

Università degli Studi di Firenze



*Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea Triennale In Chimica*

***Sintesi di un chemosensore contenente unità acridina.
Proprietà acido-base e interazione con lo ione fluoruro***

*Synthesis of an acridine-containing chemosensor.
Acid-base properties and interaction with fluoride anion*

Tesi sperimentale di laurea
di
Matteoandrea Lucherelli

Relatore

Prof. Andrea Bencini

Correlatore

Dott.ssa Cristina Gellini

Indice

Capitolo 1, Introduzione	3
1.1 La chimica supramolecolare.....	3
1.2 Tipi di interazione.....	4
1.3 Riconoscimento molecolare.....	8
1.4 I chemosensori.....	9
1.5 Chemosensori fluorimetrici.....	11
1.5.1 Sensori fluorimetrici per cationi metallici.....	16
1.5.2 Sensori fluorimetrici per specie anioniche.....	18
1.6 I recettori poliamminici.....	22
1.7 Le interazioni anione- π	23
1.8 Acridina.....	29
1.9 Obiettivi del progetto di tesi.....	33
Capitolo 2, Parte sperimentale	35
2.1 Sintesi del legante macrociclico	
2.1.1 Sintesi di 4,5-bis(bromometil)acridina.....	35
2.1.2 Sintesi di 2.5.8.11-tetratosil-2,5,8,11[12]-	
-4,5-acridinofano.....	36
2.1.3 Sintesi del legante macrociclico Acry222 _{IN}	39
2.1.4 Ottenimento dell'ammina libera.....	41
2.2 Caratterizzazione chimico-fisica del legante.....	41
2.2.1 Potenzimetria.....	41
2.2.2 Spettrofotometria UV-visibile ed emissione	
di fluorescenza.....	44
Capitolo 3, Discussione	46
3.1 Discussione della sintesi.....	46
3.2 Proprietà acido-base.....	47

3.2.1 Determinazione delle costanti di equilibrio acido-base.....	47
3.2.2 Spettrofotometria UV-visibile.....	49
3.2.3 Spettrofotometria di emissione di fluorescenza.....	51
3.3 Emissione di fluorescenza in presenza di N ₂	57
3.4 Interazione del legante con ione fluoruro.....	61
Capitolo 4, Conclusioni.....	66

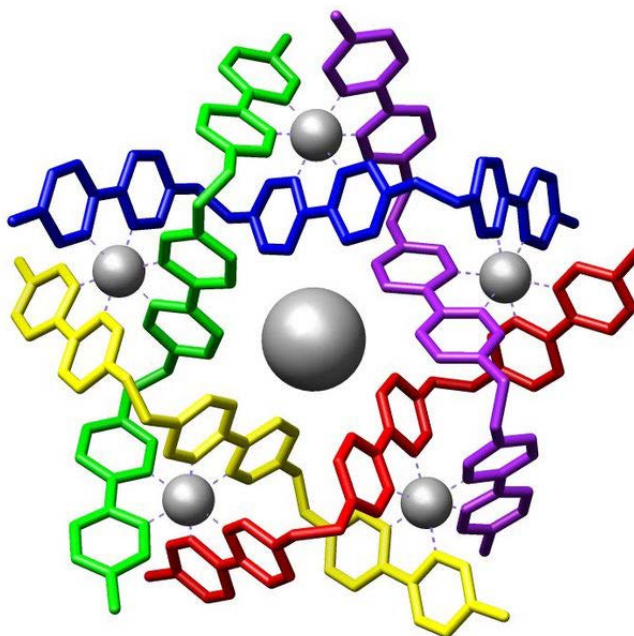
Capitolo 1 : Introduzione

1.1 La chimica supramolecolare

La chimica supramolecolare è la chimica del legame non covalente¹: studia infatti la struttura e le proprietà di addotti che si formano tra due o più specie molecolari guidati da forze deboli come interazioni di tipo elettrostatico, legame a idrogeno, forze di Van Der Waals, interazioni di stacking, effetto idrofobo.

Gli addotti che si formano, pur essendo costituiti da forze non covalenti, hanno caratteristiche chimiche e chimico-fisiche diverse rispetto alle molecole che li compongono; inoltre i legami sono più deboli ma molto più numerosi rispetto ai legami intramolecolari, garantendo sia stabilità che versatilità agli addotti. Gli aggregati supramolecolari possono quindi esplicare funzioni e dar vita a processi molto complessi: la chimica supramolecolare è infatti la chiave di processi biologici di grande importanza come l'associazione tra proteine, la trascrizione del codice genetico, l'induzione di segnali da parte di neurotrasmettitori e il trasporto attraverso membrane biologiche.

¹J. M. LEHN, VCH, Weinheim 1995.



*Figura 1.1 - Un esempio di un sistema supramolecolare, descritto da Jean-marie Lehn in *Angew Chem., Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 1838-1840. Il recettore è costituito da un complesso pentanucleare di ferro, in cui gli ioni metallici sono legati da cinque molecole di tris(bipiridina), con una conformazione "a doppia elica". La specie guest è lo ione cloruro al centro.*

Generalmente un addotto supramolecolare è formato da due specie molecolari di cui quella di dimensioni maggiori è detta "recettore" o "host" e quella di dimensioni minori è detta "substrato" o "guest". Perché l'addotto si formi le due specie devono essere complementari: le interazioni che si formano sono infatti selettive e l'interazione può quindi essere considerata una forma di riconoscimento molecolare^{2,3}. Inoltre, il substrato può essere trasformato dal recettore (si pensi ad esempio agli enzimi), oppure può essere trasportato attraverso membrane lipofile in cui non sarebbe solubile grazie alla solubilità del recettore, che in questo caso fa da carrier per il substrato.

² J. M. LEHN, *Struct. Bonding*, Berlin, 16 (1973), 1.

³ D. J. CRAM, J. M. CRAM, *Science*, Washington, 183 (1974), 803.

1.2 Tipi di interazione

Le forze in gioco nella formazione degli addotti supramolecolari sono di tipo non covalente. La particolarità della struttura di un addotto rispetto ad una specie molecolare sta nel fatto che la stabilità è garantita da un numero elevato di legami deboli, complessivamente equivalenti da un punto di vista energetico ad un legame covalente, ma che garantiscono una maggiore flessibilità della geometria della molecola. Questo meccanismo spiega la capacità degli addotti supramolecolari di svolgere funzioni diverse e quindi la loro presenza fondamentale nei sistemi biologici.

Forze di tipo elettrostatico sono importanti nella formazione di aggregati supramolecolari in quanto tra tutte le forze citate sono quelle che danno le interazioni più stabili. L'interazione, secondo il modello delle cariche puntiformi, è diretta (avviene) lungo la congiungente le due cariche. È importante considerare la costante dielettrica del mezzo in cui si localizzano le cariche puntiformi che interagiscono: le interazioni sono ridotte in mezzi polari con alta costante dielettrica, ad esempio in ambiente acquoso, mentre possono essere molto più efficaci in un mezzo quasi apolare come ad esempio una matrice proteica.

Il legame a idrogeno è un legame direzionale e questa proprietà è molto importante nel design di recettori sintetici per il riconoscimento molecolare di substrati. Infatti, la specie host deve infatti essere strutturata in modo che gli atomi che interagiscono, cioè X-H oppure Y, si trovino in corrispondenza degli atomi complementari, Y oppure X-H, della specie guest; solo così l'energia delle interazioni è massimizzata e si può avere la complessazione della specie guest da parte del recettore.

Un esempio della complementarietà tra host e guest nel riconoscimento molecolare è riportato in figura 1.2; la coordinazione dello ione guanidinio

da parte del recettore polipiridinico è resa possibile dalla fitta rete di legami a idrogeno che si instaurano tra le due specie.



Figura 2.2 - Riconoscimento molecolare dello ione guanidinio da parte di un recettore polipiridinico

Un altro contributo alla stabilità degli addotti supramolecolari dovuto a deboli interazioni elettrostatiche è dato dalle forze di Van Der Waals; che comprendono interazioni di tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo indotto e dipolo indotto-dipolo indotto. L'energia di queste interazioni dipende dai momenti di dipolo per le molecole polari e dalla polarizzabilità nel caso di molecole apolari e diminuisce molto più velocemente all'aumentare della distanza tra le specie interagenti rispetto alle interazioni tra specie cariche. Le interazioni che si instaurano tra specie apolari, quindi tra dipoli indotti, sono anche dette forze di dispersione.

Nella stabilizzazione degli addotti supramolecolari tra specie apolari possono giocare un ruolo fondamentale l'effetto idrofobo e le interazioni di stacking (interazioni dovute alla sovrapposizione di anelli aromatici). Il termine "effetto idrofobo" viene usato per descrivere il fenomeno di complessazione di specie apolari in solventi polari come ad esempio l'acqua. La formazione dell'addotto può essere guidata dal contributo entalpico, perché le interazioni attrattive tra solvente polare e soluto apolare sono più deboli delle interazioni che si instaurano tra le molecole di soluto nella fase massiva del solvente e delle interazioni di tipo Van der Waals tra le superfici idrofobe di host e guest, o dal contributo entropico,

perché l'interazione tra le superfici delle due specie molecolari implica la desolvatazione e quindi la liberazione di un gran numero di molecole di solvente (Fig. 1.3).

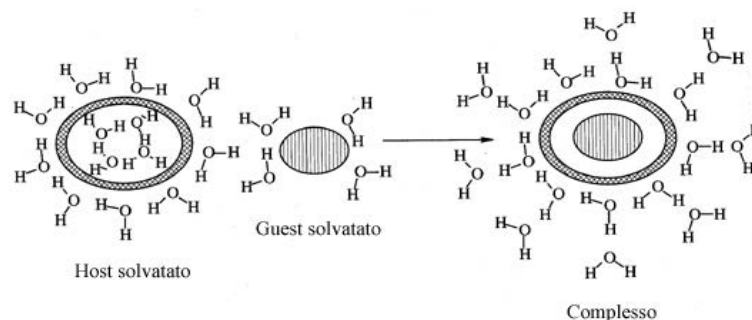


Figura 1.3 Rappresentazione della desolvatazione di specie host e guest in seguito al processo di coordinazione

Quando substrato e recettore contengono unità aromatiche l'addotto è stabilizzato anche da interazioni di stacking. Questo tipo di interazione si instaura tra due sistemi, uno π -elettronrico (ad esempio sistemi aromatici legati a gruppi elettrondonatori) e uno π -elettronpovero (ad esempio sistemi aromatici legati a gruppi elettronattrattori). Gli addotti formati sono anche detti complessi π . In alcuni casi si può avere un vero e proprio trasferimento di carica dal sistema elettronrico al sistema elettronpovero; in questo caso gli addotti ottenuti sono detti complessi a trasferimento di carica. In figura 1.4 è rappresentato un sistema che presenta l'incapsulamento della specie guest, il durene, all'interno della cavità di un legante ciclofanico.

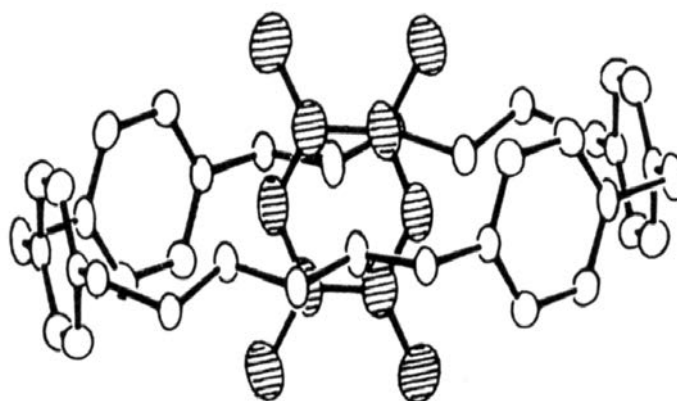


Figura 1.4 - struttura cristallina del complesso fra il ciclofano e una molecola di durene

Gli addotti che si formano vengono stabilizzati da interazioni di stacking e inoltre, se il solvente è polare, l'effetto idrofobo gioca un ruolo importante.

1.3 Riconoscimento molecolare

Il riconoscimento molecolare è la coordinazione selettiva di una specie chimica in presenza di altre specie. La specie riconosciuta, il substrato, è la specie che presenta la più elevata complementarità strutturale ed elettronica con il recettore; in queste condizioni si realizza il maggior numero di contatti di legame.

Il recettore deve avere due requisiti fondamentali per coordinare selettivamente un substrato:

- Complementarità stereochimica dei siti di coordinazione: i siti di legame del recettore devono avere una disposizione corrispondente ai siti di legame del substrato in modo tale da realizzare il maggior numero di interazioni non covalenti e garantire la stabilità dell'addotto supramolecolare.
- Preorganizzazione del legante: se un recettore possiede già prima del processo di coordinazione una conformazione analoga a quella che avrà nell'addotto, l'energia necessaria per portare il recettore nella conformazione finale sarà minore e quindi la specie formata sarà più stabile.

E' necessario quindi che il recettore abbia un'elevata superficie di contatto con il substrato, ovvero deve essere capace di 'avvolgerlo' dando luogo a numerose interazioni non covalenti. In generale il recettore deve avere una dimensione, una forma e un'architettura specifica. Quanto più recettore e substrato sono preorganizzati, cioè presentano prima dell'interazione la

stessa conformazione che assumono nell'addotto, tanto più selettivo è il processo di riconoscimento molecolare.

I tipi di substrato possono essere sia cationici (ioni metallici, sistemi contenenti gruppi ammoniacali), che anionici (anioni inorganici e organici) oppure molecole neutre.

La necessità di comprendere in maniera più approfondita il meccanismo che regola il riconoscimento molecolare ha dato forte impulso al design e alla sintesi di nuovi recettori e allo studio delle interazioni recettore-substrato portando sia ad una migliore conoscenza dei requisiti stereoelettronici che recettore e substrato devono possedere perché la coordinazione abbia luogo, sia delle forze che intervengono nella formazione del complesso recettore-substrato.

1.4 I chemosensori

Il riconoscimento e la determinazione quantitativa di analiti, sia cationi che anioni, è di fondamentale importanza per molte attività umane, dall'agricoltura, alle scienze alimentari, ambientali, fino alla medicina. Quindi la ricerca di composti le cui proprietà possono essere modificate in presenza di un composto *target* costituisce una materia di grande interesse⁴, che negli ultimi 20 anni ha conosciuto un forte impulso.

Dal punto di vista della chimica supramolecolare, un sensore è una molecola capace di operare un riconoscimento molecolare di una specie guest e di segnalare l'avvenuta coordinazione attraverso la variazione di una grandezza fisica relativamente facile da misurare. A questo scopo si possono sfruttare cambiamenti di emissione in fluorescenza⁵, di colore^{6,7}, oppure variazioni di proprietà elettrochimiche come ad esempio il

⁴ C. LODEIRO, F. PINA, *Coordination Chemistry Reviews*, 253 (2009), 1353-1383

⁵ A. W. CZARNIK, *Acc. Chem. Res.* 27 (1994), 302.

⁶ H. G. LOHR, F. VOGTLE, *Acc. Chem. Res.*, 18 (1985), 65.

⁷ M. TAKAGI, K. UENO, *Top. Curr. Chem.*, 121 (1984), 39.

potenziale di riduzione⁸. Attraverso l'uso di chemosensori è possibile rivelare la presenza di determinati analiti; in particolare la tecnica della fluorescenza garantisce bassi "detection limits" e larga accessibilità e può quindi essere efficacemente utilizzata per caratterizzare le interazioni del sensore con il target.

Il concetto di chemosensore fu riportato per la prima volta da L. R. Sousa nel 1977, che descrisse la perturbazione della fluorescenza dei composti 1 e 2 (Fig. 1.5) ad opera di cationi alcalini. Mentre per il composto 1 la fluorescenza è diminuita in presenza di questi cationi, la fluorescenza del composto 2 è invece rafforzata.

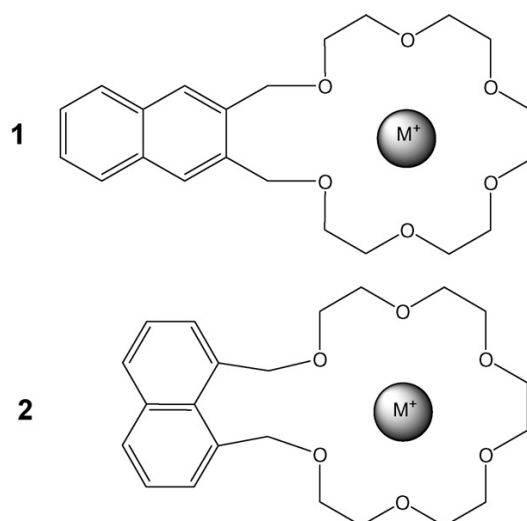


Figura 1.5 Il primo chemosensore: un crown-etero contenente un'unità luminescente, il naftalene

Analizzando la struttura di un chemosensore si possono riconoscere almeno due subunità: la prima è un recettore selettivo nei confronti della specie che si vuol rilevare e la seconda è costituita dall'unità capace di segnalare la presenza della specie guest (Fig. 1.6).

⁸ P. D. BEER, *Coord. Chem. Rev.*, 205 (2000), 131.

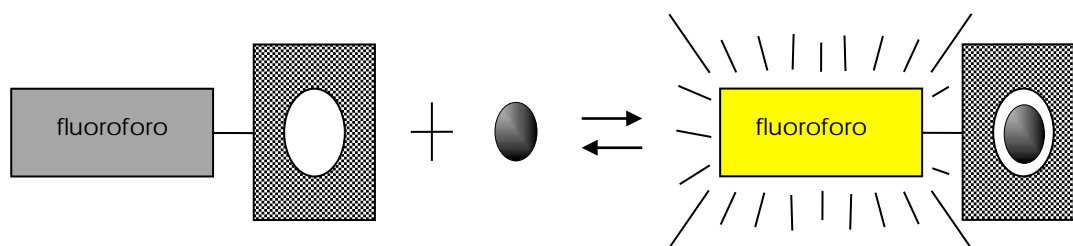


Figura 1.6 Schematizzazione di un chemosensore fluorimetrico

L'ottimizzazione di un sensore consiste nell'aumentare la selettività della subunità host nei confronti del guest, nel progettare la subunità segnalante in modo che il segnale sia più facilmente rilevabile e nel disegnare l'intera molecola in modo che questa sia solubile nel mezzo in cui si deve rilevare il guest e attiva sia nella coordinazione che nella segnalazione nel range di pH del mezzo. Nel caso di chemosensori per anioni di importanza biologica questo si traduce nel cercare sensori che siano solubili in ambiente acquoso e che diano forte interazioni con il substrato anche a pH neutro; in quest'ottica molecole contenenti frammenti poliamminici sono le migliori candidate⁹.

1.5 Chemosensori fluorimetrici

La spettroscopia di emissione in fluorescenza è senza dubbio una tecnica con elevata sensibilità; la ricerca nel campo dei sensori fluorimetrici è più promettente rispetto a quella basata sull'utilizzo di altre tecniche spettroscopiche, come ad esempio la spettroscopia elettronica di assorbimento UV-Vis¹⁰.

La coordinazione della specie guest da parte della subunità host del sensore può portare a due diversi cambiamenti dello spettro di emissione in fluorescenza della subunità segnalante: il fluoroforo infatti può

⁹ F. PINA, M. A. BERNARDO, E. GARCIA-ESPAÑA, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2000), 2143-2157.

