

SCUOLA DI SCIENZE
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Complessi tetrazolici di Re(I): design e
preparazione di una nuova classe di probes
luminescenti

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Anna Maria Ranieri

RELATORE

Dott. Stefano Stagni

CORRELATORE

Dott.ssa Valentina Fiorini

Dott.ssa Alessandra Stefan

Sessione I

Anno Accademico 2014-2015

Abstract (ITA)

In questo lavoro di tesi sperimentale è presentata una nuova classe di complessi neutri di Re(I) di formula generale *fac*-[Re(CO)₃(N^N)(2-QTZ)], dove N^N = 2,2' bipyridina o 1,10 fenatrolina, mentre 2-QTZ rappresenta l'anione 2-chinolil tetrazolato. La progettazione dei complessi e, in particolare, la scelta del legante tetrazolico 2-QTZ è stata rivolta allo studio dell'interazione specifica verso ioni divalenti di interesse biologico quali Zn(II), Cd(II) e Cu(II). È stato verificato come l'aggiunta di tali ioni comporti variazioni significative delle proprietà fotoemittive dei complessi rendendoli pertanto nuovi esempi di sensori luminescenti. I risultati ottenuti sono stati estesi in contesto biologico ove è stato possibile osservare come i complessi in questione mantenessero inalterate le loro proprietà fotoemittive in substrati cellulari, in particolare entro colture di *Yarrowia Lipolytica*. All'interno di questi lieviti i complessi mostrano inalterate proprietà di *luminescent sensing* nei confronti dello ione Zn(II) e Cd(II).

Abstract (ENG)

In this experimental work we report the design, the synthesis and characterization of a new class of Re(I) complexes of the general formula *fac*-[Re(CO)₃(N^N)(2-QTZ)], where N^N = 2,2' bipyridine or 1,10 phenanthroline, whereas 2-QTZ is the anion 2-quinolyl-tetrazolate. The complexes and, in particular, the tetrazolate ligand 2-QTZ were designed in order to investigate their specific interaction with biologically and toxicologically relevant metal ions, as Zn(II), Cd(II) e Cu(II). The addition of such ions led to substantial variations of the photophysical properties of these complexes, suggesting their application as luminescent sensors. The photophysical performance of the complexes proved to remain unchanged inside cellular substrates, as *Yarrowia Lipolytica* cultures. Within these yeasts, the complexes show unchanged ability to perform *luminescent sensing* towards Zn(II) and Cd(II) ions.

INDICE

INTRODUZIONE	1
Ruolo dello Zinco nei sistemi biologici	2
Ruolo del rame nei sistemi biologici	2
Tossicità del Cadmio	3
Fotofisica dei complessi di metalli di transizione	4
Probes luminescenti per la rilevazione di cationi metallici	10
Probes luminescenti per Zn^{2+}	10
Probes luminescenti per Cu^{2+}	11
Probes luminescenti per Cd^{2+}	12
Complessi di metalli di transizione come probes luminescenti	12
Complessi tetrazolici di Re(I)	13
Cenni di Microscopia Ottica	15
Microscopia Confocale (LSCM)	15
Interazioni tra complessi tetrazolici di Re(I) e DNA	17
RISULTATI E DISCUSSIONE	20
Scelta del legante	20
Sintesi dei complessi di Re(I)	21
Reattività verso elettrofili: CH_3^+ , M^{n+}	25
Fotofisica dei complessi	31
Addizione di cationi M^{2+} : titolazioni di emissione	34
Prove di uptake cellulare	41
Interazione con DNA: prove preliminari	42
CONCLUSIONI	44
PARTE SPERIMENTALE	46
Procedura generale	46
Sintesi dei leganti	50
2-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)chinolina	50
2-(1-metil-2 <i>H</i> -tetrazol-5-il)chinolina, 2-(2-metil-2 <i>H</i> -tetrazol-5-il)chinolina	51
Sintesi dei precursori di Renio	52
$Re(CO)_5Br$	52
<i>fac</i> - $Re(CO)_3Br(phen)$ e <i>fac</i> - $Re(CO)_3Br(bipy)$	52
Sintesi dei complessi	53
$Re(CO)_3(phen)(QTZ)$	53
$Re(CO)_3(phen)(1-Me-2-QTZ)$	54
$Re(CO)_3(bpy)(QTZ)$	55

Re(CO) ₃ (phen)(1-Me-2-QTZ)	56
Re(CO) ₃ (bipy)(1-Me-2-QTZ)	57
Re(CO) ₃ Br(2-Me-QTZ)	58
Re(CO) ₃ (2-Me-QTZ)(3-clorometil-piridina)	59
Re(CO) ₃ (bipy)(2-QTZ)-Cu-POP	60
Bibliografia	61

INTRODUZIONE

L'impiego di complessi contenenti metalli appartenenti alla seconda e terza serie di transizione come *sensori* per determinare la presenza di un'ampia classe di analiti, è diventato, negli ultimi anni, uno dei maggiori interessi di ricerca nell'ambito della chimica di coordinazione.¹ Complessi di metalli di transizione aventi configurazione d^6 , d^8 e d^{10} presentano una serie di caratteristiche che li rende candidati ideali per il loro impiego come *probes* per cationi metallici divalenti con rilevanza biologica quali Zn^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} . A differenza dei sensori luminescenti a matrice puramente organica infatti, sono innumerevoli i vantaggi derivanti dall'impiego di questi sistemi, tra cui elevati valori di resa quantica, ampi spostamenti di Stokes, tempi di vita lunghi (nell'ordine della fosforescenza) e maggior sensibilità ai parametri chimico-fisici che si riscontrano *in vivo*. Partendo da questi presupposti, il lavoro di tesi svolto ha riguardato il design, la sintesi e la caratterizzazione fotofisica di una nuova classe di complessi tetrazolici di Re(I) allo scopo di esplorarne il potenziale uso come sensori luminescenti per cationi metallici di rilevanza biologica, sia per abbondanza negli organismi viventi come Zn^{2+} e Cu^{2+} , come per la loro tossicità come il Cd^{2+} . L'interesse verso questa specifica classe di leganti aromatici azotati scaturisce dagli studi precedenti del gruppo di ricerca. E' stato infatti dimostrato il ruolo fondamentale che i leganti tetrazolici svolgono nel determinare e/o regolare le proprietà di luminescenza dei corrispettivi complessi di Ru(II), Ir(III), Pt(II) e Re(I). Sono stati quindi condotti studi preliminari di *uptake cellulare*, seguiti mediante microscopia confocale, nonché prove di affinità dei complessi ottenuti verso il DNA. Sono state condotte inoltre prove di reattività dei sistemi sintetizzati verso elettrofili quali $-CH_3$, che unite a studi precedenti svolti dal gruppo di ricerca² hanno confermato il ruolo fondamentale del legante tetrazolico nel comportamento fotofisico dei complessi presentati.

Ruolo dello Zinco nei sistemi biologici

Tra i metalli di transizione presenti nei sistemi biologici, lo zinco è secondo per abbondanza solamente al ferro. Riscontrabile unicamente come catione bivalente, lo ione Zn(II) si trova nel corpo umano adulto in quantità che raggiungono i 2-3 grammi; esso è localizzato in particolare nei tessuti nervosi, dove si trova in concentrazione variabile tra 0.1 a 0.5 mM. La funzione principale dello Zn²⁺ a livello biologico è quella di cofattore in svariate famiglie di metalloproteine (*carbossipeptidasi, anidrasi, DNA polimerasi*) in cui può avere sia funzione strutturale che catalitica al sito attivo dell'enzima. Il ruolo che ricopre lo ione Zn(II) nelle strutture appena descritte è nota, mentre si hanno meno informazioni riguardo la funzione del cosiddetto “zinco libero” o chelabile, meno abbondante ma strettamente correlato a processi neurologici fondamentali come la neurotrasmissione e la modulazione dei segnali sinaptici.³

Pur essendo essenziale per svariate funzioni vitali, lo ione Zn(II), se presente in concentrazioni troppo elevate risulta citotossico, e più in generale è stato riscontrato come il manifestarsi di disordini nel metabolismo di tale catione sia strettamente correlato a disturbi neurologici molto gravi come epilessia, sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e morbo di Parkinson.⁴ E' evidente quindi come diventi di primaria importanza lo sviluppo di sensori chimici per lo Zn²⁺, in modo da seguirne l'omeostasi cellulare e chiarirne le funzioni a livello metabolico.

Ruolo del rame nei sistemi biologici

Il rame, seppur presente solamente in tracce, è il terzo metallo di transizione più abbondante nei sistemi biologici e, a differenza dello zinco, è presente sia nella forma di catione monovalente Cu⁺ (rameoso), sia in quella di catione bivalente, Cu²⁺ (rameico). La presenza di due stati di ossidazione stabili e facilmente interconvertibili rende questo metallo adatto per tutti quei processi biologici che rendono necessario il trasporto di elettroni o che richiedono l'intervento di meccanismi ossidoriduttivi.

Assieme al ferro quindi, il rame è il cofattore metallico principale di svariati enzimi appartenenti alla classe delle *ossidoreduttasi*, nonché dei diversi enzimi coinvolti nelle catene di trasporto elettronico in processi fondamentali come la respirazione cellulare (*citocromo-c ossidasi*) e la fotosintesi clorofilliana (*plastocianina*).

Il rame, inoltre, è presente in diverse metalloproteine che, in molti organismi, sono incaricate del trasporto e dell'attivazione dell'ossigeno (*emocianina*) e di altre piccole molecole come ossidi di azoto e ossidi di carbonio.⁵

Grazie alle sue proprietà redox, il rame è in grado di generare fortissimi stress ossidativi nelle regioni cerebrali in cui è molto concentrato, portando alla formazione di specie sensibili all'azoto e all'ossigeno in grado di innescare reazioni ossidative che vanno a danneggiare i tessuti cerebrali, causando la formazione di placche proteiche deteriorate che sono alla base di diversi fenomeni neurodegenerativi.

Benché sia piuttosto chiaro il ruolo che il rame ricopre nei processi in cui è coinvolto, si hanno poche informazioni a riguardo di alcune fasi del suo metabolismo in termini di assimilazione e accumulo negli organelli cellulari. Il meccanismo di assorbimento del rame attraverso il tratto gastrointestinale non è del tutto conosciuto,^{5,6} come del resto si hanno poche informazioni su come avvenga nel dettaglio il suo ingresso nella barriera emato-encefalica. Un'alterazione nel metabolismo del rame può essere indotta anche dalla sindrome di Menkes, un disordine genetico che blocca il trasporto del rame attraverso l'intestino: questo porta ad una carenza globale del metallo in tutto il corpo, causando danni a livello neurologico (epilessia), nell'apparato scheletrico e nella muscolatura. Al contrario, un accumulo di rame nei tessuti (causato dal disturbo di Wilson, una malattia genetica) porta a importanti danni cerebrali ed epatici.⁶

In questo contesto dunque è di primaria importanza sviluppare dei probes chimici per il rame, per chiarire come evolva il suo assorbimento e la sua localizzazione nei tessuti corporei.

Tossicità del Cadmio

Il cadmio è scarsamente utilizzato come metallo puro, ma trova diverse applicazioni come componente in leghe metalliche, specialmente a base di acciaio e ferro, oltre ad essere piuttosto usato sotto forma di sale: lo ione Cd(II) si rileva come CdS che trova applicazione come pigmento per vernici, oltre ad essere utilizzato per il coating di diversi materiali.

Questo metallo ha una grande capacità di bioaccumulo negli organismi viventi e, nel corpo umano, tende a localizzarsi soprattutto in ossa, fegato e reni. Gli effetti tossici che derivano dal suo accumulo nei tessuti sono molteplici: esso infatti è cancerogeno, nefrotossico e teratogeno, dannoso per il sistema endocrino e riproduttivo.

Il Cd²⁺ è dimensionalmente molto simile sia allo ione Zn(II) che allo ione Ca(II) e probabilmente è proprio in questa somiglianza che risiede la causa della sua forte tossicità: sembra infatti che il Cd²⁺ sia in grado di "mimare" il comportamento dei cationi simili, per scalzarli dai siti coordinativi di cui fanno parte, senza però riuscire a svolgere la stessa funzione biologica dei metalli rimpiazzati.

L'uptake di questo ione sembra quindi dovuto alla possibilità di essere coordinato dalle stesse proteine che trasportano lo zinco all'interno delle cellule, o di passare attraverso i canali che regolano il flusso di calcio nei tessuti nervosi: in questo modo il metabolismo di questi cationi e la concentrazione necessaria per garantirne l'omeostasi cellulare vengono alterati.⁶ In questo contesto, appare chiaro come riuscire a progettare dei sensori chimici specifici per lo ione cadmio sia indispensabile per chiarirne gli effetti tossici, ma anche molto complesso, in quanto la sua somiglianza con i diversi cationi metallici sopra citati rende molto difficile la sua discriminazione rispetto agli stessi.

Fotofisica dei complessi di metalli di transizione

Per una miglior comprensione delle proprietà fotofisiche dei complessi di metalli di transizione è necessario descrivere la natura dei livelli energetici coinvolti nelle transizioni relative all'assorbimento e all'emissione di energia luminosa, ovvero la loro struttura elettronica.

La prima teoria proposta è quella nota come "teoria del campo cristallino" o CFT, nella quale i leganti sono considerati come cariche negative puntiformi in grado di generare un campo elettromagnetico. Dal momento che i metalli appartenenti alla seconda e terza serie di transizione possiedono orbitali d parzialmente occupati o vuoti, gli effetti sul loro campo elettrostatico dovuti all'avvicinamento di leganti sono riscontrabili in seguito alla loro interazione con gli orbitali d del metallo.

I cinque orbitali d degeneri di un centro metallico allo stato gassoso, vengono differenziati in energia in seguito alla perturbazione del campo elettrostatico operata dai leganti: a seconda della simmetria del complesso, ad esempio in un complesso avente numero di coordinazione = 6, i leganti si distribuiranno spazialmente come ai vertici di un ottaedro (Fig.1). Gli orbitali d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} , degeneri tra loro, puntano tra i leganti, stabilizzandosi in energia (t_{2g}); gli orbitali $d_{x^2-y^2}$ e d_z^2 puntano verso i leganti, con conseguente aumento in energia (e_g).

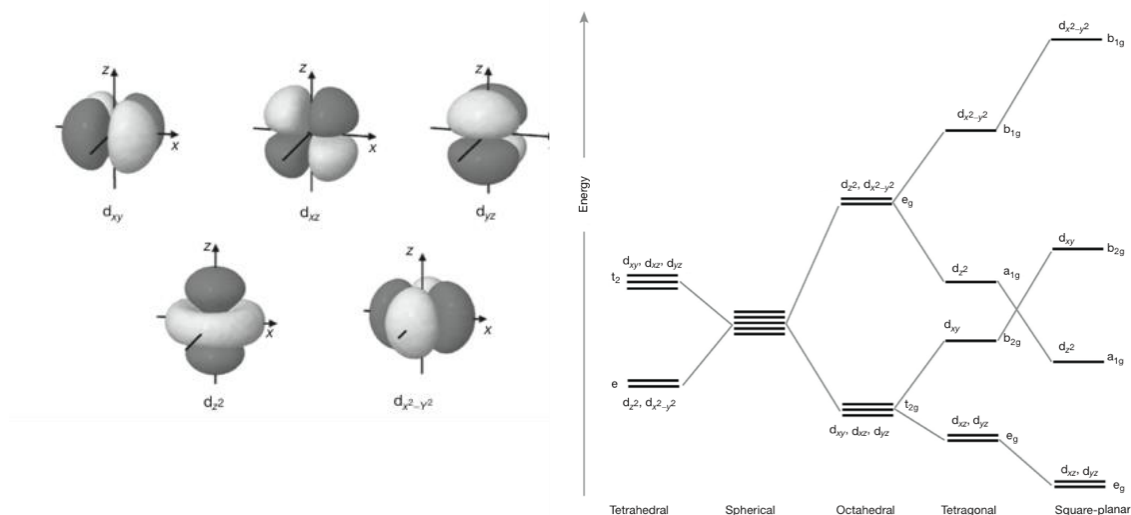


Fig 1: Rappresentazione dei 5 orbitali d e loro splitting al variare della simmetria del complesso.

La separazione energetica tra orbitali e_g e t_{2g} prende il nome di Δ o $10Dq$. Il valore di Δ dipende dall'atomo metallico considerato e alla serie di transizione di appartenenza (il valore di Δ aumenta scendendo nella tavola periodica), dai leganti coinvolti e dalla loro posizione nella serie spettrochimica. In generale, Δ rappresenta la differenza energetica tra orbitali occupati dagli elettroni ed orbitali liberi, ossia il gap HOMO-LUMO. Una descrizione più rigorosa per quanto riguarda la struttura elettronica di complessi ottaedrici è fornita dalla teoria dell'orbitale molecolare o MOT, che prevede la rappresentazione degli orbitali molecolari di un complesso metallico come combinazione lineare degli orbitali, aventi le stesse proprietà di simmetria, del metallo e dei leganti ad esso coordinati. Ogni orbitale molecolare viene indicato riportando le caratteristiche di simmetria, il simbolo * denota il carattere di antilegame.

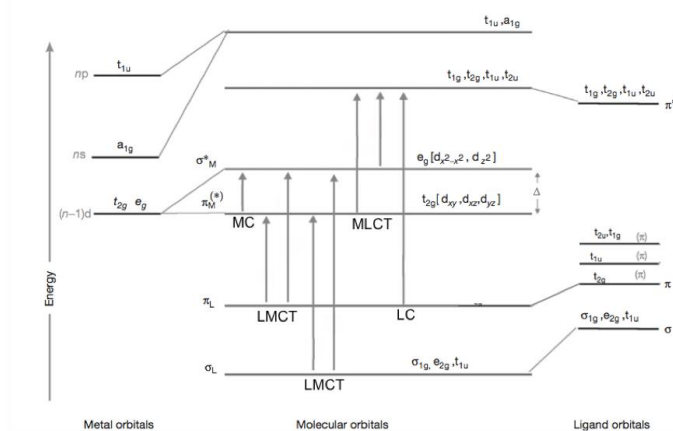


Fig 2: transizioni elettroniche per un complesso con simmetria ottaedrica.

Nel diagramma riportato in figura 2 sono riportate le transizioni elettroniche possibili per un complesso ottaedrico. Le linee collegano gli orbitali atomici con gli orbitali molecolari in cui hanno maggiore partecipazione.

La complessa struttura elettronica di un composto di coordinazione si riflette nelle sue proprietà fotofisiche e fotochimiche. Per rendere più semplice la trattazione di questi sistemi, è preferibile descrivere ogni stato usando la configurazione MO preponderante e quindi, classificare le transizioni elettroniche possibili a seconda degli orbitali molecolari coinvolti. Seguendo questo criterio quindi, sono quindi possibili:

- *Transizioni tra MO localizzati principalmente sul metallo:* sono quelle derivanti dagli orbitali di non legame del metallo π (t_{2g}) all'orbitale di antilegame localizzato sullo ione metallico σ^* (e_g), chiamate anche metallo centrate (MC) o transizioni d-d;
- *Transizioni tra MO localizzati sul metallo e sui leganti:* queste transizioni prendono il nome di CT o a trasferimento di carica. A seconda della posizione iniziale occupata dall'elettrone che passa dallo stato fondamentale a quello eccitato è possibile distinguere transizioni LMCT (ligand-to-metal-charge-transfer), che avvengono dal sistema π centrato sui leganti all'orbitale di antilegame centrato sul metallo σ^* (e_g), o MLCT (metal-to-ligand-charge-transfer) che avvengono a partire dall'orbitale di non legame del metallo σ (t_{2g}) o dall'orbitale di antilegame σ^* (e_g) al sistema π^* centrato sui leganti;
- *Transizioni tra MO localizzati principalmente sui leganti:* queste transizioni coinvolgono gli orbitali dei leganti che non risentono della coordinazione al metallo, sono chiamate LC (ligand-centered). Avvengono dal sistema π di legame al sistema π^* di antilegame dei leganti. Un'altro tipo di transizione possibile, nota come LLCT (ligand to ligand-charge-transfer), interessa direttamente gli orbitali centrati sui leganti.

In complessi ottaedrici di metalli con configurazione d^6 come quelli descritti in questo elaborato, l'assorbimento di energia sottoforma di radiazione luminosa può portare alla formazione di stati eccitati di tipo MC, CT e LC. Emerge quindi come la natura dello stato eccitato più accessibile sia influenzata e modulata dalle caratteristiche del metallo e dalle proprietà strutturali ed elettroniche dei leganti introdotti nella sua sfera di coordinazione.

La luminescenza è quel fenomeno fisico che coinvolge l'emissione spontanea di radiazione elettromagnetica da atomi, molecole o complessi eccitati elettronicamente nel momento in cui questi decadono a stati elettronici inferiori.

