



Università degli Studi di Firenze

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica

Anno Accademico 2011/2012

***Un recettore fluorescente contenente un'unità
chinolina per la coordinazione di cationi metallici e
anioni.***

***A quinoline-containing fluorescent receptor for both metal cation
and anion binding.***

Candidato:

Aurel Mullaj

Relatore:

Prof. Andrea Bencini

Correlatore:

Prof. Claudia Giorgi

Indice

	<i>Pag.</i>
1 – Introduzione	4
1.1 – Addotti Supramolecolari	4
1.2 – Interazione non covalente	5
1.3 – Leganti macrociclici	6
1.4 – Fotochimica	8
1.5 – Processi radiativi	9
1.6 – Fluorescenza e fosforescenza	10
1.7 – Meccanismi di modulazione della fluorescenza	10
1.7.1 – Trasferimento elettronico fotoindotto (PET)	11
1.7.2 – Trasferimento energetico elettronico (EET)	12
1.7.3 – Trasferimento di carica fotoindotto (PCT)	13
1.7.4 – Trasferimento di protone fotoindotto	14
1.7.5 – Formazione di eccimeri	15
1.8 – Chemosensori	16
1.8.1 – Chemosensori fluorimetrici	17
1.8.2 – Sensori fluorimetrici per specie anioniche	19
1.9 – Chinolina	22
1.10 – Obiettivo di questo progetto di tesi	24

2 – Parte sperimentale	26
2.1 – Tecniche chimico-fisiche	26
2.1.1 – Potenziometria	26
2.1.2 – Metodi di calcolo	28
2.1.3 – Spettroscopia elettronica (UV – visibile)	34
2.1.4 – Spettroscopia di emissione di fluorescenza	34
2.1.5 – Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare	35
2.1.6 – Diffrazione di raggi X su cristallo singolo	35
3 – Discussione	36
3.1 – Proprietà acido-base del legante	36
3.2 – Coordinazione di anioni	37
3.3 – Coordinazione di ioni metallici	41
3.3.1 – Struttura cristallina del complesso	43
3.3.2 – Spettroscopia di assorbimento UV-visibile	45
3.3.3 – Emissione di fluorescenza	48
3.3.4 – Spettroscopia NMR	54
3.4 – Coordinazione di specie anioniche da parte del complesso di zinco	56
3.4.1 – Determinazione delle costanti di formazione dei complessi in soluzione	56
3.4.2 – Spettri ^{31}P , ^1H -NMR e di emissione di fluorescenza del complesso in presenza dei substrati anionici	58
3.5 – Conclusioni	63
Ringraziamenti	64

1 – Introduzione

1.1 – Addotti supramolecolari

La chimica supramolecolare è il ramo della chimica che studia sistemi formati da due o più specie molecolari che interagiscono tra di loro attraverso forze di tipo non covalente^{1,2}, cioè interazioni deboli (forze di natura elettrostatica, legami a idrogeno, interazioni di stacking, forze di Van der Waals). Gli addotti che si formano, pur essendo costituiti da legami non covalenti, hanno caratteristiche chimiche e chimico-fisiche diverse rispetto alle molecole che li compongono. I legami sono più deboli ma molto più numerosi rispetto ai legami intramolecolari, garantendo sia stabilità che versatilità agli addotti. Inoltre le forze che sono all'origine della loro formazione sono anche responsabili della specificità, della selettività e della cooperatività di numerosi processi biologici, come per esempio l'associazione antigene-anticorpo, la catalisi enzimatica, il trasporto attraverso le membrane, la trascrizione del codice genetico e la formazione di complessi proteina-proteina. Gli addotti supramolecolari³ si formano in genere a seguito dell'associazione di due specie molecolari distinte: una di dimensioni maggiori, che prende il nome di "recettore" o "host", e una di dimensioni minori, detta "substrato" o "guest". La formazione dell'addotto supramolecolare si realizza solo se è garantita la formazione di interazioni stabili e selettive tra le due unità, cioè se le specie sono complementari. L'interazione quindi è una forma di riconoscimento molecolare⁴. Nel caso in cui il recettore possiede, oltre ai siti di legame, anche opportuni gruppi funzionali, sarà in grado non solo di coordinare uno specifico substrato, ma anche di trasformarlo a seguito di una reazione chimica, comportandosi quindi come un vero e proprio reagente o catalizzatore. Proprio per questo motivo alcuni addotti supramolecolari sono responsabili del trasporto di specifici substrati, i quali da soli non sarebbero solubili in mezzi a carattere lipofilo, attraverso le membrane cellulari. L'ambito biologico non è il solo in cui la chimica supramolecolare svolge un ruolo importante; altri campi dove trova largo impiego sono la sintesi di nuovi materiali e la costruzione di elettrodi selettivi.

1 Lehn J.M.; Supramolecular chemistry, VCH: Weinheim 1995

2 N.N. Greenwood, A. Earnshaw; Chimica Degli Elementi

3 Lehn J.M.; Struct. Bonding, Berlin 1973, 16, 1

4 D. J. Cram, J. M. Cram, Science, Washington, 183 (1974), 803.

In generale la progettazione di un recettore è tesa all'interazione selettiva con un particolare substrato al fine di formare un composto di coordinazione che possieda un'elevata stabilità cinetica e termodinamica. Come recettori vengono spesso impiegati leganti macrociclici.

1.2 - Interazione non covalente

Lo stabilirsi di un numero elevato di interazioni deboli è sufficiente a conferire ad un composto di coordinazione una stabilità paragonabile a quella di una struttura formata da un numero minore di interazioni forti, pur mantenendo come vantaggio una maggiore facilità al cambiamento della geometria strutturale poiché un'eventuale riorganizzazione, spesso utile a collocare opportunamente i siti di legame per meglio adattarsi al guest, necessita della rottura di interazioni ad energia minore di quelle covalenti. La formazione degli addotti è quindi reversibile e permette il riarrangiamento fino alla struttura più stabile e funzionale. Questo spiega la capacità degli addotti supramolecolari di svolgere funzioni diverse e quindi la loro presenza fondamentale nei sistemi biologici. Esaminiamo ora brevemente le interazioni deboli che possono instaurarsi nella formazione di un composto di coordinazione.

- Legame a Idrogeno: possiede la più elevata direzionalità tra le forze deboli e la sua energia dipende dalla permittività elettrica del mezzo in cui si manifesta; questo perché il legame a Idrogeno è un caso particolare di interazione dipolare, una parziale donazione di H^+ tra un atomo molto elettronegativo a cui l'Idrogeno è legato covalentemente e un atomo (chiamato accettore) che possiede un doppietto di elettroni libero. Per queste sue caratteristiche questo tipo di interazione può conferire al legante un'elevata selettività verso uno o più substrati.
- Interazione di stacking: di tipo "face to face" o "edge to face", è un'interazione elettrostatica che si instaura tra due sistemi con delocalizzazione π , uno elettrone-ricco (in genere un anello aromatico con sostituenti elettrone-donatori) e uno elettrone-povero (in genere un anello aromatico con sostituenti elettrone-attrattori). In Natura è molto diffusa nelle macromolecole biologiche (proteine, acidi nucleici).
- Forze di Van der Waals: si tratta di interazioni di tipo dipolo-dipolo tra dipoli

permanenti, dipoli istantanei e dipoli indotti. Dipendono marcatamente dalla polarizzabilità delle molecole coinvolte e risultano fondamentali nel caso di host e guest apolari.

- Interazione elettrostatica: oltre ai casi particolari citati sopra, forze elettrostatiche di tipo coulombiano o dipolare sono spesso alla base delle interazioni selettive tra host e guest, soprattutto nel caso di molecole con elevata polarizzabilità.
- Effetto idrofobo: si osserva nell'associazione di due o più unità apolari in ambiente acquoso (polare) e spesso si basa su una complementarità dimensionale tra host e guest che contemporaneamente rafforza l'interazione ma aumenta la selettività.

1.3 – Leganti macrociclici

Una particolare classe di leganti è composta dai leganti macrociclici, cioè macromolecole cicliche che possiedono almeno tre atomi donatori per la formazione di legami di coordinazione^{5,6}.

Le principali differenze rispetto ai leganti aperti si riscontrano nella loro maggiore selettività, la quale dipende non solo dalla natura degli atomi donatori, ma anche dalla forma e dalle dimensioni della cavità atta ad ospitare il guest, molto spesso preorganizzata in modo da consentire un'elevata affinità con un determinato tipo di substrati; a questo si associa una maggiore stabilità degli addotti formati.

Esistono diverse tipologie di leganti macrociclici, che si differenziano per la natura e il numero degli atomi donatori: tra le più comuni ricordiamo gli eteri corona, che hanno atomi di ossigeno come donatori e sono particolarmente adatti alla coordinazione di ioni metallici del primo e secondo gruppo e i poliazacicloalcani. La grande importanza rivestita da questi ultimi nel campo dei chemosensori è data innanzitutto dalla loro capacità di operare in acqua, solvente di particolare interesse per i sistemi biologici. Infatti la presenza dell'unità recettore poliamminico rende il sensore solubile in acqua, grazie alle caratteristiche idrofile dei gruppi amminici e all'instaurarsi degli equilibri di protonazione tipici delle poliammine in acqua. La

5 C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, A. Danesi, E. Faggi, C. Giorgi, S. Santarelli, B. Valtancoli; *coordination chemistry reviews* 252 (2008) 1052-1068

6 R.M. A. E. Martell; *Nist Critical Stability Constants of Metal Complexes Database, V4.0*, Dept. Of Commerce: Gaithersburg (1997)

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, mentre a pH basico le forme meno protonate sono in grado di complessare ioni metallici.

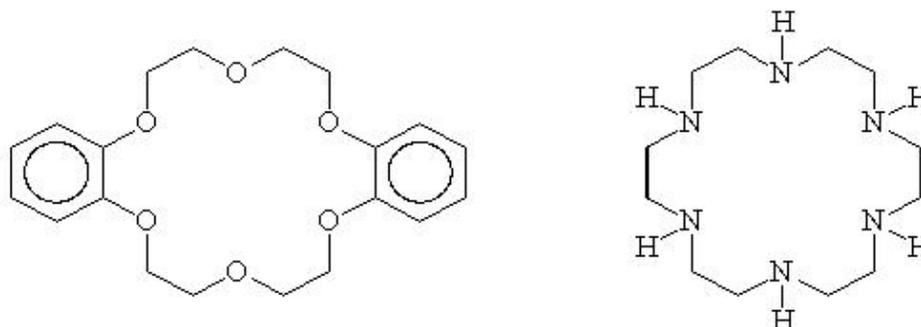


Figura 1.3.1 dibenzo [18] corona [6] e 1,4,7,10,13,16 esa-aza-ciclo-otta-decano

Nell'interazione host-guest, la selettività di questo tipo di leganti è influenzata dal numero e dal tipo di atomi donatori, nonché dalle caratteristiche strutturali della molecola host. La rigidità della struttura è un primo parametro da considerare: un legante con struttura più rigida darà luogo ad interazioni più selettive, tuttavia una struttura più flessibile è in grado di adattarsi maggiormente alle esigenze coordinative della molecola guest garantendo interazioni più stabili. Affinché l'interazione sia stabile e selettiva deve anche esistere una complementarità tra la cavità del legante e la molecola guest, sia in termini di dimensioni che di disposizione dei siti donatori; si parla in questo caso di opportuna "preorganizzazione" del legante.

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 ammoniaci), 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.

Oltre a considerazioni di carattere strutturale, è importante notare come le caratteristiche chimiche negli atomi donatori influiscano sulla selettività; in particolare, la teoria HSAB (hard soft acids and bases) ci permette di prevedere le interazioni favorite per un determinato atomo donatore. Così, ad esempio, un donatore hard come l'ossigeno lega preferenzialmente ioni di metalli alcalini, alcalino terrosi o lantanidi, mentre atomi dalle caratteristiche soft (S, P) dimostrano una maggiore affinità per metalli soft quali Ag^+ o Hg^{2+} . Gli atomi di azoto amminici presenti nei poliazacicloalcani, avendo caratteristiche intermedie, sono efficaci nella coordinazione di ioni di metalli di transizione (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}).

1.4 – Fotochimica

In generale quando una molecola interagisce con un fotone di energia appropriata, questa passa in un suo stato eccitato, come descritto dall'espressione :



dove **A** rappresenta una molecola nel suo stato fondamentale e **A*** la molecola nel suo stato eccitato mentre la differenza di energia tra **A** e **A*** è rappresentata da **hν**. Raggiunto lo stato eccitato **A***, una molecola può evolvere in più modi, tornando allo stato fondamentale o dando luogo a prodotti diversi, attraverso processi intra- o intermolecolari schematicamente rappresentati dalle reazioni riportate in tabella

Processi fisici	Fluorescenza	$\mathbf{S}^* \rightarrow \mathbf{S} + h\nu$
	Emissione indotta per urto	$\mathbf{S}^* + \mathbf{M} \rightarrow \mathbf{S} + \mathbf{M} + h\nu$
	Emissione stimolata	$\mathbf{S}^* + h\nu \rightarrow \mathbf{S} + 2 h\nu$
	Intersystem crossing	$\mathbf{S}^* \rightarrow \mathbf{T}^*$
	Fosforescenza	$\mathbf{T}^* \rightarrow \mathbf{S}$
	Accumulo	$\mathbf{S}^* + \mathbf{S}^* \rightarrow \mathbf{S}^* + \mathbf{S}$
Ionizzazione	Ionizzazione dissociativa	$\mathbf{A}^* + \mathbf{BC} \rightarrow \mathbf{AB}^+ + \mathbf{C} + \mathbf{e}^-$
	Ionizzazione associativa	$\mathbf{A}^* + \mathbf{B} \rightarrow \mathbf{AB}^+ + \mathbf{e}^-$
	Ionizzazione per urto	$\mathbf{A}^* + \mathbf{B} \rightarrow \mathbf{A}^+ + \mathbf{B} + \mathbf{e}^-$

Processi chimici	Dissociazione	$AB^* \rightarrow A + B$
	Addizione o inserimento	$A^* + B \rightarrow AB$
	Asportazione o frammentazione	$A^* + B \rightarrow C + D$
	Isomerizzazione	$A^* \rightarrow A'$
	Eccitazione dissociativa	$A^* + CD \rightarrow A + ^*C + D$

Tabella 1 Schema di alcuni processi di disattivazione: **S** rappresenta uno stato di singoletto, **T** uno stato di tripletto; **A, B, C, D, M** sono specie arbitrarie.

1.5 – Processi radiativi

I processi elettronici radiativi alla base della fotochimica, possono essere facilmente rappresentati mediante il diagramma di A. Jablonski: compatibilmente con l'approssimazione dovuta al principio di Frank-Condon, vengono rappresentate transizioni elettroniche verticali, visto che la loro velocità (i processi avvengono in un tempo dell'ordine di 10^{-15} secondi) consente di considerarle istantanee, senza riarrangiamento, perciò, delle coordinate nucleari.