¹⁰ R. MARTINEZ-MAÑEZ, F. SANCENON, *Chem. Rev.*, 203 (2003), 4419-4476.

aumentare l'emissione (CHEF, chelation enhancement of fluorescence) o subire un quenching della fluorescenza (CHEQ, chelation enhancement of quenching)¹¹ (Fig. 1.7). I due fenomeni dipendono dal tipo di disattivazione promosso dalla formazione dell'addotto: la complessazione può infatti aumentare o inibire la disattivazione per trasferimento elettronico fotoindotto^{12,13} (PET, photoinduced electron transfer), per trasferimento energetico elettronico^{9,10} (EET, electron energy transfer), formazione di eccimeri¹⁰ o effetti di rigidità¹⁴.

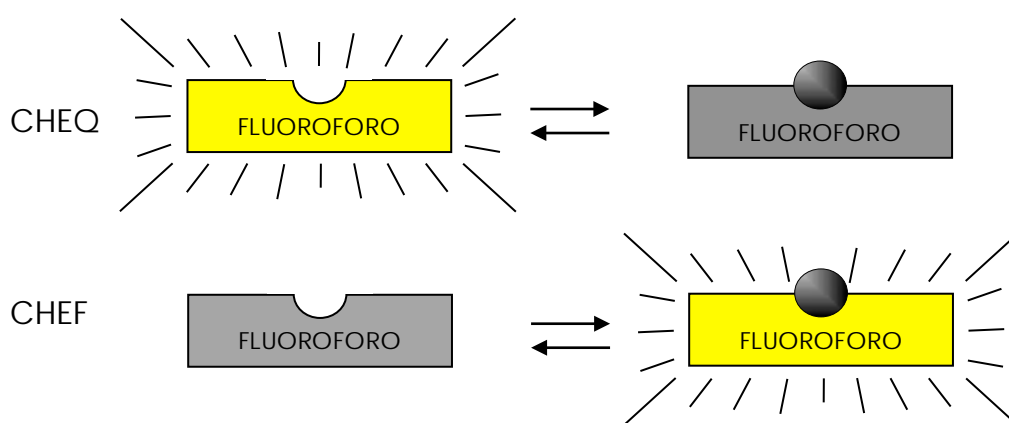


Figura 1.7 - Schematizzazione degli effetti CHEQ e CHEF

In figura 1.8 è schematizzato il processo PET; questo tipo di disattivazione non radiativa può avvenire se è presente un livello elettronico ad energia intermedia rispetto ai due livelli responsabili dell'emissione in fluorescenza. In figura i due livelli sono schematizzati come HOMO (high occupied molecular orbital) e LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) del fluoroforo. La presenza di un orbitale molecolare occupato o non occupato con un valore di energia intermedio rispetto ai due livelli che partecipano alla fluorescenza fa sì che l'elettrone promosso

¹¹ F. PINA, M. A. BERNARDO, E. GARCÍA-ESPAÑA, Eur. J. Inorg. Chem. (2000), 2143-2157.

¹² L. FABBRIZZI, M. LICCHELLI, P. PALLAVICINI, L. PARODI, A. TAGLIETTI, John Wiley & Sons Ltd, (1999), 93.

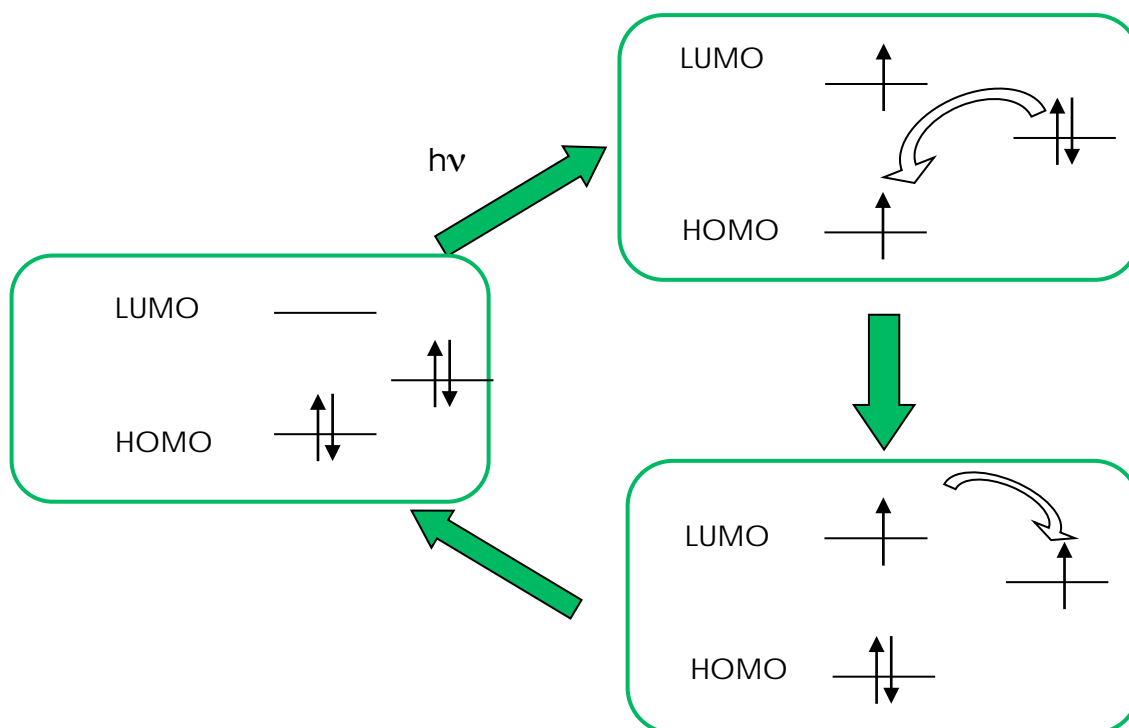
¹³ P. DE SILVA, H. Q. N. GUANARATNE, A. J. M. HUXLEY, C. P. MCCOY, J. T. RADEMACHER, T. E. RICE, Chem. Rev., 97 (1997), 1515.

¹⁴ P. D. BEER, Acc. Chem. Res., 31 (1998), 71.

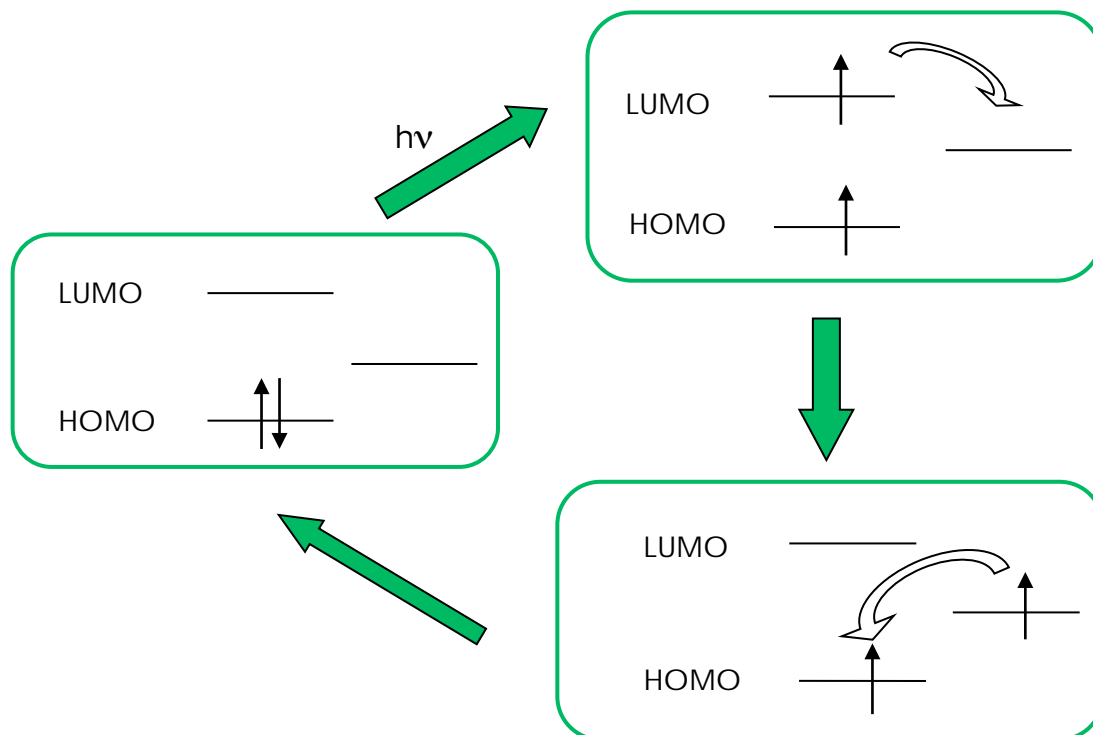
dall'HOMO al LUMO in seguito all'eccitazione possa rilassare seguendo un processo non radiativo se la transizione tra LUMO e livello intermedio e tra livello intermedio e HOMO avviene ad esempio grazie alla sovrapposizione tra stati vibrazionali eccitati. Questa sovrapposizione è evidentemente favorita dalla vicinanza in energia dei livelli tra cui avvengono le transizioni.

La molecola in esempio è un potenziale sensore sia che la coordinazione favorisca il processo PET sia che lo sfavorisca. La coordinazione può far sì o che un livello elettronico dell'addotto si posizioni ad energia intermedia tra HOMO e LUMO oppure che un livello intermedio in assenza di coordinazione cambi in energia con la formazione dell'addotto, in modo da posizionarsi a diversa energia (ad esempio, ad energia più basse dell'orbitale HOMO) e rendere sfavorito il processo PET. Nel primo caso si osserverà il quenching della fluorescenza, nel secondo si avrà invece un aumento della fluorescenza.

In figura 1.9 è riportato il meccanismo dell'EET (Electronic Energy Transfer); il processo è simile al PET. In questo caso sono necessari due orbitali molecolari parzialmente occupati ad energia intermedia rispetto a quella dei due livelli energetici che determinano l'emissione in fluorescenza.



a) PET con la partecipazione di un orbitale esterno occupato.



b) PET con la partecipazione di un orbitale esterno non occupato.

Figura 1.8 Meccanismo del processo PET

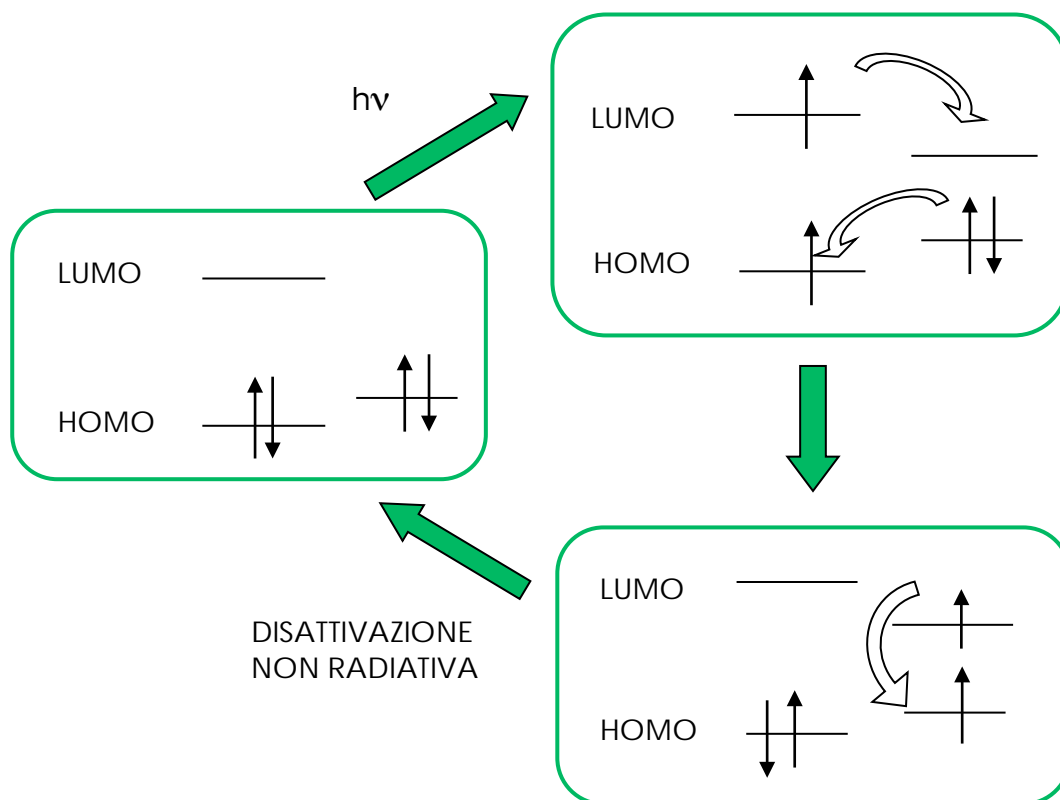


Figura 1.9 – Meccanismo del processo EET

Il passaggio simultaneo di due elettroni, dal LUMO al più alto dei livelli intermedi e dal più basso dei livelli intermedi all'HOMO, ripristina il fluoroforo nel suo stato fondamentale. Successivamente l'elettrone nel più alto dei due livelli intermedi rilassa al più basso, ripristinando così lo stato iniziale del sistema. Anche in questo caso se queste transizioni seguono processi non radiativi, avvenendo ad esempio grazie alla sovrapposizione degli stati vibrazionali eccitati, si osserva quenching dell'emissione.

1.5.1 Sensori fluorimetrici per cationi metallici

Cationi di metalli pesanti e di transizione assumono un ruolo importante in molti processi biologici e fenomeni ambientali^{15,16}.

La necessità di determinare la concentrazione di questi analiti (separatamente o simultaneamente) in campioni di rilevanza biologica o clinica, o la necessità di sviluppare metodi analitici per la determinazione in situ degli ioni metallici, ha portato allo sviluppo di sensori molecolari fluorescenti capaci di rivelare in maniera quantitativa i suddetti ioni.

Per quanto riguarda la selettività, misure che si basano sull'aumento del segnale di emissione da parte della specie bersaglio sono analiticamente favorite rispetto a quelle che prevedono uno spegnimento; per le prime, infatti, non solo il rapporto segnale-rumore è maggiore (rendendo possibile anche la rivelazione a livello delle singole molecole^{17,18}), ma spesso un aumento della fluorescenza è accompagnato da un nuovo e caratteristico tempo di vita, che può essere sfruttato per una migliore discriminazione tra analiti con diversi tempi di vita.

Comunemente però i cationi dei metalli pesanti e di transizione possiedono proprietà intrinseche che causano uno spegnimento dell'emissione dei fluorofori organici.

Le variazioni osservabili nello spettro di assorbimento (spostamento ipso o batocromico) sono simili per tutti gli ioni metallici e le bande dei complessi spesso si sovrappongono^{19,20}. Gli spostamenti indotti dallo ione riflettono l'interazione elettrostatica tra il doppietto elettronico libero degli

¹⁵ A. X. TRAUTWEIN, *Bioinorganic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim (1997).

¹⁶ E. MERIAN, VCH, Weinheim (1991).

¹⁷ W. P. AMBROSE, P.M. GOODWIN, J.H. JETT, A. VAN ORDEN, J.H. WERNER, R.A. KELLER, *Chem. Rev.*, 99 (1999), 2929.

¹⁸ M. PRUMMER, C. G. HÜBNER, B. SICK, B. HECHT, A. RENN, U. P. WILD, *Anal. Chem.*, 72 (2000), 443.

¹⁹ K. RURACK, R. RADEGLIA, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2000), 2271.

²⁰ C. BAZZICALUPI, A. BENCINI, A. BIANCHI, C. GIORGI, V. FUSI, B. VALTANCOLI, M. A. BERNARDO, F. PINA, *Inorg.Chem.*, 38 (1999), 3806.

eteroatomi donatori appartenenti al sistema π del legante e il catione. Il coefficiente di estinzione molare del legante libero e del complesso risultano spesso molto simili.

In contrasto con l'invariabilità nelle caratteristiche di assorbimento, quelle di emissione risultano subire forti variazioni. A seguito della complessazione dello ione metallico si possono verificare tre situazioni che risultano direttamente connesse con le proprietà periodiche e la configurazione elettronica degli ioni metallici bersaglio:

- il complesso è più fluorescente del legante libero (CHEF): solo i metalli di transizione leggeri diamagnetici, ad esempio lo Zn^{2+} , danno luogo a tale effetto con la maggior parte di questi sensori;
- il complesso è debolmente fluorescente (CHEQ parziale): è il tipico caso degli ioni diamagnetici come Hg^{2+} o Pb^{2+} , che possono essere considerati "metalli pesanti" in termini di effetto dell'atomo pesante²¹ e che determinano uno spegnimento della fluorescenza più o meno pronunciato^{22,23};
- il complesso non è fluorescente (CHEQ totale): tipico degli ioni paramagnetici con un orbitale d non completamente riempito^{24,25} per es. Cu^{2+} o Ni^{2+} .

Mentre gli effetti di spegnimento sono sostanzialmente connessi con la natura dello ione metallico, l'aumento della fluorescenza può derivare da cambiamenti nella geometria o nella flessibilità del legante, indotti dalla coordinazione dello ione, così come dalla diversa disponibilità, nel

²¹ D. S. McCLURE, J. Chem. Phys., 20 (1952), 682.

²² A. HARRIMAN, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, 77 (1981), 1281

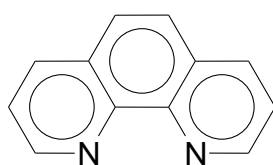
²³ H. MASUHARA, H. SHIOYAMA, T. SAITO, K. HAMADA, S. YASOSHIMA, N. MATAGA, J. Phys. Chem., 88 (1984), 5868.

²⁴ T.L. BANFIELD, D. HUSAIN, Trans. Faraday Soc., 65 (1995), 1969.

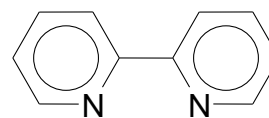
²⁵ A.W. VARNES, R.B. DODSON, E.L. WEHRY, J. Am. Chem. Soc., 94 (1972), 946.

complesso, di alcuni gruppi funzionali coinvolti nei processi di disattivazione del legante libero. Inoltre, le variazioni indotte dalla coordinazione nella posizione relativa di livelli energetici ad energia simile centrati sul legante, può precludere dei canali di disattivazione non radiativi. Nel caso di leganti flessibili la coordinazione generalmente sopprime processi di decadimento dello stato eccitato non radiativi, come ad esempio i movimenti torsionali della molecola²⁶.

Esempi di leganti utilizzabili anche come sensori fluorimetrici, sono riportati in Figura 1.10.



1,10-fenantrolina



2,2'-dipiridina

Figura 1.10 - Esempi di chemosensori di fluorescenza che presentano anche dei siti di legame per analiti.

1.5.2 Sensori fluorimetrici per specie anioniche

Il rilevamento di anioni è interessante sia dal punto di vista della chimica supramolecolare sia per le sue possibili applicazioni in campo biologico e medico. In molti processi biologici infatti sono le specie anioniche ad avere un ruolo fondamentale; si pensi ad esempio che rappresentano la fonte di energia per la maggior parte delle reazioni metaboliche. Sebbene le specie anioniche rivestano ruoli estremamente importanti in chimica e in biologia, la chimica dei loro processi di complessazione è stata trascurata come campo specifico di ricerca, mentre la complessazione degli ioni metallici e delle molecole cationiche è stata studiata estesamente.

²⁶ K. RURACK, R. RADEGLIA, Eur. J. Inorg. Chem. (2000), 2271.

La genesi della chimica di coordinazione di anioni può essere fatta risalire ad un articolo del 1968 di C.H. Park e H.E. Simmonds della du Pont de Nemours (J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 2428, 2429, 2431), che riguardava la complessazione di alogenuri da parte di una famiglia di host macrobicyclici detti catapinandi (dal Greco: katapino = inghiotto; vedi Figura 1.11).