In accordo con la distribuzione di Boltzmann, a temperatura ambiente la popolazione dei livelli elettronici più alti è trascurabile rispetto a quella dello stato ad energia inferiore, lo stato fondamentale. Per questo motivo, si assume che la maggior parte delle molecole siano normalmente nello stato fondamentale. Nel caso particolare di complessi con il metallo in configurazione d^6 , tale stato è rappresentato da tre coppie di elettroni accomodate sui tre livelli t_{2g} , situazione che comporta una molteplicità di spin pari a 1 e la conseguente denominazione di stato di singoletto (*singlet ground state* S_0). In seguito all'assorbimento di energia, le molecole passano dallo stato fondamentale S_0 allo stato eccitato S_n ; per la regola di selezione di spin, lo stato eccitato che si forma presenta la stessa molteplicità dello stato fondamentale.

Lo stato eccitato S_n non è stabile, quindi le molecole torneranno spontaneamente allo stato fondamentale attraverso processi di decadimento radiativo o non radiativo. I processi non radiativi avvengono senza l'emissione di fotoni, e possono avvenire secondo i seguenti meccanismi:

- *Vibrational relaxation*: la molecola eccitata trasferisce energia vibrazionale mediante collisione con le molecole di solvente circostante ($\approx 10^{-12}$ s);
- *Internal conversion*: transizione mediante due stati elettronici aventi la stessa molteplicità ($\approx 10^{-13}$ s);
- *Conversion between systems (intersystem crossing, ISC)*: transizione mediante due stati elettronici aventi differenti molteplicità ($\approx 10^{-8}$ s).

Se il decadimento allo stato fondamentale avviene per via radiativa, si osserva il fenomeno fisico della luminescenza, che coinvolge l'emissione spontanea di radiazione elettromagnetica da atomi, molecole o complessi eccitati elettronicamente nel momento in cui questi decadono a stati elettronici inferiori. Sulla base del meccanismo con cui avviene e in relazione alla natura degli stati eccitati coinvolti, la luminescenza può essere distinta in diverse tipologie:

- *Fluorescenza*: transizioni da stato eccitato a fondamentale caratterizzati dalla stessa molteplicità di spin ($\approx 10^{-9}$ s);
- *Fosforescenza*: da stato eccitato a fondamentale caratterizzati da diversa molteplicità di spin ($\approx 10^{-6}$ s);

- *Radiazione di risonanza*: emissione con una frequenza uguale a quella assorbita. Avviene solo per gas a basse pressioni ($\approx 10^{-8}$ s).

Osservando i tempi di vita dei singoli processi, è subito evidente come quelli non radiativi sono sempre in concorrenza con quelli radiativi, ed è per questo motivo che a volte non sono osservabili. Ciò è dovuto a vari fattori, come ad esempio l'elevata flessibilità della struttura della molecola considerata, alte temperature che favoriscono le collisioni o la presenza di un solvente in grado di assorbire l'energia della molecola eccitata. Il diagramma di Jablonski mostrato in figura 3 riassume tutte le casistiche appena elencate.

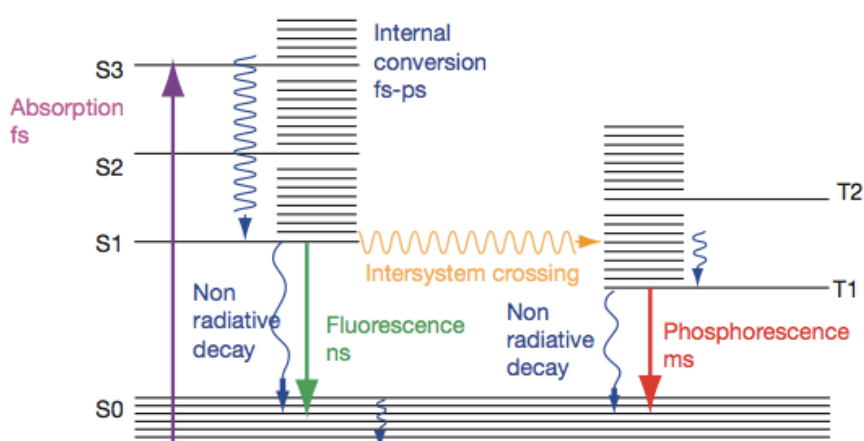


Fig 3: diagramma di Jablonski.

In generale, una molecola eccitata ad uno stato S_n decade ad uno stato eccitato ad energia inferiore S_1 mediante conversione interna (Regola di Kasha). La fluorescenza quindi può essere osservata solo per i decadimenti da S_1 ad S_0 , ma rimane comunque in competizione con il fenomeno della conversione interna.

La fosforescenza invece è osservabile solamente quando l'intersystem crossing è sufficientemente veloce da competere con gli altri meccanismi elencati in precedenza, (come avviene nel caso dei complessi tetrazolici di Re(I) discussi in questo elaborato) consentendo agli stati eccitati di tripletto di essere popolati a partir dai corrispondenti stati eccitati di singoletto, in quanto una transizione $S_0 \rightarrow T_1$ non sarebbe permessa dalle regole di selezione. Inoltre, sulla base del principio di massima molteplicità, gli stati di tripletto hanno energia inferiore rispetto ai corrispondenti stati di singoletto. Per questo motivo l'emissione fosforescente è osservabile a lunghezze d'onda più alte dell'emissione fluorescente.

Un ulteriore meccanismo che può portare alla disattivazione dello stato eccitato è noto come quenching, e può essere di varie tipologie:

- *Collisional quenching*: processo bimolecolare che avviene quando un fluoroforo ed una sostanza, chiamata quencher, in grado di ricevere l'eccesso di energia posseduta dalla molecola eccitata, si scontrano;
- *Static quenching*: formazione di un complesso tra fluoroforo non fluorescente e quencher;
- *Self-quenching*: fenomeno che avviene quando molecole appartenenti al fluoroforo fungono da quencher, oppure se in presenza di sostanze che assorbono alla stessa lunghezza d'onda di emissione del fluoroforo.

La capacità di una sostanza di emettere è quantificata con una grandezza nota come resa quantica, calcolabile mediante la relazione:

$$\Phi = \frac{K_r}{K_r + K_{NR} + K_Q[Q]}$$

dove K_r , K_{NR} e K_Q sono rispettivamente le costanti di velocità dei processi radiativi, non radiativi e di quenching. Un altro parametro importante è il tempo di vita (*decay time*, τ) che corrisponde al tempo medio che la molecola trascorre nello stato eccitato prima di decadere mediante un processo radiativo.

$$\tau = \frac{1}{K_r + K_{NR} + K_Q[Q]}$$

La fluorescenza e la fosforescenza sono distinte inoltre anche dal tempo di vita: la prima ha un tempo di vita medio nell'ordine dei nanosecondi, mentre la seconda è nell'ordine dei microsecondi.

Per emettere luce una molecola deve rispettare alcuni importanti requisiti, primo tra tutti deve avere uno stato eccitato con geometria simile a quello fondamentale. Inoltre, la probabilità di avere emissione di luce è inversamente proporzionale alla separazione energetica tra stato fondamentale e stato eccitato. Per quanto riguarda i complessi di metalli di transizione, le classi in grado di soddisfare tali requisiti sono quelle che prevedono l'uso di metalli appartenenti alla seconda e terza serie di transizione, circondati da leganti

aromatici e sufficientemente rigidi. La presenza di ioni metallici pesanti induce un forte accoppiamento spin-orbita con conseguente ottenimento di emissione fosforescente. Alcuni dei composti modello, tra cui composti polipiridinici di Ru(II), complessi ciclotetrametallati di Ir(III) e complessi triscarbonilici di Re(I) vengono riportati a titolo di esempio in figura 4.

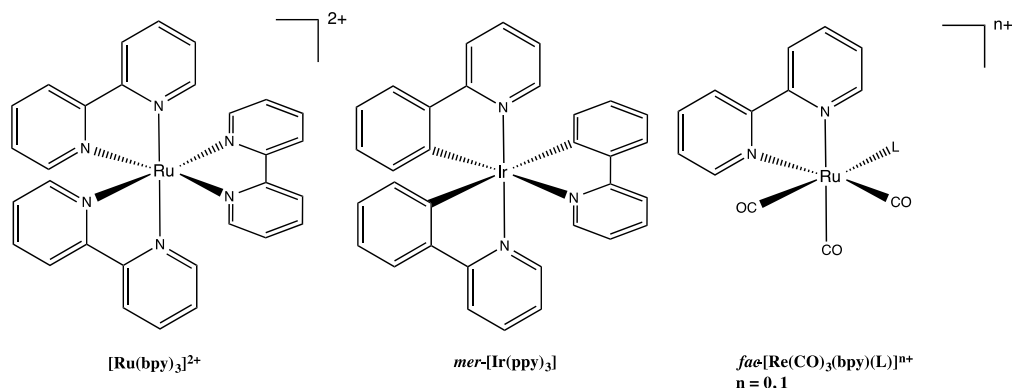


Fig 4: Complessi modello di Ru(II), Ir(III) e Re(I).

Probes luminescenti per la rilevazione di cationi metallici

La necessità di rilevare la presenza e determinare la localizzazione di uno o più analiti di interesse ha portato allo sviluppo di tecniche analitiche sensibili e selettive per la loro rilevazione; una delle più utilizzate è quella che prevede l'impiego di probes luminescenti, che possono essere costituiti da molecole organiche o da complessi di metalli di transizione. Lo sviluppo di tecniche da abbinare all'uso di questi sensori, come la microscopia confocale, ha indirizzato la ricerca verso il design e la sintesi di probes luminescenti con caratteristiche chimiche e strutturali tali da attagliarsi alla natura dell'analita da rilevare. La variazione delle proprietà di emissione di un fluoroforo in seguito alla sua interazione con l'analita di interesse è essenziale affinché questo possa essere utilizzato come sensore luminescente. La fluorescenza derivante dalla formazione dell'addotto fluoroforo-analita deriva da processi radiativi dagli stati eccitati dei fluorofori organici, i quali vengono appositamente progettati per essere selettivi nei confronti dell'analita che si intende rilevare, come nei casi rappresentati da molecole organiche come sensori luminescenti per ioni metallici in grado di rivestire notevole rilevanza biologica.⁷

Probes luminescenti per Zn²⁺

Alcuni dei fluorofori più utilizzati per la rilevazione del catione Zn²⁺ sono ammine terziarie come la BPA - bis(piridin-2-ilmetil)ammina, BPEA - N¹-metil-N²,N²-bis(piridin-2-

ilmetil)etan-1,2-diammina, TPEA - N¹-metil-N¹,N², N²-tris(piridin-2-ilmetil)etan-1,2-diammina (Fig 5). Questi fluorofori sono in grado di complessare lo zinco in rapporto stechiometrico 1:1. Altri sistemi, tra cui il TSQ (Fig 5), il cui design è ispirato all'8-amminochinolina (AQ, Fig 5), mostrano invece capacità di complessare lo zinco in rapporto stechiometrico 2:1.⁷

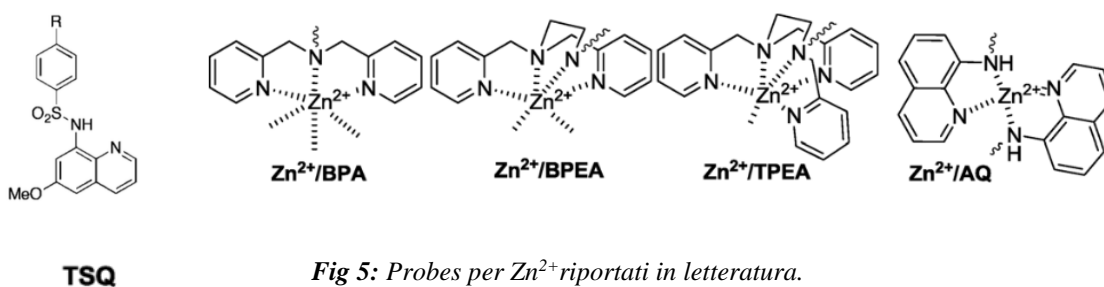


Fig 5: Probes per Zn²⁺ riportati in letteratura.

Probes luminescenti per Cu²⁺

A causa della sua natura paramagnetica, la coordinazione del catione rameico (Cu²⁺) con fluorofori organici si traduce spesso in uno spegnimento della fluorescenza da essi prodotta. E' evidente quindi come sia difficile progettare un sistema in grado di incrementare le sue performances fotofisiche in seguito alla coordinazione con questa specie.

Al contrario, i complessi rameosi mostrano proprietà fotoemittive, ma essendo instabili disproporzionano facilmente in Cu²⁺ e Cu⁰, cationi che portano invece allo spegnimento (“quenching”) dell'emissione. E' chiaro quindi che solamente fluorofori in grado di stabilizzare il catione Cu⁺ sono in grado di dare una risposta di tipo “turn-on” se in sua presenza, come ad esempio quelli riportati in figura 6.⁷

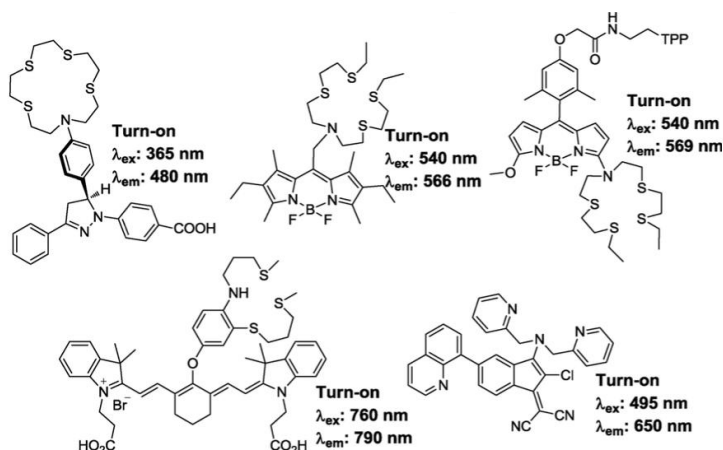


Fig 6: Probes per Cu⁺ riportati in letteratura.

Probes luminescenti per Cd²⁺

Nel caso del catione Cd²⁺ sono numerosi i tentativi di progettare un sensore specifico. Vengono solitamente impiegati, come nel caso dello Zn²⁺, sistemi quali BPA, chinoline e poliammine. A causa infatti delle loro simili proprietà di coordinazione gli ioni Zn²⁺ e Cd²⁺ risultano difficilmente discriminabili.

Complessi di metalli di transizione come probes luminescenti

I sensori luminescenti basati su metalli appartenenti alla seconda e terza serie di transizione, aventi configurazione d⁶, d⁸ e d¹⁰, presentano proprietà fotofisiche diverse rispetto ai fluorofori organici descritti in precedenza. Il carattere fosforescente della emissione è dovuto all'elevato accoppiamento spin-orbita caratteristico dei metalli di transizione, che favorisce processi di ISC a partire dallo stato S_n verso lo stato T_n, risultando quindi in un decadimento da quest'ultimo allo stato fondamentale S₀ con tempi più lunghi rispetto a quelli visti per la fluorescenza (microsecondi vs nanosecondi). In particolare, complessi di metalli di transizione aventi configurazione d⁶ e d⁸ presentano un'emissione fosforescente ascrivibile a transizioni a trasferimento di carica di tipo MLCT (Fig 7).

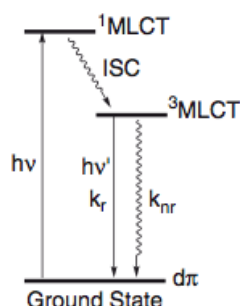


Fig 7: Diagramma di Jablonski per complessi del tipo $[Re(N^N)(CO)_3L]$, modello MLCT. k_r e k_{nr} sono le costanti radiative e non radiative dei decadimenti dallo stato eccitato allo stato fondamentale.

Per questi motivi, risultano ottimi candidati come probes per la rilevazione di svariati analiti. Inoltre, l'emissione originata da un composto di coordinazione può generare una gamma di colori molto più ampia rispetto a quella di un fluoroforo organico, permettendo quindi di distinguere l'emissione del complesso dall'autofluorescenza dei campioni biologici utilizzati per l'imaging in vivo. Gli esempi più interessanti riportati in letteratura

sono basati sull'uso di complessi lantanoidei o di metalli di transizione come Ru(III), Ir(III) e Re(I).

Gli approcci utilizzati per il design di complessi di metalli di transizione da impiegare come probes luminescenti possono essere di due tipi:

- Il recettore dell'analita da rilevare è combinato con un complesso avente emissione fosforescente mediante un'unità spaziatrice o *spacer*;
- Il recettore dell'analita da rilevare è un legante del complesso fosforescente impiegato come probe. Poiché il comportamento fotofisico del complesso è regolato anche da processi a trasferimento di carica (MLCT), le proprietà di assorbimento ed emissione sono sensibili alle variazioni chimico-fisiche dell'intorno del complesso. Complessivamente si avrà un cambiamento delle sue performances fotofisiche, traducibile in una variazione della lunghezza d'onda di emissione, della resa quantica e del tempo di vita.⁷

Complessi di Re(I)

I radiofarmaci sono preparazioni medicinali contenenti isotopi radioattivi di alcuni elementi, utilizzate in medicina nucleare a scopo diagnostico e/o terapeutico. Tuttavia, la diffusione di radiofarmaci specifici è condizionata dalla disponibilità di radionuclidi adatti, di efficienti processi di marcatura e di tecniche che ne consentano la specifica localizzazione tissutale. La chimica inorganica è da sempre protagonista nello sviluppo di radiofarmaci in quanto molti dei radioisotopi utilizzati sono metalli. Tecnezio e Renio, rappresentano un'interessante coppia di radionuclidi per uso biomedico. Attualmente la grande maggioranza dei radiofarmaci utilizzati hanno come base un complesso di coordinazione che contiene l'isotopo metastabile ^{99m}Tc. L'interesse verso il renio, congenere del tecnezio nel gruppo 7, è cresciuto per le notevoli similitudini chimiche, che si traducono, per complessi stabili aventi stessa geometria molecolare, in un analogo comportamento all'interno di un sistema biologico.

I complessi triscarbonilici di Re(I) hanno caratteristiche fotofisiche uniche. In termini di intensità di emissione, i complessi di Re(I) si collocano in posizione intermedia tra forti emettitori come i complessi cicloometallati di Ir(III) ed i derivati più scarsamente emissivi come i complessi polipiridinici di Ru(II). I sistemi del tipo $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{L})]^{n+}$, dove $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ = è un legante diimminico come la 2,2'-bipiridina o la 1,10-fenantrolina, risultano essere ottimi candidati per essere impiegati nel campo dell'imaging in vivo. Nei complessi

di Re(I) presentati in questo elaborato, si hanno due posizioni di coordinazione occupate dal legante N^N, tre posizioni facciali occupate da gruppi carbonilici e nella posizione assiale (L) si trova il legante tetrazolico. Nei complessi triscarbonilici di renio, possono avvenire svariate transizioni elettroniche che coinvolgono stati eccitati relativi al campo dei leganti, in particolare transizioni di tipo MLCT e LC. Per questi motivi i complessi sintetizzati risultano altamente sensibili alle variazioni del loro intorno chimico. Andando infatti a valutare il comportamento dei complessi tetrazolici nei confronti di diversi tipi di elettrofili (H⁺, CH₃⁺), è stato possibile confermare come il legante tetrazolico influenzi significativamente le proprietà luminescenti del complesso, in quanto in seguito a modificazioni operate sul legante si hanno cambiamenti sostanziali nella lunghezza d'onda del massimo di emissione (λ_{max}), resa quantica (Φ) e tempo di vita (τ) delle emissioni del complesso.

Con l'intento di estendere la casistica di elettrofili da impiegare come reagenti nei confronti di complessi tetrazolici di Re(I), si è intrapresa la progettazione di un legante idoneo per la rilevazione di cationi metallici. A questo scopo è stato scelto l'anione 2-chinolit-tetrazolato, in modo da avere sia coordinazione al centro metallico mediante l'anello tetrazolico, che un sito di coordinazione adeguato per cationi metallici. La compresenza degli atomi di azoto appartenenti all'anello tetrazolico e dell'azoto appartenente alla chinolina forma infatti una "tasca" entro la quale possono andare a coordinarsi specie metalliche cationiche, rientrando nella tipologia di complessi di tipo "pyridine-pendant" riportati in letteratura.⁷ Questi sistemi hanno la caratteristica di avere entro la sfera di coordinazione del metallo un legante contenente uno o più atomi di azoto di tipo piridinico in grado di interagire con elettrofili di varia natura. L'avvenuta coordinazione complesso-elettrofilo si tradurrà quindi in un diverso comportamento fotofisico del sistema finale, in seguito ad un'interazione chelante con altri ioni metallici.