S_0 rappresenta lo stato di singoletto fondamentale, mentre S_1, S_2 , ecc- sono gli stati di singoletto eccitati; gli stati di tripletto si indicano solitamente con le lettere T_1, T_2 , ecc. Ogni stato elettronico presenta diversi livelli vibrazionali: se due livelli elettronici, ad esempio S_0 ed S_1 , presentano strutture vibrazionali che si sovrappongono energeticamente, il rilassamento da S_1 ad S_0 ha carattere non radiativo, come rappresentato nel grafico dalla freccia ondulata e la velocità del processo è dell'ordine di 10^{-13} - 10^{-12} secondi.

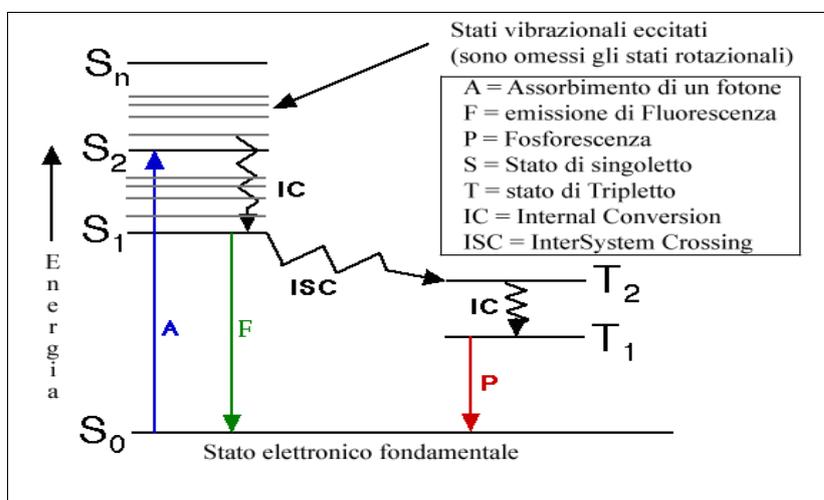


Figura 1.5.1. Diagramma di Jablonski.

1.6 – Fluorescenza e fosforescenza

L'emissione di un fotone che origina il fenomeno detto fluorescenza, è dovuta ad una transizione elettronica radiativa dallo stato vibrazionale fondamentale di S_1 ad uno dei livelli vibrazionali di S_0 . I tempi del suddetto rilassamento sono dell'ordine di 10^{-8} secondi dal momento dell'assorbimento della radiazione.

La transizione elettronica tra S_0 ed S_1 coinvolge, oltre ai livelli vibrazionali fondamentali dei due stati elettronici, anche livelli vibrazionali ad energia maggiore, dai quali, l'elettrone rilassa in modo non radiativo dopo l'assorbimento di radiazione fino al livello vibrazionale fondamentale, sia prima che dopo l'emissione di fluorescenza. Queste transizioni non radiative determinano lo "spostamento di Stokes", cioè lo spostamento dello spettro di emissione a λ maggiore (cioè a minore energia) rispetto allo spettro di assorbimento. Inoltre, viste le analogie tra gli stati vibrazionali di S_0 ed S_1 , avremo spettri di assorbimento e di emissione che sono generalmente speculari tra loro.

L'emissione di fosforescenza si verifica invece a seguito di un'interconversione (non radiativa) $S_1 \rightarrow T_1$ detta "intersystem crossing" e successivo rilassamento radiativo $T_1 \rightarrow S_0$. Essendo una transizione di questo tipo proibita dalle regole di selezione in quanto comporta una variazione della molteplicità di spin, di fatto l'emissione di fosforescenza può aver luogo in presenza di condizioni che tendono a favorire processi non permessi, quali l'accoppiamento spin-orbita, l'effetto dell'atomo pesante e l'effetto dell'atomo paramagnetico. Per questi motivi la durata temporale di un'emissione di fosforescenza è alcuni ordini di grandezza maggiore rispetto a quella di un'emissione di fluorescenza. E' da notare che gli effetti accennati sopra possono favorire anche processi di decadimento non radiativo, che possono portare al semplice spegnimento dell'emissione di fluorescenza senza la comparsa di emissione di fosforescenza.

1.7 – Meccanismi di modulazione della fluorescenza

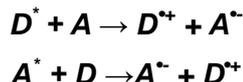
Come appena visto, la coordinazione dell'analita può portare il sensore ad un aumento o ad una diminuzione di fluorescenza: questo dipende dal tipo di

interazione che si instaura tra il recettore e il substrato e, per uno stesso sensore, è anche indice di alcune caratteristiche del substrato bersaglio. Si possono identificare alcune diverse tipologie di effetti dovuti all'interazione:

- Trasferimento elettronico fotoindotto⁷ (PET: Photoinduced Electron Transfer)
- Trasferimento di carica interno⁶ (ICT: Internal Charge Transfer)
- Trasferimento energetico elettronico⁸ (EET: Electron Energy Transfer)
- Trasferimento protonico fotoindotto
- Formazione di eccimeri o ecciplessi⁹

1.7.1 – Trasferimento elettronico fotoindotto (PET)

Le proprietà ossidative e riduttive di una molecola possono essere sviluppate nello stato eccitato in modo tale da portare alla realizzazione di processi di trasferimento elettronico sia di tipo ossidativo che riduttivo, in accordo alle seguenti reazioni:



dove **D** e **A** sono rispettivamente molecole di donatori o accettori. Nel meccanismo PET di tipo riduttivo, ad esempio, un fluoroforo **A** viene eccitato dalla radiazione ad una specie **A***, nella quale un elettrone è stato promosso dal più alto orbitale molecolare occupato (HOMO) al più basso orbitale molecolare non occupato (LUMO). In seguito dal LUMO del quencher 'elettron-ricco' un elettrone si sposta verso lo HOMO del fluoroforo colmando la lacuna lasciata a seguito dell'eccitazione. In tal modo si realizza il quenching della fluorescenza (figura 1.7.1).

La maggior parte dei sensori PET sono costituiti da un fluoroforo connesso ad un residuo (poli)amminico mediante uno spacer metilenico. Il trasferimento elettronico fotoindotto interessa il gruppo amminico appartenente all'idrocarburo aromatico e comporta un quenching della fluorescenza. Quando tale gruppo amminico è protonato oppure interagisce fortemente con un catione (metallico) il trasferimento

7 A. Weller; Pure Appl. Chem. 1968, 16, 115

8 J.E. Richmann, T.J. Atkins; J. Am. Chem. Soc 1974, 96, 2268

9 A. Bianchi, M. Ciampolini, M. Micheloni, N. Nardi, B. Valtancoli, S. Mangani, E. Garcia Espana, J. A. Ramirez; J. Chem. Soc., Perkin Trans 1989, 1131

elettronico viene inibito e si assiste ad una notevole intensificazione della fluorescenza.

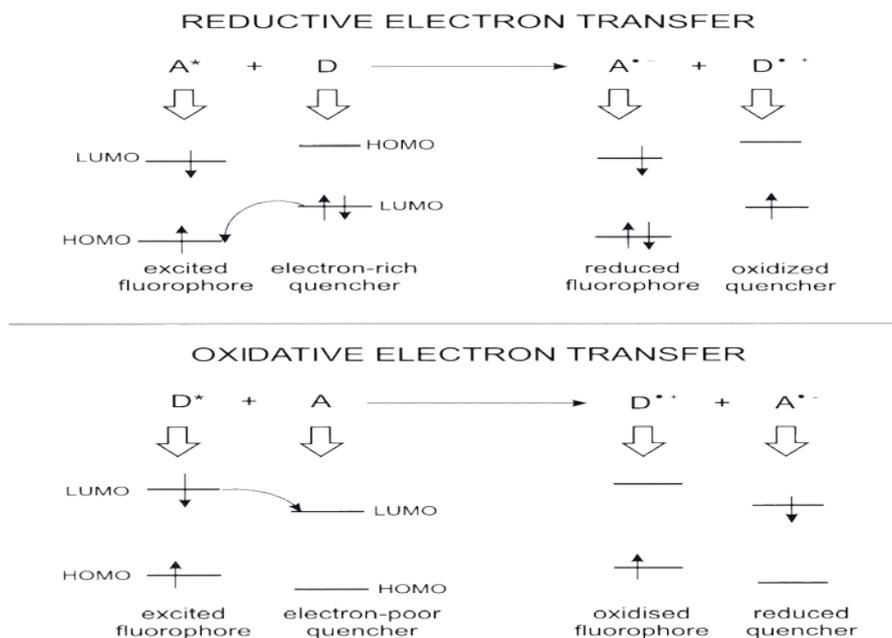


Figura 1.7.1 Meccanismo PET per un sistema ossidativo e riduttivo

Analogamente al caso generale, in seguito all'eccitazione del fluoroforo un elettrone dello HOMO è promosso verso il LUMO e questo attiva il trasferimento elettronico dal HOMO del donatore (ammina libera dal legame con un eventuale protone o catione) al HOMO del fluoroforo determinando una diminuzione di fluorescenza. Se l'ammina viene invece protonata, oppure si lega ad un catione (metallico), il potenziale redox del donatore aumenta mentre il suo HOMO diviene più basso in energia rispetto a quello del fluoroforo non rendendo più possibile il processo di trasferimento elettronico. Il quenching viene inibito e la fluorescenza aumenta.

1.7.2 – Trasferimento energetico elettronico (EET)

Nel meccanismo di trasferimento elettronico fotoindotto è necessario un solo livello elettronico intermedio agli altri due livelli ottici, nel trasferimento elettronico energetico, invece, ne occorrono due in seguito all'eccitazione un elettrone passa dal HOMO al LUMO del fluoroforo e subito dopo si realizza un movimento

contemporaneo di due elettroni di cui uno passa dal LUMO del fluoroforo al LUMO del recettore mentre l'altro lascia l'orbitale HOMO del recettore per andare sul HOMO del fluoroforo ripristinandone così lo stato fondamentale. Infine il sistema ritorna al ground state anche per quanto riguarda il recettore.

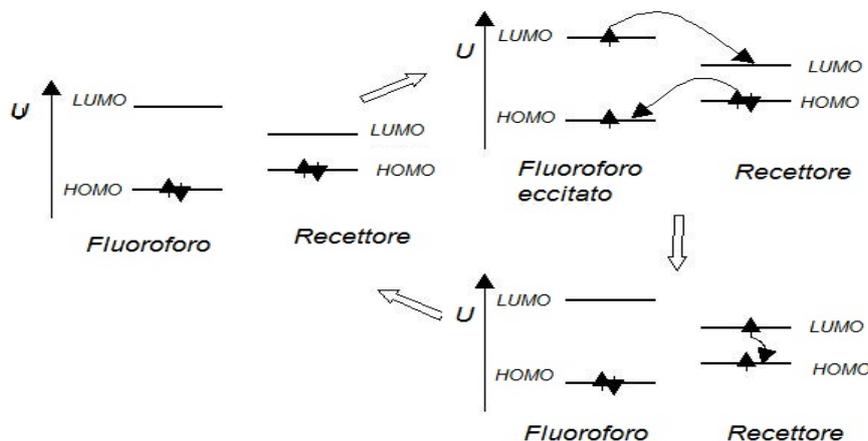


Figura 1.7.3 Meccanismo EET

1.7.3 – Trasferimento di carica fotoindotto (PCT)

Quando un fluoroforo contiene un gruppo elettrone-donatore (generalmente amminico) coniugato a un gruppo elettrone-attrattore, l'eccitazione dovuta alla radiazione luminosa determina un processo di trasferimento di carica intramolecolare dal donatore all'accettore. La conseguente variazione del momento di dipolo nello stato eccitato determina uno spostamento delle lunghezze d'onda delle bande negli spettri di emissione e assorbimento (Stokes' shift) dipendente dall'intorno chimico del fluoroforo stesso. L'interazione supramolecolare del recettore con uno ione guest perturba l'efficienza di tale trasferimento di carica determinando dei cambiamenti nelle proprietà chimico fisiche del fluoroforo. Considerando il caso dell'interazione con un catione metallico, si nota che nel gruppo elettrone-donatore del fluoroforo che con esso interagisce, si verifica una riduzione del carattere elettrone-donatore diminuendo, quindi, la coniugazione nello stato eccitato. Ciò si traduce in una maggiore destabilizzazione di quest'ultimo rispetto allo stato fondamentale e in uno spostamento verso energie maggiori delle lunghezze d'onda dello spettro (blue shift), oltre che in una diminuzione dei coefficienti di assorbimento molari. Viceversa l'interazione del catione con un gruppo elettrone-accettore del fluoroforo ne aumenta il carattere elettrone-attrattore,

stabilizzando preferenzialmente lo stato eccitato rispetto a quello fondamentale e causando uno spostamento delle lunghezze d'onda verso energie inferiori (red shift); ne consegue un aumento dei coefficienti di assorbimento.

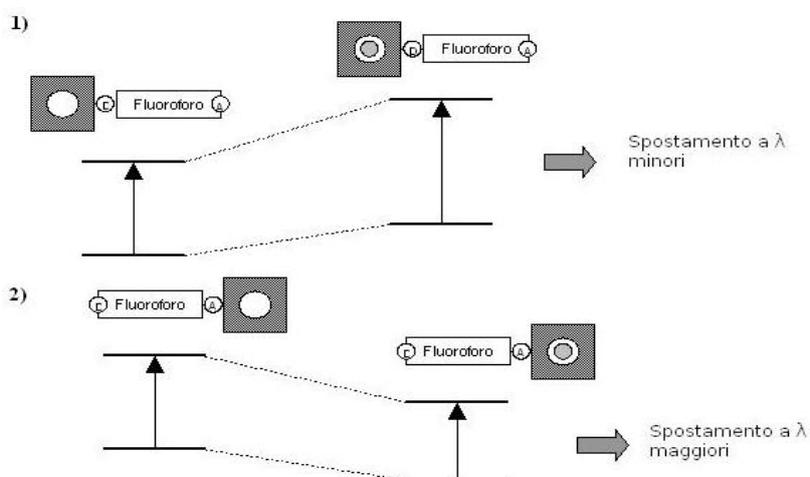


Figura 1.7.4 Effetto PCT quando il catione interagisce 1) con il gruppo ED e 2) con quello EWG del fluoroforo

Lo stesso meccanismo può essere interpretato anche in termini di interazione dipolo-carica. Il trasferimento di carica attivato per via radiativa porta in genere ad un momento di dipolo maggiore nello stato eccitato rispetto a quello dello stato fondamentale; quando il catione interagisce con il gruppo donatore destabilizza maggiormente lo stato eccitato portando così a un blue shift delle lunghezze d'onda.