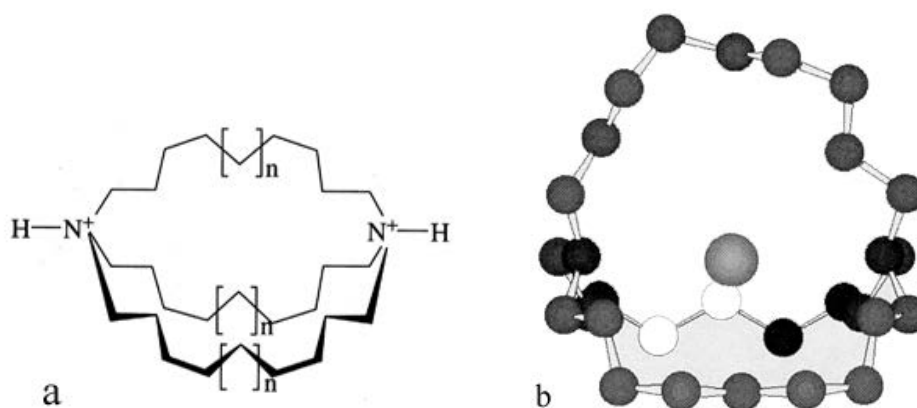


Figura 1.11 - Struttura minimizzata del complesso di inclusione dello ione cloruro da parte del catapinando 1,1,11,11-diazabicyclo[9.9.9]nonacosane ($n = 0$)

Questi possono inglobare nella cavità ioni alogenuro quando vengono protonati i due atomi di azoto. Si tratta del primo esempio di incapsulamento di anioni e l'articolo rappresenta il secondo contributo fondamentale agli albori della chimica supramolecolare, di qualche mese successivo al lavoro fondamentale di Charles Pedersen, sempre della du Pont Company, sulla complessazione dei cationi ad opera del dibenzo[18]corona-6.

Questa area della complessazione di anioni ha avuto uno sviluppo più lento rispetto allo sviluppo di host per cationi o molecole neutre.

Gli host per anioni obbediscono alle stesse regole generali che governano le costanti di legame e la selettività nel caso degli host cationici (principalmente la preorganizzazione, la complementarità e la

solvatazione discusse nel paragrafo 1.2) ma il loro utilizzo è reso molto più difficile a causa di alcune proprietà intrinseche degli anioni:

- Gli anioni sono relativamente grandi e quindi richiedono recettori di dimensioni considerevolmente maggiori rispetto ai cationi. Il fluoruro, uno dei più piccoli anioni, ha un raggio ionico simile a quello di K^+ . Alcuni raggi anionici sono riportati in Tab. 1.
- Anche i più semplici anioni inorganici presentano una varietà di geometrie: possono essere sferici (alogenuri), lineari (SCN^- , N_3^-), planari (NO_3^- , $PtCl_4^{2-}$), tetraedrici (PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), ottaedrici (PF_6^- , $Fe(CN)_6^{3-}$). Esempi più complessi si riscontrano negli anioni oligofosfati di interesse biologico.
- In confronto ai cationi di simili dimensioni, gli anioni hanno alte energie libere di solvatazione e quindi gli host anionici devono competere più efficientemente con il mezzo circostante. Ad esempio: $\Delta G_{idrat.}(F^-) = -465 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G_{idrat.}(K^+) = -295 \text{ kJ mol}^{-1}$ (vedi Tabella 1).
- Gli anioni sono di solito saturi coordinativamente e quindi possono legare solo attraverso forze deboli.

ione	Raggio (Å)	$\Delta G_{idrat.}$ (kJ* mol^{-1})	ione	Raggio (Å)	$\Delta G_{idrat.}$ (kJ* mol^{-1})
F ⁻	1.33	-465	PO ₄ ³⁻	2.38	-2765
Cl ⁻	1.81	-340	Li ⁺	0.69	-475
Br ⁻	1.95	-315	Na ⁺	1.02	-365
I ⁻	2.16	-275	K ⁺	1.38	-295
ClO ₄ ⁻	2.50	-430	Cs ⁺	1.70	-250
NO ₃ ⁻	1.79	-300	Ca ²⁺	1.00	-505
CO ₃ ²⁻	1.78	-1315	Al ³⁺	0.53	-4525
SO ₄ ²⁻	2.30	-1080	NH ₄ ⁺	1.48	-285

Tab. 1

Il legame selettivo di guest anionici è, dal punto di vista quantitativo, più difficoltoso di quello cationico, anche se i concetti fondamentali sono gli stessi alla base di tutta la chimica host-guest.

Gli sviluppi in questo settore sono proseguiti sporadicamente negli anni settanta e primi ottanta, con la sintesi di host di notevole rilievo (specialmente del tipo dei criptandi) ad opera di Schmidtchen (Monaco) e Jean-Marie Lehn. Solo alla fine degli anni ottanta la complessazione anionica ha acquistato un più pieno sviluppo. La pubblicazione del primo libro in questa area (Bianchi et al. 1997) e una vasta review di Schmidtchen e Berger (1997) hanno contribuito a diffonderne l'interesse.

Studi effettuati sulla coordinazione di anioni inorganici complessi hanno ampiamente dimostrato come l'interazione sia dovuta fondamentalmente a forze di natura elettrostatica e alla formazione di legami a idrogeno: in figura 1.12 è riportata la struttura del complesso del PdCl_4^{2-} con il recettore [30]aneN₁₀ completamente protonato²⁷. Il macrociclo assume una conformazione a 'S' e include il substrato anionico in maniera da massimizzare le interazioni di tipo legame a idrogeno $\text{NH}\cdots\text{Cl}$.

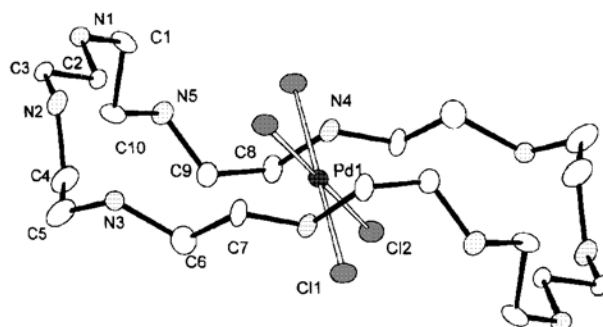


Figura 1.12 – Struttura cristallina del complesso di PdCl_4^{2-} incapsulato nel macrociclo [30]aneN₁₀10H⁺

Queste specie che derivano dalla complessazione di complessi anionici sono state anche chiamate 'supercomplessi'.

²⁷ A. BENCINI, A. BIANCHI, M. MICHELONI, P. PAOLETTI, P. DAPPORTO, P. PAOLI, E. GARCIA-ESPAÑA, J. A. RAMIREZ, *Inorg. Chem.*, 31 (1992) 1902.

Due sono state essenzialmente le strategie adottate nel tempo per il riconoscimento anionico:

- interazioni supramolecolari anione-recettore di tipo elettrostatico e/o legame a idrogeno e interazioni π -stacking come *driving forces*
- attraverso siti acidi *tipo Lewis* presenti in complessi metallici coordinativamente insaturi

Mentre il secondo approccio è stato adottato e sviluppato da Fabbrizzi e Kimura, del primo approccio si trova in letteratura un numero più limitato di esempi.

1.6 I recettori poliamminici

La grande importanza rivestita dai recettori poliamminici nel campo dei chemosensori è data innanzitutto dalla loro capacità di operare in acqua, il solvente ubiquitario, di particolare interesse per i sistemi biologici. La presenza dell'unità recettrice poliamminica rende infatti il sensore solubile in acqua, grazie alle caratteristiche idrofile dei gruppi amminici e all'instaurarsi degli equilibri di protonazione tipici delle poliammine.

La speciazione di questo tipo di sensori mostra la presenza di un insieme di forme che possono essere selezionate ed utilizzate per il riconoscimento selettivo di un dato analita. Per esempio la protonazione delle poliammine a pH acidi le rende, in linea di principio, potenziali recettori per gli anioni (Fig. 1.16), mentre a pH alcalino le forme meno protonate sono in grado di complessare cationi metallici.

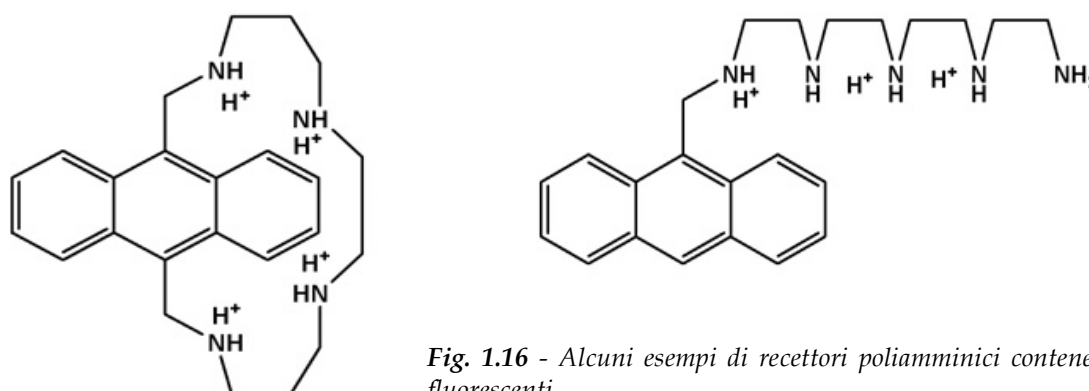


Fig. 1.16 - Alcuni esempi di recettori poliamminici contenenti unità fluorescenti

1.7 Le interazioni anione- π ²⁸

È stata ampiamente dimostrata l'importanza sia da studi teorici che sperimentali delle interazioni anione- π , cioè delle forze non-covalenti che possono instaurarsi tra anioni e sistemi aromatici elettrondeficienti, sia da studi teorici che sperimentali. Diversi studi teorici hanno rivelato che queste interazioni sono energeticamente favorite²⁹.

Le interazioni anione- π stanno ottenendo significativi riconoscimenti, e il loro ruolo centrale in molti processi chimici e biologici è sempre più apprezzato. Il design di recettori altamente selettivi per gli anioni sta conoscendo un importante sviluppo in questo nascente campo della chimica supramolecolare.

La natura fisica delle interazioni anione- π è stata studiata approfonditamente e numerose sono le pubblicazioni a riguardo³⁰. Queste hanno evidenziato che i contributi principali all'energia d'interazione sono dati essenzialmente dalla forza elettrostatica e dalla polarizzazione indotta dallo ione. Il termine elettrostatico è dovuto alla presenza del momento di quadrupolo permanente del sistema aromatico. Il valore del momento di quadrupolo, negativo per sistemi come il benzene, può essere convertito in un valore positivo sostituendo gli idrogeni legati all'anello benzenico con sostituenti elettronattrattori (Fig. 1.17).

²⁸ D. QUIÑONERO, A. FRONTERA, P.M. DEYÀ, Chapter X

²⁹ D. QUIÑONERO, C. GARAU, C. ROTGER, A. FRONTERA, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002), 3389-3392

³⁰ D. KIM, P. TARAKESHWAR, K.S. KIM, *J. Phys. Chem. A*, 108 (2004), 1250-1258

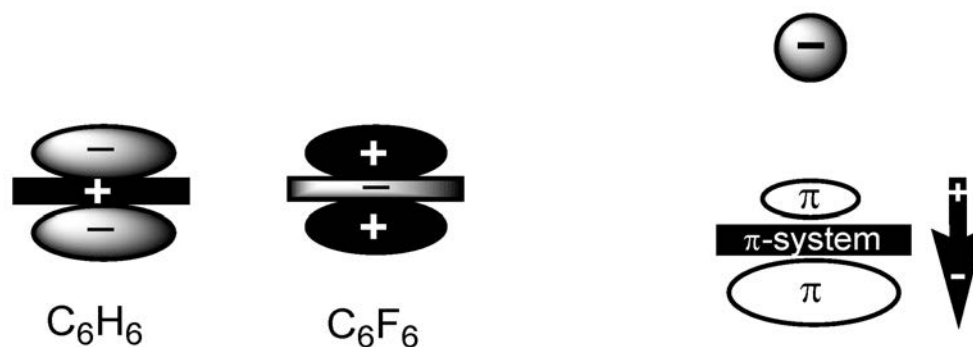


Fig. 1.17 - A sinistra: rappresentazione schematica dei momenti di quadrupolo del benzene ($Q_{zz} = -8.45$ B) e dell'esafuorobenzene ($Q_{zz} = 9.50$ B). A destra: rappresentazione schematica del dipolo indotto dall'anione. L'unità di misura del momento di quadrupolo è il Buckingham, definita da A. David Buckingham, equivalente a Debye-Angstrom

Quindi l'interazione anione- π , a priori elettrostaticamente sfavorita, può essere convertita in un'interazione favorita. La polarizzazione del sistema π indotta dall'anione ha un contributo significativo, mentre l'effetto contrario, cioè la polarizzazione indotta dal sistema π sull'anione, si prevede sia sensibilmente più debole. Il contributo delle forze dispersive all'energia totale di interazione è invece trascurabile.

L'entità del momento di quadrupolo e la polarizzabilità del sistema π determinano la forza dell'interazione. Anche sistemi π con momento di quadrupolo sfavorevole ai fini dell'interazione (cioè negativo) possono interagire efficacemente con anioni se possiedono un'alta polarizzabilità.

Sia il contributo elettrostatico che quello di polarizzazione contribuiscono all'energia totale di interazione, ed entrambi dipendono fortemente dalla distanza ione-arene. Perciò è importante considerare non solo le proprietà del composto aromatico, ma anche le caratteristiche dell'anione. Piccoli anioni sono più polarizzanti (cioè più hard) e possiedono piccole distanze di equilibrio; perciò danno energie di interazione più negative, che si riflettono in un'interazione più stabile. Di contro ioni grandi sono meno polarizzanti e possiedono distanze di equilibrio maggiori. Si veda a tal proposito quanto riportato in Tab. 2.

Complesso	E	R_e
$H^- \cdots C_6F_6$	-12.1	2.693
$F^- \cdots C_6F_6$	-18.2	2.570
$Cl^- \cdots C_6F_6$	-12.6	3.148
$Br^- \cdots C_6F_6$	-11.6	3.201
$NO_3^- \cdots C_6F_6$	-12.2	2.917
$CO_3^{2-} \cdots C_6F_6$	-34.7	2.720

Tab. 2 - Energie di interazione (E, kcal/mol) e distanze di equilibrio (R_e , Å), calcolate tramite calcoli quantomeccanici e misurate dall'anione al centro dell'anello, in diversi complessi con esafluorobenzene

Anche ioni planari o ioni lineari, come NO_3^- o N_3^- , possono interagire con l'anello aromatico in maniera simile a quanto visto sopra. Questo tipo di legame previsto teoricamente è stato confermato sperimentalmente da strutture a raggi X in un sale nitrato di un derivato dell'amminopirimidina (Fig. 1.19).

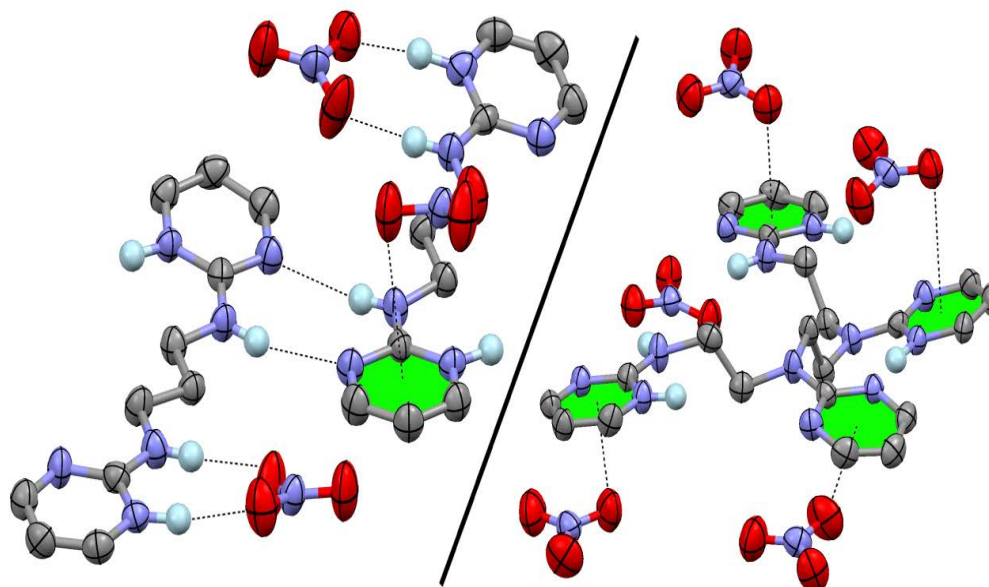


Fig. 1.18 - Strutture a raggi X di sali amminopirimidinici in cui si notano le interazioni anione- π tra gli ioni nitrato e gli anelli aromatici

Rispetto all'interazione catione- π , quella anione- π è energeticamente meno favorita, perché i raggi di Van der Waals degli anioni sono più grandi di quelli dei cationi, quindi le distanze di equilibrio sono più grandi nei complessi anione- π che nei complessi catione- π ³¹.

Una soluzione che è stata proposta per superare questo "svantaggio" si basa sul combinare l'utilizzo dei legami a idrogeno con le forze elettrostatiche per legare l'anione, ad esempio in sali di guanidinio. Quindi sono stati utilizzati composti aromatici carichi per incrementare la capacità dell'anello a dare legami anione- π .

Sono state anche studiate le caratteristiche energetiche e geometriche di complessi anione- π tra diversi cationi aromatici (tropolio, 2-amminopirimidina protonata, ecc) e anioni; i risultati teorici sono confermati da alcune strutture cristallografiche (Fig. 1.20).

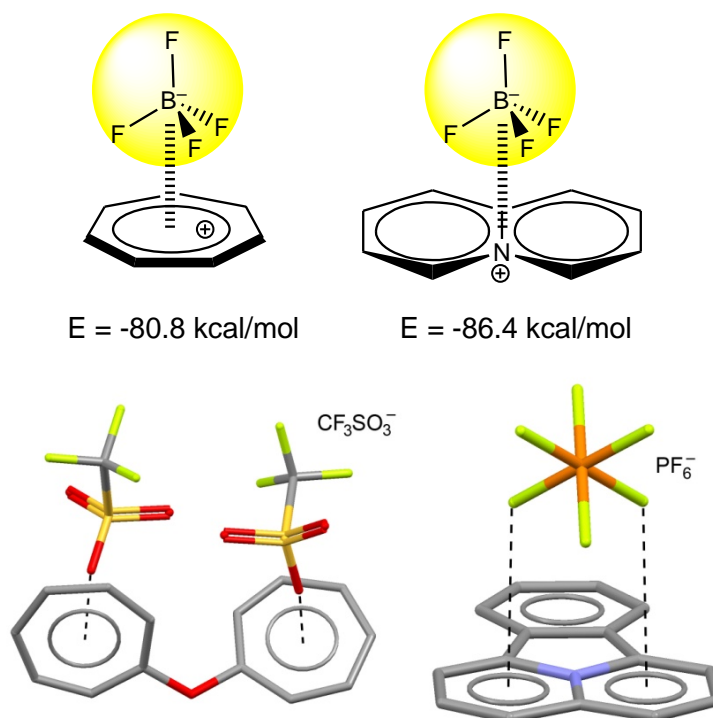


Fig. 1.19 - In alto: rappresentazioni schematiche di complessi di BF_4^- con anelli aromatici carichi positivamente. Sono indicate anche le energie di interazione calcolate. Sotto: strutture a raggi X che evidenziano le interazioni anione- π .