L'interesse verso il design e la sintesi di complessi di metalli di transizione da applicare come probes luminescenti in tecniche di bioimaging è aumentato considerevolmente negli ultimi anni, in virtù delle loro caratteristiche discusse in precedenza. Con l'intento di testare i complessi tetrazolici di Re(I) sintetizzati come sensori in vivo, sono state eseguite analisi di microscopia confocale su sistemi modello semplici, quindi lieviti *Yarrowia Lipolytica*, noti organismi cellulari in grado di accumulare una considerevole quantità di lipidi. Alcuni complessi tetrazolici, simili a quelli riportati in questo elaborato,⁸ hanno

infatti dimostrato affinità verso gli accumuli lipidici (*lipid droplets*) interni alle cellule, il cui ruolo nelle disfunzioni metaboliche cellulari è oggetto di numerosi studi.⁸

Cenni di Microscopia Ottica

Quando un campione viene illuminato, sono due i processi fisici che limitano la nitidezza dell'immagine che si osserva: guardando un piano del campione a fuoco, all'occhio arriva anche la luce riflessa dai piani che non sono a fuoco, rendendo l'immagine confusa. L'altro limite fisico tipico della microscopia ottica classica è quello dovuto all'illuminazione del campione: la luce diffonde in esso rendendo l'immagine complessivamente meno nitida, disturbando il piano di messa a fuoco.

La risoluzione dell'immagine è determinata principalmente dalla diffrazione della luce da parte del campione e da parte della lente dell'obiettivo. Lavorando in assenza di aberrazioni significative, si utilizzano i seguenti criteri per stimare la risoluzione dello strumento:

- risoluzione laterale: $r = 0.61 \lambda_0 / \text{NA}_{\text{obj}}$; la risoluzione nel piano di fuoco, è definita come la minima distanza a cui si possono avvicinare lateralmente due oggetti senza che le figure di diffrazione li rendano indistinguibili. r dipende dalla lunghezza d'onda incidente della luce nel vuoto (λ_0) e dall'apertura numerica dell'obiettivo che è data dalla relazione $\text{NA} = n \sin \alpha$, dove α è la semiapertura dell'obiettivo.
- risoluzione assiale: $z_{\text{min}} = 2\lambda_0 n / (\text{NA}_{\text{obj}})^2$; la risoluzione assiale è definita come la distanza minima alla quale posso avvicinare due oggetti lungo l'asse perpendicolare al piano di fuoco e vederli distinti.
- profondità di campo: è lo spessore dell'immagine che appare a fuoco, misurato lungo l'asse del microscopio (asse z); quindi due oggetti che si trovano all'interno di tale spessore vengono visti sullo stesso piano xy . Teoricamente la profondità di campo è determinata dalla risoluzione assiale, ma nella microscopia classica la luce possiede un'intensità considerevole anche al di sopra e al di sotto del piano di fuoco; gli oggetti fuori fuoco producono luce non desiderata che viene raccolta dal condensatore riducendo il contrasto della regione di interesse.

Microscopia Confocale (LSCM)

La microscopia confocale nasce nel 1957 ad opera di Marvin Minsky, con l'intento di

risolvere i problemi caratteristici della microscopia tradizionale, che sono risoluzione messa a fuoco e contrasto.⁹ Alla base della microscopia confocale risiede il concetto di bloccare la luce proveniente dai piani sovrastanti e sottostanti quello in esame, mediante l'uso di una piccola apertura, a discapito però del campo visuale: sul piano xy vengono rimosse le diffrazioni derivanti da altri piani, sull'asse z invece si elimina la luce che aumenta la profondità di campo, rendendo complessivamente più nitide le sole parti del campione che risiedono entro la risoluzione assiale. La differenza saliente della microscopia confocale rispetto alla classica è la presenza di un otturatore o *pinhole*, che permette di illuminare una porzione ridotta del campione e raccogliere quindi solamente la luce proveniente da essa. Complessivamente l'immagine non è disturbata quindi riflessioni provenienti da piani diversi rispetto a quello di messa a fuoco.⁹

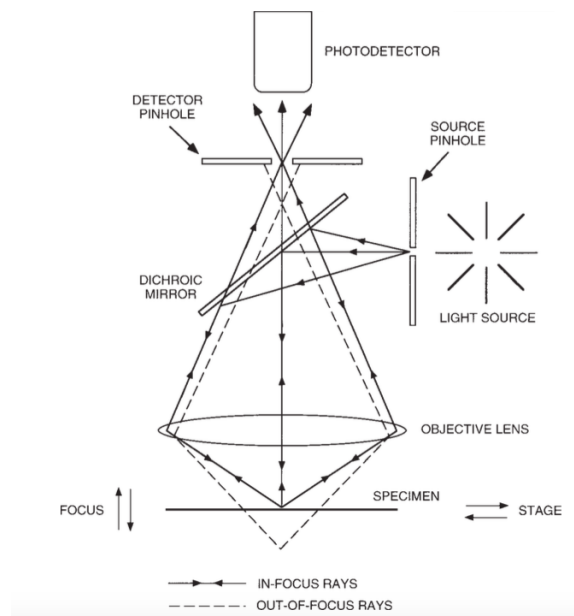


Fig 8: schema di funzionamento di un microscopio confocale.

Il fascio di eccitazione proveniente dal laser, attraversa il pinhole (*source pinhole*, fig.8) illuminando quindi solo una piccolissima regione dell'oggetto. Prima del rivelatore (*photodetector*, fig.8) una seconda apertura confocale (*detector pinhole*, fig.8) attenua i contributi dei piani sopra e sottostanti quello di messa a fuoco (*out of focus rays*, fig.8). Mediante tecniche a scansione, si può quindi studiare l'intera superficie, illuminando un punto per volta. Il segnale risultante dall'interazione tra la radiazione incidente e il campione viene registrato ed elaborato per formare una riproduzione dell'oggetto in esame punto per punto. I tempi di acquisizione sono più lunghi rispetto a quelli della microscopia

classica, e sono regolati dalla modalità con cui si esegue la scansione. Tenendo conto del fatto che chiudendo il pinhole l'intensità di illuminazione viene ridotta, è necessaria una maggiore sensibilità o un tempo di acquisizione più lungo, col rischio di aumentare il rumore di fondo, danneggiare il campione stesso (*photobleaching*) o perdere in risoluzione dell'immagine. La sorgente di eccitazione più frequente è costituita da un laser, che fornisce luce ad alta intensità ma in un intervallo ristretto di lunghezze d'onda. Infine è necessario un sistema digitale di cattura e visualizzazione dell'immagine.⁹

Interazioni tra complessi tetrazolici di Re(I) e DNA

L'interazione tra i complessi di metalli di transizione e DNA rappresenta una tematica d'interesse centrale sia per lo sviluppo di nuovi chemioterapici metallo-derivati (che svolgono la loro attività interagendo con il DNA delle cellule tumorali, per rallentarne o addirittura impedirne la replicazione), sia per la messa a punto di agenti diagnostici in grado di riconoscere il DNA e dare un'informazione più precisa possibile della sequenza di basi azotate di cui è costituito.¹⁰

Nel corso degli anni sono state studiate svariate classi di complessi e, tra queste, i complessi polipiridinici di Ru(II) e Re(I) vengono posti in evidenza come classe di molecole privilegiata per questi campi applicativi. Essi sono stabili, piuttosto solubili in ambiente acquoso e presentano proprietà fotofisiche fortemente influenzabili da variazioni dell'intorno chimico del complesso, come per esempio la presenza di un determinato substrato biologico.¹¹

I dati raccolti nei diversi studi svolti hanno permesso di definire essenzialmente tre tipologie di interazione non-covalente tra complessi metallici e DNA:¹²

- interazione elettrostatica, in cui viene sfruttata l'eventuale natura cationica del complesso per interagire con lo scheletro del DNA, che presenta una distribuzione di carica negativa grazie alla presenza dei gruppi fosfati;
- Interazione idrofobica con il "*minor groove*";
- *Intercalazione* di uno dei leganti tra le basi azotate del "*major groove*" del DNA.

Delle tre, l'interazione di tipo intercalativo è quella più interessante per gli scopi sopra citati, in quanto è forte abbastanza da portare alla formazione di un addotto "DNA-complesso" stabile e quindi sfruttabile dal punto di vista applicativo.

In letteratura viene identificata, in generale, una struttura di complesso "modello" del tipo $[M(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{n+}$, mostrato in figura 9, che presenta tutte le caratteristiche necessarie per l'intercalazione:¹³ oltre ad essere cationico, possiede un legante caratterizzato da un

sistema eterociclico policondensato con un sistema π coniugato molto esteso, in grado di protrudersi verso l'esterno e andare a inserirsi tra le basi azotate del DNA, instaurando con esse un'interazione π - π per dare appunto luogo all'interazione intercalativa. I complessi di questo tipo danno luminescenza in soluzione organica, mentre tale luminescenza viene spenta in soluzione acquosa, poiché lo stato eccitato che si forma viene disattivato dalla formazione di legami ad idrogeno tra il solvente e il legante intercalante.

In presenza di DNA invece, anche in soluzione acquosa si osserva fotoluminescenza: tale fenomeno è dovuto al fatto che, quando il complesso si inserisce nel doppio filamento, il DNA "protegge" i leganti dal solvente acquoso: questo non solo impedisce all'acqua di disattivare gli stati eccitati, ma irrigidisce anche la struttura del complesso limitando la sua possibilità di muoversi e vibrare (e quindi di disperdere energia attraverso fenomeni non radiativi), portando ad un aumento delle proprietà fotoemittive.

È proprio questo effetto, denominato "*molecular light switch*", che rende possibile riscontrare e studiare l'interazione di tipo intercalativo tra il complesso e il DNA, in modo da poterla sfruttare per sviluppare un'ampia gamma di *probes* luminescenti per questo substrato.¹³

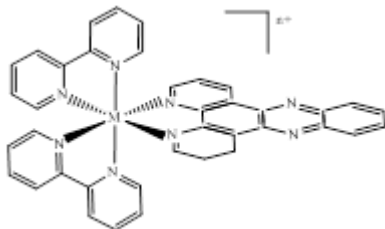


Fig 9: Struttura modello dei complessi di tipo $[M(\text{bipy})_2(\text{dppz})]^{n+}$, dove l'atomo metallico centrale può essere uno ione Ru(II) o Re(I).

In questo contesto dunque, diventa fondamentale riuscire a modulare l'affinità dei complessi nei confronti del DNA, in modo che le proprietà chimico-fisiche e fotofisiche dei complessi stessi possano essere sfruttate per sviluppare dei veri e propri agenti diagnostici.

Partendo da questo presupposto, in questo lavoro di tesi si sono progettati alcuni complessi che possedessero le caratteristiche necessarie per potere in qualche modo interagire con il DNA. Il legante chinolil-tetrazolo, scelto per i vari screening svolti in questo lavoro, è strutturalmente un buon candidato per l'intercalazione: a differenza del legante dppz è monocoordinato, meno ingombrante, ma presenta comunque un sistema aromatico planare

piuttosto esteso, che si protende verso l'esterno della struttura e quindi è potenzialmente in grado di andare ad inserirsi nella doppia elica del DNA. Su questa base si è portata quindi a termine la sintesi di complessi cationici di Re(I) che recassero questo legante nella sfera di coordinazione, per svolgere alcuni studi preliminari del comportamento di tali complessi in presenza di DNA

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la sintesi e la caratterizzazione di complessi tetrazolici di Re(I) da impiegare come *probes* luminescenti per specie di interesse biologico, in particolare per cationi di metalli di transizione come Zn^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} .

Scelta del legante

Tale obiettivo ha portato alla scelta di un legante tetrazolico in grado di coordinare diversi centri metallici con opportune geometrie di coordinazione. Per questi motivi è stato quindi scelto il 2-chinolil-tetrazolo (2-QTZ) che, per la sua struttura, si presta perfettamente come legante polifunzionale (*ditopic ligand*), ovvero in grado di coordinare diversi frammenti metallici.

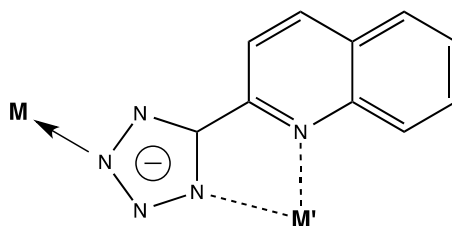


Fig 10: Struttura del legante e schema delle possibili modalità di coordinazione.

In particolare, come si può vedere in figura 10, le modalità di coordinazione possibili sono due: la prima vede l'anione chinolil-tetrazolato agire da legante monocoordinante e quindi interagire con il metallo attraverso un solo azoto, appartenente all'eterociclo (CN_4^-). Il secondo sito di coordinazione è invece costituito da due atomi di azoto, ovvero l' N_4 (equivalente ad N_1) del tetrazolato e l'azoto piridinico della chinolina: questo sito diimminico forma una tasca chelante adatta per ospitare cationi metallici divalenti. In figura 11 si riporta la numerazione scelta come riferimento per quanto riguarda gli atomi di azoto del tetrazolo.

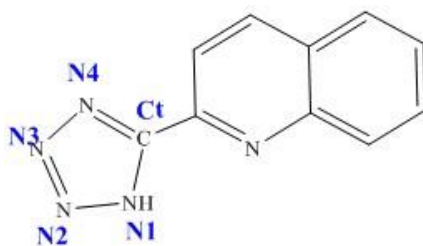
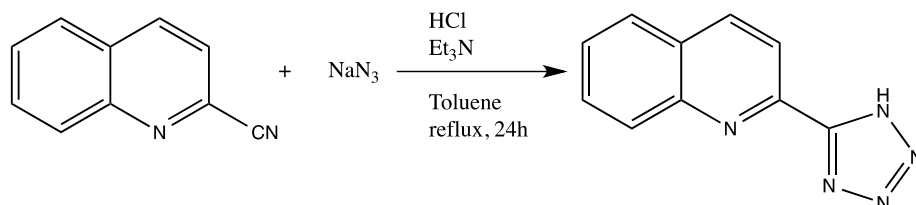


Fig. 11: Numerazione di riferimento degli atomi di azoto tetrazolici.

Il legante è stato ottenuto seguendo la procedura sintetica riportata di seguito (schema 1), che prevede la reazione di ciclizzazione 1,3 dipolare dell'anione azide sul precursore nitrilico.¹⁴

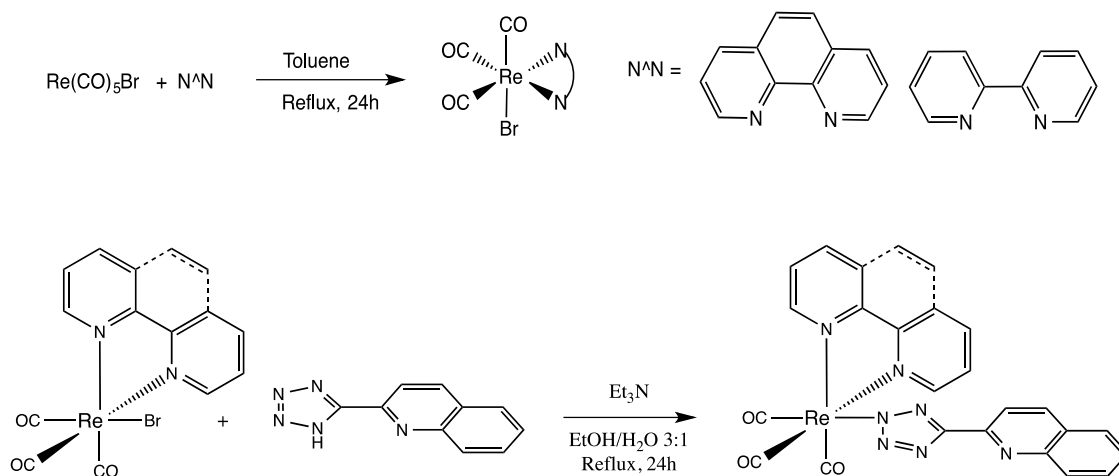


Schema 1

Viste le proprietà acide del gruppo tetrazolico, che si presenta come il corrispondente azotato degli acidi carbossilici, la sua complessazione al centro di Re(I) è stata fatta in seguito a trattamento con base debole.

Sintesi dei complessi di Re(I)

I due complessi neutri $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})]$ e $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bipy})(2\text{-QTZ})]$, (phen = 1,10-fenantrolina; bipy = 2,2'-bipiridina) sono stati sintetizzati seguendo lo schema di reazione 2.



Schema 2

Il punto di partenza per la preparazione dei complessi è la sintesi del precursore metallico, che avviene per reazione di $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ con il legante ancillare ($\text{N}^{\wedge}\text{N}$) ovvero la 1,10-fenantrolina o la 2,2'-bipiridina. Tali precursori vengono poi fatti reagire con l'anione 2-

chinolil tetrazolato (2-QTZ⁻) e i complessi risultanti sono stati isolati per filtrazione della miscela di reazione.

I complessi ottenuti sono stati caratterizzati tramite spettroscopia di massa ESI-MS, spettroscopia IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR e tramite diffrattometria a raggi X.

La caratterizzazione ESI-MS ha permesso di identificare, per entrambi i complessi, la presenza dello ione molecolare ($[M+H^+] = 646 m/z$ per il complesso $[Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$; $[M+H^+] = 623 m/z$ per il complesso $Re(CO)_3(bipy)(2-QTZ)$) e il segnale corrispondente a $[M]+Na^+$ e $[M^+]+K^+$.

Dalla caratterizzazione IR si può riscontrare l'effettiva formazione di due complessi neutri, entrambi recanti i carbonili disposti in conformazione facciale. In figura 12 si riportano gli spettri IR dei complessi $[Re(CO)_3(phen)(Br)]$ e $[Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$: si può vedere come l'avvenuta coordinazione dell'anione tetrazolato comporti il collassamento dei due stretchings A' e A'' in un'unica banda centrata a *ca.* 1922 cm⁻¹.

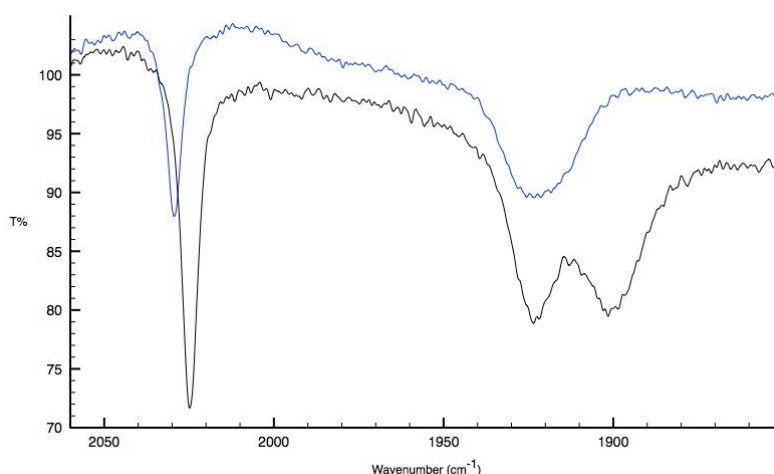


Fig. 12: Spettro IR di $[Re(CO)_3(phen)(Br)]$ Linea nera; $[Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$ linea blu.

La caratterizzazione ¹H-NMR evidenzia la presenza del caratteristico pattern aromatico del legante 2-QTZ compreso tra 7.5 ppm e 8.5 ppm, mentre a campi più bassi, tra 8 ppm e 10 ppm si trova il pattern relativo al legante ancillare N^N che, essendo simmetrico, mostra un numero di segnali pari alla metà del numero di H totali.

In figura 13 vengono riportati lo spettro ¹H-NMR del legante 2-QTZ e, a titolo di esempio, lo spettro del complesso $[fac-Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$.