1.7.4 – Trasferimento di protone fotoindotto

In seguito all'assorbimento di radiazione luminosa può verificarsi nel fluoroforo una ridistribuzione di densità elettronica determinante una differenziazione tra le proprietà acido base nello stato fondamentale e nello stato eccitato. In questo caso si può giungere al trasferimento di un protone, per esempio dalla specie eccitata AH^* , all'acqua circostante. Prendiamo ad esempio il caso di un donatore protonico, come può essere un sostituto $-OH$ su un anello aromatico: secondo questo meccanismo la sua forza acida verrebbe intensificata a seguito dell'eccitazione. Di conseguenza la pK_a^* di tale gruppo nello stato eccitato diverrebbe più bassa della pK_a riferita allo stato fondamentale. Tale principio è alla base del funzionamento degli indicatori di pH fluorimetrici.

1.7.5 – Formazione di eccimeri

Gli eccimeri sono dimeri nello stato eccitato la cui formazione è controllata principalmente da processi di tipo diffusivo ed è permessa solo ad alte concentrazioni, secondo la reazione:



La corrispondente banda di fluorescenza cade a lunghezze d'onda maggiori di quella del monomero e non mostra la struttura fine vibronica. Ciò è dovuto principalmente alla forma delle superfici potenziali per cui, come si vede dalla figura 1.9.5, la banda dell'eccimero appare strutturata poiché il più basso stato è dissociativo e può quindi considerarsi come continuo.

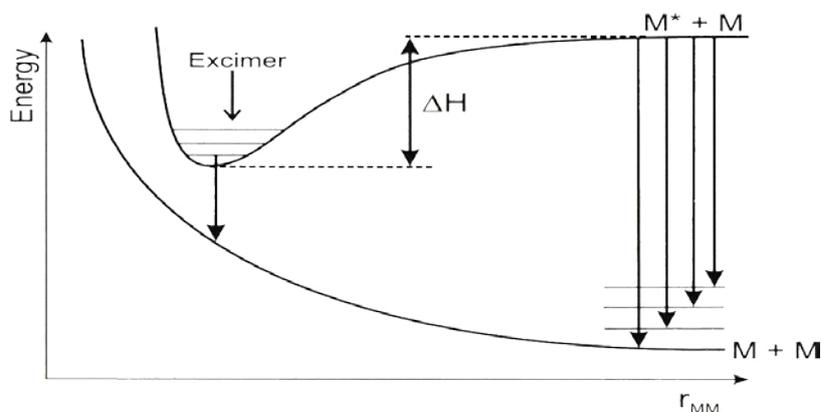


Figura 1.7.5 Curve di potenziale per $M + M$ (stato fondamentale) e $M^* + M$ (stato eccitato per una sola delle due)

Un fluoroionoforo può contenere due unità fluorogeniche, le quali, in caso di eccitazione, se poste ad opportuna distanza tra loro, possono portare alla formazione di un eccimero con la sua banda di fluorescenza caratteristica. Tale distanza viene modificata dall'eventuale complessazione di un catione, che può dunque favorire o inibire la formazione dell'eccimero, consentendo all'operatore di monitorare la concentrazione del catione stesso.

1.8 – Chemosensori

Un chemosensore è una molecola capace di determinare la presenza o, a seconda dei casi¹⁰, la concentrazione di un analita bersaglio interagendo con esso. L'interazione deve essere selettiva, non distruttiva e reversibile, deve inoltre determinare una variazione apprezzabile di alcune caratteristiche proprie del sensore, al fine di essere identificata dall'operatore.

Una molecola o un addotto supramolecolare agente da sensore si può immaginare costituito da alcune subunità:

- Recettore: è la subunità addetta all'interazione col substrato che deve rispettare le caratteristiche sopra elencate (selettività e reversibilità).
- Unità attiva: è la responsabile della variazione di una caratteristica che segnala la presenza del substrato.
- Spaziatore: funge da raccordo strutturale tra le due subunità sopra elencate quando questo è necessario.

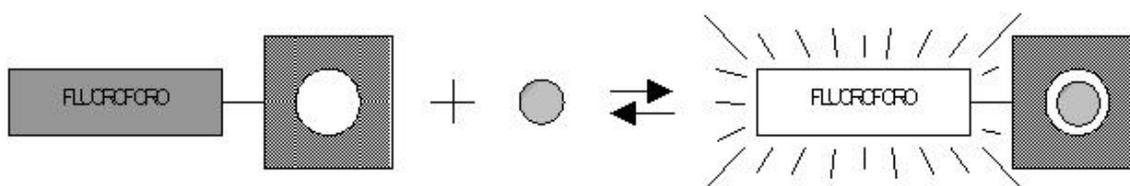


Figura 1.8.1 Schematizzazione di un chemosensore fluorimetrico

È necessario che tra substrato e recettore avvenga un riconoscimento molecolare (principio lock and key), cioè un'interazione selettiva rispetto a possibili specie in competizione. La selettività è determinata dalla complementarità tra le dimensioni, la forma e la disposizione dei siti di legame del substrato e del recettore, al fine di ottenere l'instaurazione del maggior numero possibile di interazioni non covalenti tra i due. Questa caratteristica influisce anche sulla stabilità, necessaria per poter eventualmente effettuare analisi in tempi lunghi. Altro fattore importante è la preorganizzazione strutturale del recettore che diminuisce l'energia necessaria al raggiungimento della conformazione finale e aumenta la stabilità. Inoltre, è anche utile che la superficie di contatto tra recettore e substrato sia la maggiore possibile. In ogni caso è importante anche che l'interazione stabilita sia veloce e reversibile, al

10 B. Valeur; Molecular Fluorescence, Wiley-VCH Weinheim 2002

fine di non perturbare eccessivamente l'ambiente chimico in cui si trova l'analita durante il suo monitoraggio.

L'unità segnalante, infine, deve possedere una caratteristica facilmente rilevabile che vari a seconda della condizione del recettore se è libero o legato al substrato. Proprietà utili a questo scopo possono essere variazioni di colore, variazioni di natura elettrochimica (per esempio variazione del potenziale di riduzione) o anche, nel caso di un sensore fotochimico, variazioni nell'emissione di fluorescenza. In particolare, quest'ultima famiglia di sensori, la cui unità attiva è detta fluoroforo trova molteplici applicazioni ed è oggetto di questo progetto di tesi.

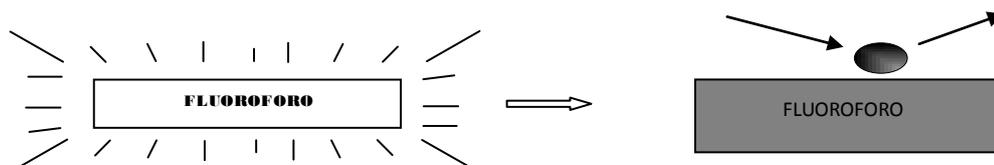
1.8.1 – Chemosensori fluorimetrici

In un chemosensore fluorimetrico l'unità attiva è detta segnalante, quando l'analita legato al recettore genera nel fluoroforo cambiamenti delle caratteristiche fotofisiche tali da generare una variazione rilevabile. Il fluoroforo agisce da trasduttore del segnale a seguito dell'interazione del sensore con il substrato.

Un indicatore fluorimetrico offre grandi vantaggi vista l'ampia gamma di fluorofori utilizzabili in un vasto arco di lunghezze d'onda uniti ad una risposta molto rapida a seguito della complessazione della specie bersaglio. Queste caratteristiche, unite alla proprietà già elencate per i sensori supramolecolari (selettività, velocità, reversibilità, ecc-) rendono le indagini con sensori di fluorescenza efficaci con uno svariato range di specie chimiche: cationi metallici, anioni inorganici e organici (è una tecnica molto diffusa in ambito biochimico), molecole neutre e gas.

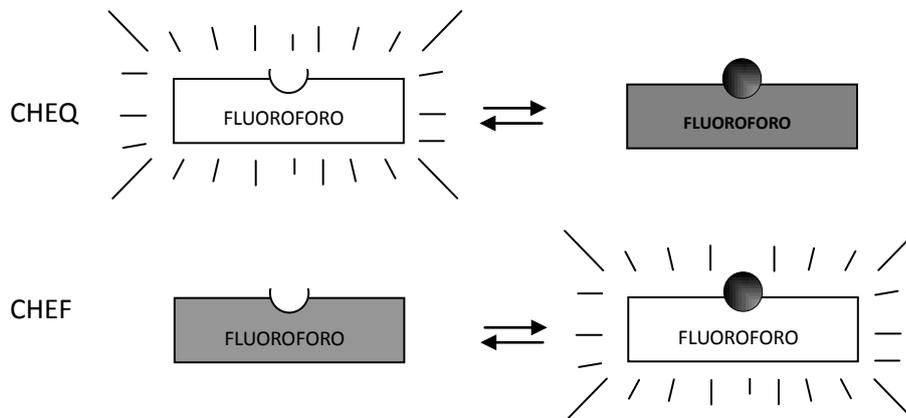
Si possono identificare tre classi di sensori molecolari fluorimetrici¹¹:

- Fluorofori che subiscono un quenching in seguito ad una collisione con l'analita.

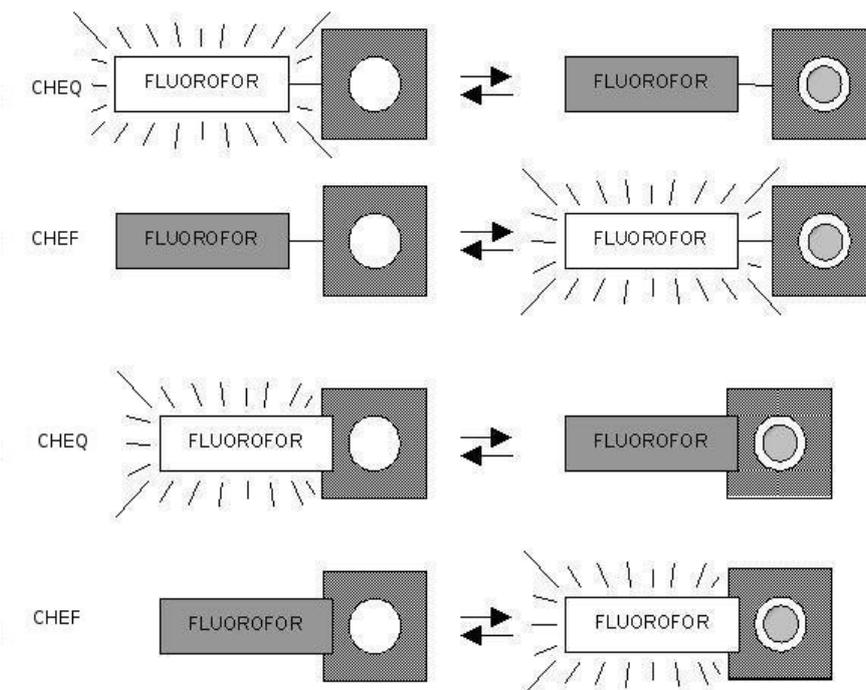


11 F. Pina, M. A. Bernardo; Garcia Espana E. ;ur. J. Inorg. Chem. 2000, 2143-2157

- Fluorofori in grado di legarsi reversibilmente con l'analita; a seguito di ciò possono verificarsi un quenching di fluorescenza (effetto CHEQ: Chelation Enhancement of Quenching) oppure un aumento (effetto CHEF: Chelation Enhancement of Fluorescence). In quest'ultimo caso si parla spesso di "accensione" del fluoroforo.



- Fluorofori analoghi ai precedenti ma facenti parte di un sensore supramolecolare strutturalmente articolato. In questo caso il fluoroforo può essere direttamente collegato all'unità recettrice oppure esservi collegato mediante uno spaziatore.



Chiaramente, nei casi sopra riportati dove è necessaria la complessazione dell'analita, la costante di formazione del complesso dovrà essere sufficientemente elevata in relazione al range di concentrazione previsto per l'analita.

1.8.2 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 esse 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.

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 1.9.6).

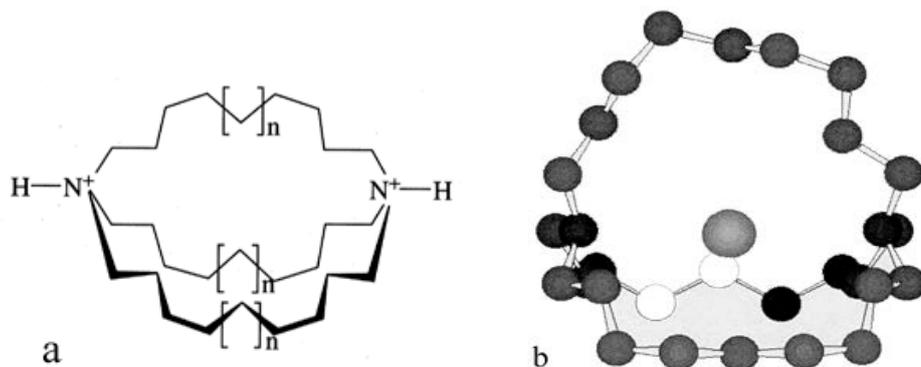


Figura 1.9.6:Struttura minimizzata del complesso di inclusione dello ione cloruro da parte del catapinando 1,1,11-diazabicyclo[9.9.9]nonacosane ($n = 0$)

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, pubblicato qualche mese dopo al lavoro precedente grazie a 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 1.3) ma il loro utilizzo è reso molto più difficile a causa di alcune proprietà intrinseche degli anioni:

- (1) 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^+ . 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.
- (2) 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).
- (3) Gli anioni sono di solito saturi coordinativamente e quindi possono legare solo attraverso forze deboli.

Ione	Raggio (Å)	$\Delta G_{idrat.}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Ione	Raggio (Å)	$\Delta G_{idrat.}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
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

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 1.8.7 è riportata la struttura del complesso del PdCl_4^{2-} con il recettore [30]aneN₁₀ completamente protonato¹². Il macrociclo assume una conformazione a 'S' e include il substrato anionico in maniera da massimizzare le interazioni legami a idrogeno NH---Cl.

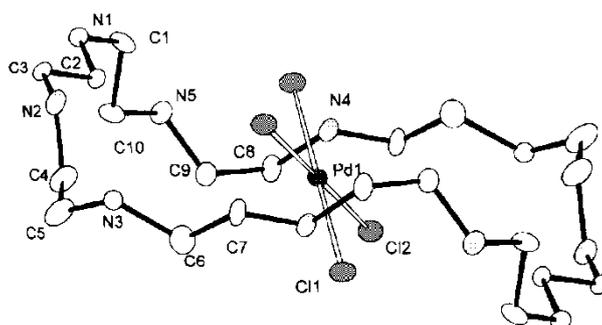


Fig. 1.8.7 - Struttura cristallina del complesso di PdCl_4^{2-} incapsulato nel macrociclo [30]aneN₁₀ 10H⁺.

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

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

- (4) interazioni supramolecolari anione-recettore di tipo elettrostatico e/o legame a idrogeno e interazioni π -stacking come driving forces
- (5) 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.