³¹ C. GARAU, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, J. Phis. Chem. A, 108 (43) (2004), 9423-9427

Un altro aspetto interessante è l'osservazione della variazione dell'aromaticità dell'anello aromatico. Alcuni studi hanno evidenziato che le interazioni catione- π diminuiscono l'aromaticità del sistema π , mentre questa è maggiore in complessi anione- π (rispetto all'anello aromatico non coordinato³²).

È interessante notare anche le differenze osservate tra le interazioni catione- π e anione- π dal punto di vista degli orbitali molecolari, studiando l'interazione dell'1,3,5-trifluorobenzene rispettivamente con F^- e con Na^+ ³³. Dall'analisi degli orbitali si può concludere che, mentre gli orbitali atomici del catione non partecipano alla formazione degli orbitali molecolari del complesso, quelli dell'anione sì (Fig. 1.21).

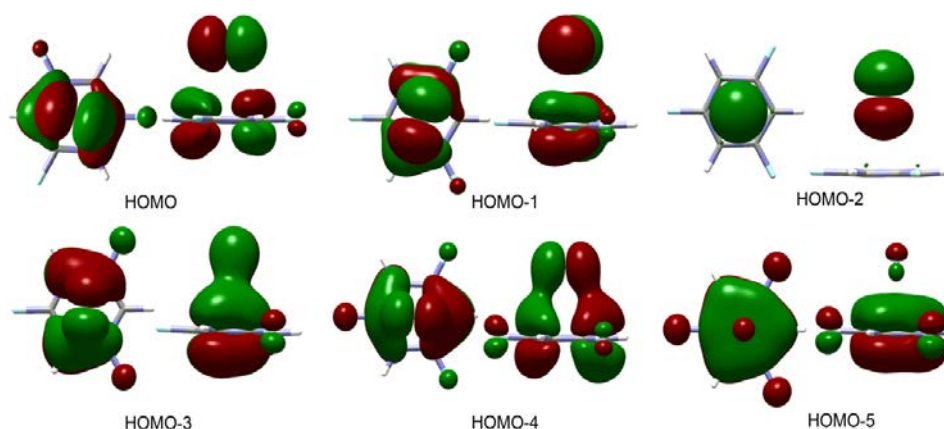


Fig. 1.20 - Rappresentazione degli orbitali di tipo π nel complesso $F^- \cdots C_6F_3H_3$

Altri studi hanno dimostrato che esiste un effetto cooperativo tra le interazioni anione- π e quelle di legame a idrogeno, cioè si osserva un rafforzamento di entrambe se presenti contemporaneamente in complessi in cui il sistema aromatico è accettore di legami a idrogeno. Questa interazione è dovuta principalmente a effetti di tipo elettrostatico³⁴. Nei

³² C. GARAU, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, Chem. Phys. Lett., 392 (1-3) (2004), 85-89

³³ C. GARAU, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, Chem. Phys. Lett., 399 (1-3) (2004), 220-225

³⁴ D. ESCUDERO, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P.M. DEYÀ, J. Comput. Chem., 30 (1) (2009), 75-82

sistemi studiati da Escudero et al. (Fig. 1.22) è emerso che l'anello aromatico trasmette quest'effetto sinergico dall'anione (interazione anione- π), attraverso il sistema π , alla molecola di acqua (interazione via legame a idrogeno), fino ad un secondo set di molecole di acqua, e viceversa.

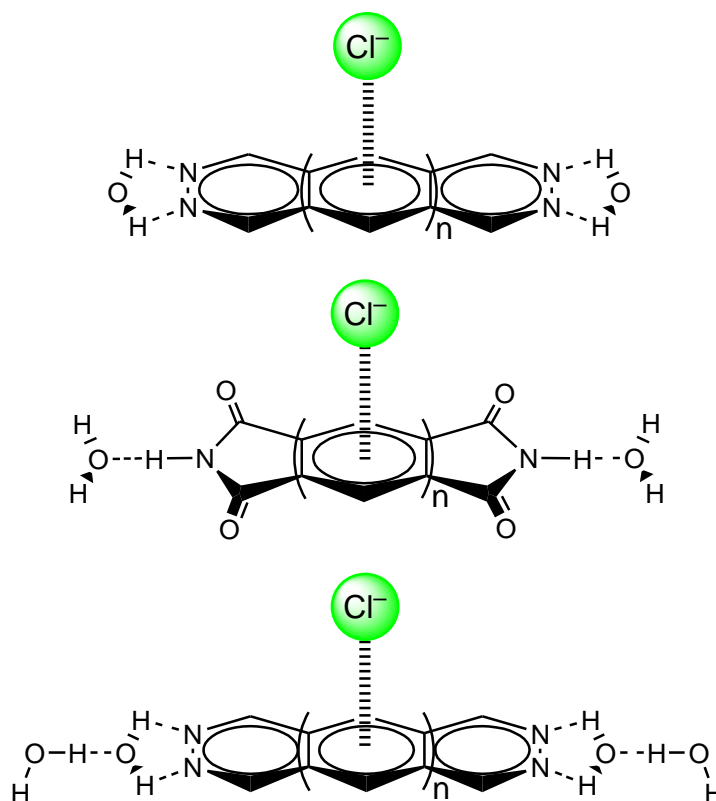


Fig. 1.21 - Alcuni sistemi studiati da Escudero et al.

Un interessante esempio in cui operano simultaneamente legami a idrogeno e interazioni anione-arene è quello riportato da Frontera et al.³⁵. Qui un anello aromatico elettronpovero (acido tiocianurico), funzionalizzato con etilammonio, cristallizza con il controione cloruro (Fig. 1.23). La struttura cristallina ottenuta mostra chiaramente che lo ione

³⁵ A. FRONTERA, F. SACZEWSKI, M. GDANIEC, E. DZIEMIDOWICZ-BORYS, A. KURLAND, P.M. DEYA, D. QUIÑONERO, C. GARAU, Chem.-Eur. J., 11 (2005), 6560-6567

cloruro si trova nella conformazione ottimale per dare sia interazione con l'anello aromatico elettronepovero che legame a idrogeno con R-Et-NH₃⁺.

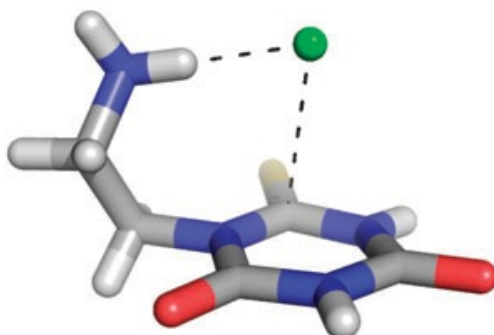


Fig. 1.22 - Struttura cristallina dell'acido tiocianurico con un sostituito etilammonico, che illustra la contemporanea presenza di un legame ad idrogeno e di un'interazione anione- π con lo ione cloruro (rappresentato in verde)

Le evidenze sperimentali confermano che l'interazione anione- π è presente se il sistema aromatico è elettronepovero.

1.8 Acridina

L'acridina (Fig. 1.23) è un composto aromatico eterociclico, ad anelli condensati, derivato formalmente dall'antracene per sostituzione di un gruppo CH centrale con un atomo di azoto.

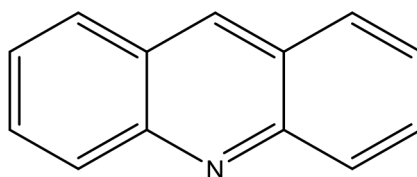


Fig. 1.23 - Formula di struttura dell'acridina

La sua importanza nell'ambito della chimica supramolecolare è dovuta principalmente alla capacità di intercalare il DNA; numerosi sono infatti gli studi su suoi derivati come potenziali agenti intercalanti del DNA con proprietà antitumorali o antivirali.

Avendo una resa quantica di fluorescenza alta, è naturalmente un potenziale candidato come unità fluorescente per la realizzazione di chemosensori fluorimetrici. Inoltre l'azoto aromatico possiede un

doppio elettronico potenzialmente disponibile per le interazioni con cationi metallici.

In soluzione acquosa dà luogo ad un equilibrio acido-base, riportato in Fig. 1.24 ; la pK_a del catione acridinio (AcH^+) è 5,4.

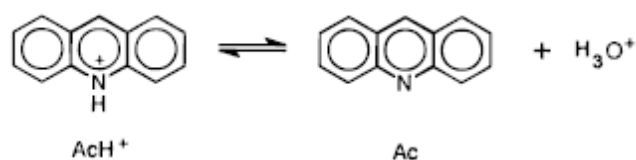


Fig. 1.24 - Equilibrio di protonazione/deprotonazione dell'acridina

Considerando lo spettro UV-Vis di questa molecola, il massimo di assorbimento sia dell'acridina (Ac) che del catione acridinio (AcH^+) cade nel vicino UV, a 356 nm, ma lo spettro di AcH^+ presenta una larga spalla centrata a circa 400 nm che non è invece presente nello spettro di assorbimento di Ac ³⁶ (Fig. 1.25).

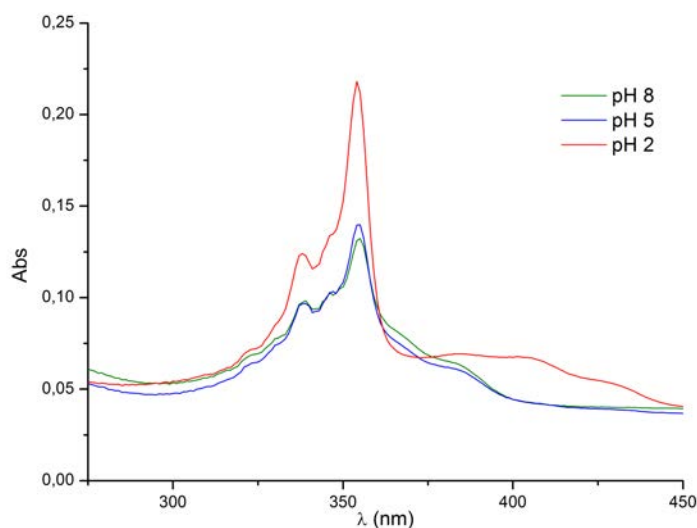


Fig. 1.25 - Spettri di assorbimento di soluzioni di acridina in acqua ($1 \cdot 10^{-4}$ M), a temperatura e pressione ambiente, rispettivamente a pH 2, 5 e 8.

³⁶ E. T. RYAN, T. XIANG, K.P. JOHNSTON, M.A. FOX, J. Phys. Chem. A, 101(1997), 1827-1835

Gli spettri di emissione di fluorescenza delle due forme (protonata e non protonata), registrati eccitando a 355 nm, sono invece sostanzialmente diversi. Infatti Ac presenta un massimo di emissione a circa 430 nm, mentre l'emissione di AcH⁺ è spostata a lunghezze d'onda maggiori, circa 475 nm (Fig. 1.26). Un dettagliato esame delle transizioni che danno origine a queste caratteristiche spettrali sarà riportato nella parte di Discussione di questa tesi (Paragrafo 3.2.3)

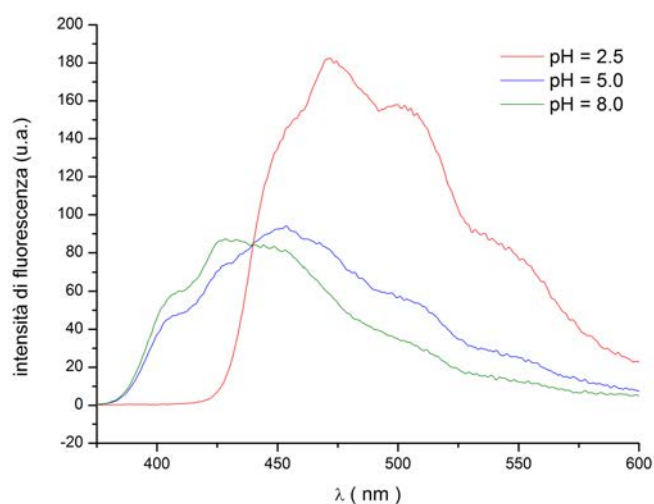


Fig. 1.26 – Spettro di fluorescenza dell'acridina in acqua ($1 \cdot 10^{-4}$ M), a temperatura e pressione ambiente, a tre valori di pH: 2,5 5.0 e 8.0 .

L'intensità di fluorescenza dell'acridina, e più in generale quella degli eterocicli contenenti azoto, dipende dalle interazioni via legame a idrogeno tra il soluto e il solvente. In particolare l'acridina fluoresce maggiormente in solventi protici che in solventi aprotici. La spiegazione di questo fenomeno sta nel fatto che lo stato eccitato di singoletto ad energia minore è n,π^* in solventi aprotici, mentre in solventi donatori di legami a idrogeno è π,π^* . Il decadimento dallo stato n,π^* allo stato fondamentale di singoletto è proibito per simmetria. Ciò inibisce il processo di decadimento radiativo. Perciò il ritorno allo stato fondamentale ha luogo preferenzialmente tramite intersystem crossing e/o conversione interna,

piuttosto che per emissione radiativa. Una schematizzazione è riportata in Fig. 1.27.

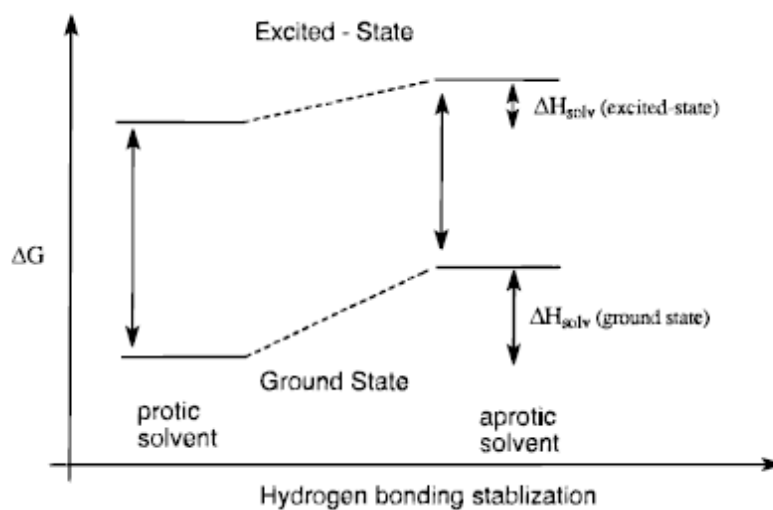


Fig. 1.27 – Effetto del legame a idrogeno sull'energia dei livelli elettronici in eterocicli contenenti atomi di azoto, come l'acridina. In solventi protici, la presenza del legame a idrogeno tra il solvente e il doppietto elettronico di non legame presente sull'atomo di azoto stabilizza maggiormente lo stato fondamentale rispetto a quello eccitato, perché la densità elettronica sull'azoto è maggiore in $n-\pi$ piuttosto che in $n-\pi^*$

1.9 Obiettivi del progetto di tesi

In questo progetto di tesi ci siamo occupati della sintesi di un legante, della sua caratterizzazione e dello studio della sua interazione con lo ione fluoruro in soluzione acquosa.

Il legante sintetizzato è caratterizzato da una struttura poliammidica macrociclica in cui è stata inserita un'unità acridina come parte integrante della struttura ciclica (fig. 1.28).

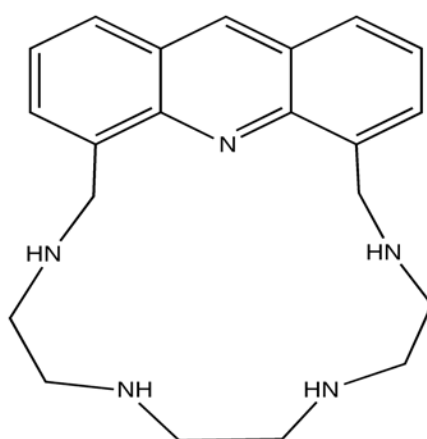


Fig. 1.28 - Molecola di Acri222_{IN}

L'interesse verso questo recettore è dovuto al fatto che i leganti poliamminici sono facilmente solubili in acqua dove possono protonarsi, anche a pH neutro, generando cationi poliammonici adatti alla coordinazione di substrati anionici tramite interazioni carica-carica e via legame ad idrogeno. Inoltre la presenza dell'acridina come unità fluorescente rende questi legami dei potenziali chemosensori di fluorescenza.

Le loro proprietà fotochimiche sono anche determinate dallo stato di protonazione della catena poliammidica e dall'eventuale protonazione dell'azoto eteroaromatico rivolto verso l'interno della cavità macrociclica. Queste proprietà vengono spesso alterate dalla coordinazione di specie anioniche, che possono modificare la distribuzione e la localizzazione dei

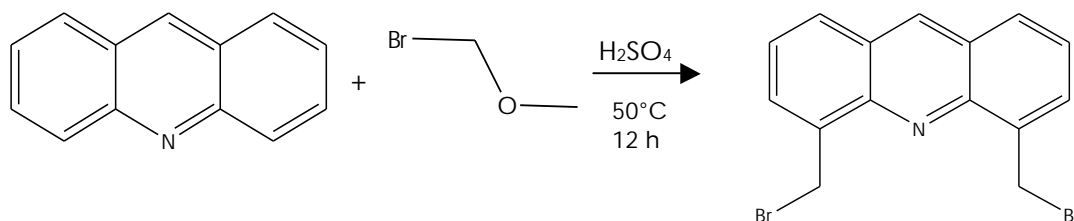
protoni acidi sugli atomi di azoto del recettore. Inoltre, l'unità acridina potrebbe essere coinvolta nel processo coordinativo tramite interazioni anione- π .

Nel corso di questo lavoro di tesi abbiamo per prima cosa sintetizzato il recettore macrociclico e ne abbiamo successivamente studiate le proprietà acido-base in soluzione acquosa abbinando misure potenziometriche a misure di spettrofotometria UV-vis e di emissione di fluorescenza. L'analisi delle caratteristiche di protonazione del recettore è infatti una necessaria premessa a qualunque studio di coordinazione anionica, visto che questa ha luogo spesso attraverso la formazioni di interazioni carica-carica e via legame ad idrogeno con i gruppi ammoniacali del recettore. Successivamente, sempre utilizzando misure spettrofotometriche e di emissione di fluorescenza, abbiamo analizzato, sia pure a livello preliminare, studiato l'interazione con lo ione fluoruro, un anione decisamente "hard" ad alta densità di carica negativa, capace perciò di dare sia forti interazioni elettrostatiche via legame ad idrogeno con gruppi ammoniacali sia interazioni di tipo anione- π con sistemi aromatici.

Capitolo 2 : Parte sperimentale

2.1 Sintesi del legante macrociclico

2.1.1. Sintesi di 4,5-bis(bromometil)acridina



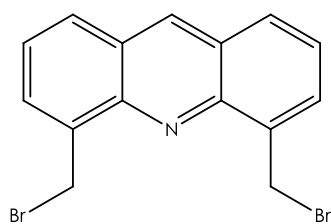
La 4,5-bis(bromometil)acridina è stata preparata utilizzando un procedimento precedentemente riportato in letteratura, opportunamente modificato¹.

A una soluzione di acridina (3.0 g, 16.7 mmol) in acido solforico (38mL) sono stati addizionati 6 mL di bromometil metil etere (d = 1.531 g/mL a 25 °C, 73,2mmol) e la soluzione è stata mantenuta sotto flusso di azoto a 50°C per 12 h.