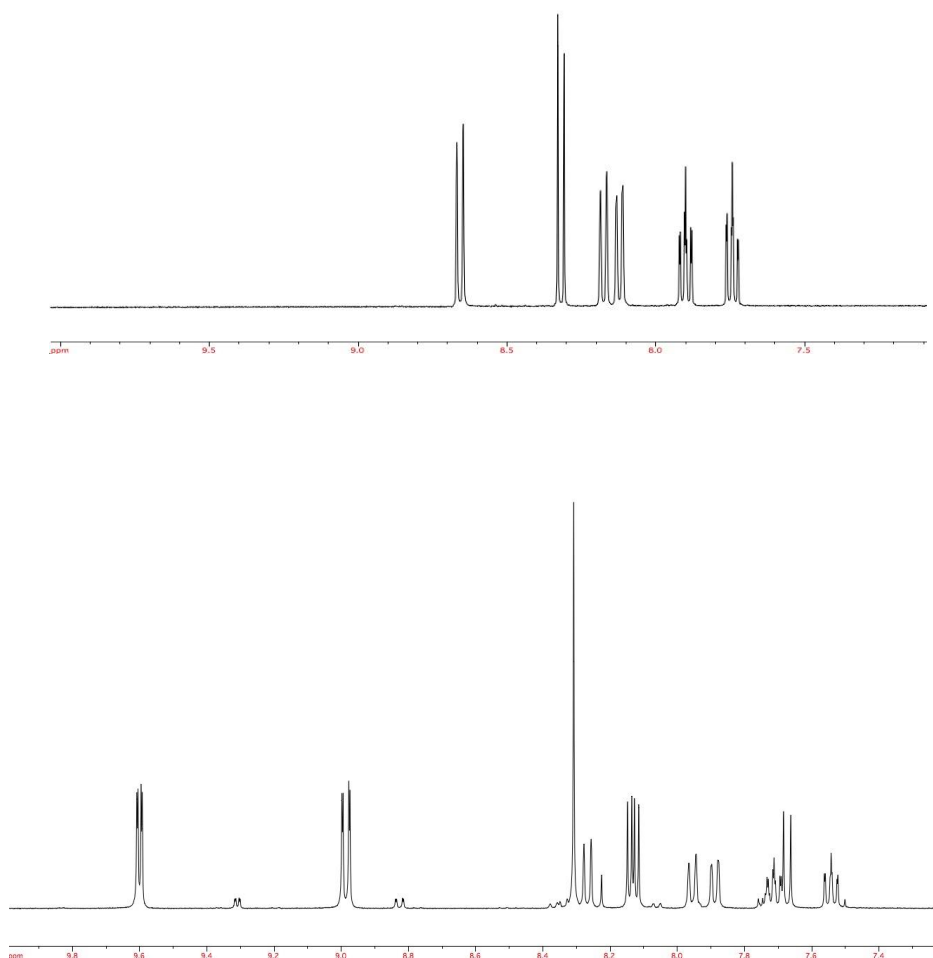


Fig. 13: Spettro $^1\text{H-NMR}$ del legante 2-QTZ (sopra) e del complesso $[\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})]$ (sotto).

L'analisi dello spettro $^{13}\text{C-NMR}$ permette di riscontrare l'effettiva coordinazione al centro metallico del legante 2-QTZ e di avere informazioni precise sulla regioselettività della coordinazione. A questo proposito, il segnale diagnostico è quello corrispondente al carbonio tetrazolico, Ct. Da lavori svolti in precedenza dal gruppo di ricerca² si è potuto constatare come il Ct risuoni diversamente al variare della posizione di coordinazione del legante tetrazolico al centro metallico: in particolare, laddove il centro metallico venga coordinato da N1, il carbonio tetrazolico sarà compreso tra i 152 e i 157 ppm, mentre nel caso in cui la coordinazione avvenga tramite N2, il segnale risuonerà tra i 160 ed i 165 ppm. (fig. 14)

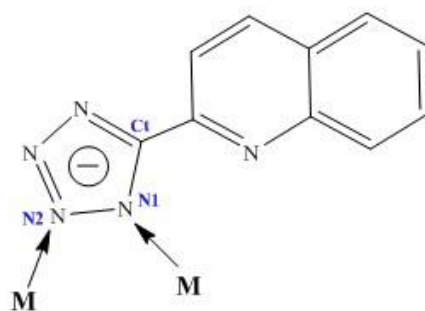


Fig.14: Possibili posizioni di coordinazione del centro metallico all'anione tetrazolato.

Gli spettri ^{13}C -NMR dei complessi neutri sintetizzati hanno confermato come la coordinazione avvenga attraverso la posizione N2. In figura 15 viene riportato come esempio lo spettro relativo al complesso $[\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})]$, in cui si evidenzia il segnale del carbonio tetrazolico a 163.55 ppm.

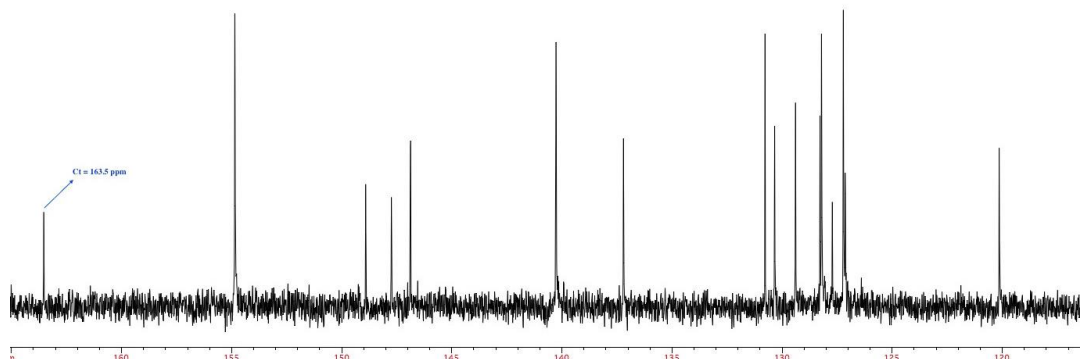


Fig.15: Spettro ^{13}C -NMR del complesso $[\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})]$.

La struttura ai raggi X del complesso $[\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})]$, riportata in figura 16, conferma le attribuzioni effettuate sulla base dalle analisi spettroscopiche sopra riportate: il complesso mostra infatti i carbonili disposti in conformazione facciale ed il legante risulta coordinato al centro di Re(I) mediante l'azoto tetrazolico N2. Inoltre, la struttura permette di osservare come il frammento tetrazolico (N_4C) e gli anelli benzofusi del legante ancillare chinolina siano tra loro coplanari.

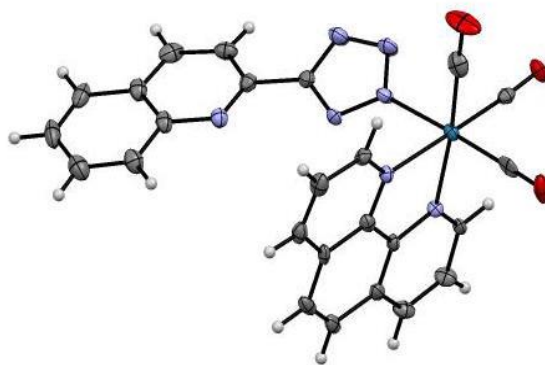


Fig.16: Struttura ai raggi X del complesso [fac-Re(CO)₃(phen)(2-QTZ)].

Reattività verso elettrofili: CH₃⁺, Mⁿ⁺

La reattività nei confronti di specie elettrofile (-CH₃⁺; H⁺) è una caratteristica peculiare dei complessi tetrazolici.^{2,15} Si è potuto constatare che, ad esempio, l'aggiunta di un gruppo -CH₃ a complessi recanti un legante di tipo N₄-fenile-X sia regioselettiva. In particolare, l'attacco elettrofilo avviene esclusivamente all'N4 (equivalente ad N1) dell'anello tetrazolico. A conferma di tale dato, in seguito ad analisi ¹³C-NMR, si è osservato che il Ct risuona nella regione compresa tra 152-157 ppm.

Solamente nel caso di complessi di Re(I), alla metilazione in N4 corrisponde la formazione di due isomeri: in un isomero il Re(I) è legato ad N1, nell'altro isomero si trova invece coordinato ad N2 (fig17).

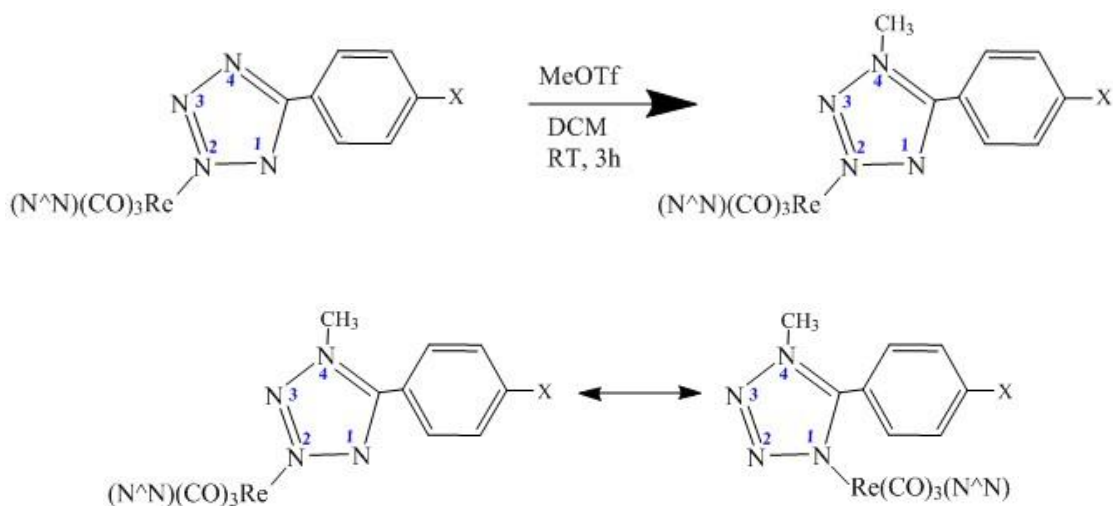
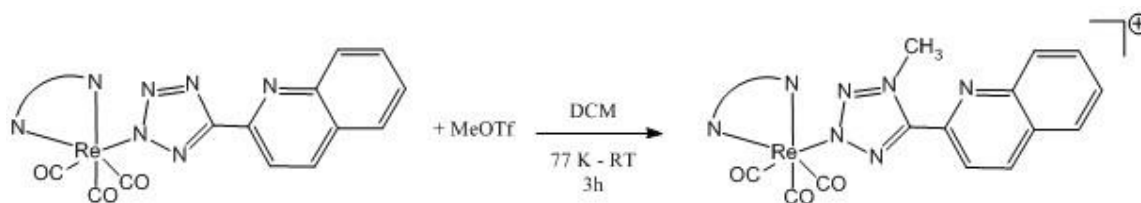


Fig.17: Sopra: reazione di metilazione. Sotto: isomero Re-N2 (sinistra); Isomero Re-N1 (destra).

La formazione dei due isomeri è stata riscontrata in prima analisi mediante spettroscopia NMR (^1H , ^{13}C), i cui risultati evidenziano la formazione di due distinti complessi (prodotti) metilati.

La conferma effettiva si è ottenuta grazie all'analisi delle strutture ottenute per diffrazione di raggi X. Si è osservato come i due isomeri si differenziavano per la presenza del frammento $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})$ all'atomo N1 o N2 dell'anello tetrazolico, mentre il gruppo metilico risultava invariabilmente legato alla posizione N4.

Con l'intento di estendere la casistica di complessi impiegati, si è scelto di utilizzare come legante monocoordinante il 2-QTZ, introducendo quindi un sito competitivo all'interno del complesso, rappresentato dall'azoto chinolinico. Per verificare la reattività dei complessi neutri ottenuti nei confronti del gruppo $-\text{CH}_3^+$, i substrati oggetto di questo studio sono stati sottoposti a reazione di metilazione secondo la procedura riportata nello schema di reazione 3.



Schema 3

A differenza di quanto verificato per i complessi con leganti fenil tetrazolici, la metilazione porta in entrambi i casi ad un unico prodotto finale che non mostra la formazione di isomeri.

I due complessi cationici ottenuti sono stati caratterizzati mediante spettroscopia ESI-MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, IR e tramite diffrattometria a raggi X.

Lo spettro ESI-MS mostra un unico pattern isotopico in ioni positivi ($[\text{M}]^+ = 661 \text{ m/z}$ per $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(1\text{-Me-2-QTZ})]^+$ e $[\text{M}]^+ = 637 \text{ m/z}$ per $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bipy})(1\text{-Me-2-QTZ})]^+$).

La caratterizzazione IR conferma, in entrambi i casi, la formazione di un complesso cationico: le bande relative ai carbonili, infatti, risultano traslate a numeri d'onda più alti rispetto a quelle dei complessi neutri di partenza. Gli spettri IR confermano il mantenimento della disposizione facciale dei carbonili (fig. 18).

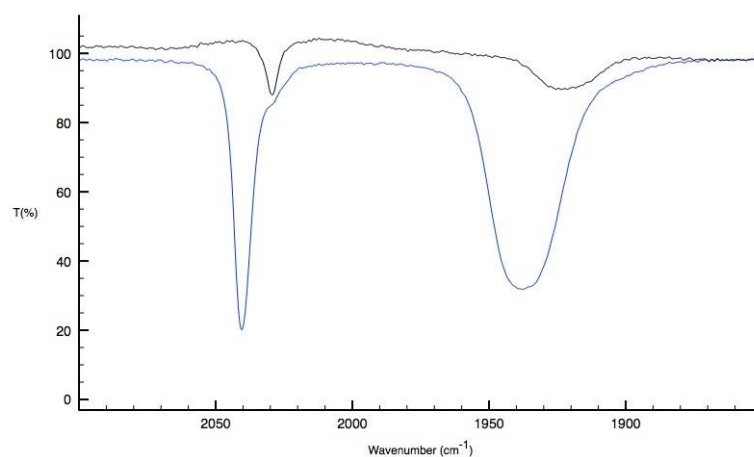


Fig.18: $[Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$ linea nera; $[Re(CO)_3(phen)(1-Me-2-QTZ)]^+$ linea blu.

Lo spettro 1H -NMR mostra la presenza di un solo pattern di segnali relativo ad un unico complesso metilato (fig. 19)

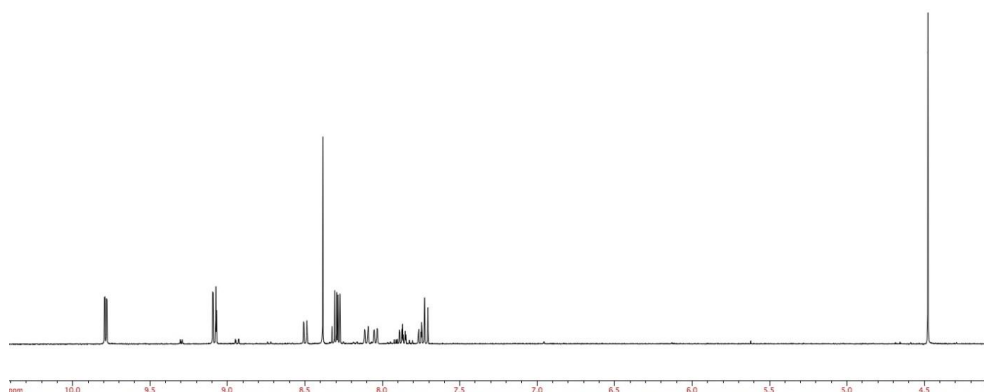


Fig.19: Spettro 1H -NMR del complesso $[Re(CO)_3(phen)(1-Me-2-QTZ)]^+$.

La regioselettività della reazione è stata verificata, anche in questo caso, mediante spettroscopia NMR: lo spettro al carbonio evidenzia la presenza del segnale Ct a 155 ppm, indice dell'avvenuta metilazione all'azoto N4 (N1) del tetrazolo. (fig. 20)

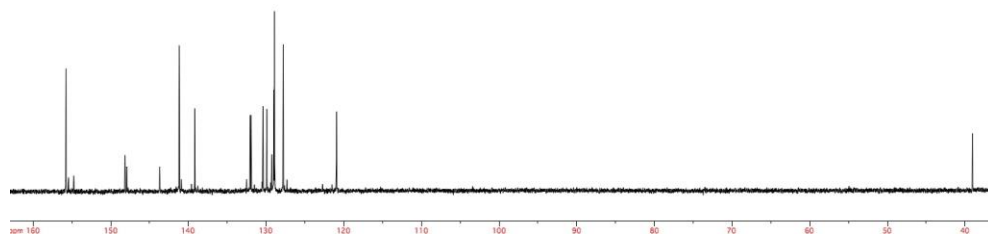


Fig.20: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso $[\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(1\text{-Me-2-QTZ})]$.

A conferma dei dati ottenuti, la struttura ottenuta tramite diffrazione a raggi X, riportata in figura 21.

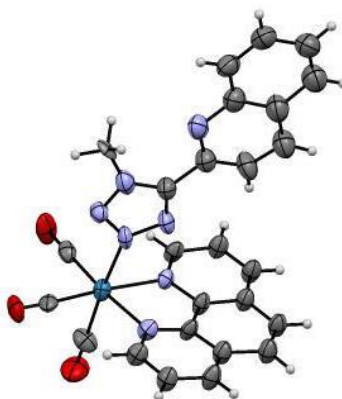


Fig.21: Struttura ai raggi X di $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(1\text{-Me-2-QTZ})]^+$.

Introducendo nella sfera di coordinazione del complesso $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})\text{Br}]$ il legante 2-QTZ previamente metilato in posizione N4, si ottiene un risultato completamente differente. In questo caso infatti si osserva la formazione del complesso $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(1\text{-Me-2-QTZ})]^+$ che si presenta sotto forma di due isomeri distribuiti in rapporto 1:0,69.¹⁶ In figura 22a e 22b si riportano gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso, in cui si possono chiaramente distinguere due pattern, ognuno corrispondente a un distinto isomero.

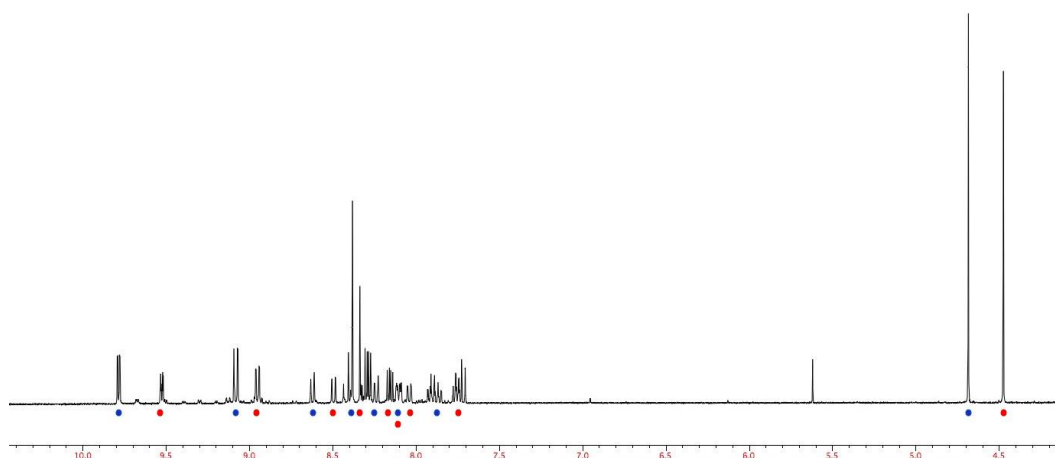


Fig. 22a: Spettro $^1\text{H-NMR}$ dei due isomeri corrispondenti al complesso $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(1\text{-Me-2-QTZ})]^+$

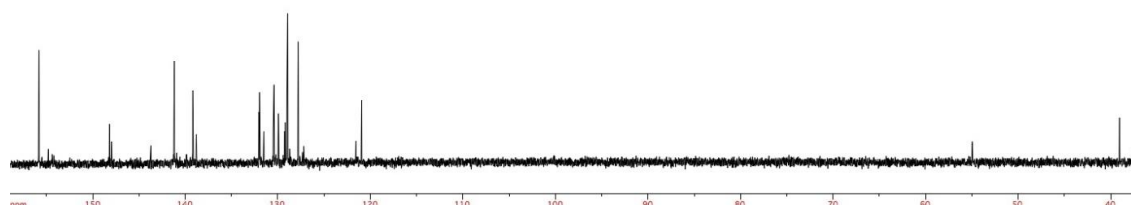
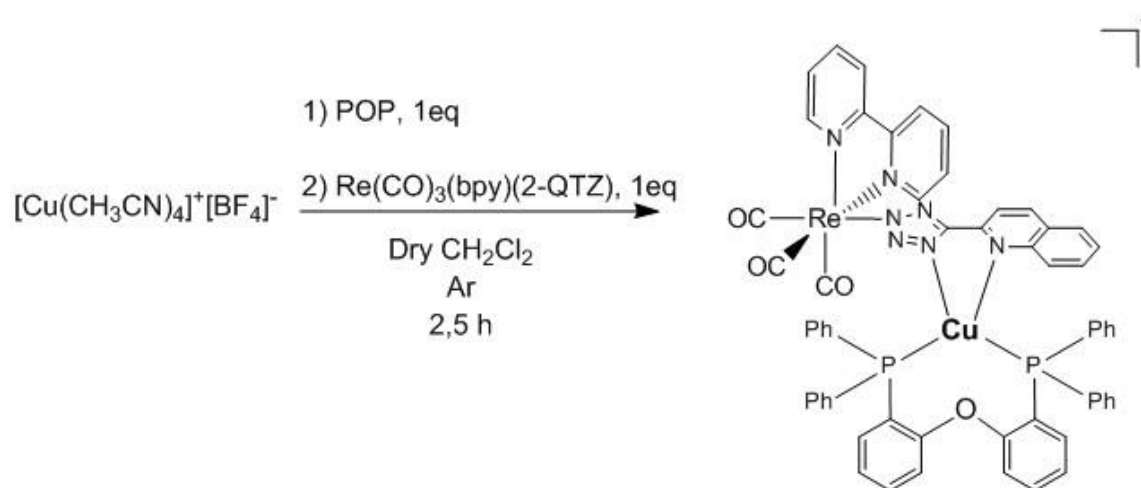


Fig. 22b: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ dei due isomeri corrispondenti al complesso $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(1\text{-Me-2-QTZ})]^+$

L'introduzione di un sito competitivo al gruppo (N_4C), come appunto l'azoto chinolinico influenza quindi la reattività dei complessi di $\text{Re}(\text{I})$ nei confronti di sostituenti elettrofili. Dalla metilazione del complesso neutro si ottiene infatti una singola specie in cui il metile in posizione N_4 viene probabilmente stabilizzato dalla presenza dell'azoto chinolinico. Per approfondire le potenzialità coordinative del sito $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ costituito dall' azoto N_1 del tetrazolo e dall'azoto della chinolina, si è verificata la sua reattività nei confronti dello ione Cu^+ . In particolare è stato utilizzato il frammento $[\text{Cu}(\text{POP})]^+$, in cui lo ione rame è coordinato al bis(2-(difenilfosfino)fenil)etere, una fosfina specifica per la chelazione di un

singolo centro metallico. Secondo la reazione riportata di seguito (schema di reazione 4) è stato isolato il complesso eterodinucleare $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bipy})(2\text{-QTZ})\text{-Cu-POP}^+][\text{BF}_4^-]$, la cui analisi per via diffrattometrica ha portato all'ottenimento della struttura molecolare riportata in figura 23.