¹² A. BENCINI, A. BIANCHI, M. MICHELONI, P. PAOLETTI, P. DAPPORTO, P. PAOLI, E. GARCIA-ESPAÑA, J. A. RAMIREZ, *Inorg. Chem.*, 31 (1992) 1902.

1.9 Chinolina

La chinolina è un composto aromatico eterociclico, ad anelli condensati derivato formalmente dal naftalene per sostituzione di un gruppo CH in posizione 4 con un atomo di azoto.

Avendo una resa quantica di fluorescenza alta, è un potenziale candidato come unità fluorescente per la realizzazione di chemosensori fluorimetrici. Inoltre l'azoto aromatico possiede un doppietto elettronico disponibile per le interazioni con cationi metallici. In soluzione acquosa dà luogo ad un equilibrio acido-base, riportato in Fig. 1.9.1 ; la pK_a del catione chinolinio è 4.79.

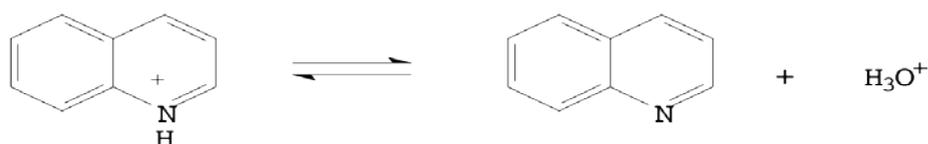


Fig. 1.9.1 – Equilibrio di protonazione/deprotonazione della chinolina

Considerando lo spettro UV-Vis di questa molecola, il massimo di assorbimento della chinolina cade nel vicino UV, a 318 nm mentre quello dell'anione chinolinio cade a 305 nm. Lo spettro della chinolina presenta un andamento più netto mentre quello dell'anione si presenta come una larga spalla avente due sporgenze di cui una è il massimo.

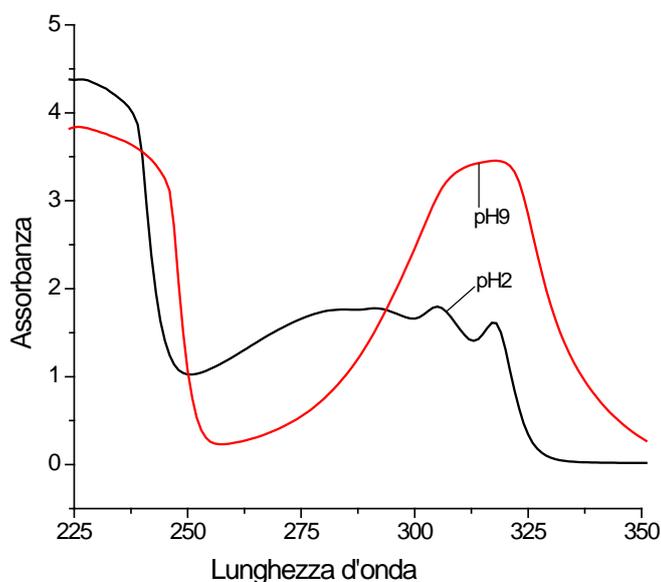


Fig. 1.9.2 – Spettro di assorbimento della Chinolina in soluzione ($5 \times 10^{-4} M$) acqua etanolo 70%:30% (V:V)

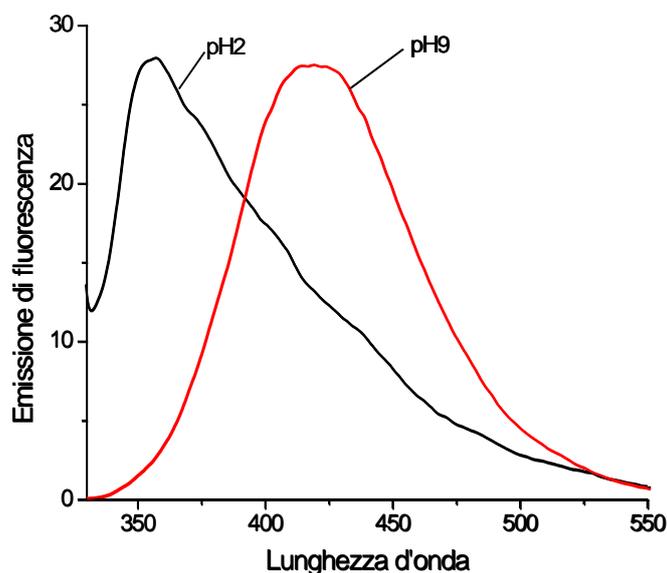


Fig. 1.9.3 – Spettro di emissione della Chinolina in soluzione ($5 \times 10^{-4} M$) acqua-etanolo 70%:30% (V:V) $\lambda_{eccitazione} = 315 \text{ nm}$

Gli spettri di emissione di fluorescenza delle due forme (protonata e non protonata), registrati utilizzando una lunghezza d'onda incidente di 315 nm, sono invece sostanzialmente diversi. Infatti la chinolina presenta un massimo di emissione a platò con centro a circa 425 nm, mentre quello del chinolinio è spostato a lunghezze d'onda minori, circa 350 nm come si può vedere in figura 1.9.3. L'intensità di fluorescenza della chinolina, e più in generale quella degli eterocicli contenenti azoto, dipende dalle interazioni via legame a idrogeno tra il soluto e il solvente. In particolare la chinolina 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 in solventi aprotici 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. 1.9.4.

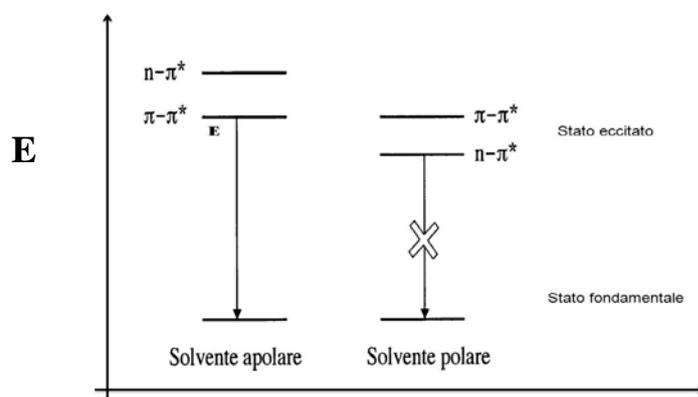
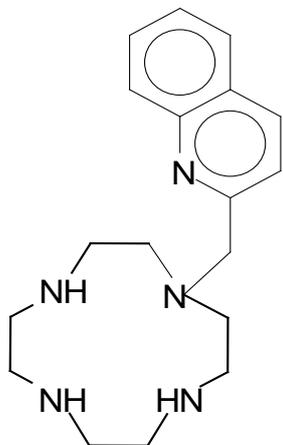


Fig. 1.9.4 – Effetto del legame a idrogeno sull'energia dei livelli elettronici in eterocicli contenenti atomi di azoto, come la chinolina

1.10 – Obiettivi di questo progetto di tesi

Il lavoro effettuato in questo progetto di tesi fa parte di un progetto di ricerca più ampio, dedicato alla sintesi e alla caratterizzazione di leganti poliamminici, strutturalmente progettati per ottenere efficaci sensori fluorimetrici per ioni di diversa natura.

In particolare in questo progetto di tesi ci siamo occupati dello studio di un piccolo legante macrociclico e della possibilità di poterlo utilizzare come sensore fluorimetrico studiando la sua capacità di coordinarsi più o meno selettivamente alle specie anioniche e cationiche prese in esame. Abbiamo inoltre studiato le capacità del suo complesso con lo ione Zn^{2+} come sensore per alcune specie anioniche.



Il legante è costituito da un cyclen (cyclen = 1,4,7,10-tetraazaciclododecano) a cui è stata legata un'unità chinolina tramite un ponte metilenico. L'interesse verso questo nuovo recettore è dovuto al fatto che i leganti poliamminici sono solubili in acqua e presentano generalmente una buona affinità per cationi metallici di transizione e post-transizione. La presenza della chinolina

come unità fluorescente rende questo legante un potenziale chemosensore di fluorescenza. Infatti le proprietà fotochimiche possono essere influenzate dallo stato di protonazione dell'azaciclo, dall'eventuale protonazione dell'atomo di azoto

eteroaromatico e, soprattutto, dalla coordinazione di ioni metallici. In particolare, sappiamo che questo recettore è capace di coordinare e segnalare in maniera selettiva lo ione Zn^{2+} tramite variazioni dell'emissione di fluorescenza. Il primo passo è stato quello di studiare le proprietà acido base del legante e di verificare le interazioni legante-ione e successivamente studiare eventuali interazioni complesso di Zn(II) anioni con diverse tecniche chimico-fisiche a nostra disposizione tra cui potenziometria, spettrofotometria UV-Visibile, Emissione di fluorescenza, NMR (1H , ^{31}P). Tra i cationi metallici presi in esame abbiamo Cu (II), Cd (II), Zn (II). Tra gli anioni analizzati di cui, fosfato, difosfato, trifosfato, ATP solo le interazioni del complesso con quest'ultimi ci hanno fornito risultati promettenti.

2 – PARTE SPERIMENTALE

2.1 – Tecniche chimico-fisiche

2.1.1 – Potenziometria

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

- Potenziometro da ricerca Metrohm 713 pH meter
- Buretta automatica Metrohm 665 Dosimat da 1 ml
- Agitatore meccanico Metrohm 728 Stirrer
- Cella termostatica della capacità di circa 25 cm³ termoregolata mediante circolazione di acqua.
- Elettrodo combinato HamiltonLiq-Glass
- Personal computer dotato di unità video, hard disk, stampante ed interfaccia.

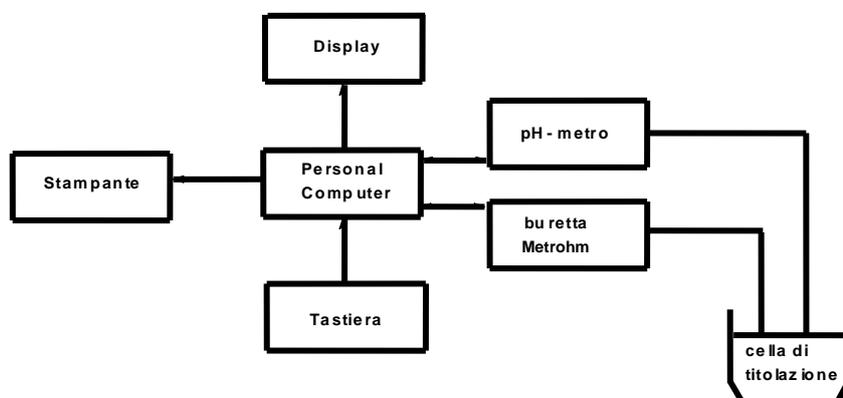


Figura 2.1 - Schema a blocchi di un sistema potenziometrico.

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.

Le soluzioni di NaOH, HCl, NMe₄OH, NMe₄Cl sono state preparate impiegando prodotti commerciali di elevata purezza e le loro concentrazioni sono state determinate seguendo procedure analitiche standard.

Le misure sono state effettuate a 35±0.1°C a causa della cinetica di complessazione lenta per gli ioni metallici. Sia la cella potenziometrica che la stanza che accoglie il sistema potenziometrico sono state termostattizzate a questa temperatura. Durante le misure un flusso continuo di azoto è stato mantenuto all'interno della cella, allo

scopo di evitare la carbonatazione delle soluzioni studiate.

Prima di raggiungere la cella, il gas viene fatto passare attraverso una bottiglia di lavaggio, contenente una soluzione concentrata di NaOH e, successivamente, attraverso una bottiglia di lavaggio contenente lo stesso mezzo ionico impiegato nelle misure potenziometriche.

Così operando, si rimuovono eventuali tracce di anidride carbonica presenti nell'azoto e si presatura il gas in vapor acqueo, prima di introdurlo nella cella potenziometrica.

Le misure sono state condotte a forza ionica costante, usando soluzioni di NMe_4Cl 0.1 M. Il personal computer, sulla base dello schema fornito dal programma, controlla il sistema di misura, regolando le aggiunte di soluzione titolante ed eseguendo le letture dei valori di forza elettromotrice.

Quest'ultima operazione è resa possibile dall'interfaccia che collega il computer al potenziometro.

Il programma richiede sette parametri iniziali di input, che vengono scelti in modo da definire le caratteristiche dell'acquisizione potenziometrica:

- 1) numero massimo di letture
- 2) intervallo di tempo fra due letture
- 3) tolleranza sulla deviazione standard
- 4) tolleranza sulla deriva
- 5) volume di titolante aggiunto inizialmente
- 6) volume di titolante da aggiungere complessivamente
- 7) incremento di volume del titolante

Inseriti questi dati il computer inizia a raccogliere i valori di f.e.m. misurati dal potenziometro.

Nell'intervallo di tempo stabilito secondo il parametro 2, vengono raccolti dieci valori di f.e.m., dei quali viene calcolata la media.

Il valore medio così determinato (lettura), viene memorizzato e visualizzato sul video, accanto ad un numero progressivo.

Tale procedura viene ripetuta fino ad ottenere un gruppo di dieci letture.

Di queste, il computer calcola il valore medio e controlla se la deviazione standard sul valore medio è maggiore o minore della tolleranza imposta (parametro 3).

Nel primo caso, se il numero di letture effettuate è uguale al numero massimo prestabilito dal parametro 1, il computer memorizza e stampa sulla stessa riga il volume di titolante aggiunto, il valore medio delle ultime dieci letture, il numero di letture eseguite ed un segnale grafico che indica che la deviazione standard sul valore medio è superiore alla tolleranza imposta per la stessa.

Se invece il numero di letture eseguite è inferiore al numero massimo imposto, il sistema effettua un'altra lettura, calcola il valore medio delle ultime dieci letture, ed esegue nuovamente il controllo sulla deviazione standard.

Tale sequenza può protrarsi fino al raggiungimento del numero massimo di letture imposto.

Nel caso in cui la deviazione standard sul valore medio sia inferiore alla tolleranza imposta, viene calcolata la differenza fra il primo ed il decimo valore di f.e.m., usati per calcolare il valore medio, e viene controllato che il valore assoluto di tale differenza non superi il valore fissato per la tolleranza sulla deriva (parametro 4).

In questo modo vengono scartati quei valori che, pur rispettando la condizione imposta sulla deviazione standard, sono il risultato di una serie di letture di f.e.m. delle quali l'ultima è molto diversa dalla prima.

Se questa condizione non è verificata, viene eseguita un'altra lettura, controllato il nuovo valore medio e controllati i valori della deviazione standard e della deriva. Altrimenti il computer considera buona la misura, memorizza e stampa i dati e procede ad un'altra aggiunta.

I dati così ottenuti vengono successivamente elaborati con il programma di calcolo HYPERQUAD 2003¹³.