Terminata la reazione, sono stati aggiunti alla miscela 150 g di ghiaccio e il precipitato giallo formatosi è stato filtrato e solubilizzato in cloroformio (450 mL). La parte insolubile è stata eliminata e la fase organica anidrificata su Na₂SO₄. Dopo evaporazione del solvente il residuo è stato

¹ C. Di Giorgio, M. De Meo, J. Chiron, F. Delmas, A. Nikoyan, S. Jean, G. Dumenil, P. Timon-David, J-P. Galy, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13, 5560-5568.

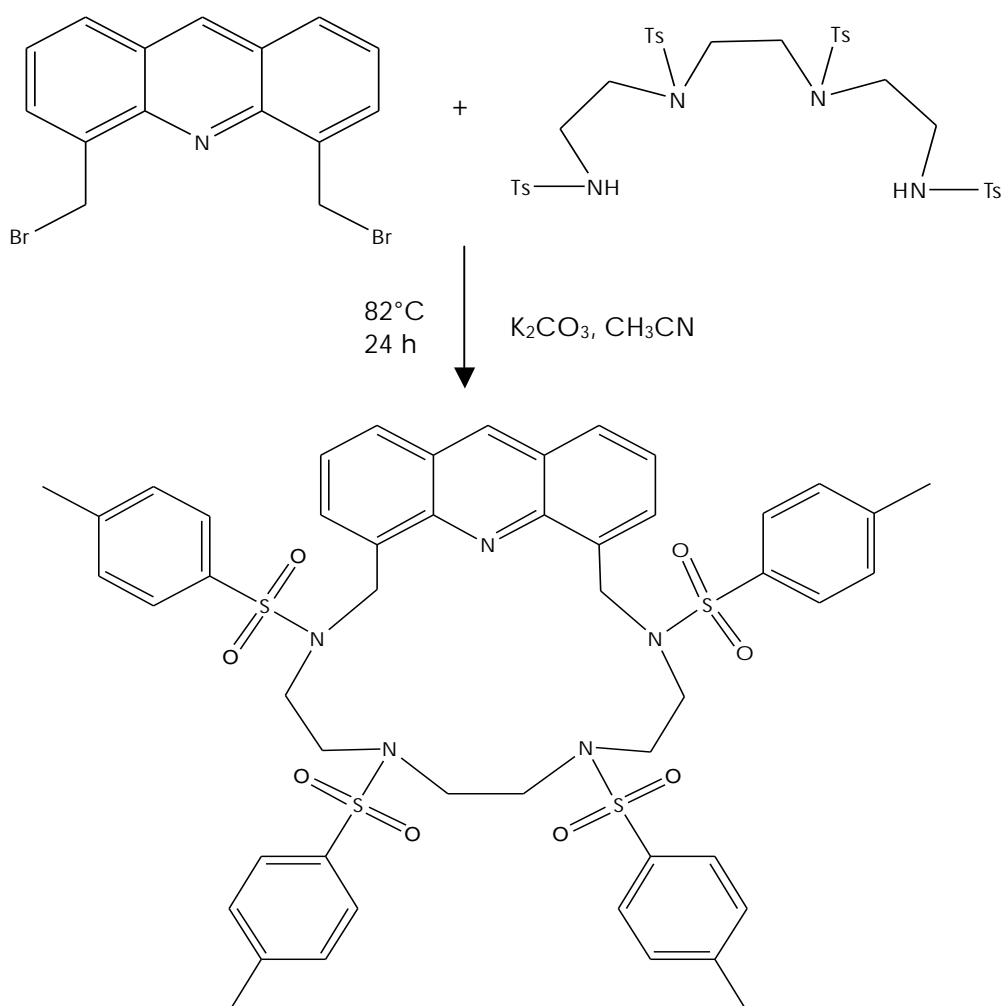
cristallizzato da una miscela etere etilico/cicloesano per dare un solido giallo (2.5g, resa 41,7%, PM: 365.06 g/mol)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} 5.34 (s, 4H), 7.41-7.46 (m, 2H), 7.86-7.92 (4H), 8.69 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} 29.91, 125.56, 126.87, 128.84, 131.0, 136.11, 143.20.

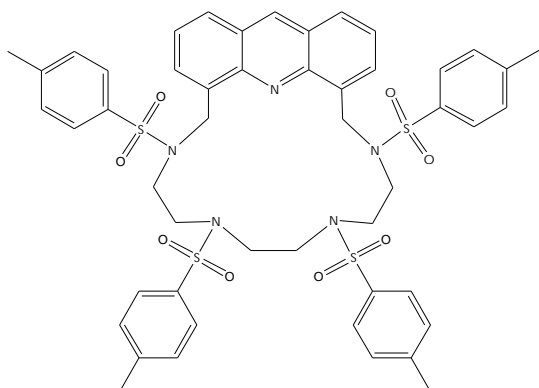
2.1.2 sintesi di 2,5,8,11-tetratosil-2,5,8,11-tetraaza[12]-4,5-acridinofano



La reazione è stata condotta in un pallone a tre colli, munito di insufflatore per N₂, imbuto sgocciolatore con agitatore meccanico e refrigerante a bolle con tappo a CaCl₂. Nel pallone è stato introdotto 1,4,7,10-tetrazadecano-tetratosilato (2 g, 2.62 mmol), quindi sono stati aggiunti K₂CO₃ (3 g) e CH₃CN precedentemente anidrificato su setacci molecolari (80 mL). La vetreria è stata seccata in stufa e durante la reazione è stato insufflato azoto in continuo per mantenere l'ambiente di reazione anidro. Nell'imbuto sgocciolatore è stata introdotta la sospensione di 4,5-bis(bromometil)acridina (1 g, 2.2 mmol) in CH₃CN (160 mL); questa è stata mantenuta sotto agitazione con l'ausilio di un agitatore meccanico, perché 4,5-bis(bromometil)acridina non è perfettamente solubile nel mezzo di reazione.

Dopo aver portato a riflusso il contenuto del pallone (T=82°C), tenuto sotto agitazione magnetica, è stata aggiunta goccia a goccia la sospensione di 4,5-bis(bromometil)acridina; l'aggiunta è stata completata in 2 ore. Quindi la miscela è stata lasciata a riflusso per altre 22 ore.

Una volta interrotto il riscaldamento si è lasciata raffreddare la miscela fino a temperatura ambiente. Quindi il prodotto è stato filtrato su filtro a pieghe, per eliminare il solido, e la soluzione ottenuta è stata tirata a secco. Il prodotto ottenuto è stato sciolto nella minima quantità necessaria di CH₂Cl₂ e purificato mediante cromatografia su colonna di allumina (attivata di grado II/III), utilizzando come eluente una miscela CH₂Cl₂/acetato di etile, utilizzando un gradiente di concentrazione per l'acetato di etile da un rapporto di 10:0.2 a 10:2. La resa è circa del 23,5% (500 mg, 0.5mmol, PM: 966.22 g/mol)

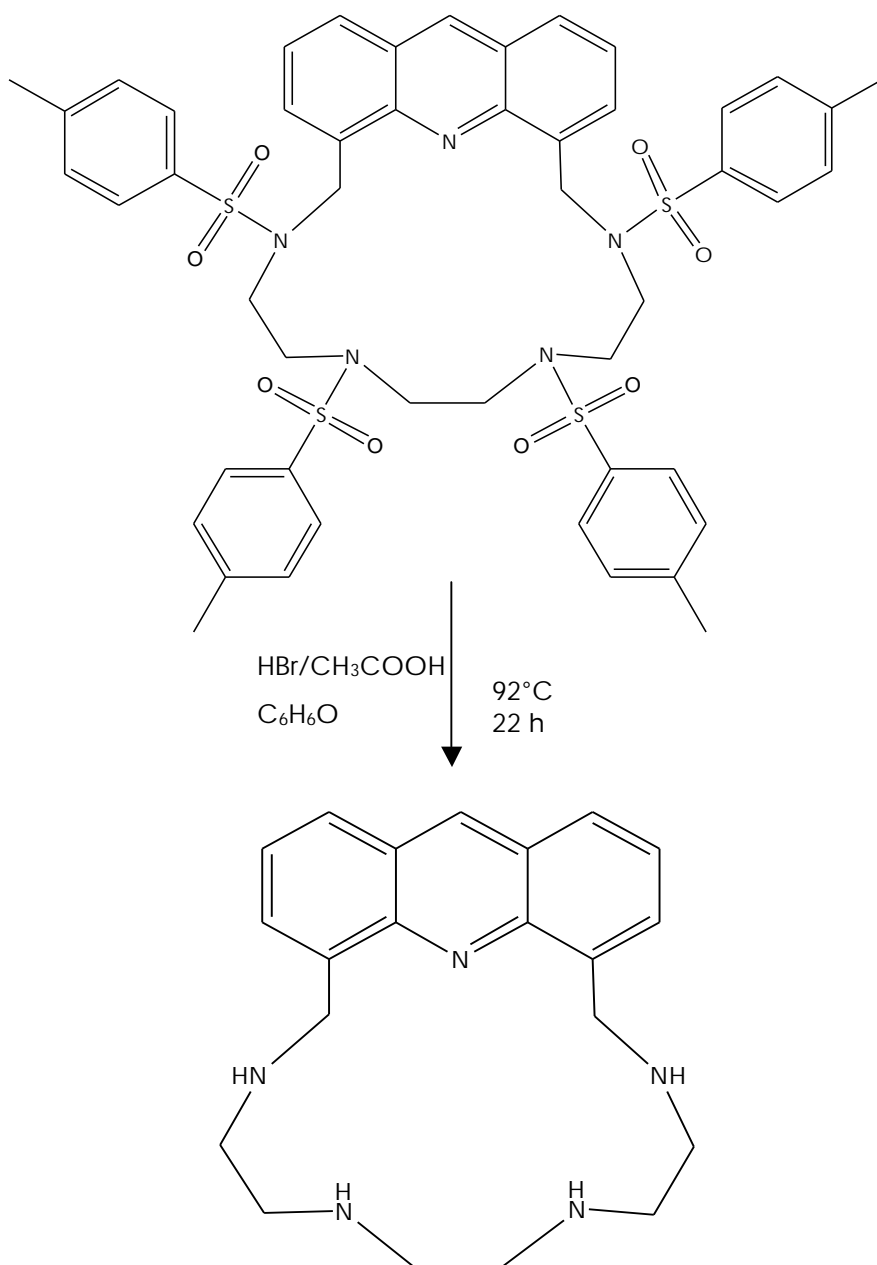


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ_{H} (ppm) 2.38 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 2.54 (t, 4H), 2.70 (t, 4H), 3.39 (t, 4H), 5.18 (s, 4H), 7.21 (d, 4H), 7.32 (d, 4H), 7.42 (d, 4H), 7.54 (dd, 2H), 7.76 (d, 4H), 7.89 (d, 2H), 7.95 (d, 2H), 8.72 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ_{C} 21.64, 21.67, 48.22, 49.18, 49.44, 49.55, 126.06,

126.60, 127.47, 127.69, 127.71, 128.78, 129.74, 129.77, 129.95, 129.98, 132.69, 134.84, 135.19, 135.66, 137.17, 143.44, 143.53, 146.99.

2.1.3 sintesi del legante macrociclico Acry222_{IN} (2,5,8,11-tetraza[15]-4,5-acridinofano)



In un pallone ad un collo munito di due refrigeranti a bolle montati in serie, con tappo a CaCl_2 , sono stati introdotti 500 mg (0.50 mmol) di 2,5,8,11-tetratosil-2,5,8,11-tetraaza[12]-4,5-acridinofano, 7 g di fenolo (74 mmol) e la miscela $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ al 33% (30 mL). La soluzione è stata portata a riflusso.

Trascorse 22 ore si è stata lasciata raffreddare la miscela di reazione fino a temperatura ambiente, quindi sono stati aggiunti 80 mL di CH_2Cl_2 . Il precipitato giallo è stato filtrato su buckner e lavato con CH_2Cl_2 .

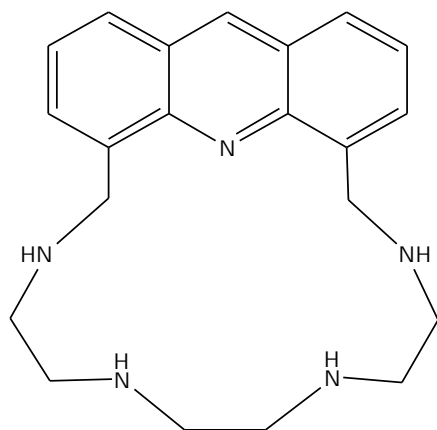
Il solido giallo ottenuto è stato ricristallizzato da una miscela di $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ acidificata con poche gocce di HBr conc.

Il legante Acry222_{IN} è stato quindi ottenuto cristallino come bromidrato (50 mg, PM: 754.04). La resa è circa del 25%.

Analisi elementare per $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5 \cdot 5\text{HBr}$ (PM = 754.04 g/mol)

Calc. C: 33.45% H:4.28% N:9.29%

Sper. C: 34.54% H:4.29% N:8.98%



$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: δ_{H} (ppm) 9.21 (s, 1H), 8.30 (d, 2H), 8.05 (d, 2H), 7.71 (dd, 2H), 5.07 (s, 4H), 3.57 (t, 4H), 3.35 (t, 4H), 3.13 (t, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: δ_{C} (ppm) 145.84, 139.06, 133.91, 131.51, 128.08, 126.82, 126.17, 59.92, 47.94, 44.61, 43.92, 43.48.

2.1.4 Ottenimento dell'ammina libera Acri222_{IN}

Come visto nel paragrafo precedente, il legante macrociclico è stato isolato come pentabromidrato. È stato quindi necessario, soprattutto in vista della successiva caratterizzazione dell'interazione dei leganti con anioni di alogenuri, ottenere la corrispondente ammina libera.

Ciò è stato realizzato mediante utilizzo della resina a scambio anionico DOWEX (8% cross-linking, 20-50 mesh), commercializzata nella sua forma acida, seguendo la seguente procedura:

- lavaggio della resina con H₂O
- lavaggio con NaOH 0.1 M
- lavaggio con H₂O fino al raggiungimento della neutralità
- deposizione del legante, precedentemente solubilizzato nella minima quantità possibile di acqua
- eluizione con acqua
- raccolta a fondo colonna del prodotto, fino al ritorno alla neutralità

Il legante libero così ottenuto ha dimostrato una scarsa stabilità, decomponendosi lentamente a pH alcalino. Per questo motivo, la soluzione ottenuta dall'eluizione della resina è stata acidificata aggiungendo 214 μ L di CH₃SO₃H 1 M.

2.2 Caratterizzazione chimico-fisica del legante

2.2.1 Potenziometria

Le misure potenziometriche sono state effettuate mediante un sistema potenziometrico automatizzato (Fig. 2.1) costituito dalle seguenti parti:

- Potenziometro da ricerca Metrohm 713 pH-meter
- Buretta automatica Metrohm 665 Dosimat
- Agitatore meccanico Metrohm 728 Stirrer
- Cella termostatica della capacità di circa 25 mL termoregolata mediante circolazione di acqua.
- Elettrodo combinato Hamilton Liq-Glass
- Personal computer dotato di interfaccia

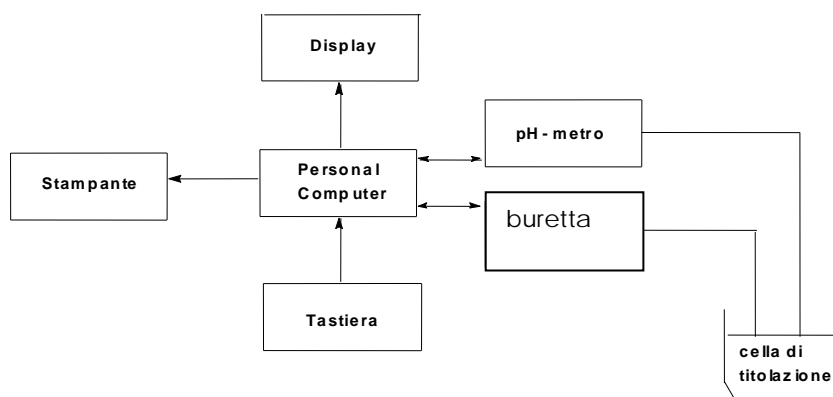


Fig. 2.1 - Schema a blocchi di un sistema potenziometrico.

Tutte le soluzioni usate nelle misure potenziometriche sono state preparate con acqua bidistillata, disareata per ebollizione, raffreddata in ambiente inerte e successivamente passata attraverso un sistema di purificazione Millipore, che garantisce l'eliminazione di specie ioniche e composti organici.

Tutte le misure sono state effettuate a $298 \pm 0.1 \text{K}$, utilizzando una cella potenziometrica termostata a circolazione di acqua. Durante le misure un flusso continuo di azoto è stato mantenuto all'interno della cella allo scopo di evitare la carbonatazione delle soluzioni studiate.

Tutte le misure sono state condotte a forza ionica costante usando soluzioni disareate di $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{NO}_3$ 0.1 M.

I dati ottenuti vengono elaborati con il programma di calcolo HYPERQUAD 2006.

Per determinare le costanti di equilibrio in soluzione è necessario conoscere la concentrazione di tutte le specie all'equilibrio, questo non è generalmente possibile. Per ovviare a questo inconveniente, si mette in relazione la concentrazione di uno dei componenti con le costanti di equilibrio e le concentrazioni iniziali del sistema.

Questa determinazione può essere realizzata per via potenziometrica attraverso la misura della differenza di potenziale esistente fra un elettrodo di riferimento ed un altro elettrodo il cui potenziale è funzione della concentrazione della specie considerata. Nel caso degli equilibri di complessazione nei quali sono coinvolti un legante ed un anione protonabili, le determinazioni delle costanti di equilibrio possono essere effettuate mediante la misura, con un elettrodo a vetro, della concentrazione dello ione idrogeno.

La concentrazione dello ione idrogeno in soluzione ed il potenziale misurato sono in relazione tra loro secondo l'equazione di Nerst:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{F} \ln [H^{+}]$$

E° deve essere sperimentalmente determinato per le condizioni specifiche delle misure potenziometriche richieste e a breve distanza da queste. La calibrazione dell'elettrodo di riferimento nelle condizioni sperimentali impiegate, cioè la determinazione di E° , si realizza attraverso la titolazione di una quantità esattamente nota di acido forte con una base forte. La determinazione di E° e della pK_w sono state effettuate mediante il metodo di Gran, a $T = 298 \pm 0.1 K$, in una soluzione di $N(CH_3)_4NO_3$ 0.1 M.

La concentrazione di legante è stata variata in un intervallo da $4 \cdot 10^{-4}$ - $9 \cdot 10^{-3}$ M. Le misure sono state eseguite in un intervallo di pH tra 2.5 - 10.5.

2.2.2. Spettrofotometria UV-visibile ed emissione di fluorescenza

Gli spettri di assorbimento sono stati registrati con uno spettrofotometro VARIAN Cary 5.

Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati registrati utilizzando uno spettrofluorimetro PerkinElmer Luminescence Spectrofotometer LS 55 con una cella spettrofotometrica di quarzo con un lato di 1 cm.

È stata scelta una λ di eccitazione di 345 nm, come compromesso tra una buona intensità di assorbimento e una piccola variazione di coefficiente di estinzione molare al variare del pH della soluzione investigata.

