M. E. Thompson, *Inorganic Chemistry*, **40**, (2001), 1704-1711.
- <sup>50</sup> L. Herde, J. C. Lambert, C. V. Senoff, *Inorganic Syntheses*, **15**, (2007), 18-20.
- <sup>51</sup> R. Gao, D. G. Ho, B. Hernandez, M. Selke, D. Murphy, P.I. Djurovich, M. E. Thompson, *Journal American Chemistry Society*, **124**, (2002), 14828-14829.
- <sup>52</sup> A. S. Ionkin, W. J. Mashall, B. M. Fish; *Organometallics*, **25**, (2006), 1461-1471.
- <sup>53</sup> A. Auffrant, A. Barbieri, F. Berigelletti, J. Collin, L. Flamini, C. Sabatini, J. Sauvage, *Inorganic Chemistry*, **45**, (2006), 10990-10997.
- <sup>54</sup> F. Neve, M. La Deda, F. Puntoriero, S. Campagna, *Inorganica Chimica Acta*, **359**, (2006), 1666-1672.
- <sup>55</sup> S. Basu, S. Peng, G. Lee, S. Bhattacharya, *Polyedron*, **24**, (2005), 157-163.
- <sup>56</sup> S. Muzzioli, "Sintesi e studio delle proprietà elettroniche di nuovi composti di coordinazione con leganti aromatici azotati", *Tesi di Dottorato*, **2011**, pagina 75.