2.1.2 – Metodi di calcolo

Il problema della determinazione delle costanti di equilibrio in soluzione, sarebbe facilmente risolvibile, se fosse possibile ottenere una misura diretta della concentrazione all'equilibrio di tutte le specie presenti in soluzione.

E' evidente che questo non è generalmente possibile.

D'altra parte è generalmente possibile mettere in relazione la concentrazione di uno dei componenti con le costanti di equilibrio e le concentrazioni iniziali del sistema, per cui, in principio, la misura della variazione della concentrazione di questa sola specie, con la composizione totale del sistema, può permettere la determinazione delle costanti di equilibrio.

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 è coinvolto un legante ed uno

¹³ P. GANS, A. SABATINI, A. VACCA, *Talanta*, **43** (1996) 807,812.

ione 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:

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

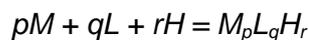
E° deve essere sperimentalmente determinato per le condizioni specifiche delle misure potenziometriche richieste e a breve distanza da queste.

La calibrazione dell'elettrodo di riferimento nelle condizioni sperimentali impiegate, cioè la determinazione di E° , si realizza attraverso una esperienza di titolazione di una quantità esattamente nota di acido forte con una base forte. Nel nostro caso il punto equivalente è stato determinato con il metodo di Gran.

Dalla stessa esperienza si ottiene il valore di E° ed il prodotto ionico dell'acqua K_w .

Il metodo di elaborazione dei dati differisce a seconda che si tratti di un sistema in cui il legante interagisce con uno ione metallico oppure con un anione :

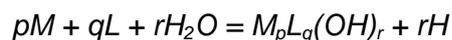
- In forma generale la formazione in soluzione acquosa di un complesso derivante dall'interazione di uno ione metallico M con un legante L protonabile può essere espressa con la seguente equazione (le cariche sono state omesse per semplicità):



La costante di formazione della specie $M_pL_qH_r$ è quantitativamente identificata nella costante relativa all'equazione precedente:

$$\beta_{pqr} = [M_pL_qH_r] / [M]^p [L]^q [H]^r$$

Nel caso di specie ossidrilate la costante β_{pqr} sarà riferita all'equazione:



β_{pqr} è in relazione con la costante β' :

$$\beta' = [M_pL_q(OH)_r] / [M]^p [L]^q [OH]^r$$

riferita all'equilibrio:



mediante il prodotto ionico dell'acqua:

$$\beta_{pqr} = \beta' K_w^r$$

Nel corso di una misura potenziometrica la soluzione conterrà ad ogni punto quantità note di metallo, legante e acido le cui concentrazioni totali sono definite da:

$$T_M = [M] + \sum_{pqr} p [M_p L_q H_r]$$

$$T_L = [L] + \sum_{pqr} q [M_p L_q H_r]$$

$$T_H = [H] + \sum_{pqr} r [M_p L_q H_r] - [OH]$$

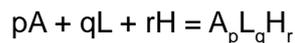
da cui, introducendo le espressioni delle β_{pqr} :

$$T_M = [M] + \sum_{pqr} p \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r$$

$$T_L = [L] + \sum_{pqr} q \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r$$

$$T_H = [H] + \sum_{pqr} r \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r - [OH]$$

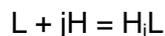
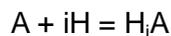
- In forma generale, la formazione in soluzione acquosa di un complesso derivante dall'interazione di una specie anionica A con un legante L, entrambi protonabili, può essere espressa con la seguente equazione (le cariche sono state omesse per semplicità):



In uno stesso sistema anione-legante-protone, possono formarsi un certo numero di specie complesse, ognuna con una differente combinazione dei coefficienti p, q, r. Per ognuno di essi è possibile definire la costante di formazione:

$$\beta_{pqr} = [A_p L_q H_r] / [A]^p [L]^q [H]^r$$

Anche l'anione e il legante possono subire processi di protonazione, per cui andranno considerati anche gli equilibri:



Con le rispettive costanti di stabilità:

$$\beta_{10i} = [H_i A] / [A][H]^i$$

$$\beta_{01j} = [H_jL]/[L][H]^j$$

Nello studio di un particolare sistema anione-recettore, la procedura generalmente seguita, consiste nel determinare, in primo luogo, le costanti di protonazione dell'anione e del legante separatamente, utilizzando sempre il metodo potenziometrico; successivamente viene titolata con una base forte una soluzione contenente l'anione e il legante in concentrazioni iniziali note.

Le concentrazioni totali di queste tre specie sono definite da:

$$\begin{aligned} T_A &= [A] + \sum_{pqr} p[A_pL_qH_r] + \sum_i [H_iA] \\ T_L &= [L] + \sum_{pqr} q[A_pL_qH_r] + \sum_j [H_jL] \\ T_H &= [H] + \sum_{pqr} r[A_pL_qH_r] + \sum_i i[H_iA] + \sum_j j[H_jL] - [OH] \end{aligned}$$

ovvero introducendo le espressioni delle β_{pqr} :

$$\begin{aligned} T_A &= [A] + \sum_{pqr} p\beta_{pqr} [A]^p[L]^q[H]^r + \sum_i \beta_{10i} [A][H]^i \\ T_L &= [L] + \sum_{pqr} q\beta_{pqr} [A]^p[L]^q[H]^r + \sum_j \beta_{01j} [L][H]^j \\ T_H &= [H] + \sum_{pqr} r\beta_{pqr} [A]^p[L]^q[H]^r + \sum_i i\beta_{10i} [A][H]^i + \sum_j j\beta_{01j} [L][H]^j - [OH] \end{aligned}$$

Durante l'esperimento potenziometrico si misura la concentrazione dello ione idrogeno libero e si ottiene la curva di titolazione sperimentale del potenziale di elettrodo contro il volume di titolante aggiunto. A ciascun punto sperimentale corrisponde un sistema di tre equazioni in $n+2$ incognite (con n numero degli addotti formati), le quali corrispondono alle n costanti di stabilità ed alle concentrazioni di legante e anione liberi. Complessivamente per N punti sperimentali avremo un sistema di $3N$ equazioni in $(n+2)N$ incognite.

Il trattamento matematico di tale sistema è estremamente complicato, per cui si ricorre a metodi di calcolo iterativi che richiedono l'impiego di computer.

Attualmente sono disponibili vari programmi per il calcolo di costanti di stabilità da misure potenziometriche.

Le costanti di stabilità riportate in questa tesi sono state ottenute con il programma di calcolo HYPERQUAD 2003¹⁴.

Questo programma consiste essenzialmente in un metodo di affinamento delle costanti di stabilità dei complessi, mediante minimi quadrati non lineari.

¹⁴ P. GANS, A. SABATINI, A. VACCA, *Talanta*, **43** (1996) 807,812.

La variabile U minimizzata nel calcolo è direttamente legata con i dati sperimentali, principalmente con il potenziale di elettrodo, e tiene conto degli errori sulla misura del potenziale stesso e sul volume di reattivo aggiunto:

$$U = \sum_i w_i [E_i(\text{calc}) - E_i(\text{exp})]^2$$

Il coefficiente w_i , che tiene conto del peso statistico di ciascun punto sperimentale, è inversamente proporzionale al parametro σ_i^2 definito:

$$\sigma_i^2 = \sigma_e^2 + (dE_i/dV)^2 \sigma_V^2$$

Questa relazione contiene le varianze stimate sul volume di reagente aggiunto (σ_V^2) e sul potenziale letto (σ_e^2), oltre alla derivata dE/dV , che rappresenta la pendenza della curva di titolazione potenziale/volume.

Questa ultima ha un valore elevato in prossimità di rapide variazioni di potenziale (ad esempio in corrispondenza dei punti equivalenti) e di conseguenza il peso statistico (w), assegnato ai punti sperimentali corrispondenti a questa parte della titolazione potenziometrica, è piccolo.

Analogamente avranno maggior peso i punti sperimentali ottenuti in zone tampone. Le altre due variabili, presenti nell'espressione di U , $E_i(\text{exp})$ ed $E_i(\text{calc})$, sono rispettivamente il potenziale misurato sperimentalmente ed il potenziale calcolato. Quest'ultimo è il potenziale teorico corrispondente a ciascun punto sperimentale ed è calcolato a partire dai parametri sperimentali (concentrazioni, E° , K_W) e dalle costanti relative agli equilibri, che intervengono nel sistema studiato, in maniera tale da rendere minima la funzione U .

Si possono così determinare le costanti di equilibrio corrispondenti al valore minimo di U .

Il programma risolve l'equazione matriciale:

$$A^T W A s = A^T W e$$

dove W è la matrice dei pesi statistici, A è la matrice delle derivate parziali dei potenziali rispetto ai parametri da raffinare, A^T è la sua trasposta, e è il vettore degli scarti sui potenziali $[E(\text{calc}) - E(\text{exp})]$, e s è il vettore delle deviazioni da applicarsi ai parametri da raffinare.

Questi ultimi valori sono quelli da determinare nel processo di raffinamento per ottenere la minimizzazione di U.

Il miglior raffinamento possibile, con i dati sperimentali disponibili, viene raggiunto quando si ottiene un gruppo di valori autoconsistenti.

Il programma di calcolo fornisce due parametri statistici per verificare la bontà del raffinamento.

Il primo è il valore della deviazione standard definita come:

$$\sigma = [(e^T W e)/(m-n)]^{1/2}$$

dove m è il numero dei punti ed n il numero di parametri da raffinare, mentre gli altri simboli mantengono il significato consueto.

Il miglior valore di σ è 1, ma, come suggeriscono gli autori del programma, sono ben accettabili tutti i valori di σ inferiori a 3.

Buoni risultati possono essere ottenuti anche per valori compresi tra 3 e 10.

Il secondo parametro statistico, indicato con χ^2 , misura la distribuzione degli scarti, in modo tale che se $\chi^2 = 12.6$, gli errori pesati si distribuiscono statisticamente attorno a $\sigma = 0$, non esistendo, pertanto, errori sistematici nel trattamento.

Per fissare un valore di χ^2 che serva per tutti i valori, indipendentemente dal numero di punti e di variabili da raffinare, il programma distribuisce i punti in 8 classi differenti, in funzione di come gli errori si distribuiscono attorno a $\sigma=0$.

Ciascuna classe si definisce assumendo una distribuzione normale degli errori e deve contenere un ugual numero di punti.

In base alla differenza fra numero di punti sperimentali e numero di punti teorici si calcola χ^2 per ciascuna classe dall'espressione:

$$\chi^2 = \sum_i X_i^2 \text{ dove } X_i^2 = 8(m/8-m_i)^2/m$$

dove m è il numero totale di punti del sistema e m_i il numero di punti sperimentali della i-esima classe.

Un valore di χ^2 superiore a 12.6 significa che gli scarti non seguono una distribuzione normale.

Ciò può essere dovuto ad errori sperimentali sistematici, oppure ad errori molto piccoli, che occupano principalmente le classi centrali.

Il valore 12.6 corrisponde ad una distribuzione χ^2 con 7 gradi di libertà (il numero delle classi meno uno) e un livello di affidabilità del 95%.

L'impiego di titolazioni potenziometriche, nella determinazione di costanti di stabilità, non è applicabile quando una o più specie, presenti in soluzione, sono instabili nell'intervallo di tempo necessario all'effettuazione della misura.

2.1.3 – Spettroscopia di assorbimento UV-Visibile

Gli spettri di assorbimento sono stati registrati con uno spettrometro a doppio raggio Jasco 2010 usando celle di quarzo dello spessore di 1 cm termostatate a 298 K. L'intervallo di acquisizione usato è 200nm-400nm, con una velocità di scansione di 200 nm/min. Le soluzioni di lavoro del legante Quin-Cyclen ($5 \cdot 10^{-4}$ M, solvente H_2O) sono state ottenute diluendo opportunamente soluzioni madri di concentrazione $1 \cdot 10^{-2}$ M preparate per pesata diretta del legante.

Al fine di determinare le caratteristiche coordinative del legante sono state eseguite delle misure a pH fisso (pH=9) tamponando con il CHES (regione tampone 8,6 – 10) aggiungendo equivalenti di Zinco (soluzione di $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$).

Successivamente per osservare le interazioni complesso – anione sono state eseguite delle misure dove al complesso Zn-QuinCyclen (1:1) abbiamo aggiunto equivalenti di PO_4^{3-} , $P_2O_7^{4-}$, $P_3O_{10}^{5-}$, ATP^{4-} .

2.1.4 – Spettroscopia di emissione di fluorescenza

Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro PerkinElmer Luminescence Spectrofotometer LS 55 usando celle dello spessore di 1 cm termostatate a 298 K. La lunghezza d'onda di eccitazione usata è 315 nm. L'intervallo di acquisizione usato è 300nm-550nm, con una velocità di scansione di 250 nm/min e fenditure di 8 nm. Le soluzioni di lavoro del legante Quin-Cyclen ($5 \cdot 10^{-4}$ M, solvente H_2O) sono state ottenute diluendo opportunamente soluzioni madri di concentrazione $1 \cdot 10^{-2}$ M preparate per pesata diretta del legante.

Al fine di determinare le caratteristiche coordinative del legante sono state eseguite delle misure a pH fisso (pH=9) tamponando con il CHES (regione tampone 8,6 – 10) aggiungendo equivalenti di Zinco (soluzione di $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$).

Successivamente per osservare le interazioni complesso – anione sono state eseguite delle misure dove al complesso Zn-QuinCyclen (1:1) abbiamo aggiunto equivalenti di PO_4^{3-} , $P_2O_7^{4-}$, $P_3O_{10}^{5-}$, ATP^{4-} .

2.1.5 – Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

Per la caratterizzazione dei composti e lo studio delle interazioni del complesso con gli anioni sono stati registrati spettri ^1H e ^{31}P a 298 K utilizzando uno spettrometro *Bruker Ultrashield Plus 400 MHz*, che opera ad una frequenza di 400 MHz per ^1H e 161 MHz per ^{31}P . I chemical shift delle soluzioni acquose sono riportati in ppm: come riferimento, per gli spettri ^1H è stato usato il segnale di H-OD ($\delta = 4.79$ ppm), mentre per il ^{31}P si utilizza come riferimento esterno H_3PO_4 85% ($\delta = 0$ ppm).

Il pH delle soluzioni in acqua deuterata si calcola in base alla relazione¹⁵:

$$\text{pH} = \text{pD} - 0.40$$

Per variare il pD sono state aggiunte piccole quantità di NaOD o DCI 0.01M alle soluzioni in studio.

2.1.6 – Diffrazione di raggi X su cristallo singolo

I cristalli sono stati ottenuti riponendo in un vial con il tappo forato 2 ml di acqua deionizzata, 5mg di Quin-Cyclen, un equivalente di Cu^{2+} (7,8 μl di una soluzione di CuCl_2 1M) e un eccesso di NaClO_4 .

¹⁵ D. J. CRAM, *Angew. Chem. Int. Ed Eng.*, **25** (1986), 1039.