Gli spettri di emissione di fluorescenza e di assorbimento UV-visibile sono stati registrati su soluzioni con concentrazione $2 \cdot 10^{-5}$ M. Nel caso degli spettri di emissione, si è utilizzata un'ampiezza delle fenditure di ingresso e di uscita di 10 nm. Le soluzioni sono state preparate a partire dalla soluzione madre descritta nel paragrafo precedente. Data l'elevata emissione di fluorescenza del legante è stato anche inserito un filtro a densità neutra di trasmissione con $T=1\%$, così da attenuare la radiazione in arrivo al rivelatore.

Il pH è stato variato tramite aggiunte di soluzioni di NaOH 0,1 M e $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ 0,1 M. L'uso di acido metansolfonico è motivato dalla scarsa tendenza dell'anione metansolfonato a interagire con cationi poliammonici, vista la sua bassa densità di carica.

Per le misure in presenza di fluoruro è stata utilizzata una soluzione a concentrazione $2 \cdot 10^{-1}$ M di NaF, in modo da ottenere precisi rapporti tra le concentrazioni di anione e legante.

Le misure sono state effettuate mantenendo costante in ogni campione la concentrazione di legante, in modo tale da poter trascurare in fase di elaborazione dati l'effetto di diluizione.

Le misure di emissione di fluorescenza su soluzioni preparate all'aria sono risultate poco stabili e scarsamente riproducibili nel tempo, variando a

volte anche sensibilmente l'intensità di fluorescenza nell'arco di alcune ore.

Un miglioramento della stabilità nell'intensità di emissione (vedi grafici capitolo 3) è stato ottenuto disareando le soluzioni tramite flusso di N_2 direttamente in cella prima di registrare gli spettri. Si nota, oltre ad una maggiore stabilità, un notevole aumento dell'intensità di fluorescenza.

Questo effetto è sicuramente da correlarsi all'assenza di ossigeno atmosferico, noto per le sue efficaci proprietà di spegnimento dell'emissione.

Abbiamo quindi preparato le successive soluzioni in glove-box, lavorando in atmosfera di N_2 , riuscendo ad ottenere una notevole riproducibilità e stabilità nelle misure.

Capitolo 3 : Discussione

3.1. Discussione della sintesi

La sintesi del legante macrociclico **Acry222_{IN}** è stata condotta seguendo la procedura di Richman e Atkins¹, opportunamente modificata, secondo questa serie di reazioni:

- Ciclizzazione di un'ammina alifatica N-tosilata con un'unità acridina funzionalizzata nelle posizioni 4 e 5 con gruppi bromometilenici.
- Rimozione dei gruppi tosile dalla molecola.

A differenza di quanto proposto da Richman e Atkins, nel nostro caso non è prevista l'attivazione del nucleofilo attraverso la trasformazione della poliammina N-tosilata nel corrispondente sale sodico.

La sintesi del legante è stata condotta in ambiente anidro. Il solvente usato è acetonitrile anidro in presenza di carbonato di potassio, necessario per neutralizzare l'acido bromidrico che si forma dalla reazione e per promuovere l'attacco nucleofilo, deprotonando il gruppo amminico terminale tosilato che possiede un idrogeno con caratteristiche acide.

Il macrociclo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna e poi detosilato mediante trattamento con una miscela di HBr/CH₃COOH, in presenza di fenolo, seguendo una metodologia standard per questo tipo di composti².

¹ J. E. RICHMAN, T. J. ATKINS, J. Am. Chem. Soc., 96 (1974), 2268

² J. CORMARMOND, P. PLUMIERE, J. M. LEHN, Y. AGNUS, R. LOIS, R. WEISS, O. KAHN, J. M. BADARAN, J. Am. Chem. Soc., 104 (1982), 6330-6340.

Questo metodo, che prevede la riduzione e successiva rimozione dei gruppi tosile, si è rivelato altamente efficace. Esso infatti garantisce una buona resa senza decomposizione del legante.

3.2. Proprietà acido-base

3.2.1. Determinazione delle costanti di equilibrio acido-base

La determinazione e l'analisi delle costanti di protonazione dei leganti risulta di fondamentale importanza per intraprendere qualsiasi altro tipo di studio in soluzione, visto che le proprietà chimico-fisiche di questo tipo di leganti sono profondamente influenzate dal loro grado di protonazione. Gli equilibri di protonazione dei leganti sono stati studiati mediante tecniche potenziometriche e spettroscopiche di assorbimento ed emissione di fluorescenza.

I valori delle costanti di protonazione del legante sono stati determinati potenziometricamente in soluzione acquosa di $N(CH_3)_4NO_3$ 0.1 M a 25°C; sono riportati in Tab. 3.1

Reazione	logK
$L + H^+ \rightleftharpoons [LH]^+$	10.24 (6)
$[LH]^+ + H^+ \rightleftharpoons [LH_2]^{2+}$	9.44 (5)
$[LH_2]^{2+} + H^+ \rightleftharpoons [LH_3]^{3+}$	5.91 (9)
$[LH_3]^{3+} + H^+ \rightleftharpoons [LH_4]^{4+}$	3.36 (9)

Tab. 3.1 Equilibri di protonazione del legante Acry222_{IN} e relative costanti (in unità logaritmiche) in soluzione acquosa ($NaClO_4$ 0.1 M a 25°C). I numeri tra parentesi indicano la deviazione standard sull'ultima cifra significativa.

Osservando i dati in Tab 3.1 si nota una marcata diminuzione delle costanti all'aumentare del grado di protonazione del legante; questo

comportamento, caratteristico dei composti poliamminici, è spiegabile in termini di repulsioni elettrostatiche fra i gruppi amminici protonati, che aumentano all'aumentare del grado di protonazione del legante.

Si nota in particolare una netta differenza tra i valori delle prime due costanti ($\log K = 10.24$ e 9.44) e quelli delle ultime due ($\log K = 3.36$ e 2.26), fatto che si riflette nella stabilità della specie biprotonata in un ampio intervallo di pH (Fig. 3.1). Infatti, dato che le costanti dei primi due step di protonazione sono simili, la specie monoprotoneata risulta essere la meno abbondante, perché già a pH 9.5 inizia a formarsi la specie diprotoneata. Un comportamento simile si osserva per la specie tetraprotoneata nei confronti di quella triprotoneata.

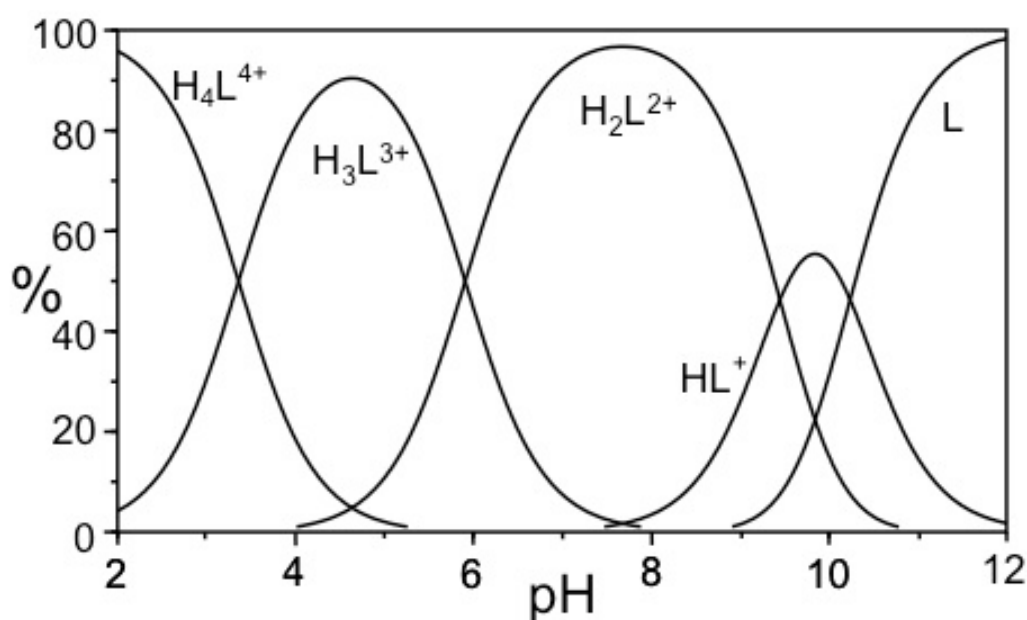


Fig. 3.1 Diagramma di distribuzione delle specie $[LH_n]^{n+}$ in soluzione di $N(CH_3)_4NO_3$ 0.1 M, in funzione del pH ($[L] = 10^{-3}$ M)

3.2.2. Spettrofotometria UV-visibile

Come abbiamo visto nel capitolo 1, la molecola di acridina, in soluzione acquosa, dà luogo ad un equilibrio acido-base, osservabile anche per via spettrofotometrica. In fig. 3.2 abbiamo riportato lo spettro di assorbimento dell'acridina a 3 valori di pH diversi registrati nelle nostre condizioni sperimentali.

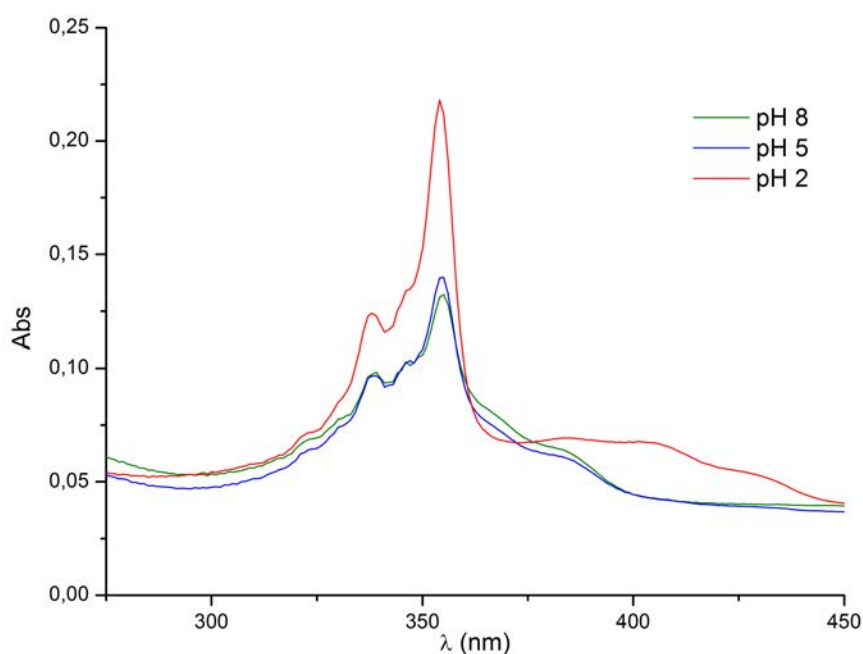


Fig 3.2- Spettri di assorbimento di acridina ai vari pH

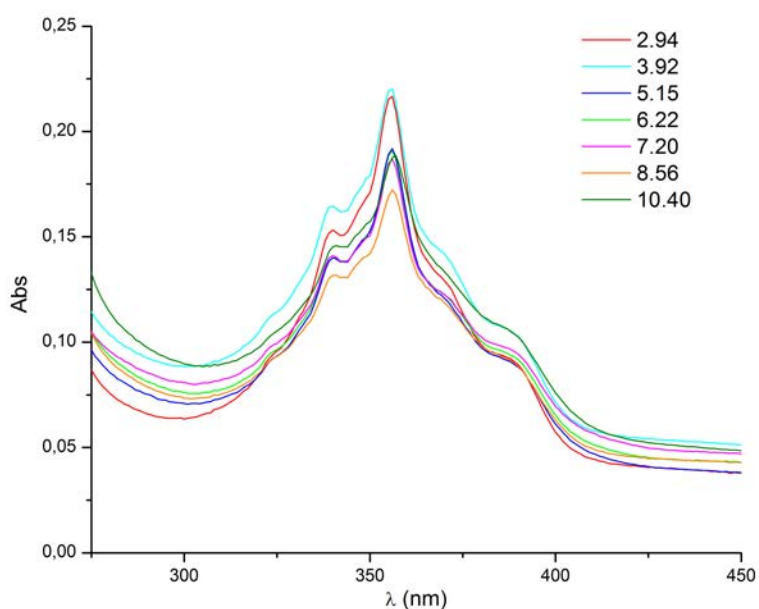


Fig. 3.3 - spettri di assorbimento di Acri222_{IN} ai vari pH

L'equilibrio acido-base che, in funzione della variazione di pH, determina la formazione dello ione acridinio, la specie protonata dell'acridina AcH^+ comporta anche una grande variazione nella forma dello spettro di assorbimento della molecola. Le transizioni elettroniche responsabili degli assorbimenti nella regione spettrale compresa tra 450 e 300 nm sono essenzialmente tre: una relativa alla presenza di un doppietto di non legame sull'azoto acridinico e due che coinvolgono gli orbitali di tipo π delocalizzati sull'anello aromatico. In solventi polari, come la soluzione acquosa in cui le misure sono state eseguite, la transizione a minore energia è di tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e a pH neutro o debolmente alcalino (pH 5 e 8), ove predomina la presenza di acridina non protonata, può essere osservata a circa 385 nm. La transizione associata al doppietto di non legame dell'azoto, cioè di tipo $n \rightarrow \pi^*$, è normalmente poco intensa poiché non permessa e dunque non risulta chiaramente osservabile poiché nascosta dalla precedente. Infine, una seconda transizione ancora centrata sull'anello e dunque di tipo $\pi \rightarrow \pi^{*3,4,5}$, presenta il suo massimo a 355 nm. A pH acido (pH 5.6), si ha la formazione dello ione acridinio, AcH^+ , in cui il doppietto dell'azoto forma un legame con un atomo di idrogeno. Per questa ragione, scompare la transizione $n \rightarrow \pi^*$, mentre quella $\pi \rightarrow \pi^*$ si sposta a minore energia a circa 440 nm. L'assorbimento di radiazione Uv-visibile da parte del legante in soluzione acquosa è dovuto principalmente alla presenza del gruppo cromoforo acridina, essendo il contributo della poliammina trascurabile in questa regione spettrale. A differenza dell'acridina però, il legante non mostra variazione dello spettro di assorbimento al variare del pH (vedi fig. 3.3), anche se le caratteristiche spettrali sono molto simili a quelle dell'acridina. Infatti, come nel caso precedente, anche nel legante si distinguono due sistemi di bande, la

³ O. Rubio-Pons, L. Serrano-Andres, M. Merchán, *J. Phys. Chem. A*, 2001 105, 9664.

⁴ L. A. Diverdi, M. R. Topp, *J. Phys. Chem.*, 1984, 88, 3447.

⁵ R. M. Smith, A. E. Martell, *NIST Stability Constants Database*, version 4.0; National Institute of Standards and Technology: Washington, DC, 1997.

prima con origine a circa 390 nm e la seconda, più intensa, con massimo a 355 nm.

Alla luce di questi dati possiamo ipotizzare dunque che l'azoto acridinico del legante non partecipi agli equilibri acido-base della molecola in soluzione acquosa, e che, dunque, tutte e quattro le costanti acido-base ricavate per via potenziometrica siano relative agli atomi di azoto della catena poliamminica.

3.2.3. Spettrofotometria di emissione di fluorescenza

Nell'acridina libera, l'equilibrio acido-base è chiaramente testimoniato dalla variazione dello spettro di emissione di fluorescenza in funzione del pH. Eccitando una soluzione di acridina con una radiazione di 345 nm, si osserva un'emissione di fluorescenza molto intensa e fortemente dipendente dal pH.

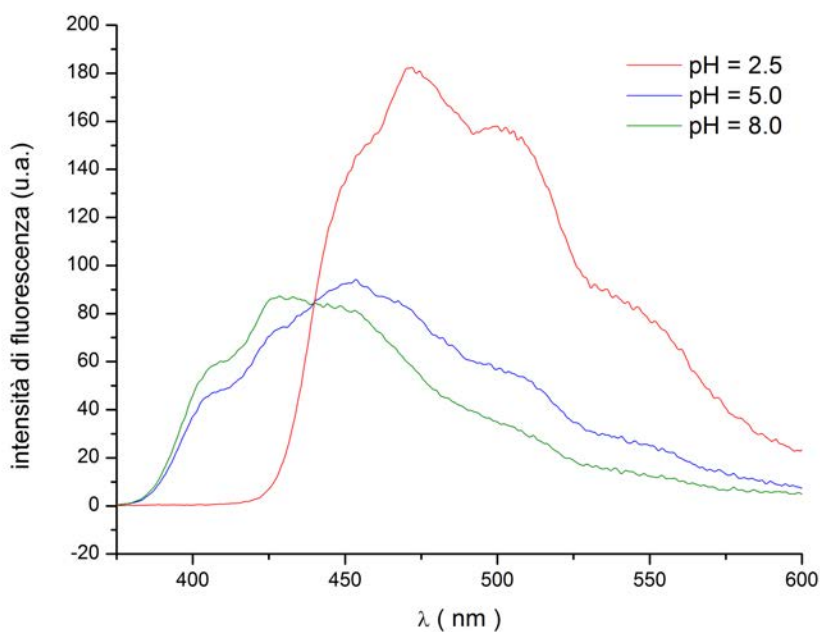


Fig. 3.4– spettri di emissione di fluorescenza di acridina

Come mostrato nella figura 3.4, a pH acido dove è presente principalmente lo ione acridinio AcH^+ , il massimo di emissione si osserva a ca. 450 nm. Viceversa, a pH alcalino, in cui l'acridina è non protonata, Ac , il massimo di emissione è a 420 nm. A valori intermedi di pH, l'emissione osservata risulta da una combinazione delle precedenti. Questo comportamento così complesso dell'emissione di fluorescenza in funzione del pH è determinato dai valori delle costanti di dissociazione acida dello ione acridinio nello stato fondamentale (pK_a di $\text{AcH}^+ = 5.4$) ed in quello eccitato (pK_a^* di $\text{AcH}^{+*} = 9.2^{6,7,8}$). Quando $\text{pH} < \text{pK}_a$, AcH^+ è la specie predominante, l'emissione osservata è prodotta dalla specie AcH^{+*} , il cui massimo è quello ad energia minore. Quando $\text{pK}_a < \text{pH} < \text{pK}_a^*$, la specie presente in soluzione acquosa è Ac ; l'eccitazione di Ac produce una specie Ac^* che ha le caratteristiche di una base più forte di Ac e dunque, in stato eccitato, tenderà a protonarsi generando AcH^{+*} . Di conseguenza lo spettro risultante sarà costituito da due emissioni sovrapposte: una proveniente dalla specie Ac^* ed una dalla specie AcH^{+*} . Lo spettro risultante presenta un massimo di emissione a circa 450 nm (spettro a $\text{pH} = 5$ in Fig.3.4). Infine, se $\text{pH} > \text{pK}_a$ è presente solo la specie Ac e l'emissione proviene solo da Ac^* , responsabile dell'emissione centrata a circa 420 nm (spettro a $\text{pH}=8$). Gli spettri di emissione dell'acridina mostrano un punto isosbastico a 440 nm, indice di un equilibrio acido-base in soluzione.

Misure analoghe sul legante mostrano un comportamento in netto contrasto con quello dell'acridina. A pH fortemente acidi, dove la specie prevalente è H_4L^{4+} si ha un forte spostamento verso il blu, con un massimo del picco a ca. 430 nm, simile alla banda dell'acridina non protonata.

⁶ A. Gafni, L. Brand, *Chem. Phys. Lett.*, 1978, 58, 346.

⁷ E. Todd Ryan, T. Xiang, K.P. Johnston, M.A. Fox, *J. Phys. Chem. A*, 1997, 101, 1827.

⁸ J. Rak, J. Blazejowski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1992, 92, 287.