Schema 4

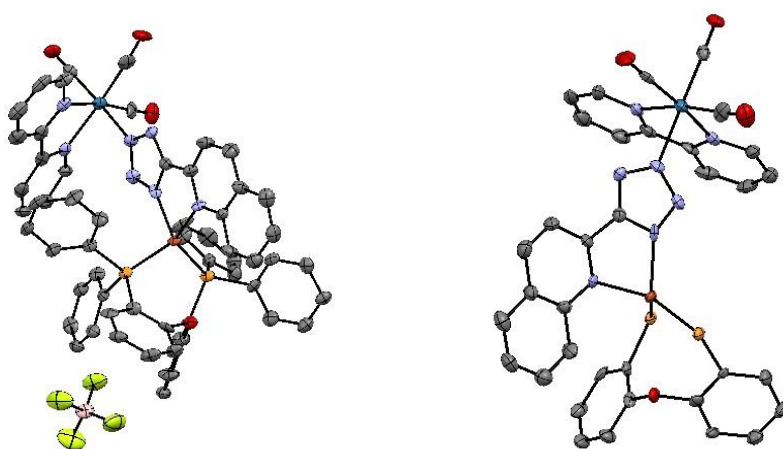
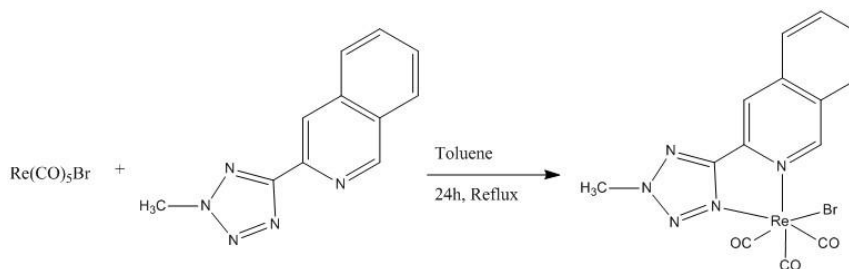


Fig.23: Struttura ai raggi X del complesso Re-Cu-POP (sinistra); La medesima struttura viene mostrata sulla destra in versione semplificata per esaltare la coordinazione Cu-(2QTZ).

Dalla struttura si può vedere come lo ione Cu^+ vada a coordinarsi alla tasca diimminica costituita dal legante 2-QTZ, confermando l'affinità di questo sito verso gli elettrofili, includendo anche cationi metallici.

Un'altra prova in merito alla reattività di questo tipo è stata ottenuta facendo reagire il complesso $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ con legante 2-QTZ previamente metilato in posizione N2, per

ottenere il complesso $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{2-Me-QTZ})$ seguendo la procedura riportata in schema 5.



Schema 5

La formazione del complesso e la sua caratterizzazione permettono di confermare come effettivamente il sito $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ in analisi sia affine alla coordinazione di elettrofili metallici.

Fotofisica dei complessi

Le proprietà fotofisiche dei complessi sintetizzati sono state studiate registrando gli spettri di assorbimento, eccitazione ed emissione. Sono stati inoltre calcolati i tempi di vita e le rese quantiche di emissione.

Lo spettro di assorbimento UV-vis dei complessi neutri mostra la presenza di una banda molto intensa in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra i 240 e i 260 nm, dovuta a transizioni $\pi\text{-}\pi^*$ centrate sui leganti (transizioni LC) mentre a lunghezze d'onda più elevate, in particolare nell'intervallo compreso tra i 370 e i 390 nm, si nota una banda meno intensa, caratteristica delle transizioni a trasferimento di carica *metal-to-ligand-charge-transfer* (MLCT). Il passaggio da specie neutre a specie cationiche (come le specie ottenute per metilazione dei complessi neutri di partenza) porta ad uno spostamento delle bande MLCT verso energie maggiori. In figura 24a e 24b vengono riportati gli spettri di assorbimento dei complessi neutri e viene mostrata la sovrapposizione degli spettri del complesso neutro e cationico.

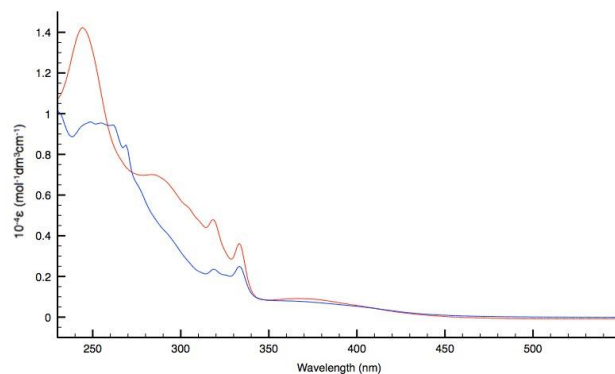


Fig. 24a: Spettri di assorbimento di $[fac-Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$ (linea blu) e $[fac-Re(CO)_3(bipy)(2-QTZ)]$ (linea rossa).

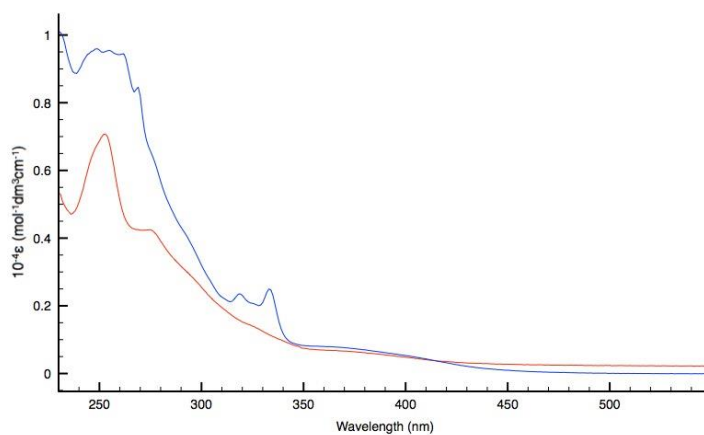


Fig 24b: $[fac-Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$ (linea blu); $[Re(CO)_3(phen)(1-Me-2-QTZ)]^+$ (linea rossa).

In seguito all'eccitazione del massimo di assorbimento MLCT, i complessi mostrano luminescenza. In particolare, gli spettri di emissione mostrano un caratteristico profilo allargato, il cui aspetto è tipico di emissioni risultanti da stati eccitati di tipo MLCT, centrato a circa 590 nm.

La natura MLCT degli stati eccitati da cui deriva l'emissione è confermata registrando gli spettri di emissione a 77K. In tali condizioni si osserva infatti un marcato spostamento verso il blu (*rigidochromic blue-shift*) del massimo di emissione. (fig. 25)

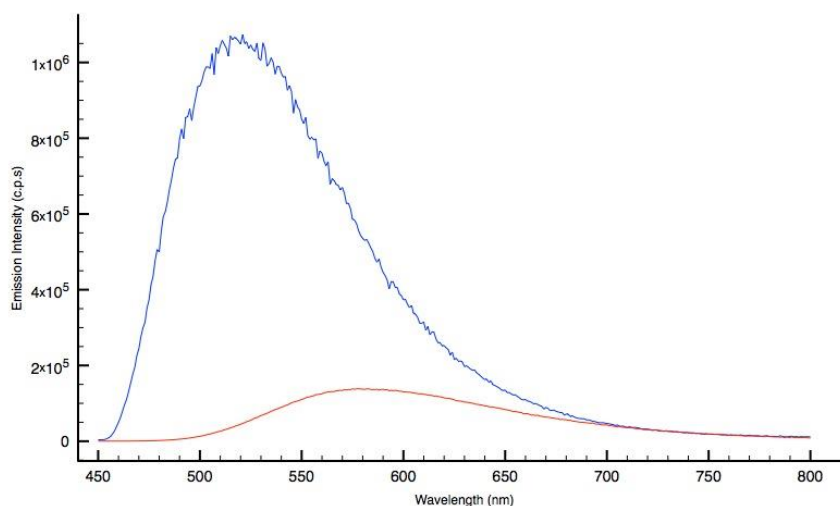


Fig. 25: Sopra: spettro di emissione di [fac-Re(CO)₃(phen)(2-QTZ)] a 298 K (linea rossa) e 77 K (linea blu).

Il carattere fosforescente delle fenomeni radiativi è evidenziato dall'aumento dell'intensità di emissione che si osserva in seguito all'allontanamento di O₂ dalle soluzioni misurate. Da studi precedenti¹⁷ è stato ipotizzato come la partecipazione del leganti tetrazolici nel determinare le proprietà di emissione, ossia sul gap HOMO-LUMO, dei corrispondenti complessi di Re(I) si traduca in una consistente influenza nella composizione del livello HOMO. Tale peculiarità è stata evidenziata sperimentalmente osservando come l'aggiunta di specie elettrofile (i.e. H⁺, CH₃⁺) comportasse variazioni sostanziali nello spettro di emissione dei complessi di Re(I) corrispondenti. Nel caso dei complessi riportati in questo lavoro di tesi, la reazione di metilazione porta a un risultato simile. Il metile infatti, produce una perturbazione dell'intorno chimico del complesso localizzata sul legante tetrazolico: come conseguenza, il massimo di emissione dei complessi metilati subisce uno spostamento verso energie maggiori, la resa quantica aumenta e i tempi di vita si allungano. In figura 26 si riporta il confronto tra lo spettro di emissione del complesso neutro e quello del complesso metilato.

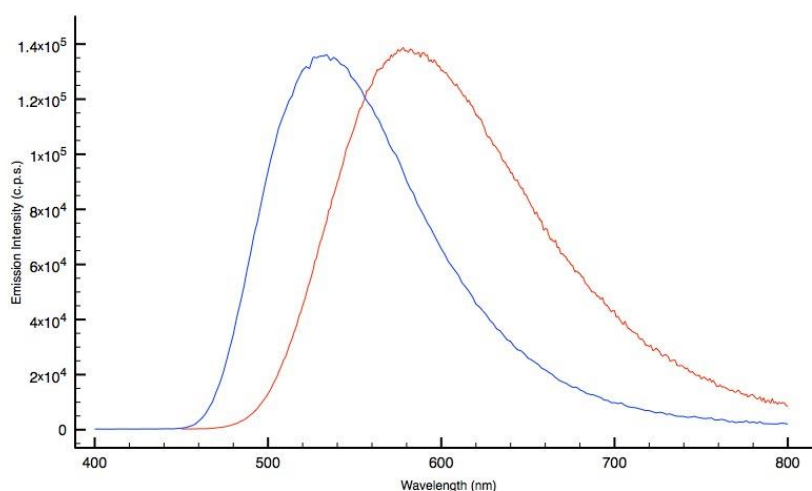


Fig. 26: Spettro di emissione di $[fac-Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$ (linea rossa) e di $[fac-Re(CO)_3(phen)(1-Me-2-QTZ)]^+$ (linea blu).

In tabella 1 si riportano i dati relativi alle caratterizzazioni fotofisiche svolte.

Compleso (Solvente: CH ₂ Cl ₂)	Assorbimento		Emission 298K			Emission 77K		
	λ_{abs} (nm): ($10^{-4} \epsilon$) (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	τ_{air} (ns)	$\tau_{under Ar}$ (ns)	ϕ_{air} (%)	ϕ_{Ar} (%)	λ_{em} (nm)	τ (ns)
<i>Re(CO)₃(phen)-(2-QTZ)</i>	255, 319, 370	580	342	938	6,15	18,8	520	6808
<i>Re(CO)₃(phen)-(1Me-2-QTZ)</i>	252, 374	540	968	2669	4,4	26,4	518, 554	8086
<i>Re(CO)₃(bpy)-(2-QTZ)</i>	244, 318, 370	598	104	128	3,53	5,81	536	6026 (57) 1656 (43)
<i>Re(CO)₃(bpy)-(1Me-2-QTZ)</i>	251, 361	546	963	2894	11	29	480,516, 554	7820
<i>Re(CO)₃(Br)-(2Me-QTZ)</i>	257, 393	678	153	209	0,75	1,06	622	5195

Tabella 1: Dati fotofisici.

Addizione di cationi M²⁺: titolazioni di emissione

Dalle indicazioni sull'affinità del sito coordinativo N^N del legante 2-QTZ nei confronti di specie cationiche si è voluto quindi approfondire il comportamento dei complessi in esame in presenza dei cationi metallici bivalenti Zn²⁺, Cd²⁺ e Cu²⁺, e come questi possano influire sulle loro proprietà fotofisiche. Sono state condotte, a tale scopo, titolazioni in emissione seguendo la procedura riportata di seguito.

Titolazione di [Re(CO)₃(phen)(2-QTZ)]: è stata preparata una soluzione $1,55 \cdot 10^{-4}$ M del complesso in CH₃CN; 2 mL di questa soluzione sono stati trasferiti in una cuvetta di quarzo

e dopo aver registrato lo spettro di emissione e il tempo di vita, si sono effettuate aggiunte progressive della soluzione del catione, registrando lo spettro di emissione dopo ogni aggiunta, ad intervalli regolari di tempo (20 aggiunte da 10 μL con $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ in CH_3CN , $5,37 \cdot 10^{-4}\text{M}$; 60 aggiunte da 10 μL con $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ in CH_3CN , $2,38 \cdot 10^{-4}\text{M}$; 15 aggiunte da 5 μL con $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ in CH_3CN , $2,69 \cdot 10^{-4}\text{M}$).

Titolazione di $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bipy})(2\text{-QTZ})]$: è stata preparata una soluzione $1,61 \cdot 10^{-4}\text{M}$ del complesso in CH_3CN ; 2 mL di questa soluzione sono stati titolati seguendo le modalità sopra descritte (20 aggiunte da 10 μL con $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ in CH_3CN , $5,37 \cdot 10^{-4}\text{M}$; 60 aggiunte da 10 μL con $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ in CH_3CN , $2,38 \cdot 10^{-4}\text{M}$; 15 aggiunte da 5 μL con $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ in CH_3CN , $2,69 \cdot 10^{-4}\text{M}$).

Nella tabella di seguito riportata (tabella 2) vengono raccolti i dati relativi alle titolazioni:

Complesso (Solvente: CH_3CN)	Assorbimento		Emission 298K		
	λ_{abs} (nm): ($10^{-4} \epsilon$) ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	τ_{air} (ns)	$\Delta\lambda$ (nm)	I/I_0
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})$	243, 274, 318, 332	594	107	0	1
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})+\text{Zn}^{2+}$	249, 275, 323, 335	564	324	30	1.55
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})+\text{Cd}^{2+}$	249, 274 323, 336	570	219	24	1.41
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})+\text{Cu}^{2+}$	252, 274, 330	594	107	0	0.00402
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(2\text{-QTZ})$	243, 317, 332	608	48	0	1
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(2\text{-QTZ})+\text{Zn}^{2+}$	250, 319, 336	572	270	36	2.38
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(2\text{-QTZ})+\text{Cd}^{2+}$	248, 319, 337	578	135	30	2.63
$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(2\text{-QTZ})+\text{Cu}^{2+}$	246, 317, 332	608	48	0	0,017

Tabella 2: dati relativi alle titolazioni.

Nel caso dei cationi Zn^{2+} e Cd^{2+} si nota che, con il proseguire delle aggiunte, l'intensità di emissione aumenta progressivamente e contemporaneamente, il massimo di emissione si sposta a energie maggiori. A fine titolazione si ha uno spostamento complessivo del massimo di emissione di 30 nm verso il blu (energie maggiori) per lo Zn^{2+} , mentre il Cd^{2+} induce uno spostamento inferiore di λ_{max} , pari a 24 nm.

In figura 27a e 27b vengono riportati gli andamenti degli spettri di emissione di $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})]$ con il susseguirsi delle aggiunte.

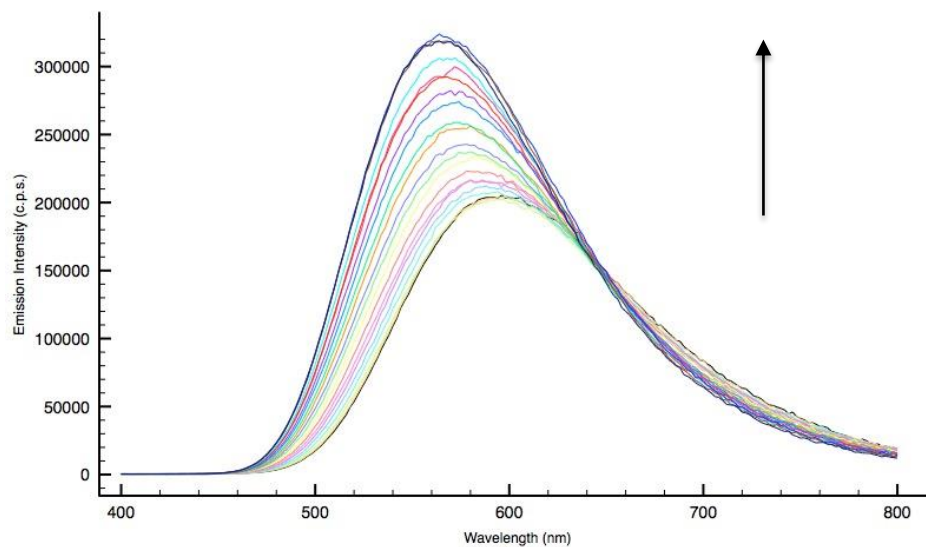


Fig. 27a: $[Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$ ($1,55 \cdot 10^{-4} M$) in CH_3CN , 20 aggiunte da $10 \mu L$ con $Zn(ClO_4)_2$ in CH_3CN , $5,37 \cdot 10^{-4} M$.

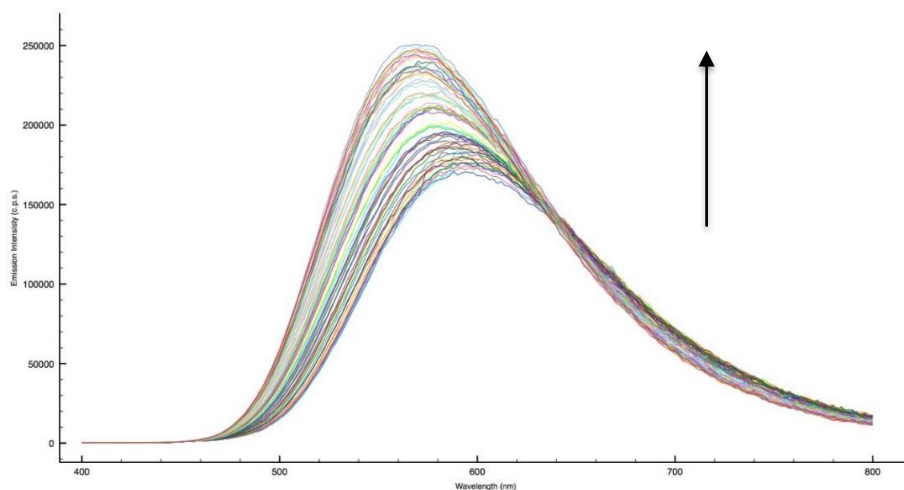


Fig 27b: $[Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$ ($1,55 \cdot 10^{-4} M$) in CH_3CN . 60 aggiunte da $10 \mu L$ con $Cd(ClO_4)_2$ in CH_3CN , $2,38 \cdot 10^{-4} M$.