3- Discussione

3.1 – Proprietà acido-base del legante

In soluzione acquosa i gruppi amminici del legante hanno la caratteristica di dare equilibri di protonazione acido-base che non solo competono con gli ioni metallici nella formazione del complesso, ma influenzano anche l'intensità dell'emissione di fluorescenza. Per questo motivo, abbiamo per prima cosa analizzato le caratteristiche acido-base del legante. Gli equilibri di protonazione del legante 1-(2-metilchinolina)cyclen (da ora in avanti chiamato Quin-Cyclen) sono stati studiati con metodi potenziometrici e spettroscopici (assorbimento UV-visibile ed emissione di fluorescenza).

Le misure sono state effettuate a $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$ a causa della cinetica di complessazione lenta degli ioni metallici.

Le misure sono state condotte a forza ionica costante, usando soluzioni di NMe_4Cl 0.1M.

Dalle misure potenziometriche si può notare come il legante Quin-cyclen riesca a legare fino a quattro protoni acidi. Nella tabella che segue sono state riportate le costanti di protonazione determinate in soluzione acquosa per il legante libero ricavate tramite misure potenziometriche.

Reazione	log K
$\text{H}^+ + \text{L} = [\text{LH}]^+$	10,71 (5)
$[\text{LH}]^+ + \text{H}^+ = [\text{LH}_2]^{2+}$	8,90 (7)
$[\text{LH}_2]^{2+} + \text{H}^+ = [\text{LH}_3]^{3+}$	2,3 (1)
$[\text{LH}_3]^{3+} + \text{H}^+ = [\text{LH}_4]^{4+}$	2.0 (3)

Tabella 2 Costanti di protonazione del legante Quin-cyclen in NMe_4Cl 0.1M, $308 \pm 0.1\text{K}$. I numeri tra parentesi rappresentano l'errore sull'ultima cifra.

Dalle costanti di protonazione ottenute possiamo ricavare il diagramma di distribuzione delle specie presenti in soluzione 308K (fig. 3.1.1).

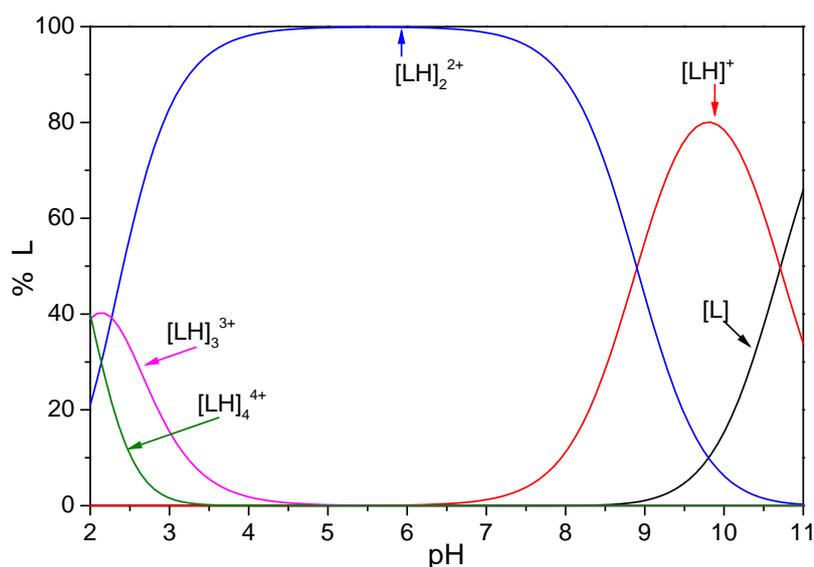


Fig 3.1.1 Diagramma di distribuzione per le specie protonate del legante Quin-cyclen in NMe₄Cl 0.1M, 308 ± 0.1K.

3.2 Coordinazione di anioni

E' noto come le poliammine, quando protonate, possano interagire con substrati anionici grazie ad interazioni elettrostatiche e via legami ad idrogeno. Per questo abbiamo deciso di analizzare le capacità coordinative del nostro recettore, che forma specie protonate già a pH alcalini, con alcuni anioni inorganici, in particolare, gli anioni mono-, di- e trifosfato e con un importante metabolita anionico, l'ATP. Quest'ultimo possiede sia una catena fosforica con caratteristiche anioniche, sia un sistema eterociclico, l'adenina, che potrebbe interagire con l'unità chinolina attraverso interazioni di π -stacking e/o idrofobe, aumentando la stabilità dei complessi host-guest con il sistema macrociclico protonato.

Misure potenziometriche hanno permesso di determinare i complessi formati con tutti gli anioni presi in considerazione e le costanti di stabilità ottenute sono riportate in tabella 3.2.1. Tutti i substrati studiati danno luogo ad addotti con stechiometria 1:1 con il nostro recettore.

Reazione	log K			
	PO_4^{3-}	$P_2O_7^{4-}$	$P_3O_{10}^{5-}$	ATP^{4-}
$HL + A = HLA$	2.7 (1)	2.86(3)		
$H_2L + A = H_2LA$		2.48(4)	3.18(6)	4.56 (6)
$H_2L + HA = H_3LA$	2.9 (1)	2.45(4)	4.01(6)	7.2 (1)
$H_2L + H_2A = H_4LA$	2.2 (1)	2.15(6)	5.11(7)	9.5 (1)
$H_3L + H_2A = H_5LA$			5.73(8)	8.9 (1)

Tab.3.2.1 Costanti di formazione degli addotti di quin-cyclen con anioni ($308 \pm 0.1K$, in NMe_4Cl 0.1M)

Carica omessa per semplicità. I numeri tra parentesi indicano la deviazione standard sull'ultima cifra significativa.

Dalle costanti di stabilità si ottengono i diagrammi di distribuzione delle specie complesse formate con i vari substrati.

- Il legante quin-cyclen, nella sua forma diprotonata, presente in soluzione acquosa in un ampio range di pH, interagisce con l'anione fosfato formando complessi in percentuali relativamente basse e a pH intorno alla neutralità il complesso prevalente è la specie neutra $[H_2L(HPO_4)]$ (figura 3.2.1)

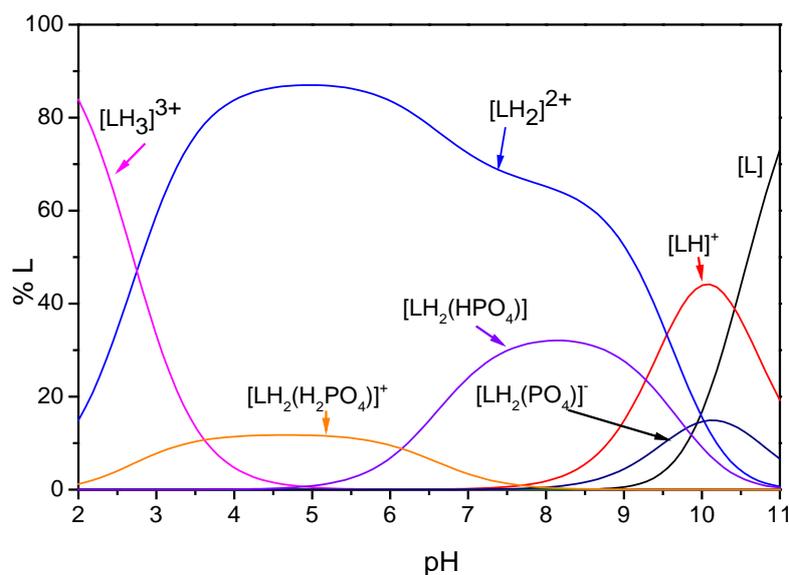


Fig.3.2.1 - diagramma di distribuzione delle specie di Quin-Cyclen - PO_4^{3-} in funzione del pH in soluzione acquosa di NMe_4Cl 0.1M a 308K

- Il legante quin-cyclen forma complessi con lo ione difosfato come riportato in figura 3.2.2 con un comportamento simile allo ione fosfato. Anche in questo caso è la specie diprotonata del legante che coordina l'anione nelle sue varie forme protonate. Anche in questo caso, però, le percentuali di difosfato coordinato non sono particolarmente elevate. Ad esempio a pH 7, solo il 30% dell'anione è coordinato, principalmente sotto forma di complesso $[H_2L(HP_2O_7)]^-$.

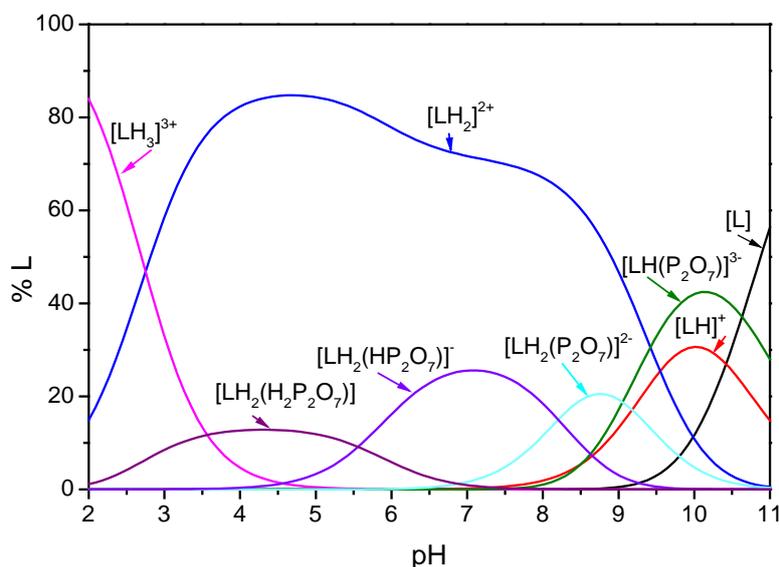
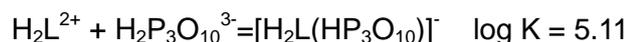


Fig.3.2.2 - diagramma di distribuzione delle specie di Quin-Cyclen - $P_2O_7^{4-}$ in funzione del pH in soluzione acquosa di NMe_4Cl 0.1M a 308K

- Osservando la figura 3.2.3 ed i dati riportati in tabella 3.2.1 per il sistema quin-cyclen/anione trifosfato, possiamo evidenziare la formazione di specie complesse con il $P_3O_{10}^{5-}$ con valori di costanti maggiori rispetto agli anioni PO_4^{3-} e $P_2O_7^{4-}$.

Infatti se per esempio confrontiamo le costanti per gli equilibri seguenti,



Possiamo notare una maggiore stabilità dell'addotto con l'anione trifosfato.

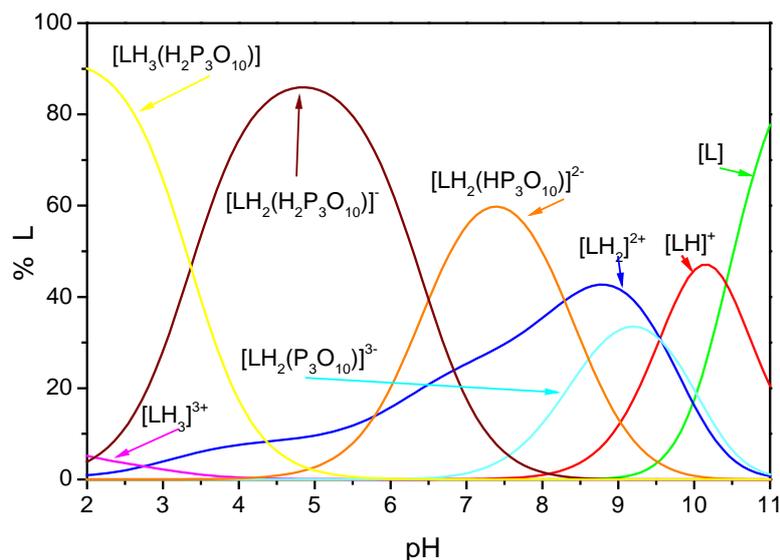


Fig.3.2.3 - diagramma di distribuzione delle specie di Quin-Cyclen - $P_3O_{10}^{5-}$ in funzione del pH in soluzione acquosa di NMe_4Cl 0.1M a 308K

- Considerando la coordinazione dell'anione ATP possiamo notare confrontando i dati in tabella 3.2.1, come le costanti di formazione di questi addotti siano maggiori rispetto agli anioni inorganici considerati. Inoltre si può evidenziare come, per pH inferiori a 8, le uniche specie presenti in soluzione sono le specie complesse. Solo a pH maggiori di 8 sono presenti in soluzione quantità non trascurabili di legante libero. A pH intorno alla neutralità la specie presente in quantità maggiori è la $[H_2L(HATP)]^-$ formata dal legante nella sua forma diprotonata. Complessi a più alto grado di protonazione dominano invece la regione acida. La maggiore stabilità dei complessi dell'ATP rispetto a quelli con il trifosfato (i due substrati sono accomunati dalla presenza di una uguale catena trifosforica) è probabilmente dovuta al coinvolgimento dell'unità adenina nel processo di coordinazione. Questa infatti può interagire per effetto idrofobo o interazioni di π -stacking con l'unità chinolina del recettore, portando alla stabilizzazione dell'addotto supramolecolare.

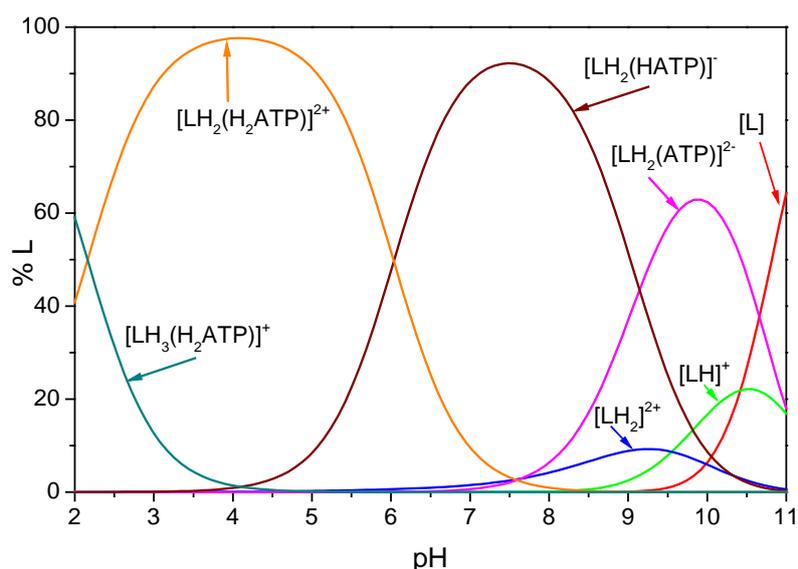


Fig.3.2.4 - diagramma di distribuzione delle specie di Quin-Cyclen - ATP⁴⁻ in funzione del pH in soluzione acquosa di NMe₄Cl 0.1M a 308K

3.3 Coordinazione di ioni metallici

Abbiamo poi analizzato le interazioni con alcuni ioni metallici, in particolare Zn(II) e Cd(II), che spesso danno complessi fluorescenti con recettori poliamminici e Cu(II), come esempio di catione di metallo di transizione paramagnetico.