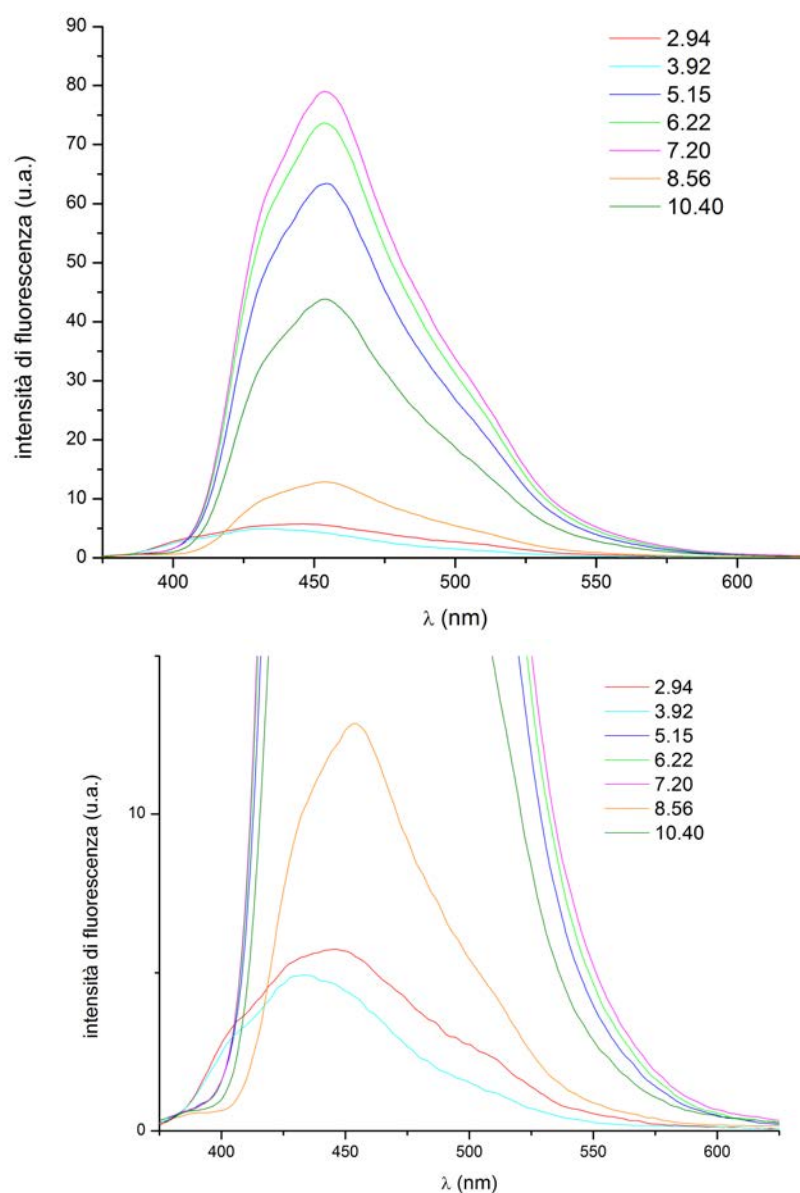


Fig. 3.5- spettri di emissione di fluorescenza di Acrid222_{IN}
a) spettro completo b) espansione dello spettro nella zona a pH acido

A pH intermedi, $4 < \text{pH} < 10$, dove le forme prevalenti sono H_3L^{3+} e H_2L^{2+} , il massimo si sposta a ca. 456 nm, come nel caso dell'acridina protonata. Paradossalmente, gli spettri registrati a pH molto acido (pH 2,94 e 3,92) sono simili a quelli dell'acridina non protonata, presente in soluzione a pH alcalino, neutro o solo debolmente acido, mentre gli spettri del legante a

pH alcalino sono simili a quelli dello ione acridinio, presente in soluzione acquosa solo a pH decisamente acido.

A pH fortemente alcalino, dove prevale la forma neutra L, si ha una netta diminuzione della fluorescenza, la cui forma però rimane del tutto simile alla precedente.

Non si osserva alcun punto isosbastico, indice dell'assenza di un equilibrio acido-base dell'azoto eteroaromatico in soluzione.

L'inserimento dell'acridina nella catena alifatica poliamminica modifica sensibilmente le caratteristiche di emissione di fluorescenza della molecola. Questo comportamento può essere imputato alla presenza, al numero e alla posizione di protoni acidi legati agli atomi di azoto della catena poliamminica, che possono influenzare lo stato di protonazione dell'azoto acridinico. Come osservato infatti dai dati potenziometrici e di assorbimento esposti precedentemente, è corretto supporre che l'azoto eteroaromatico non sia direttamente coinvolto negli equilibri acido-base; infatti lo spettro di assorbimento del legante è equivalente a quello dell'acridina non protonata, ad indicare che l'atomo di azoto eteroaromatico non è protonato almeno nello stato fondamentale della molecola. Possiamo indicare questa forma dell'acridina nel legante come "forma neutra" (A in figura 3.7).

L'emissione di fluorescenza a pH intermedi, tra pH 4 e 10, è tuttavia simile a quella di uno stato che possiamo definire "forma protonata" (B in figura 3.7). Per spiegare questo stato sono necessarie ulteriori osservazioni riguardo lo stato fondamentale e lo stato eccitato della molecola di legante. L'emissione di fluorescenza coinvolge il primo stato eccitato S_1 della molecola. Come osservato in precedenza, le proprietà acido-base dell'acridina in questo stato sono diverse rispetto allo stato fondamentale: in S_1 l'acridina è più basica.

Possiamo dunque ipotizzare che l'aumento di basicità dell'azoto acridinico porti a favorire, allo stato eccitato, un processo di trasferimento

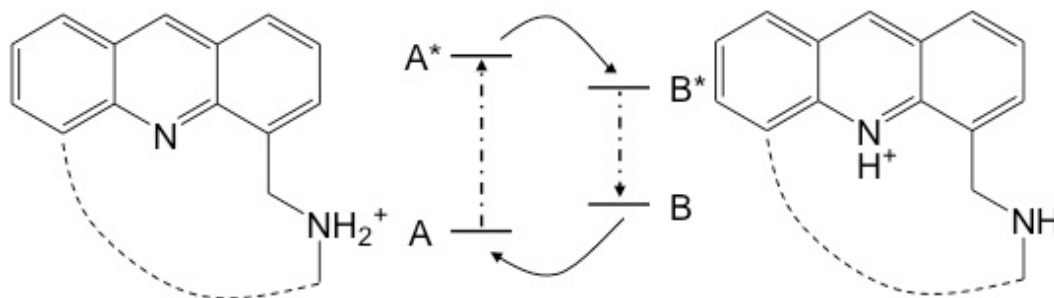


Fig. 3.7 – Rappresentazione schematica degli stati eccitati del legante e del trasferimento protonico tra lo stato A^ e lo stato eccitato B^* responsabile del trasferimento protonico.*

protonico intramolecolare, che coinvolge gli idrogeni legati agli atomi di azoto della catena alifatica più vicini all'acridina, e l'azoto eteroaromatico, come già osservato in altri derivati dell'acridina^{9,10,11,12}.

L'eccitazione della forma A pH lievemente acido o debolmente basico porta alla forma A^* eccitata, che passa quasi immediatamente alla forma B^* eccitata mediante trasferimento protonico intramolecolare.

Lo spettro di emissione è dovuto al decadimento radiativo dallo stato B^* metastabile allo stato fondamentale B, che ristabilisce lo stato termodinamicamente più stabile A attraverso il processo inverso di trasferimento protonico.

La transizione $A \rightarrow A^*$ si osserva mediante spettrofotometria di assorbimento, mentre la transizione $B^* \rightarrow B$ mediante emissione di fluorescenza.

Questa ipotesi spiega la tipica emissione dell'acridina protonata negli spettri tra pH 4 e 10, in cui però, allo stato fondamentale, l'azoto acridinico del legante non è protonato, come dimostrano gli spettri di assorbimento.

⁹ A. Gafni, L. Brand, *Chem. Phys. Lett.*, 1978, 58, 346.

¹⁰ E. Todd Ryan, T. Xiang, K.P. Johnston, M.A. Fox, *J. Phys. Chem. A*, 1997, 101, 1827.

¹¹ P. Gangola, N. B. Joshi, D. D. Pant, *Chem. Phys. Lett.*, 1979, 60, 329.

¹² C. A. Smith, H.-C. Chang, W. S. Struve, G. J. Atwell, W. A. Denny, *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 8927.

Il meccanismo non spiega però la diminuzione di intensità di fluorescenza a pH fortemente alcalino o lo spostamento verso il blu, a ca. 430 nm, osservato a pH fortemente acido. La scarsa emissione a pH alcalino può essere imputata ad uno spegnimento della fluorescenza per effetto PET (capitolo 1) ossia dovuto ad un trasferimento di elettroni dai doppietti di non legame degli atomi di azoto alifatici non protonati al fluoroforo allo stato eccitato. L'effetto PET è inoltre inibito dalla protonazione degli atomi di azoto della catena, come avviene già per la forma biprotonata H_2L^{2+} a pH debolmente alcalino. Più difficoltoso è giustificare l'emissione osservata a pH fortemente acido. Poiché l'emissione che si osserva in questo caso è molto simile a quella dell'acridina neutra, e poiché c'è una buona corrispondenza tra lo spettro di assorbimento e quello di emissione a questo valore di pH, la specie che assorbe deve essere la stessa che è responsabile dell'emissione, cioè la specie A. Questo significa che nel legante tetraprotonato, prevalente in soluzione a pH 2,94 e 3,92, il trasferimento del protone dall'azoto vicinale della catena all'azoto acridinico nello stato eccitato non avviene. La ragione di questo comportamento anomalo può essere intuitivamente compresa considerando come può cambiare la struttura del legante quando un protone acido, e dunque una carica positiva, si lega sulla catena poliamminica. Maggiore è la densità di carica, maggiori saranno le forze di repulsione tra gli azoti protonati della catena che dunque tenderanno ad allontanarsi il più possibile tra loro. L'effetto risultante è un allargamento della catena poliamminica che di fatto allontana gli atomi di azoto alifatici protonati e dunque anche i relativi atomi di idrogeno, dall'atomo di azoto, rendendo di fatto impossibile il trasferimento protonico nello stato eccitato.

In sintesi, la specie tetraprotonata ha una elevata densità di carica positiva che induce modificazioni nella struttura del macrociclo per minimizzare le repulsioni tra cariche dello stesso segno e impedisce l'ulteriore ingresso di

un quinto protone sull'azoto acridinico. Tali modificazioni allontanano gli atomi di azoto protonati dall'atomo di azoto dell'acridina, inibendo il trasferimento protonico in stato eccitato.

3.3 Emissione di fluorescenza in atmosfera di N₂

Le misure di fluorescenza esposte nel paragrafo precedente si riferiscono a campioni preparati in aria. Per questi campioni sono state osservate piccole variazioni dell'emissione di fluorescenza nel tempo ed, ad alcuni valori di pH, una scarsa riproducibilità. Si è dunque deciso di operare in assenza di ossigeno, gorgogliando azoto direttamente nelle soluzioni. Questa operazione ha reso maggiormente riproducibili le misure ed ha inoltre prodotto un incremento generale delle intensità delle emissioni osservate (vedi fig 3.8b).

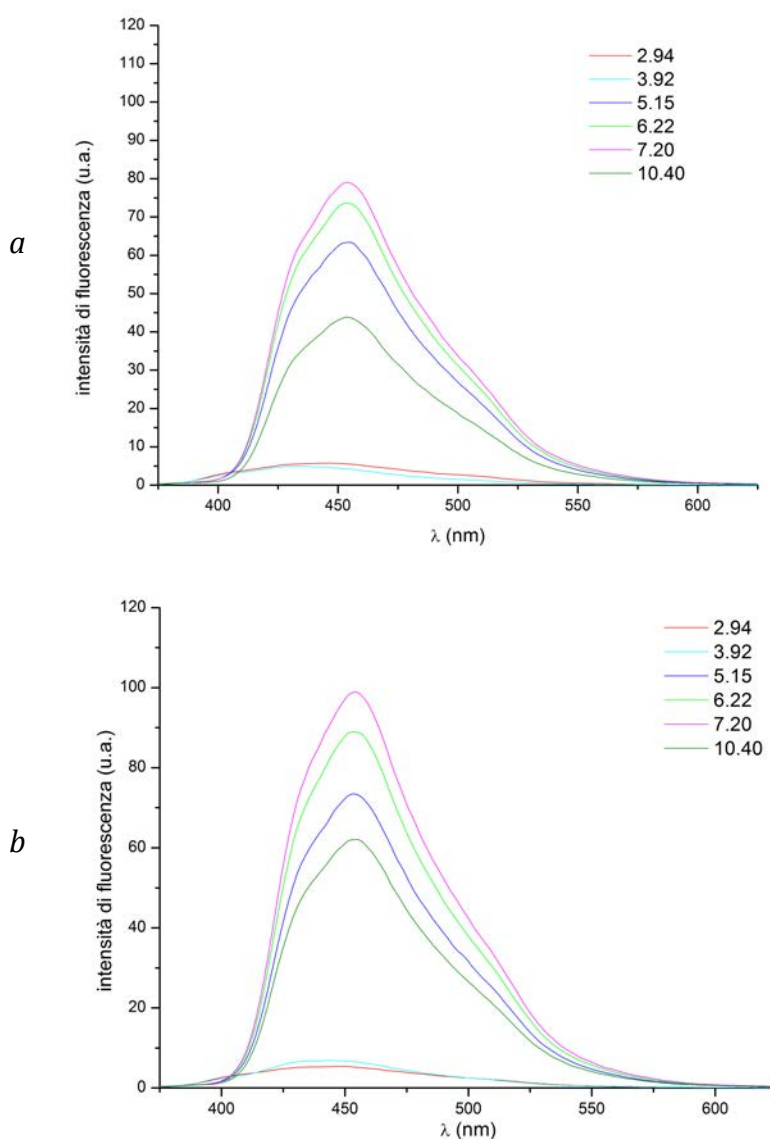


Fig. 3.8 –
spettri di
emissione di
fluorescenza di
Acrid222_{IN} in
conc. $2 \cdot 10^{-5}$ M in
a) ossigeno; b)
atmosfera di
azoto

Questo incremento è ovviamente da correlarsi all'assenza di O₂ disciolto in soluzione, gas notoriamente responsabile di effetti di spegnimento nelle soluzioni, dovuto ragionevolmente al suo paramagnetismo che può favorire fenomeni di decadimento non radiativo del fluoroforo. Viceversa, la disareazione delle soluzioni non comporta alcuna variazione negli spettri di assorbimento della molecola, come mostrato nella fig 3.9.

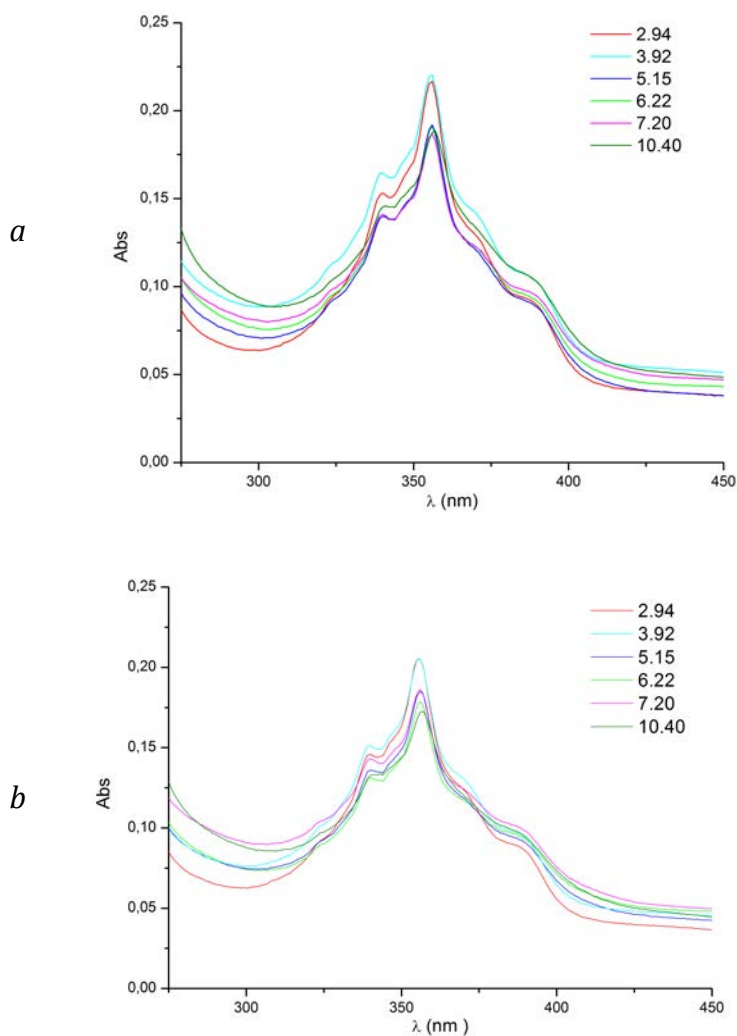


Fig. 3.9 – spettri di assorbimento di Acrid222_{IN}, conc. $2 \cdot 10^{-5} M$ in : a) ossigeno; b) atmosfera azoto

Le misure successive sono allora state eseguite su campioni preparati direttamente in glove-box, in flusso di azoto e quindi in atmosfera inerte. Con questa ulteriore precauzione, abbiamo ottenuto un'ottima

riproducibilità nelle misure effettuate. Gli spettri di emissione registrati e la dipendenza dal pH dell'intensità di emissione a 456 nm sono riportati nelle figure 3.10 e 3.11.