Lo spostamento del massimo di emissione dei complessi in seguito a titolazione con Zn^{2+} e Cd^{2+} è riscontrabile visivamente anche dalla variazione cromatica della soluzione contenuta all'interno della cuvetta irradiata a 365 nm. (figura 28)

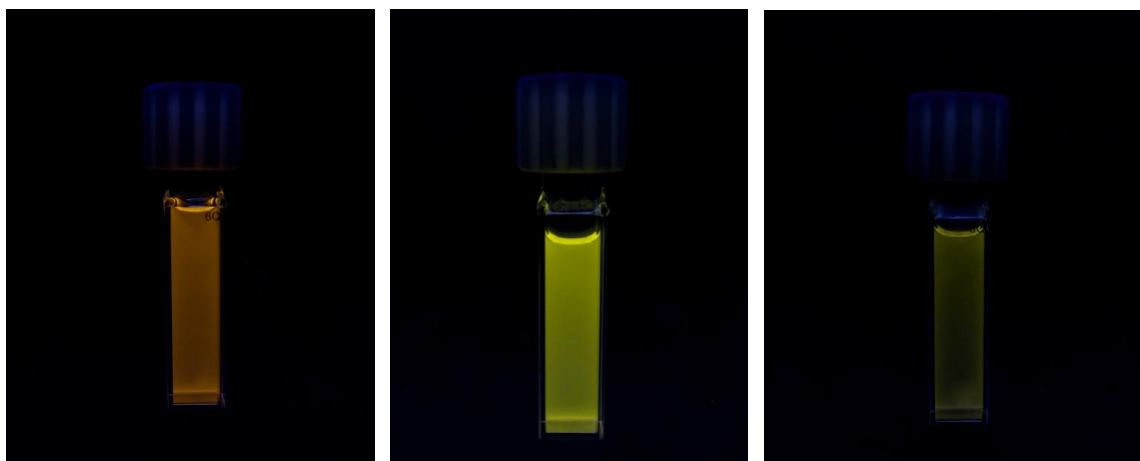


Fig 28: A sinistra: $Re(CO)_3(phen)(2-QTZ) 10^{-5}M, CH_3CN$; al centro: $Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)+Zn^{2+} 10^{-5}M, CH_3CN$; a destra $Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)+Cd^{2+} 10^{-5}M, CH_3CN$.

Al termine delle aggiunte si sono registrati i tempi di vita per compararli con quelli del complesso ad inizio titolazione. In figura 29 si riportano i decays del complesso $Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)$ prima e dopo l'aggiunta dei due cationi: in seguito all'aggiunta di Zn^{2+} il tempo di vita del complesso risulta triplicato rispetto a quello iniziale, mentre titolando con Cd^{2+} il tempo di vita raddoppia.

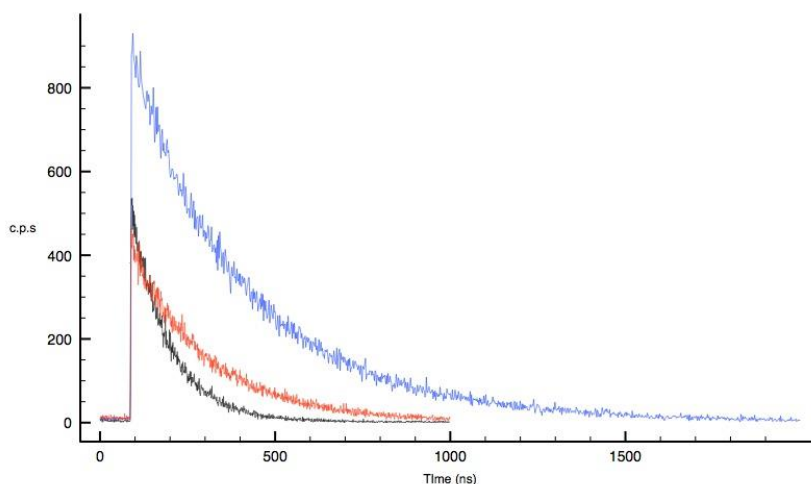


Fig 29: Linea nera: $Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)$, Linea rossa: $Re(CO)_3(phen)(2-QTZ) + 0,6 ml Cd^{2+}$ Linea blu: $Re(CO)_3(phen)(2-QTZ) + 0,2 ml di Zn^{2+}$.

Al termine delle titolazioni si è inoltre calcolato il rapporto Re/M^{2+} per avere indicazioni riguardanti la stechiometria tra le due specie: tale rapporto è pari a 3 per lo ione Zn^{2+} e pari

a 2 per Cd^{2+} . Il rapporto stechiometrico ottenuto indica come i due cationi metallici vadano a coordinare i complessi in maniera differente: probabilmente ogni ione Zn(II) coordina 3 complessi di Re(I) , che si dispongono in geometria ottaedrica mentre per ogni ione Cd(II) si hanno 2 complessi che potrebbero essere disposti a tetraedro oppure ai vertici di un ottaedro, in cui gli altri due siti vengono occupati dall'acqua di coordinazione.

Le differenze nello spostamento complessivo del massimo di emissione λ_{max} , nel rapporto Re/M^{2+} e nel tempo di vita finale τ , sono gli unici dati che permettono di fare una distinzione tra i due cationi, partendo dal presupposto che discriminare Zn^{2+} e Cd^{2+} è un'operazione molto complessa in quanto i due cationi sono chimicamente e dimensionalmente molto simili. Questa similitudine, dopo tutto, è proprio il fattore che rende il cadmio tossico nei confronti degli organismi viventi.

Titolando i complessi con lo ione Cu^{2+} , invece, si ottiene un risultato del tutto differente. Mano a mano che si procede con le aggiunte, infatti, l'intensità di emissione del complesso cala progressivamente, arrivando a spegnimento. (fig. 30)

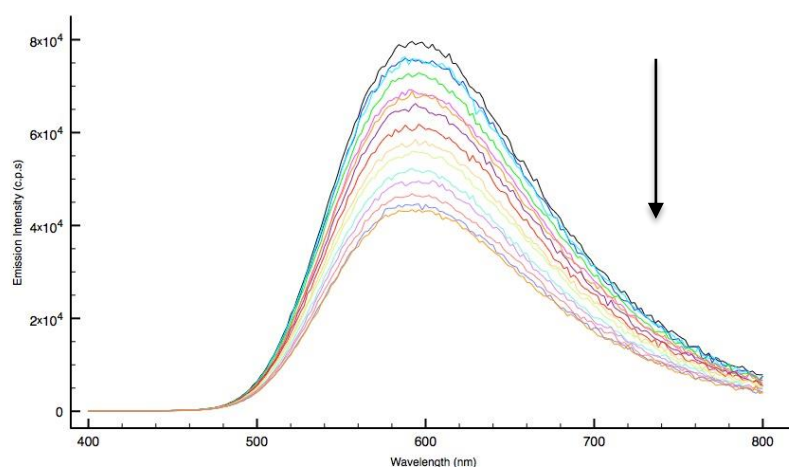


Fig. 30: Andamento dell'intensità di emissione del complesso $\text{Re(CO)}_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})$ al procedere delle aggiunte di Cu^{2+} .

L'intensità di emissione può diminuire per effetto di molti fattori. Tale fenomeno è noto come *quenching* ed avviene per effetto di una seconda sostanza, detta *quencher* che nel caso dei complessi in esame è appunto lo ione Cu^{2+} . I processi che portano a spegnimento dell'emissione sono vari, come reazioni chimiche che avvengono quando il sistema considerato è allo stato eccitato, la formazione di complessi stabili tra fluoroforo e *quencher*, trasferimento di energia (*Energy Transfer, Electron Transfer*).

I meccanismi di quenching si dicono dinamici se dipendono dalla velocità di diffusione del *quencher* verso il fluoroforo, statici se sono indipendenti dai processi diffusivi. Il quenching collisionale è un tipico processo dinamico mentre il trasferimento di energia o di carica dovuto alla formazione di complessi è un tipico processo statico.

Il quenching collisionale è descritto dall'equazione di Stern Volmer:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q]$$

dove I_0/I è il rapporto tra gli integrali degli spettri di emissione del fluoroforo (I_0) e del fluoroforo in presenza del quencher; K_{SV} è la costante di Stern Volmer ($K_{SV} = k_q\tau_0$, dove k_q = costante di quenching bimolecolare), $[Q]$ è la concentrazione (mol/L) del quencher.

Secondo l'equazione di Stern Volmer, il rapporto I_0/I dipende linearmente dalla concentrazione di quencher $[Q]$ con pendenza pari alla costante di quenching K_{SV} . per quenching di tipo dinamico.

In alcuni casi, il fluoroforo può formare un complesso stabile con il quencher. Se lo stato fondamentale del quencher non è emittivo, allora si rientra nel caso di quenching di tipo statico. In questo caso, l'intensità di emissione (I_0/I) è correlabile alla concentrazione di quencher $[Q]$ mediante la relazione:

$$I_0/I = 1 + K_a[Q]$$

dove K_a è la costante di associazione del complesso che si forma in seguito all'interazione fluoroforo – quencher.

Nel quenching statico, il tempo di vita τ non è alterato dal quencher, in quanto è la frazione di fluoroforo i cui fotoni possono raggiungere il rivelatore ad essere diminuita dall'azione complessante del quencher.

Nel caso in cui intervengano processi di quenching dell'emissione sia di tipo statico che dinamico, date le relazioni descritte in precedenza, si avrà che:

$$I_0/I = (1 + k_q \tau_0[Q]) (1 + K_a[Q])$$

Andando a misurare i tempi di vita dei complessi di $Re(I)$ in esame in seguito ad ogni aggiunta di Cu^{2+} , si è notato come questi restino invariati. A conferma del dato, è stato quindi tracciato il grafico di Stern Volmer (fig.31) che correla il rapporto tra gli integrali degli spettri di emissione ad inizio titolazione e ad ogni aggiunta con la concentrazione di quencher presente in cuvetta (I_0/I vs $[Cu^{2+}]$, dati in tabella 3)

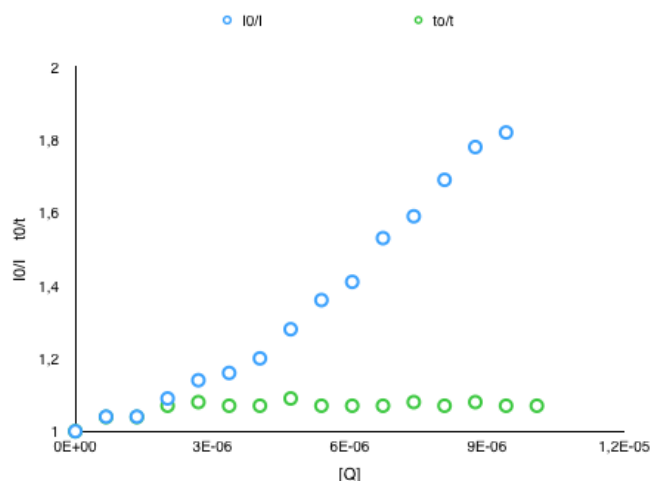


Fig.31: grafico di Stern-Volmer relativo alla titolazione con Cu^{2+} .

V aggiunto (μL)	I_0/I	τ_0/τ	$[\text{Cu}^{2+}] \text{ mol L}^{-1}$
0	1	1	0
5	1,04	1,039	$6,725 \cdot 10^{-7}$
10	1,04	1,039	$1,345 \cdot 10^{-6}$
15	1,09	1,07	$2,0175 \cdot 10^{-6}$
20	1,14	1,08	$2,69 \cdot 10^{-6}$
25	1,16	1,07	$3,3625 \cdot 10^{-6}$
30	1,20	1,07	$4,035 \cdot 10^{-6}$
35	1,28	1,09	$4,7075 \cdot 10^{-6}$
40	1,36	1,07	$5,38 \cdot 10^{-6}$
45	1,41	1,07	$6,0525 \cdot 10^{-6}$
50	1,53	1,07	$6,725 \cdot 10^{-6}$
55	1,59	1,08	$7,3975 \cdot 10^{-6}$
60	1,69	1,07	$8,07 \cdot 10^{-6}$
65	1,78	1,08	$8,7425 \cdot 10^{-6}$
70	1,82	1,07	$9,415 \cdot 10^{-6}$
75	2,04	1,07	$1,0088 \cdot 10^{-5}$

Tabella 3: dati relativi alla titolazione con Cu^{2+} .

L'andamento ottenuto suggerisce come lo spegnimento dell'emissione dei complessi sia ascrivibile a una commistione di processi di tipo statico e dinamico in cui l'intervento di un processo di *energy transfer* tra i centri metallici determina un contributo considerevole. Un' indicazione in tal senso era stata riscontrata dall'analisi degli spettri di emissione del complesso Re-Cu(I).

I dati raccolti nelle varie prove mostrano come, in seguito all'aggiunta di cationi bivalenti al complesso, si formi un addotto di tipo $[\text{Re}(2\text{-QTZ})\text{-M}^{2+}]$ che presenta proprietà fotofisiche sostanzialmente differenti rispetto al complesso di partenza.

Zn^{2+} e Cd^{2+} inducono variazioni molto simili: questi due cationi, andando a collocarsi nella

tasca diiminica del legante 2-QTZ, vanno a perturbare l'intorno chimico del legante tetrazolico e quindi ad influire sulle proprietà emittive del complesso secondo le modalità precedentemente descritte in merito all'effetto della metilazione.

Per quanto riguarda il Cu^{2+} invece, la fotofisica dell'addotto formato viene regolata dal fatto che lo ione rameico sia non emittivo, causando quindi il quenching dell'emissione Re(I) centrata.

Prove di uptake cellulare

Alcuni test svolti in precedenza dal gruppo di ricerca hanno mostrato come i complessi tetrazolici di Re(I) abbiano affinità per i compartimenti di natura lipidica ("lipid droplets") presenti all'interno delle cellule esaminate.⁸

Sulla base di ciò, si sono svolte delle prove di uptake cellulare per i complessi sintetizzati. Come substrato biologico è stato utilizzato un lievito, *Yarrowia lipolytica*, (YW) che è stato scelto in virtù della sua grande capacità di accumulo di lipidi e della sua struttura cellulare molto semplice e quindi adatta a delle prove preliminari.

L'eventuale affinità dei complessi verso questo substrato è stata verificata tramite microscopia confocale a fluorescenza: in particolare, si sono registrate le immagini del campione di lievito prima e dopo incubazione con il complesso. (Fig. 32)

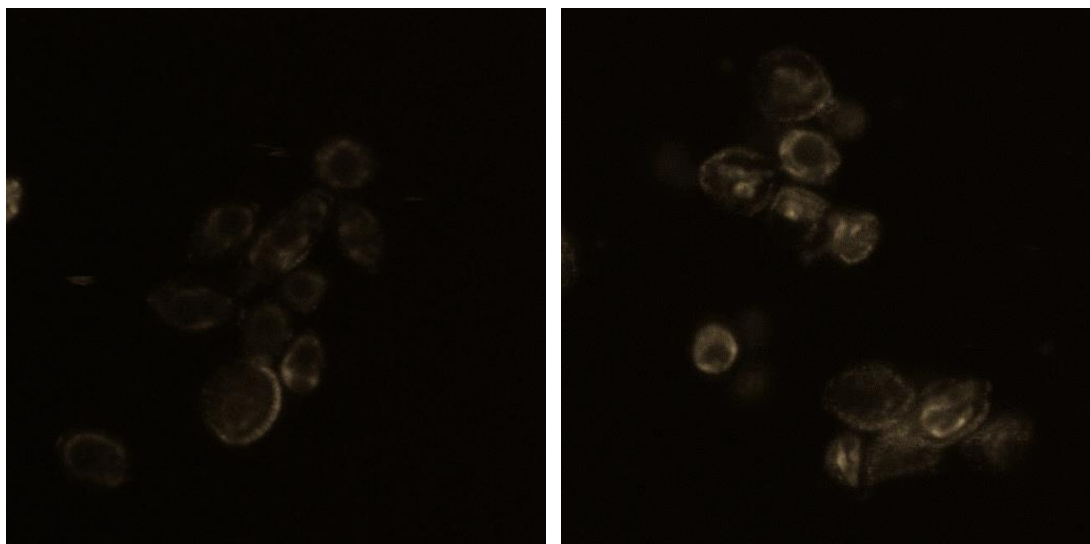


Fig. 32: Sinistra: YW; destra: YW incubati con il complesso $[\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(2\text{-QTZ})]$.

Dalle immagini si può vedere come i lieviti in assenza di complesso mostrino una fluorescenza molto scarsa, ascrivibile al fenomeno di autofluorescenza cellulare. In presenza di complesso invece si possono chiaramente visualizzare delle zone luminose che

sono date dalla luminescenza del complesso: tali zone sono essenzialmente confinate nella parte lipidica della cellula, mentre il nucleo, collocabile nella parte centrale del lievito, rimane oscurato.

In seguito, ai lieviti incubati con il complesso è stata aggiunta una soluzione di Zn^{2+} . Registrando le immagini (fig. 33) si è potuto constatare come, parità di condizioni sperimentali e di set up dello strumento, la luminescenza fornita dal complesso in presenza di Zinco sia più intensa, confermando il dato ottenuto dalle titolazioni in emissione.

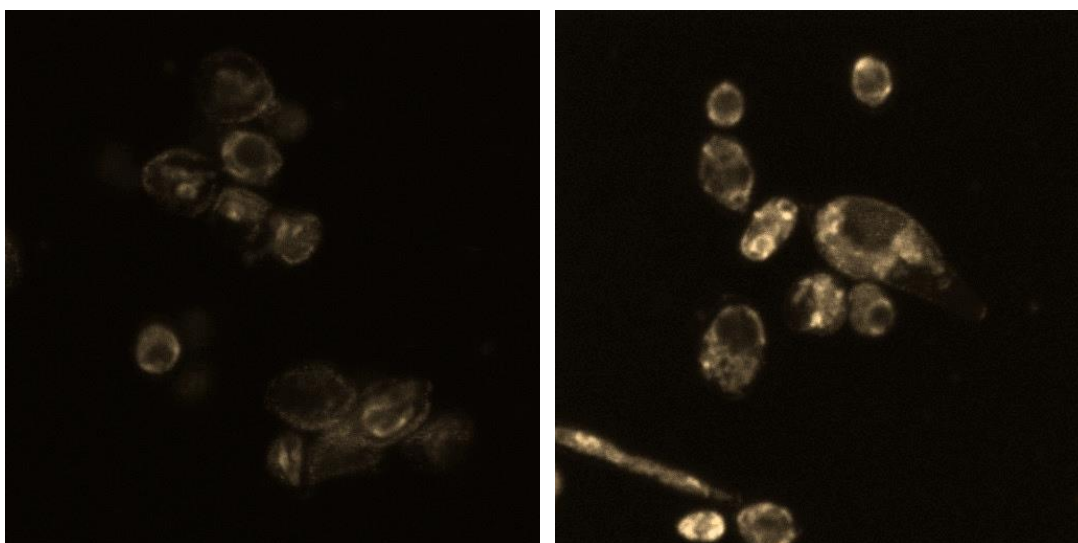


Fig. 33: Sinistra: YW + $[fac-Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)]$; destra: YW + $[fac-Re(CO)_3(phen)(2-QTZ)] + Zn^{2+}$.

Le prove svolte permettono quindi di riscontrare l'affinità dei complessi sintetizzati nei confronti di un substrato cellulare. In particolare, si può notare come questi diano una localizzazione citoplasmatica che conferma l'affinità verso i compartimenti di natura lipidica.

Interazione con DNA: prove preliminari

È ormai noto come alcune classi di complessi metallorganici a base di Re(I) si prestino all'interazione con la doppia elica del DNA. Il design di un complesso che dia luogo a questa interazione richiede il bilancio diversi fattori chimico-fisici e strutturali relativi alla scelta dello ione metallico, alla carica del complesso e al tipo di leganti che compaiono nella sfera di coordinazione.

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati due complessi cationici, $[Re(CO)_3(phen)-(1Me-2-QTZ)]^+$ e $[Re(CO)_3(bipy)-(1Me-2-QTZ)]^+$: considerando la loro natura cationica e

la presenza del legante 2-QTZ, dotato di un sistema eterociclico aromatico planare e abbastanza esteso, si è voluta ricercare, in via del tutto preliminare, un'eventuale interazione con il DNA.

A tale scopo sono state svolte delle titolazioni di emissione dei -complessi con DNA.

- Titolazione di $[fac-Re(CO)_3(phen)(1Me-2-QTZ)]$: è stata preparata una soluzione $1,51 \cdot 10^{-4}$ M del complesso in acqua; 2 mL di questa soluzione sono stati trasferiti in una cuvetta di quarzo e, dopo aver registrato lo spettro di emissione, si sono effettuate aggiunte progressive di DNA registrando lo spettro di emissione dopo ogni aggiunta, ad intervalli regolari di tempo (10 aggiunte da 5 μ L di DNA in soluzione acquosa, 2mg/mL)

In figura 34 si riportano a titolo di esempio gli spettri relativi alla titolazione del complesso $[fac-Re(CO)_3(phen)(1Me-2-QTZ)]^+$.