Misure potenziometriche hanno permesso di determinare i complessi formati con gli ioni metallici e le loro costanti di stabilità sono riportate in tabella 3.3.1

Reazione	log K		
	Zn(II)	Cu(II)	Cd(II)
$L + M^{2+} = [LM]^{2+}$	16.37(3)	20.29(4)	15.18(2)
$[LM]^{2+} + H^+ = [LMH]^{3+}$	3.77(3)	-	3.59(9)
$[LM]^{2+} + OH^- = [LM(OH)]^+$	-	-	1.8(2)
$[LM(OH)]^+ + OH^- = [LM(OH)_2]$	4.8(4)	-	-

Tab.3.3.1 Costanti di formazione dei complessi dei ioni metallici con il quin-cyclen in NMe₄Cl 0.1M (308 ± 0.1K). Carica omessa per semplicità. I numeri tra parentesi indicano la deviazione standard sull'ultima cifra significativa.

Come possiamo notare dalla tabella il legante quin-cyclen forma con lo ione Zn(II) un complesso più stabile dell'analogo complesso di Cd(II). La maggiore stabilità del

complesso $[\text{ZnL}]^{2+}$ rispetto a $[\text{CdL}]^{2+}$ è un risultato rilevante, poiché spesso questi due ioni formano complessi di stabilità simile con leganti amminici. Ciò probabilmente è dovuto alle ridotte dimensioni dello ione Zn(II) che gli permettono di adattarsi meglio alle dimensioni, anch'esse ridotte, della cavità macrociclica del legante cyclen. Inoltre tutti i complessi sono decisamente più stabili di quelli con il semplice macrociclo cyclen non funzionalizzato (per esempio $\text{Log } K = 15.3$ per l'equilibrio $\text{Zn}^{2+} + \text{cyclen} = [\text{Zn}(\text{cyclen})]^{2+}$ vs $\text{log}K = 16.37$ per il complesso $[\text{ZnL}]^{2+}$). Possiamo supporre che ciò sia dovuto al coinvolgimento dell'atomo di azoto chinolinico nella coordinazione dello ione metallico, che porta ad una generale stabilizzazione dei complessi. Questa ipotesi è confermata dalla struttura cristallina del complesso, che evidenzia come lo ione metallico sia coordinato dai 4 atomi di azoto del sistema tetraammico e dall'atomo di azoto chinolinico (vedi capitolo 3.3.1).

Dalle costanti di stabilità possiamo ricavare i diagrammi di distribuzione delle specie che il legante forma in presenza dei cationi metallici studiati che sono riportate nelle figure 3.3.1 – 3.3.3

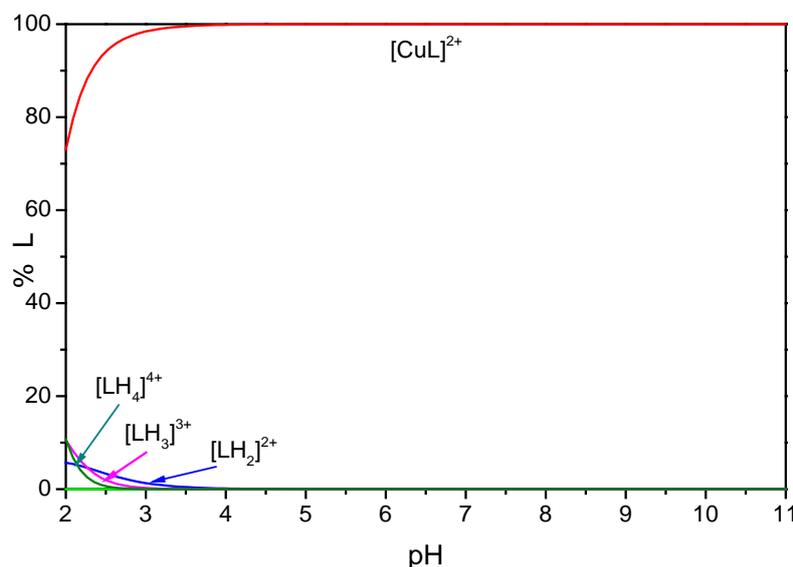


Fig.3.3.1 - diagramma di distribuzione delle specie presenti in una soluzione di Quin-Cyclen 0.001 M in presenza di un equivalente di Cu(II) in NMe_4Cl 0.1M ($308 \pm 0.1\text{K}$)

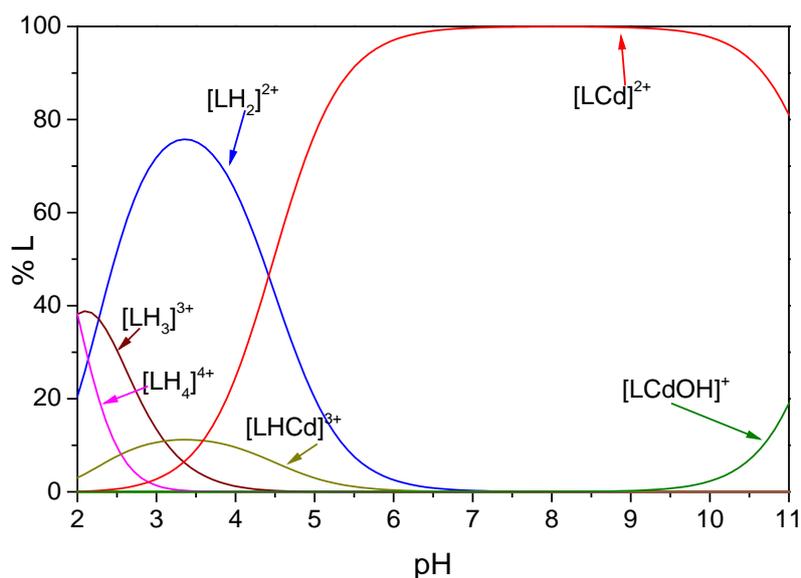


Fig.3.3.2 - diagramma di distribuzione delle specie presenti in una soluzione di Quin-Cyclen 0.001 M in presenza di un equivalente di Cd(II) in NMe₄Cl 0.1M (308 ±0.1K)

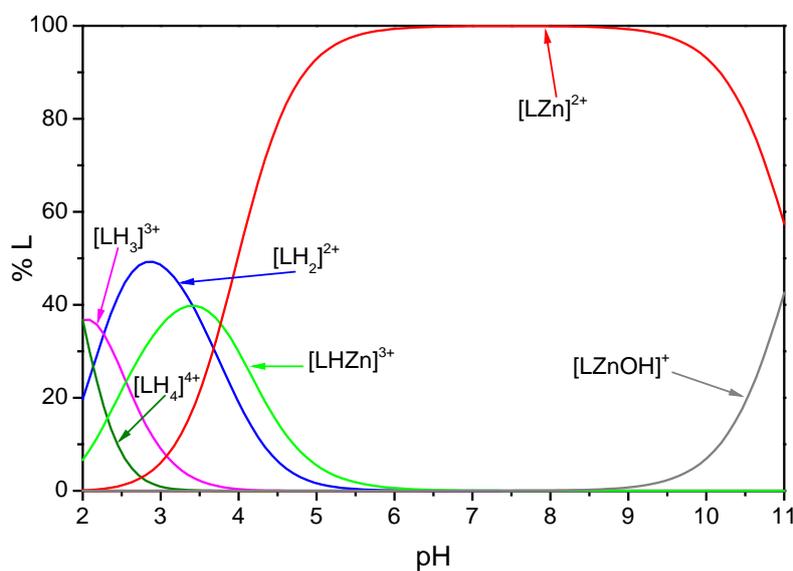


Fig.3.3.3 - diagramma di distribuzione delle specie presenti in una soluzione di Quin-Cyclen 0.001 M in presenza di un equivalente di Zn(II) in NMe₄Cl 0.1M (308 ±0.1K)

3.3.1 Struttura cristallina del complesso [Cu(Quin-Cyclen)](ClO₄)₂

Nel corso di questo lavoro di tesi sono stati isolati dei cristalli del complesso [Cu(Quin-Cyclen)](ClO₄)₂ di cui è stato possibile ottenere la struttura cristallina tramite diffrazione di raggi X su cristallo singolo. Una rappresentazione ORTEP

del complesso è riportata in Figura 3.3.4, mentre angoli e distanze di legame sono riportati in Tabella 3.3.2.

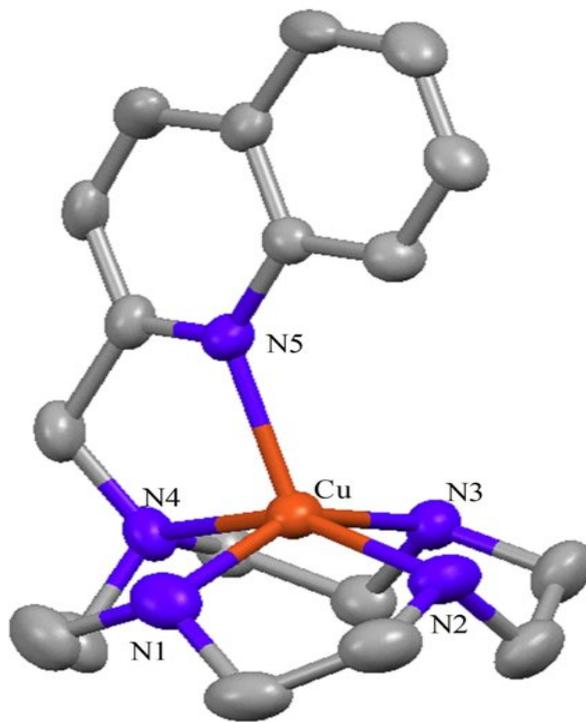


Figura 3.3.4 Rappresentazione ORTEP del complesso $[Cu(Quin-Cyclen)]^{2+}$

Cu	N4	2.063(4)
Cu	N3	2.014(4)
Cu	N5	2.140(4)
Cu	N1	2.006(5)
Cu	N2	2.025(5)

N4	Cu	N3	86.1(2)
N4	Cu	N5	81.2(2)
N4	Cu	N1	86.9(2)
N4	Cu	N2	151.8(2)
N3	Cu	N5	102.3(2)
N3	Cu	N1	147.3(2)
N3	Cu	N2	85.2(2)
N5	Cu	N1	108.1(2)
N5	Cu	N2	127.0(2)
N1	Cu	N2	86.0(2)

Tabella 3.3.2 Distanze e angoli di legame per l'intorno coordinativo dello ione metallico nel complesso $[Cu(Quin-Cyclen)]^{2+}$

La struttura evidenzia come lo ione metallico sia pentacoordinato dai cinque atomi di azoto del legante con una geometria piramidale quadrata distorta. I quattro atomi di azoto del sistema macrociclico costituiscono il piano basale, mentre l'atomo di azoto dell'unità chinolina occupa la posizione apicale. Lo ione metallico giace circa 0.15 Å al di sopra del piano definito dai quattro atomi di azoto amminici dell'unità cyclen, spostato verso l'atomo di azoto eteroaromatico in posizione apicale. Le distanze Zn-N risultano nel range 2.006-2.063 Å (solo l'atomo di azoto eteroaromatico si trova a distanza lievemente maggiore), a testimonianza della formazione di legami Cu-N particolarmente stabili.

3.3.2 Spettroscopia di assorbimento UV-Visibile

Per verificare eventuali variazioni di assorbimento in seguito alla complessazione di uno ione metallico, sono stati registrati e confrontati spettri di assorbimento UV-visibile del legante libero e in presenza di Zn(II), Cd(II) e Cu(II) (figura 3.3.5 ÷ 3.3.8).

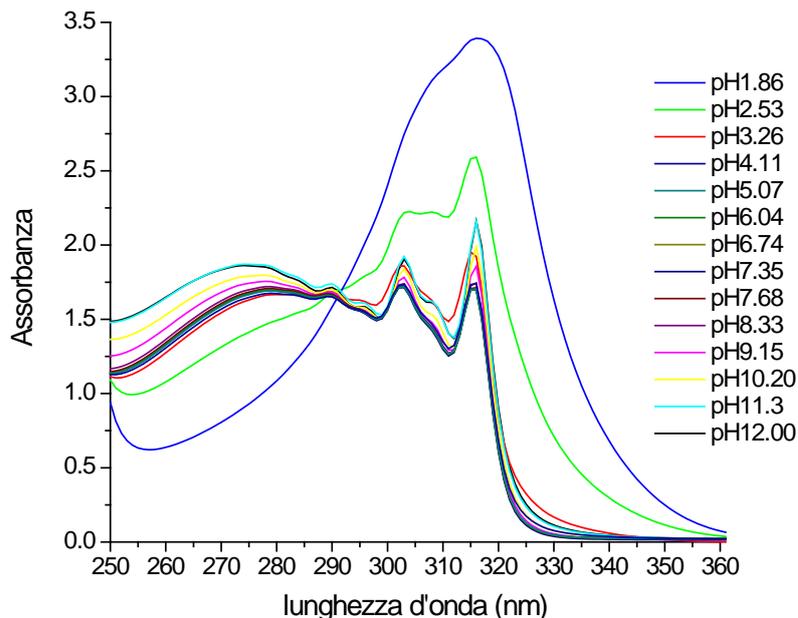


Fig.3.3.5 Spettri di assorbimento UV di una soluzione di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M a diversi valori di pH

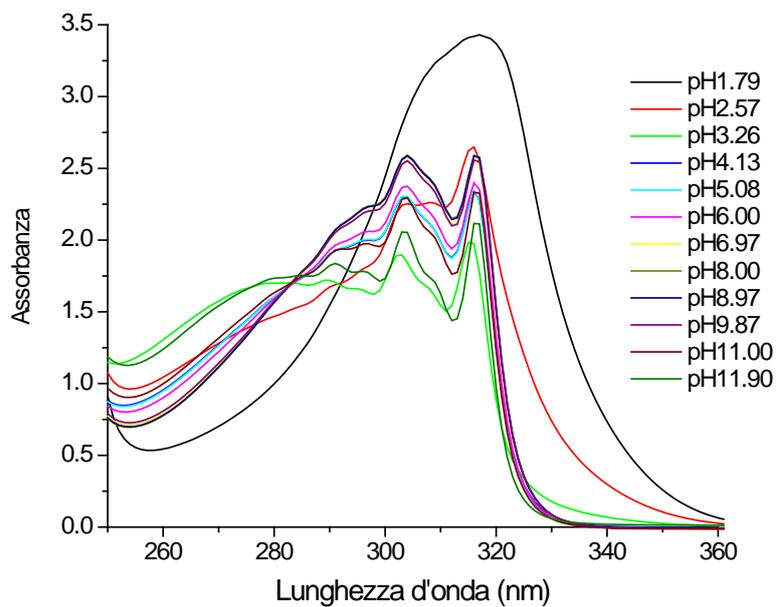


Fig.3.3.6 Spettri di assorbimento UV di una soluzione di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M con un equivalente di Zn(II) a diversi valori di pH