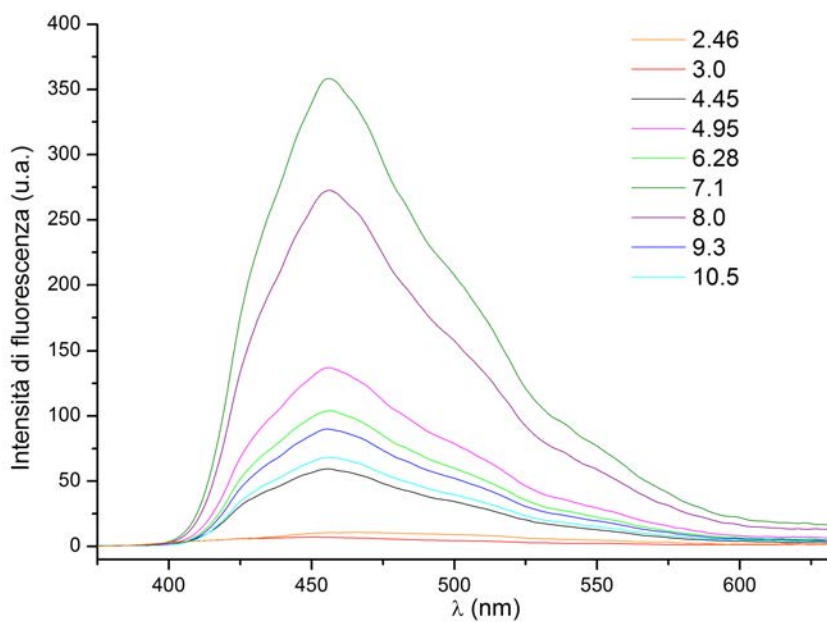


Fig. 3.10 – Emissione di fluorescenza di Acrid222_{IN}, valori misurati su soluzioni preparate in glove box

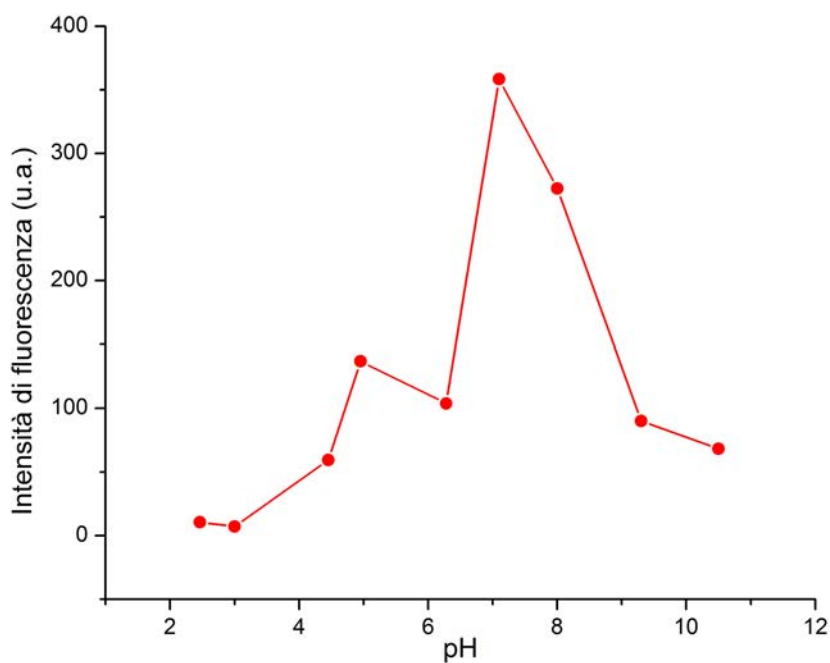


Fig. 3.11 – Massimi di emissione di fluorescenza in funzione del pH (relativi alla fig. 3.10)

Analizzando i risultati mostrati nella fig. 3.11, l'emissione di fluorescenza ha una forte dipendenza dal valore di pH della soluzione. Nell'intervallo di pH 2 - 11, l'emissione aumenta con l'aumentare del pH per raggiungere un massimo a circa 7 e ridiminuire a pH molto alcalini. Questo andamento è comunque pressochè analogo a quello registrato utilizzando soluzioni preparate all'aria.

3.4. Interazione del legante con ione fluoruro

Il legante Acry222IN ha teoricamente un vasto intervallo di pH in cui potrebbe formare complessi con gli anioni ed essere usato come sonda per determinarli. Per caratterizzare questa sua proprietà, alle soluzioni di legante ai vari pH, sono state aggiunte quantità note di una soluzione $2 \cdot 10^{-1}$ M di NaF e, sui campioni risultanti, sono stati misurati sia lo spettro di assorbimento elettronico che l'emissione di fluorescenza. La scelta di iniziare la caratterizzazione del legante con l'anione F^- deriva dal fatto che normalmente questo anione presenta complessi più stabili con cationi poliammonici rispetto ad altre specie anioniche.

Le misure, i cui spettri sono di seguito riportati, sono state effettuate su soluzioni aventi un rapporto legante:fluoruro = 1:1 e si riferiscono alle soluzioni disareate tramite gorgogliamento di azoto.

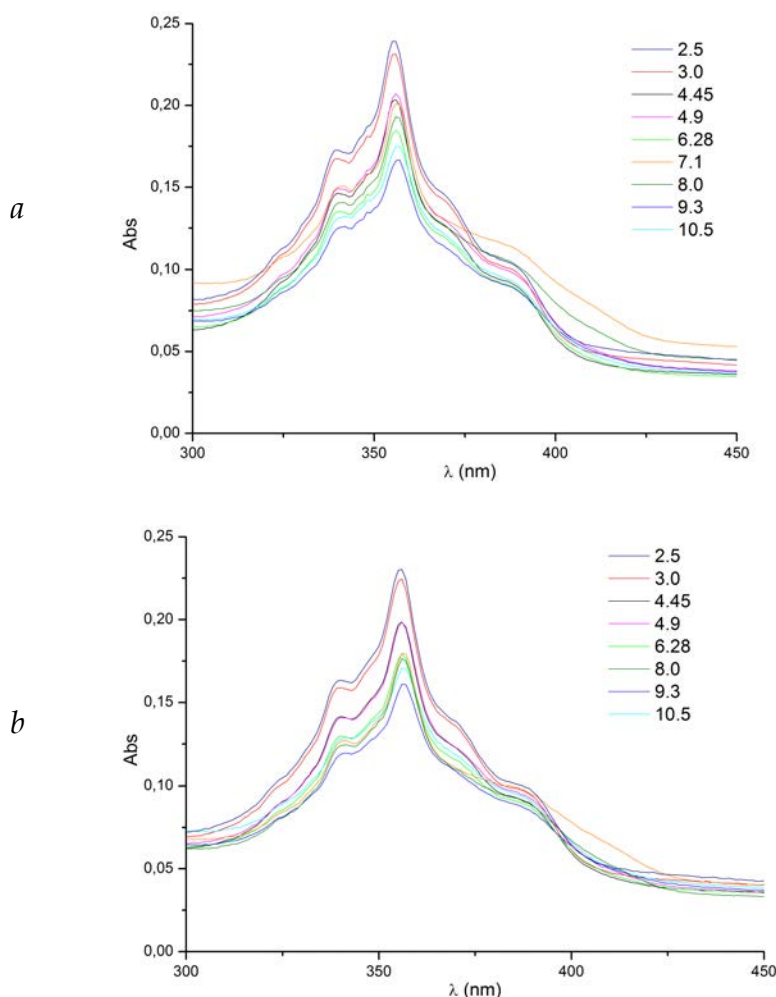


Fig. 3.12 – spettri di assorbimento di Acry222_{IN} conc. $2 \cdot 10^{-5}$ M in : a) legante libero b) presenza di fluoruro in rapporto legante:F⁻ = 1:10

Come mostrato nella fig. 3.12, lo spettro di assorbimento del legante sembra non risentire dell'aggiunta dell'anione. Al contrario l'emissione di fluorescenza risulta modificata e lo è in maniera diversa ai vari pH esaminati, vedi Fig. 3.13. La fig. 3.14 mostra come varia l'intensità sul massimo dell'emissione ($\lambda = 456$ nm) in funzione del pH. L'effetto maggiore si osserva in corrispondenza della zona intermedia di pH, tra valori medi o debolmente acidi, dove la curva rossa si discosta decisamente da quella nera.

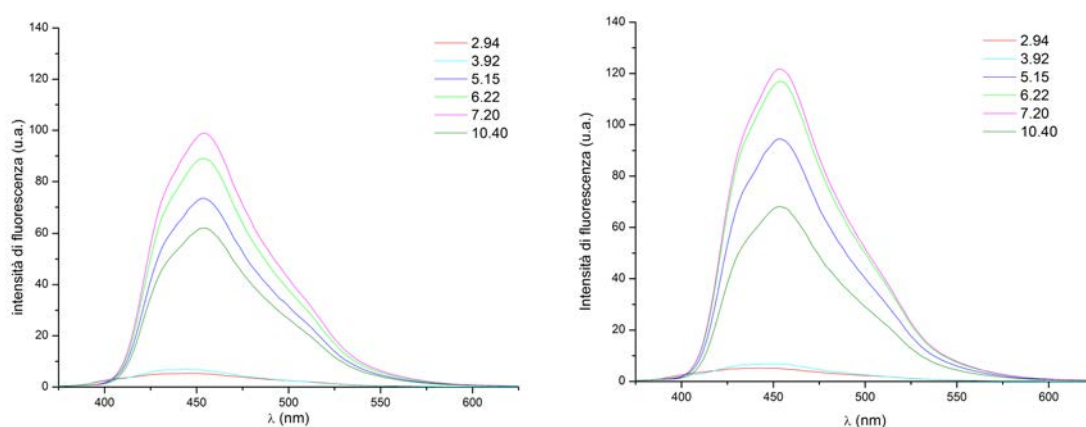


Fig. 3.13 – intensità di fluorescenza di Acrid222_{IN} conc. $2 \cdot 10^{-5}$ M in : a) legante libero b) presenza di F⁻ in rapporto legante:F⁻ = 1:1

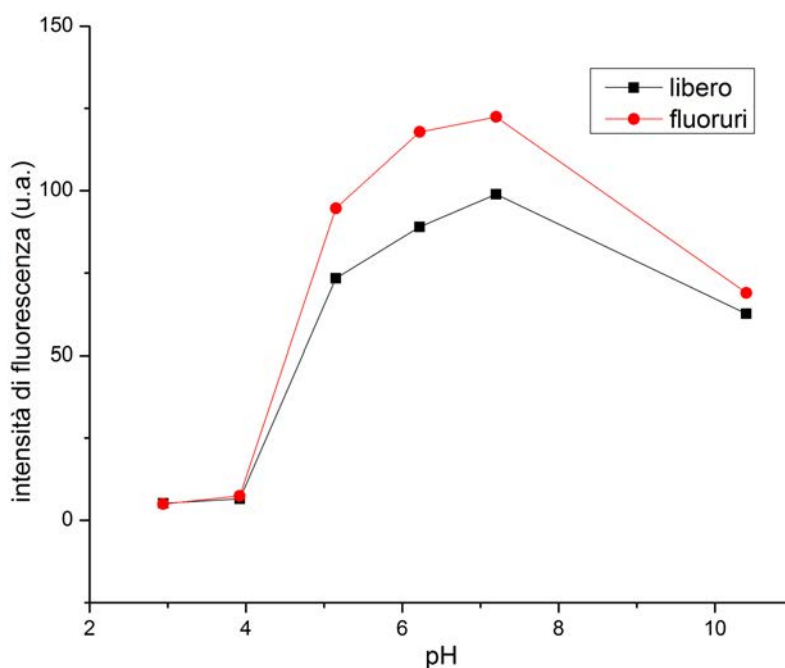


Fig 3.14 – Massimi di emissione a 456 nm di Acrid222_{IN} conc. $2 \cdot 10^{-5}$ M senza fluoruro e con fluoruro in rapporto legante:F⁻ = 1:1

Una seconda serie di misure e' stata eseguita su soluzioni preparate in glove box. I relativi spettri sono mostrati in figura 3.15 e 3.16

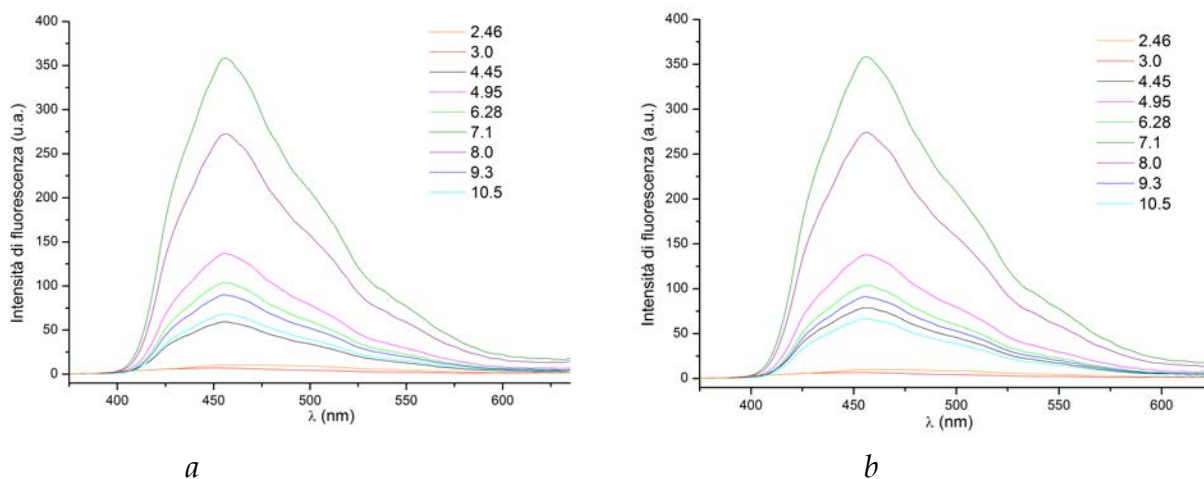


Fig. 3.15 – spettri di fluorescenza di Acrid222_{IN} conc. $2 \cdot 10^{-5}$ M in : a) legante libero b) presenza di F⁻ in rapporto legante:F⁻ = 1:10

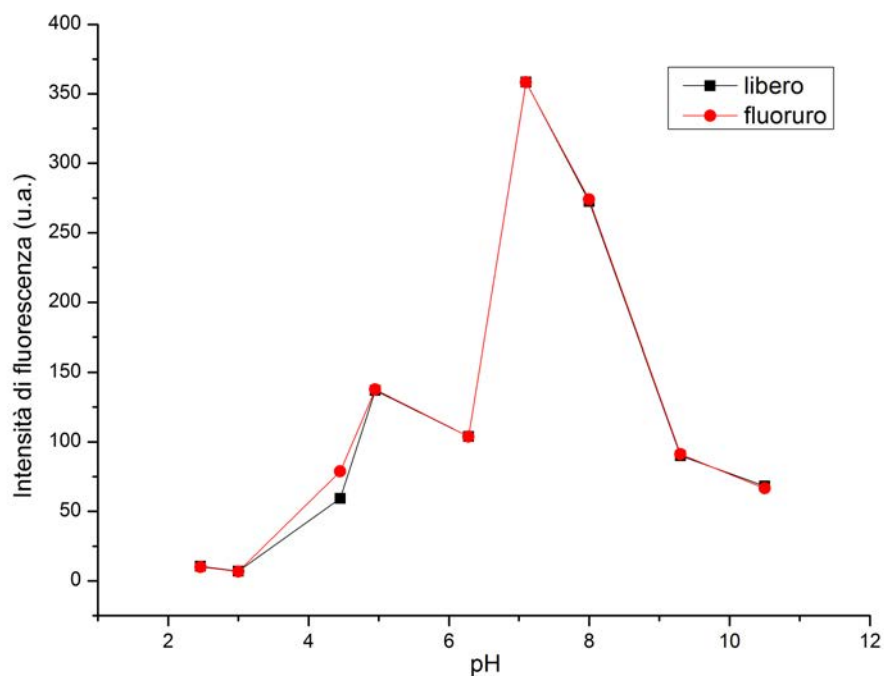


Fig. 3.16 – Massimi di emissione a 456 nm di Acrid222_{IN} conc. $2 \cdot 10^{-5}$ M senza fluoruro e con fluoruro in rapporto legante:F⁻ = 1:10

Come mostra la figura 3.16, in questo caso la fluorescenza del legante in presenza di fluoruro aumenta solo in un piccolo intervallo di pH compreso tra 3 e 5.

Confrontando l'emissione di fluorescenza dei due diversi set di dati si osserva inoltre come il massimo di fluorescenza del primo set sia ca. il 30% di quella del secondo set.

Nonostante i due set di misure mostrino andamenti diversi in funzione del pH, entrambi indicano che l'aggiunta di ioni fluoruro determina un incremento dell'emissione di fluorescenza. Questo effetto può essere messo in relazione con interazioni del sistema π dell'anello aromatico con l'anione fluoruro, (come descritto nel paragrafo 1.7). L'anione F^- fortemente polarizzante, può interagire con il sistema aromatico modificandone le proprietà di fluorescenza. Questo tipo di interazione non spiega però il diverso comportamento dei due set di misure mostrati precedentemente, che rimane di difficile interpretazione.

Va però evidenziato come i due set di esperimenti siano stati effettuati utilizzando diversi rapporti molari tra legante e fluoruro. E' anche evidente, dai risultati presentati in questo capitolo e da quelli riportati nel capitolo 3.1, che la presenza di ossigeno influenzi moltissimo l'emissione di fluorescenza del legante. Da questo punto di vista, differenti quantità di ossigeno presenti in soluzioni preparate in glove-box o in soluzioni deossigenate attraverso il gorgogliamento di azoto possono contenere pur sempre piccole, ma differenti, quantità di ossigeno.

Questi aspetti, insieme al 'modus operandi' diverso utilizzato nei due set di esperimenti e alla ben nota sensibilità dell'emissione di fluorescenza a molti parametri ambientali, possono concorrere a spiegare i differenti risultati ottenuti.

Purtuttavia, i risultati preliminari ottenuti sembrano suggerire che in presenza dello ione fluoruro si abbia un aumento dell'emissione, almeno a pH debolmente acidi. Questi risultati non ci permettono di razionalizzare

la modalità di interazione dello ione fluoruro con il legante ne tantomeno di spiegare l'incremento di emissione osservato. Va però ricordato che in genere la semplice interazione elettrostatica e via legame ad idrogeno tra specie anioniche, incluso l'anione fluoruro, e gruppi ammoniacali appartenenti a recettori fluorescenti portano in genere a uno spegnimento dell'emissione di fluorescenza, in quanto la parziale condivisione del protone acido del gruppo NH_2^+ e la specie anionica via legame ad idrogeno rende il doppietto elettronico dell'atomo di azoto più disponibile a dare effetto PET. In ogni caso, altri tipi di interazione possono concorrere a determinare l'emissione del nostro recettore e l'anione fluoruro. Come già accennato nella parte introduttiva, forti interazioni anione- π possono instaurarsi tra sistemi aromatici estesi elettronpoveri, come l'acridina, e anioni caratterizzati da alto rapporto carica/raggio, come l'anione fluoruro. E' logico aspettarsi che una simile interazione possa influenzare l'intensità di emissione.

Anche questo aspetto dovrà essere chiarito in studi futuri, sia di tipo sperimentale che teorico.

Capitolo 4 : Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato sintetizzato un sistema macrociclico poliamminico costituito da una unità acridina ed una catena tetraamminica. La catena poliamminica è legata nelle posizioni 4 e 5 dell'unità acridina e l'atomo di azoto eteroaromatico si trova all'interno della cavità macrociclica.

Obiettivo di questo progetto di tesi è stato lo studio delle proprietà acido-base e spettroscopiche di questo legante al fine di poterlo utilizzare come sonda fluorescente per anioni. Quest'ultima possibilità è stata verificata, sia pure in maniera preliminare, nel caso di anioni fluoruro.

Le proprietà acido-base in soluzione acquosa sono state determinate mediante misure potenziometriche, di assorbimento UV-visibile e di spettrofotometria di emissione di fluorescenza.

I risultati ottenuti da queste misure hanno evidenziato come l'atomo di azoto acridinico non prenda parte agli equilibri acido-base di protonazione del legante. Il legante ha mostrato una forte dipendenza dell'emissione di fluorescenza dal pH della soluzione, in accordo con quanto precedentemente riportato sul cromoforo acridina. Tuttavia, l'andamento di tale variazione risulta opposto a quello osservato per l'acridina.

Il legante infatti presenta a pH acido uno spettro con forma e massimo di emissione corrispondenti a quello dell'acridina non protonata, mentre a pH alcalino la forma spettrale è simile a quella dello ione acridinio.

Questa apparente discrepanza è da ricondursi ad un fenomeno di trasferimento intramolecolare di protone che avviene nel catione tetraprotonato H_4L^{4+} nel suo stato eccitato in un intervallo di pH compreso tra 3 e 10.

In presenza dell'anione fluoruro la fluorescenza del legante aumenta, fenomeno osservato in un ristretto intervallo di pH, tra 3 e 5. Anche se i dati a nostra disposizione non ci permettono di dedurre un meccanismo certo per spiegare questo effetto, l'incremento dell'emissione osservato potrebbe essere dovuto alle interazioni tra il sistema π elettron-povero del sistema aromatico e l'anione.