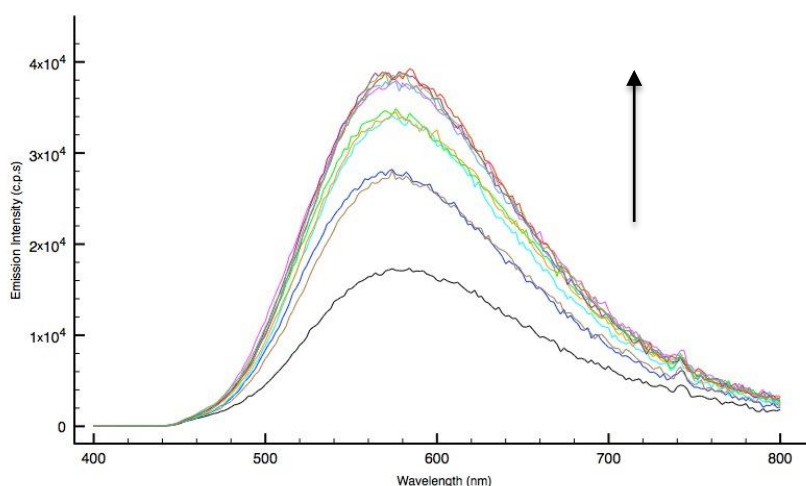


Fig 34: Titolazione del complesso $[Re(CO)_3(phen)(1-Me-2-QTZ)]^+$ con DNA.

Con il proseguire delle aggiunte, l'intensità di emissione del complesso aumenta fino a stabilizzarsi verso la fine della titolazione, suggerendo quindi l'intervento di un'interazione tra complesso e substrato.

Sebbene le prove svolte siano preliminari, i dati ottenuti permettono di riscontrare un'affinità tra complesso e DNA che può essere ulteriormente indagata.

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi sperimentale ha prodotto risultati di notevole importanza in merito allo studio della reattività dei complessi tetrazolici di Re(I) nei confronti di specie elettrofile, delineando la validità generale di un approccio rivolto alla determinazione della struttura dei prodotti di addizione elettrofila e, soprattutto, alla variazione delle proprietà di luminescenza dei complessi in seguito all'intervento di tali interazioni. Con lo scopo fondamentale di volere allargare la casistica degli elettrofilici impiegati verso cationi divalenti di interesse biologico e tossicologico, sono stati progettati, preparati e caratterizzati nuovi complessi tetrazolici di Re(I), il cui possibile utilizzo come sensori luminescenti è stato verificato nei confronti di ioni quali Zn(II), Cd(II) e Cu(II). È stato infatti dimostrato come l'introduzione di leganti tetrazolici strutturati appositamente per dare una interazione ben definita nei confronti di tali ioni, porti a complessi di Re(I) in grado di segnalarne la presenza in seguito a variazioni sostanziali delle proprietà fotoemittive. In particolare, è stato osservato come l'interazione dei complessi tetrazolici di Re(I) con Zn(II) e Cd(II) comporti lo spostamento verso energia maggiore del profilo di emissione dei complessi stessi, effetto accompagnato da un incremento dell'intensità di emissione e dal concomitante allungamento dei tempi di vita di fosforescenza. Un comportamento di natura diametralmente opposta è stato riscontrato nel caso dello ione Cu(II), la cui addizione comporta il completo spegnimento (*quenching*) della emissione dei complessi di Re(I). Si è quindi avuta una prima e fondamentale indicazione a riguardo del ruolo doppio – recettore di cationi divalenti e segnalatore dell'avvenuta interazione - esercitato dal legante tetrazolico in questi complessi di Re(I).

Si è voluto quindi estendere l'insieme di questi risultati ad un contesto biologico con prove *in vivo*. In particolare, le proprietà fotoemittive dei complessi sono state verificate in ambiente acquoso in presenza di un substrato cellulare rappresentato dal lievito *Yarrowia lipolytica* (YW), la cui scelta è stata dettata dalla sua capacità di accumulo di lipidi e della sua struttura cellulare molto semplice. Con l'ausilio della microscopia confocale è stato possibile appurare che il complesso neutro tetrazolico di Re(I) preso in esame sia stato effettivamente in grado di penetrare la membrana cellulare e che, una volta all'interno delle cellule, si sia localizzato preferenzialmente nei corpi lipidici. A ulteriore riprova delle potenzialità di *luminescent sensing* intracellulare dei complessi, una intensità di emissione notevolmente incrementata è stata osservata quando il complesso di Re(I) tetrazolico in esame è stato introdotto in cellule precedentemente incubate con un sale di Zn(II).

A complemento degli studi in ambito biologico e in via del tutto preliminare, è stata valutata la responsività delle performances fotoemittive dei complessi nei confronti di un'altra macromolecola biologicamente rilevante quale il DNA. Le prime prove effettuate indicano come anche in questi casi l'emissione dei complessi tetrazolici di Re(I) possa essere modulata in seguito all'interazione con il DNA, con modalità e intensità che dovranno essere necessariamente analizzati e studiati in futuro.

PARTE SPERIMENTALE

Procedura generale

Le reazioni, ove necessario, sono state condotte in atmosfera inerte utilizzando una linea vuoto-argon. I solventi utilizzati durante le sintesi: CH₂Cl₂, CH₃OH, CH₃CN, Toluene, THF (Sigma Aldrich) ed Et₃N (Alfa Aesar), sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. I reagenti: NaN₃, HCl, 1,10 fenantrolina, Br₂, CH₃I, CH₃OSO₂CF₃, NH₄PF₆, 2(clorometil)-piridina (Sigma Aldrich); Quinoline 2-carbonitrile, AgBF₄, AgPF₆, (Alfa Aesar); Re₂(CO)₁₀, Zn(ClO₄)₂*6H₂O, Cd(ClO₄)₂*6H₂O, Cu(ClO₄)₂*6H₂O (Strem Chemicals); 2,2'-bipridina (Flucka); K₂CO₃ (Carlo Erba), bis(2-(difenil(fosfino)fenil)etere (Aldrich) sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Il gel di silice utilizzato nelle cromatografie (40-63 μm, Merck) e la celite impiegata nelle filtrazioni sono stati utilizzati senza trattamenti ulteriori. I prodotti sono stati caratterizzati attraverso spettroscopia NMR, IR, UV-Vis ed ESI-MS. Gli spettri NMR sono stati registrati a 298K impiegando gli strumenti Varian Gemini XL300 (¹H, 300 MHz; ¹³C, 75.5 MHz), Varian Mercury Plus VX400 (¹H, 399.9 MHz, ¹³C, 100.6 MHz). Tutti i valori di chemical shift sono riportati in ppm (scala δ) ricorrendo, come standard interno, alla risonanza del residuo protonico non deuterato: CDCl₃ (7.26 ppm), DMSO-*d*⁶ (1.93 ppm), Acetone-*d*⁶ (2.05 ppm). I solventi deuterati utilizzati (Euriso-top) sono stati impiegati senza ulteriori purificazioni. Gli spettri IR sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro FT-IR Perkin Elmer-Spectrum One utilizzando una cella di NaCl (spessore 1mm). Gli spettri UV-Vis sono stati registrati su spettrofotometro a doppio raggio VARIAN CARY IE, utilizzando cuvette di quarzo di spessore 1.00 cm ed una larghezza di banda superiore (SBW) pari a 1.0 nm. Le analisi ESI-MS sono state eseguite per iniezione diretta di una soluzione di CH₃CN dei composti impiegando uno spettrometro di massa WATERS ZQ 4000.

Gli spettri di emissione sono stati registrati con uno spettrofluorimetro Edinburgh FLS920P dotato di una lampada ad arco di xeno, un monocromatore a doppia eccitazione e singola emissione, un tubo fotomoltiplicatore Hamamatsu R928P (185-850 nm) con raffreddamento Peltier. Gli spettri di eccitazione ed emissione sono stati corretti per intensità della sorgente (lampada e reticolo) e risposta spettrale di emissione (detector e reticolo) mediante una curva di calibrazione dello strumento. I tempi di vita sono stati determinati con lo stesso strumento mediante la tecnica Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC), usando come fonte di eccitazione dispositivi LED (EPLD 369, FWHM <800 ps, repetition rate compreso tra 10 kHz e 1 MHz) ed il tubo

fotomoltiplicatore come detector. Le misure effettuate in assenza di ossigeno sono effettuate dopo aver degasato le soluzioni per 10 minuti in atmosfera di Ar utilizzando una cuvetta in quarzo dotata di setto in silicone. Gli spettri di emissione a 77K sono stati registrati impiegando un tubo portacampione in quarzo posto all'interno di un apposito dewar contenente azoto liquido.

Le rese quantiche di emissione (Φ_s) sono state determinate mediante il metodo delle soluzioni otticamente diluite riportato da Crosby e Demas¹⁸ impiegando una soluzione madre avente assorbanza > 0.1 ; sono state quindi ottenute due soluzioni diluite con fattori 1:20 ed 1:10, corrispondenti a valori di assorbanza prossimi rispettivamente a 0,02 e 0,08. La legge di Lambert-Beer è stata considerata quindi rientrante nell'intervallo di linearità alle concentrazioni delle soluzioni utilizzate.

Una soluzione di $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}[\text{Cl}]^-/\text{H}_2\text{O}$ ($\Phi_r = 0.028$) è stata utilizzata come riferimento.

La resa quantica di emissione è stata quindi calcolata utilizzando la relazione:

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

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

Le immagini di microscopia confocale sono state ottenute impiegando un microscopio Zeiss LSM-700 equipaggiato con un laser avente $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm come sorgente di eccitazione del campione ed un obiettivo ad immersione Zeiss-Plan Apochromat 63x, 1.4 N.A-Oil, M27. Per tutti i campioni analizzati il diametro del pinhole è stato ottimizzato ad un valore pari a 1.01 A.U (Airy Unit/Airy Disk = pattern di diffrazione generato da un oggetto osservato al microscopio), i valori di gain (*white level*) ed offset (*black level*) regolati in modo tale da aumentare il rapporto S/N, intensità laser pari al 10% della potenza massima per evitare fenomeni di *photobleaching* del campione, risoluzione = 16-bit

(65536 grey levels), scanning zoom = 2.5X. Non essendo possibile distinguere la λ_{emi} dei campioni analizzati, quindi il colore emesso, la colorazione delle immagini proposte è frutto di un lavoro di post-produzione con lo scopo di rendere più intuitiva la loro lettura.

Per quanto riguarda le colture dei lieviti, colonie singole di *Yarrowia lipolytica* (ceppo Po1g) sono cresciute in terreno solido YPD (10 g/L estratto di lievito, 20 g/L bactopectone, 20 g/L glucosio, 15 g/L agar) a 30 °C per 48 h sono state inoculate in 2 ml di terreno liquido YNB (6.7 g/L yeast nitrogen base, pH 6) addizionato di glicerina vegetale 2 % (w/v) e mantenute in crescita a 30° C per 24 h con un'agitazione di 200 rpm.

Le colture liquide così ottenute sono state rilanciate (diluizione 1:100) in 20 mL di terreno liquido minimo (1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $MgSO_4$, 0.1 g/L $CaCl_2$, 0.1 g/L $NaCl$, urea 0.5 g/L, 200 mg/L tiamina, 8 mg/L biotina) e cresciute nelle medesime condizioni di temperatura ed agitazione per 120 h.

Aliquote da 1 mL di coltura sono state centrifugate a 4.500 g per 20 min, ed i pellet cellulari sono stati risospesi in un volume opportuno di acqua per la visualizzazione al microscopio. Per quanto riguarda il DNA, si è utilizzato *salmon sperm* genomico sonicato.

Abbreviazioni utilizzate:

Et₂O = etere dietilico;

DCM = diclorometano;

EtOH = etanolo;

Me = metile

OTf = (CF₃SO₂O⁻)

Phen = 1,10 fenantrolina;

Bipy = 2, 2' bipyridina;

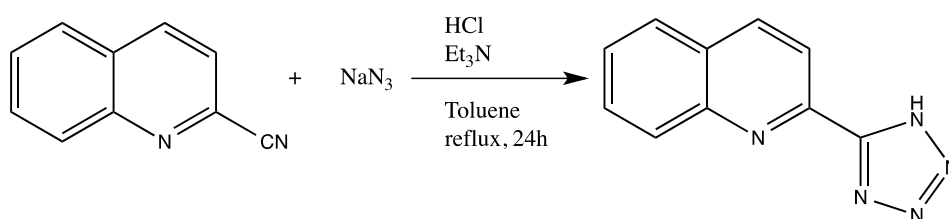
QTZ = 2-chinolil-tetrazolo;

TEA = trietilenammina (Et₃N)

POP = bis(2-(difenil(fosfino)fenil)etere).

Sintesi dei leganti

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

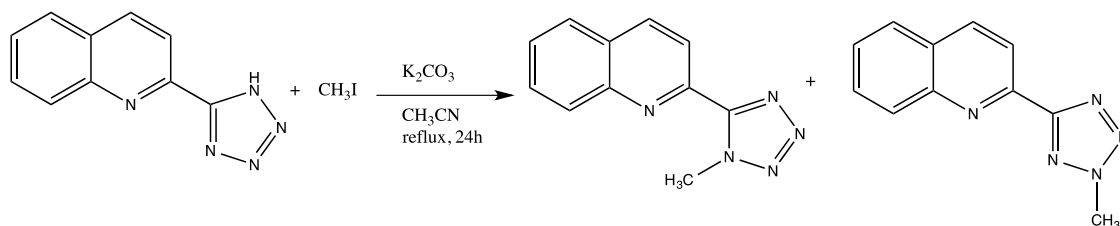


Il legante 2-(1H-tetrazol-5-il)chinolina è stato ottenuto dalla reazione di chinolina-2carbonitrile con NaN₃, Et₃N e HCl in toluene seguendo una procedura generale precedentemente descritta in letteratura.

In un Pallone a due colli da 100 mL munito di agitatore magnetico, vengono disciolti 2,6 mL (30 mmol) di HCl 37% v/v e 4,2 mL (30 mmol) di Et₃N in 30 mL di toluene a 0°C. Si osserva la formazione di trietilammonio cloruro, in seguito si riporta la soluzione a temperatura ambiente e si aggiungono 600 mg (3.89 mmol) di chinolina-2-carbonitrile e 1140 mg (17,54 mmol) di NaN₃. La miscela viene riscaldata a riflusso, sotto agitazione magnetica, per 24 h. La soluzione viene poi lasciata raffreddare a temperatura ambiente e il solvente evaporato sottovuoto. Il grezzo viene disciolto in 20 mL di acqua distillata e viene aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di HCl/H₂O 1:5 fino ad osservare la precipitazione del legante tetrazolico desiderato come solido bianco dalla soluzione acquosa. Il precipitato si separa per filtrazione. Y = 99% (MW = 197g/mol, 769 mg, 3,90 mmol).

¹H-NMR, 400 MHz, DMSO-*d*⁶ δ (ppm) = 8,65 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8,79 Hz), 8,31 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8,40 Hz), 8,17 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8,40 Hz), 8,12 (d, 1H, *J*_{H-H} = 7,99 Hz), 7,90 (t, 1H), 7,74 (t, 1H).

2-(1-metil-2*H*-tetrazol-5-il)chinolina, 2-(2-metil-2*H*-tetrazol-5-il)chinolina



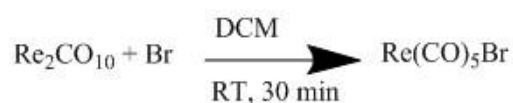
In un pallone a due colli da 50 mL dotato di agitatore magnetico, vengono disciolti 140 mg (0,711 mmol) di 2-(1*H*-tetrazol-5-il)chinolina, 202 mg (1,421 mmol) di CH_3I e 329 mg (2,843 mmol) di K_2CO_3 in 20 mL di CH_3CN . La miscela viene poi riscaldata a riflusso per 24 ore, sotto agitazione magnetica. La soluzione viene poi lasciata raffreddare a temperatura ambiente e il solvente evaporato sottovuoto. Il grezzo viene disciolto in 20 mL di CH_2Cl_2 e la frazione solubile viene recuperata e purificata tramite colonna cromatografica su gel di silice, eluita con una miscela etil acetato/etere di petrolio 9:1. La prima frazione è stata identificata come 2-(1-metil-2*H*-tetrazol-5-il)chinolina, ($Y = 56\%$, 0,40 mmol, 85 mg), e la seconda frazione come 2-(2-metil-2*H*-tetrazol-5-il)quinoline ($Y = 28\%$, 0,20 mmol, 42 mg).

2-(1-metil-2*H*-tetrazol-5-il)chinolina – $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, CDCl_3 δ (ppm) = 8,45 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,40$ Hz), 8,37 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,80$ Hz), 8,16 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,80$ Hz), 7,92 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 7,99$ Hz), 7,82 (t, 1H), 7,67 (t, 1H), 4,69 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz, CDCl_3 δ (ppm) = 152,48 (Ct), 147,74 (C_{ipso}), 145,24, 137,96, 130,83, 130,09, 128,65, 128,54, 128,22, 121,29.

2-(2-metil-2*H*-tetrazol-5-il)chinolina - $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, CDCl_3 δ (ppm) = 8,35 (m, 3H), 7,89 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 9,20$ Hz), 7,79 (t, 1H), 7,62 (t, 1H), 4,52 (s, 1H, CH_3).

Sintesi dei precursori di Renio

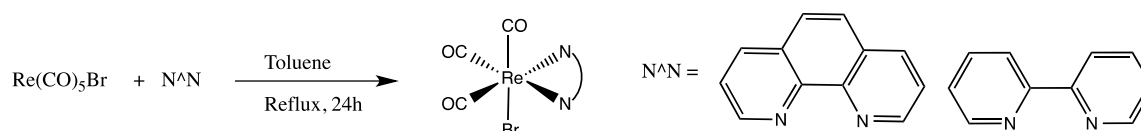
Re(CO)₅Br



In un pallone a due colli da 50 mL, munito di agitatore magnetico e in atmosfera inerte, si disciolgono 1g (1.53 mol) di Re₂(CO)₁₀ e 1 mL di Br in 30 ml di DCM.

La soluzione viene lasciata reagire per 30 minuti a temperatura ambiente. Al termine della reazione si osserva la formazione di solido bianco corrispondente al prodotto desiderato. Il precipitato viene filtrato e lavato con esano.

fac-Re(CO)₃Br(phen) e fac-Re(CO)₃Br(bipy)



fac-Re(CO)₃Br(phen)

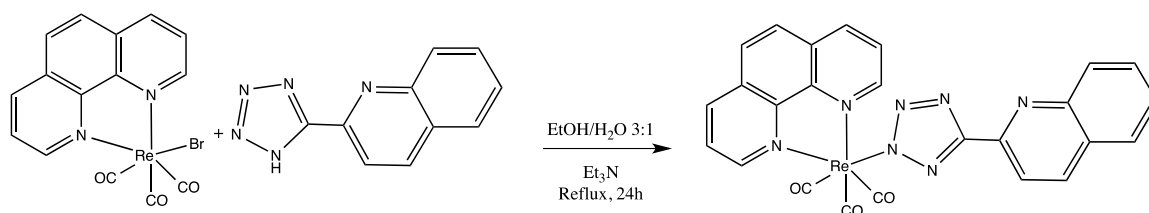
In un pallone a due colli da 100 mL vengono disciolti 150 mg (0,367 mmol) di Re(CO)₅Br e 86 mg (0,477mmol) di 1,10 fenantrolina in 60 mL di toluene. La miscela ottenuta viene riscaldata a riflusso per 24 ore, sotto agitazione magnetica. Il precipitato ottenuto, un solido giallo acceso, viene recuperate per filtrazione e lavato due volte con 5 mL di Et₂O. Y = 92%, 178 mg (0,366 mmol).

fac-Re(CO)₃Br(bipy)

In un pallone a due colli da 100 mL, vengono disciolti 200 mg (0,49 mmol) di Re(CO)₅Br e 99 mg (0,64 mmol) di 2,2'-bipiridina in 45 mL di toluene. La miscela risultante viene riscaldata a riflusso per 24 ore, sotto agitazione magnetica. Il precipitato ottenuto, un solido giallo acceso, viene recuperato per filtrazione e lavato due volte con 5 mL di Et₂O. Y = 84%, 210 mg (0,415 mmol).

Sintesi dei complessi

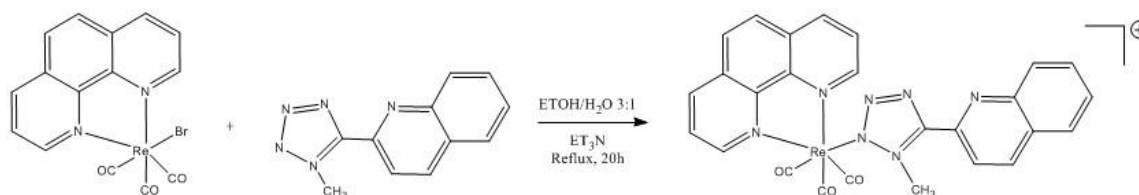
Re(CO)₃(phen)(QTZ)



In un pallone a due colli da 50 mL, vengono disciolti 100 mg (0,188 mmol) di *fac*- $\text{Re(CO)}_3\text{Br(phen)}$ in 15 mL di etanolo. 56 mg (0,282 mmol) di 2-(1H-tetrazol-5-il)chinolina vengono disciolti in 5 mL di H_2O e 0,01 mL di Et_3N ed aggiunti, goccia a goccia, alla soluzione di renio. La miscela ottenuta viene riscaldata a riflusso per 24 ore, sotto agitazione magnetica. Lasciando raffreddare la soluzione a temperatura ambiente, si osserva la formazione di un precipitato solido giallo, che viene identificato come il prodotto desiderato. Il prodotto viene recuperato per filtrazione e lavato con etanolo ed etere. $Y = 84\%$, 102 mg (MW = 646g/mol, 0,158mmol).

$^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, Acetone- d^6 δ (ppm) = 9,74 (d, 2H, $J_{\text{H-H}} = 6,40$ Hz), 9,01 (d, 2H, $J_{\text{H-H}} = 9,60$ Hz), 8,34 (s, 2H), 8,23 (m, 3H), 7,99 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,79$ Hz), 7,87 (m, 2H), 7,72 (m, 1H), 7,55 (m, 1H). **$^{13}\text{C-NMR}$** 100 MHz, Acetone- d^6 δ (ppm) = 197, 31 (CO), 195,40 (CO), 189,9 (CO), 163,55 (Ct), 154,87 (C_{ipso}), 148,93, 147,76, 146,90, 140,29, 137,22, 130,79, 130,35, 129,41, 128,29, 128,23, 127,74, 127,24, 127,15, 120,15. **ESI-MS** [M] = 646 m/z (CH_3CN).

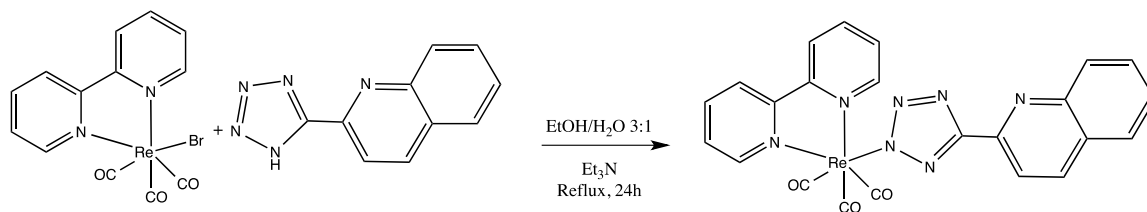
Re(CO)₃(phen)(1-Me-2-QTZ)



In un pallone a due colli da 50 mL, vengono disciolti 90 mg (0,169 mmol) di *fac*-Re(CO)₃Br(phen) in 15 mL di etanolo. 56 mg (0,254 mmol) of 2-(1-metil-2*H*-tetrazol-5-il)chinolina vengono disciolti in 5 mL di H₂O e 0,01 mL di Et₃N ed aggiunti, goccia a goccia, alla soluzione di renio. La miscela ottenuta viene riscaldata a riflusso per 24 ore, sotto agitazione magnetica. La soluzione viene lasciata raffreddare a temperatura ambiente e ridotta di volume. Il grezzo viene aggiunto ad una soluzione di etanolo contenente 50 mg di NH₄PF₆. Si osserva la formazione di un solido giallo acceso che viene separato per filtrazione e lavato due volte con etanolo ed etere. Y = 62%, 70 mg (MW = 661 g/mol, 0,106 mmol).

Rapporto degli isomeri 1:0,69 basato sui valori degli integrali dello spettro ¹H-NMR del complesso. *a* = isomero N₄C–N₂-Re, *b* = isomero N₄C–N₁-Re. **¹H-NMR** 400 MHz, Acetone-*d*⁶ δ (ppm) = 9,77 (m, 2H, *a*), 9,52 (m, 2H, *b*), 9,08 (m, 2H, *a*), 8,94 (m, 2H, *b*), 8,62 (d, 1H, *J*_{H-H} = 11,99 Hz, *a*), 8,48 (d, 1H, *J*_{H-H} = 7,99 Hz, *b*), 8,37 (s, 2H, *a*), 8,33 (s, 2H, *b*), 8,28 (m, 2H, *a*), 8,27 (m, 1H, *a*), 8,15 (m, 2H, *a*), 8,10 (m, 1H, *a*), 8,08 (m, 1H, *b*), 8,02 (m, 1H, *b*), 7,88 (m, 3H, *b*), 7,73 (m, 3H, *a*), 4,68 (s, 3H, *a*), 4,47 (s, 3H, *b*). **¹³C-NMR** 100 MHz, Acetone-*d*⁶ δ (ppm) = 155,89, 154,91, 154,50, 154,29, 148,28, 148,07, 143,84, 141,30, 141,04, 140,70, 140,00, 139,93, 139,26, 138,92, 132,14, 132,07, 131,60, 130,59, 130,50, 130,03, 129,37, 129,29, 129,11, 129,09, 129,03, 127,90, 127,42, 127,29, 121,64, 121,03. **ESI-MS** [M]⁺ = 661 *m/z* (CH₃CN).

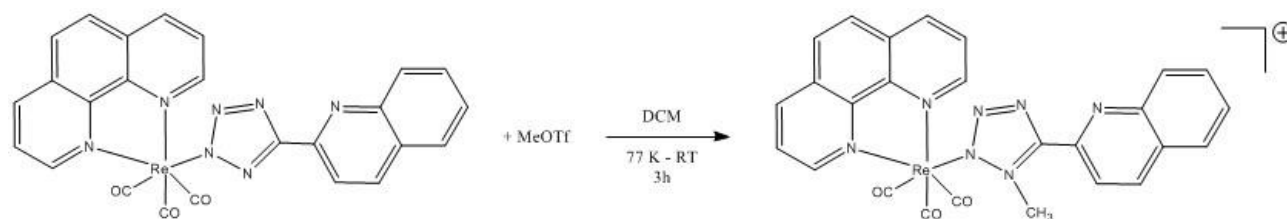
Re(CO)₃(bpy)(QTZ)



In un pallone a due colli da 50 mL vengono disciolti 100 mg (0,196 mmol) di *fac*- $\text{Re(CO)}_3\text{Br(bpy)}$ in 15 mL di etanolo. 58 mg (0,294 mmol) di 2-(1*H*-tetrazol-5-il)chinolina vengono disciolti in 5 mL di H_2O e 0,01 mL di Et_3N e aggiunti, goccia a goccia, alla soluzione di renio. La miscela ottenuta viene riscaldata a riflusso per 24 ore, sotto agitazione magnetica. Lasciando raffreddare la soluzione a temperatura ambiente si osserva la formazione di un solido giallo identificato come il prodotto desiderato. Il precipitato viene separato per filtrazione e lavato due volte con etanolo ed etere. $Y = 62\%$, 76 mg (MW = 623 g/mol, 0,122 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, Acetone- d^6 δ (ppm) = 9,29 (m, 2H), 8,70 (d, 2H, $J_{\text{H-H}} = 7,99$ Hz), 8,37 (m, 2H), 8,24 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,79$ Hz), 7,98 (m, 2H), 7,88 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,39$ Hz), 7,85 (m, 2H), 7,13 (m, 1H), 7,53 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz, DMSO- d^6 δ (ppm) = 164,18 (Ct), 156,77, 154,59, 149,54, 148,32, 141,69, 137,74, 130,85, 129,95, 129,07, 128,80, 128,27, 127,64, 125,08, 120,76. **ESI-MS** [M] = 623 m/z (CH_3CN).

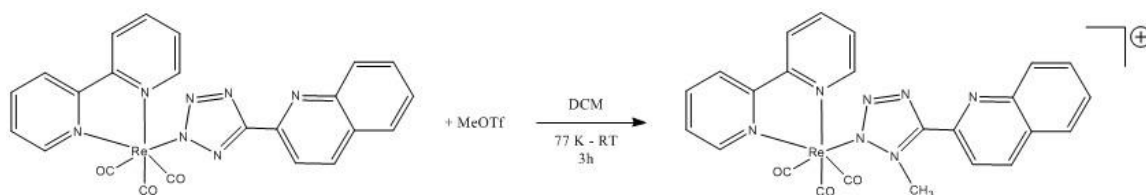
Re(CO)₃(phen)(1-Me-2-QTZ)



In un pallone a due colli da 50 mL, munito di agitatore magnetico, vengono disciolti 30 mg (0.046 mmol) di *fac*-Re(CO)₃(phen)(2-QTZ) e 7.5 mg di MeOTf (0.046 mmol) in 30 mL di diclorometano a 77K. La miscela ottenuta viene mantenuta a 77K per 30 minuti e poi lasciata reagire per 3 ore a temperatura ambiente. Al grezzo, ridotto di volume, si aggiunge una soluzione acquosa contenente 50 mg di NH₄PF₆. Separata la fase organica, dopo aggiunta di etere etilico, si osserva la formazione di un precipitato solido giallo acceso, identificato come il prodotto desiderato. Il precipitato viene recuperato per filtrazione e lavato con etere etilico. Y = 52%, 16mg (MW = 661 g/mol, 0.024 mmol)

¹H-NMR 400 MHz, Acetone-*d*⁶ δ (ppm) = 9.83 (d, 2H, *J*_{H-H} = 6,80 Hz), 9,12 (d, 2H, *J*_{H-H} = 9.60 Hz), 8,54 (d, 1H, *J*_{H-H} = 9.20 Hz), 8.42 (s, 2H), 8,34 (m, 2H), 8,14 (d, 1H, *J*_{H-H} = 9,60 Hz), 8,08 (d, 1H, *J*_{H-H} = 7,99 Hz), 7,91 (m, 1H), 7,42 (m, 2H), 4,52 (s, 3H). **¹³C-NMR** 100 MHz, Acetone-*d*⁶ δ (ppm) = 155,80, 155,47, 154,80, 148,18, 143,72, 141,21 139,19, 132,06, 131,97, 130,41, 129,92, 129,28, 129,02, 128,95, 127,81, 120,96, 39,05. **ESI-MS** [M]⁺ = 661 *m/z*, [M]⁻ = 145 (CH₃CN).

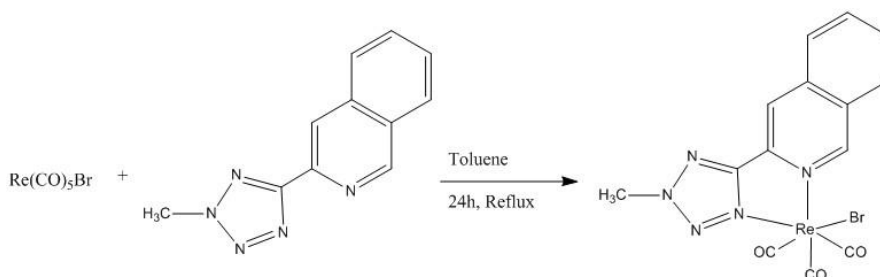
Re(CO)₃(bipy)(1-Me-2-QTZ)



In un pallone a due colli da 50 mL, munito di agitatore magnetico, vengono disciolti 50 mg (0.080 mmol) di *fac*-Re(CO)₃(bipy)(2-QTZ) e 13 mg di MeOTf (0.080 mmol) in 30 mL di diclorometano a 77K. La miscela ottenuta viene mantenuta a 77K per 30 minuti e poi lasciata reagire per 3 ore a temperatura ambiente. Al grezzo, ridotto di volume, si aggiunge una soluzione acquosa contenente 50 mg di NH₄PF₆. Separata la fase organica, dopo aggiunta di etere etilico si osserva la formazione di un precipitato solido giallo acceso, identificato come il prodotto desiderato. Il precipitato viene recuperato per filtrazione e lavato con etere etilico. Y = 92%, 47mg (MW = 637 g/mol, 0.074 mmol)

¹H-NMR 400 MHz, Acetone-*d*⁶ δ (ppm) = 9,40 (d, 2H, *J*_{H-H} = 5,60 Hz), 8,85 (d, 2H, *J*_{H-H} = 7,99 Hz), 8,61 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8,80 Hz), 8,51 (m, 2H), 8,21 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8,40 Hz), 8,12 (d, 1H, *J*_{H-H} = 8,40 Hz), 7,96 (m, 4H), 7,82 (m, 1H), 4,65 (s, 3H). **¹³C-NMR** 100 MHz, Acetone-*d*⁶ δ (ppm) = 157,57, 155,16, 148,06, 143,85, 142,15, 139,30, 132,02, 130,49, 129,99, 129,38, 129,28, 129,08, 125,27, 121,15, 39,23. **ESI-MS** [M]⁺ = 637 *m/z*, [M]⁻ = 145 (CH₃CN).

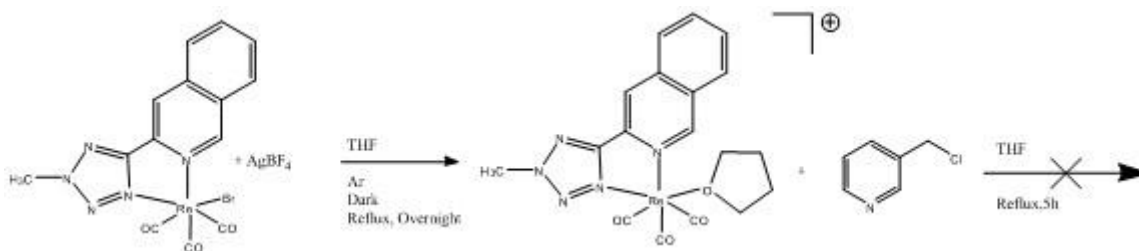
Re(CO)₅Br(2-Me-QTZ)



In un pallone a due colli da 100 mL si disciolgono 141 mg (0.345 mmol) di $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ e 95 mg (0.448 mmol) di 2-Me-chinolil-tetrazolo in 60 mL di toluene. La miscela ottenuta viene riscaldata a riflusso per 24 ore, sotto agitazione magnetica. Lasciando raffreddare la soluzione a temperatura ambiente si osserva la formazione di un solido arancio acceso identificato come il prodotto desiderato. Il precipitato viene separato per filtrazione e lavato due volte con toluene ed etere. Y = 89%, 128 mg (MW = 561g/mol, 0,228 mmol).

¹H-NMR 400 MHz, DMSO δ (ppm) = 9.11 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,39$ Hz), 8,72 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,39$ Hz), 8,57 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 8,39$ Hz), 8,41 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 7,19$ Hz), 8,26 (m, 1H), 8,02 (m, 1H), 4,78 (s, 3H). **¹³C-NMR** 100 MHz- DMSO δ (ppm) = 164,68 (Ct), 147.09, 143.34, 138,28, 134,15, 131,03, 130,45, 129,70, 129,36, 120,09, 42,9. **ESI-MS** [M] = 561 m/z (CH_3CN).

Re(CO)₃(2-Me-QTZ)(3-clorometil-piridina)

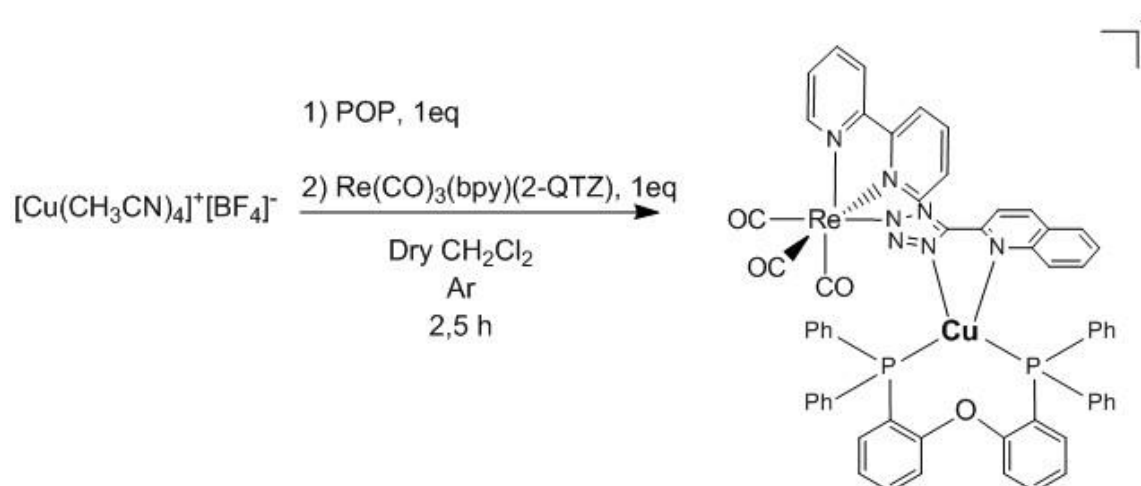


In un pallone a due colli da 100 mL al riparo dalla luce, vengono disciolti 124 mg (0.22 mmol) di $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}(2\text{-Me-QTZ})$ e 48 mg (0.243 mmol) di AgBF_4 in 50 ml di THF.

La soluzione viene portata a riflusso per tutta la notte. Al termine della reazione si osserva la formazione di AgBr che viene successivamente eliminato filtrando la soluzione su celite.

Alla soluzione filtrata vengono aggiunti 367 mg (2,24 mmol) di 3-clorometil-piridina. La soluzione viene riscaldata a riflusso per 5 ore. In seguito ad analisi del grezzo di reazione si può constatare che la formazione del prodotto desiderato non avviene.

Re(CO)₃(bipy)(2-QTZ)-Cu-POP



In uno schlenk coperto dalla luce e in atmosfera inerte si sciolgono 41 mg (0.130 mmol) di $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]^+[\text{BF}_4]^-$ in 20 mL di DCM.

Una volta portato a completo discioglimento il sale di rame, si aggiungono 70 mg di fosfina POP alla soluzione, che viene lasciata agitare a temperatura ambiente per due ore.

Trascorso questo tempo, si aggiunge goccia a goccia una soluzione di $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bipy})(2\text{-QTZ})$, precedentemente preparata disciogliendo 81 mg di complesso in 5 ml di DCM.

La soluzione ottenuta viene lasciata agitare per due ore a temperatura ambiente.

Terminata la reazione si riduce di volume la miscela di reazione, per poi preparare con la stessa un doppio strato DCM/ Et_2O , che porta alla formazione di cristalli gialli che vengono identificati come il prodotto desiderato.

ESI-MS $[\text{M}]^+ = 1224 \text{ m/z}$ (CH_3CN).

Bibliografia

- [1] Z. Liu, W. He, Z. Guo, *Chem. Soc. Rev.*, **2013** 42, 1568.
- [2] M. V. Werrett, G. S. Huff, S. Muzzioli, V. Fiorini, S. Zacchini, B. W. Skelton, A. Maggiore, J. M. Malicka, M. Cocchi, K. C. Gordon, S. Stagni, M. Massi, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 8379.
- [3] K. Kikuchi, K. Komatsu, T. Nagano, *Curr. Op. Chem. Bio*, **2004**, 8, 1822.
- [4] Z. Guo, P. Jiang, *Coordination Chemistry Reviews*, **2004**, 248, 205.
- [5] R.R. Richton, *Biological Inorganic Chemistry*, 2nd Edition, DOI: 10.1016/B978-0-444-53782-9.00001-2.
- [6] E. L. Que, D. W. Domaille, C. J. Chang, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1517.
- [7] Zhipeng, L., Weijiang, H., Zijian, G. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 1568 *ed ivi citati*.
- [8] C. A. Bader, R. D. Brooks, Y. S. Ng, A. Sorvina, M.V. Werrett, P.J. Wright, A. G. Anwer, D. A. Brooks, S. Stagni, S. Muzzioli, M. Silberstein, B. W. Skelton, E. M. Goldys, S. E. Plush, T. Shandala, M. Massi, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 16345.
- [9] A.R. Hibbs, *Confocal Microscopy for Biologist*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, **2004**, DOI: 10.1007/978-0-306-48565-7.
- [10] N. P. E. Barry, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 5106, DOI:10.1039/C3CC41143E.
- [11] F.L. Thorp-Greenwood, M.P. Coogan, L. Mishra, N. Kumari, G. Rai, S. Saripella, *New J. Chem.*, **2012**, 36, 64.
- [12] M. R. Grill, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 3179.
- [13] K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton, *Chem Rev*, **1999**, 99, 2777.
- [14] Koguro, K.; Oga, T.; Mitsui, S.; Orita, R. *Synthesis* **1998**, 910.
- [15] M. V. Werrett, S. Muzzioli, P. J. Wright, A. Palazzi, P. Raiteri, S Zacchini, M. Massi, S. Stagni, *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 229.
- [17] M. V. Werrett, D. Chartrand, J. D. Gale, G. S. Hanan, J. G. MacLellan, M. Massi, S. Muzzioli, P. Raiteri, B. W. Skelton, M. Silberstein, S. Stagni, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 1229.
- [18] G. A. Crosby, J. N. Demas, *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991.