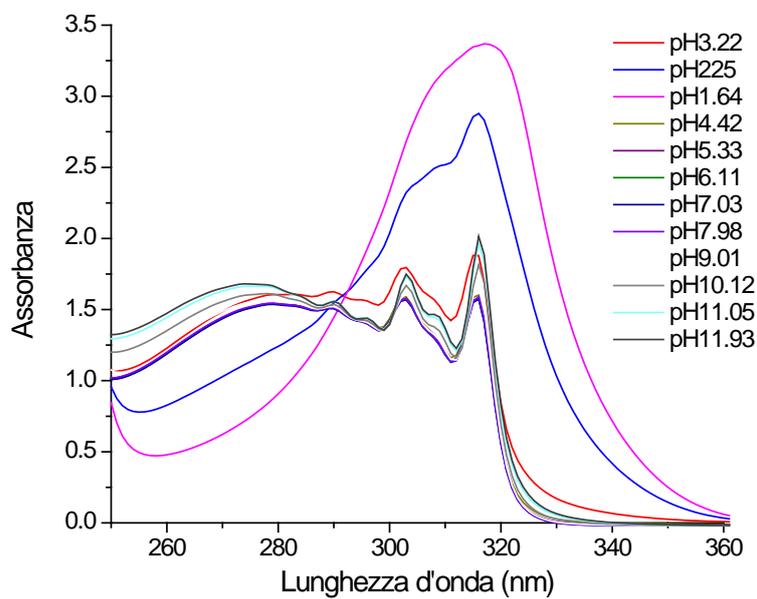


Fig.3.3.7 Spettri di assorbimento UV di una soluzione di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M con un equivalente di Cd(II) a diversi valori di pH

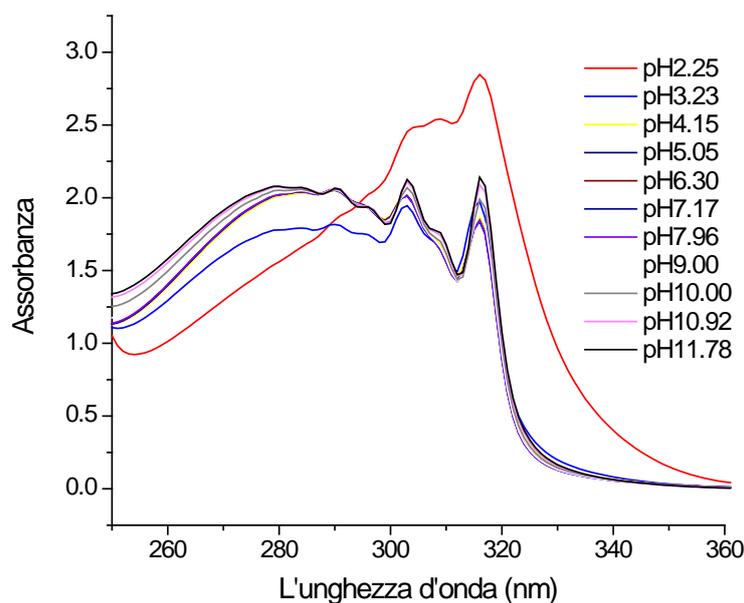


Fig.3.3.8 Spettri di assorbimento UV di una soluzione di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M con un equivalente di Cu(II) a diversi valori di pH

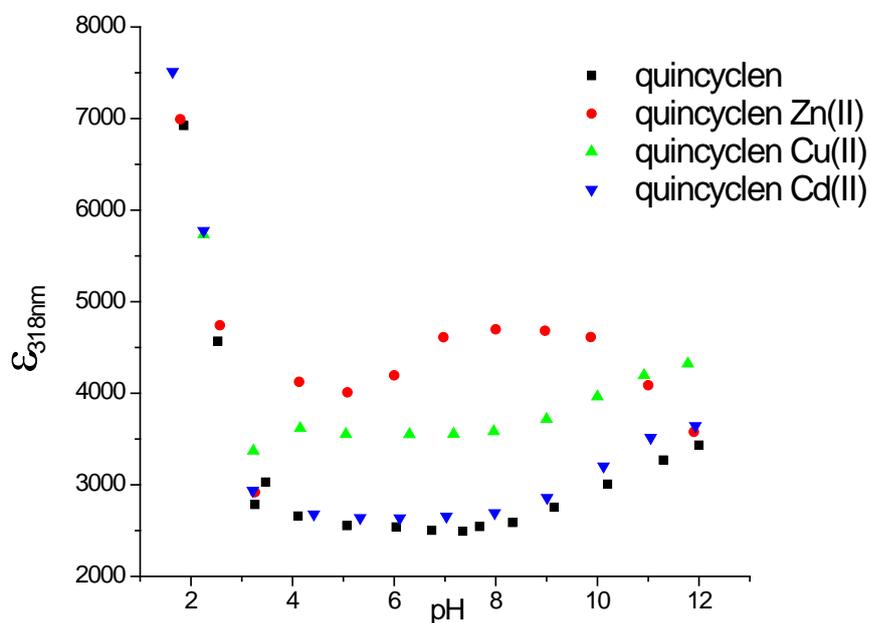


Fig.3.3.9 Variazione del coefficiente di estinzione molare a 318 nm di una soluzione del legante 5×10^{-4} M contenente un equivalente degli ioni Zn(II), Cu(II) e Cd(II) in funzione del pH

Sostanzialmente la forma dello spettro non è alterata dalla coordinazione e rimane sempre caratterizzata da un massimo a 318 nm (figure 3.3.5 – 3.3.8). Solo a pH molto acidi (inferiore a 3) si osserva un aumento dell'assorbanza, con la formazione di una nuova banda slargata a circa 320 nm. Ciò è probabilmente dovuto alla protonazione dell'azoto eteroaromatico. Questo è reso più evidente in figura 3.3.9

dove si riporta l'andamento del coefficiente di estinzione molare a 318 nm del legante e dei suoi complessi di Zn(II), Cu(II), e Cd(II).

3.3.3 – Emissioni di fluorescenza

Una volta studiate le proprietà acido-base e di coordinazione del legante tramite misure potenziometriche e spettrofotometriche, siamo passati a studiare le proprietà del legante come chemosensore di fluorescenza nei confronti dei suddetti ioni metallici. Ciò è stato fatto registrando spettri di emissione di fluorescenza su soluzioni del legante in presenza di ioni metallici sia a pH fisso che a pH variabile in modo da verificare l'eventuale variazione dell'intensità di emissione del sistema in seguito alla formazione dei vari complessi. Come primo passo sono stati registrati gli spettri di emissione del legante in presenza di 1 equivalente degli ioni metallici al variare del pH in soluzione acquosa con λ_{ecc} 315 nm. In tale modo siamo stati in grado di definire le caratteristiche di emissione delle varie specie complesse formate da ciascuno ione metallico. In figure 3.3.10 - 3.3.13 sono stati riportati gli spettri di emissione di fluorescenza di una soluzione di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M da solo e in presenza di 1 equivalente di Cd(II), Cu(II) e Zn(II) a vari valori di pH. Abbiamo poi sovrapposto i valori dell'intensità di emissione a 400 nm, in funzione del pH, con i diagrammi di distribuzione delle specie formate determinate attraverso misure potenziometriche. A titolo di esempio riportiamo il caso dei complessi di Zn(II). Da quest'ultimo grafico, si nota come per pH acidi ($pH < 4$), cioè nella regione in cui sono presenti in soluzione solo le specie protonate del legante, si ha, come era logico attendersi, un andamento analogo a quello visto per il legante in assenza dello ione metallico, mentre per pH maggiori di 4, cioè nella regione in cui il legante inizia a formare le specie contenenti lo ione metallico, l'emissione di fluorescenza aumenta. Nel caso di Cu(II) e Cd(II), invece, la formazione del complesso diminuisce o non altera l'emissione di fluorescenza osservata per il legante da solo.

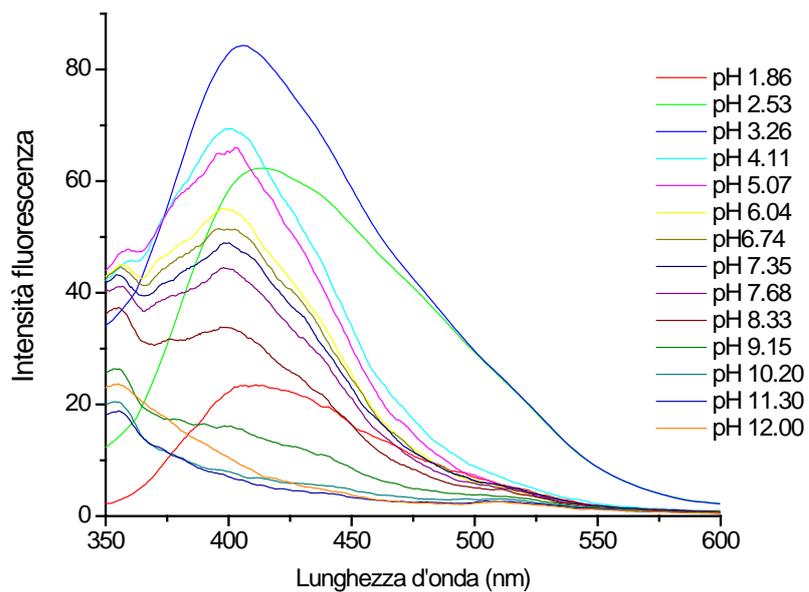


Fig.3.3.10 Spettri di emissione di fluorescenza di una soluzione acquosa di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M a differenti valori di pH

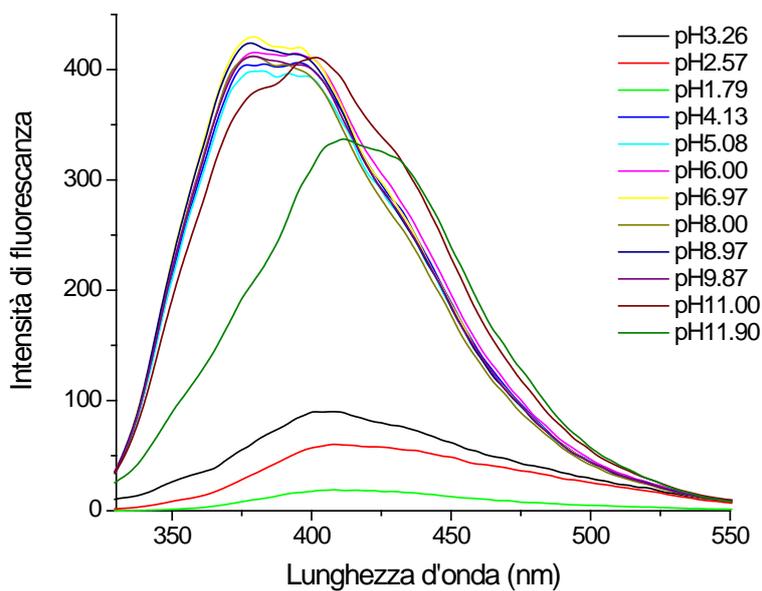


Fig.3.3.11 Spettri di emissione di fluorescenza di una soluzione acquosa di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M in presenza di un equivalente di Cd(II) a differenti valori di pH

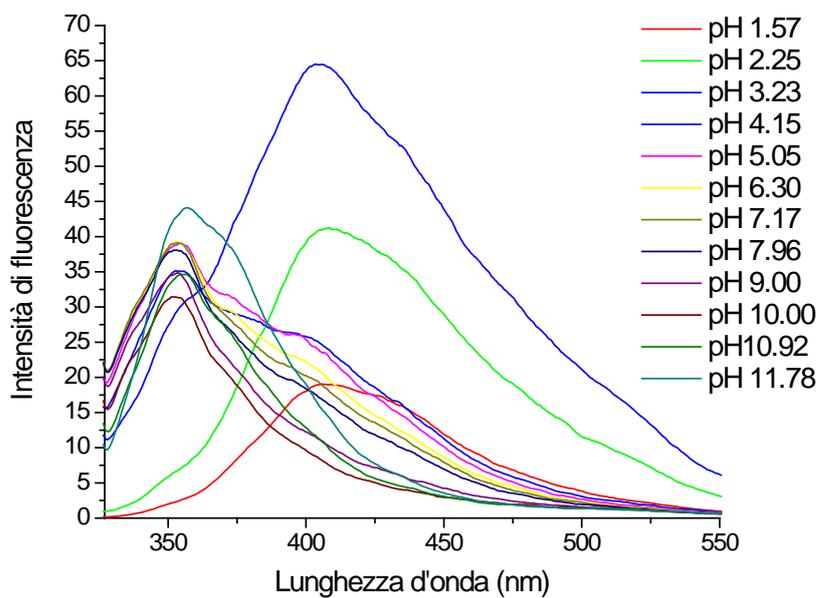


Fig.3.3.12 Spettri di emissione di fluorescenza di una soluzione acquosa di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M in presenza di un equivalente di Cu(II) a differenti valori di pH

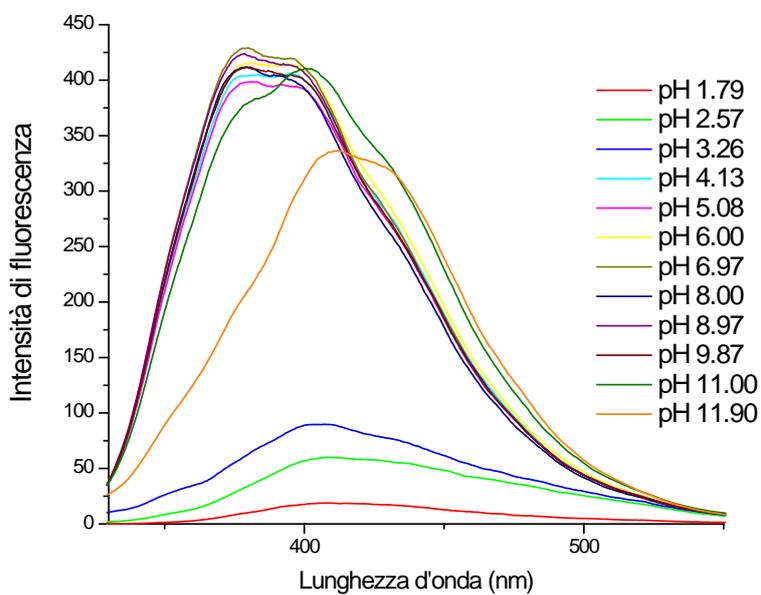


Fig.3.3.13 Spettri di emissione di fluorescenza di una soluzione acquosa di Quin-Cyclen 5×10^{-4} M in presenza di un equivalente di Zn(II) a differenti valori di pH

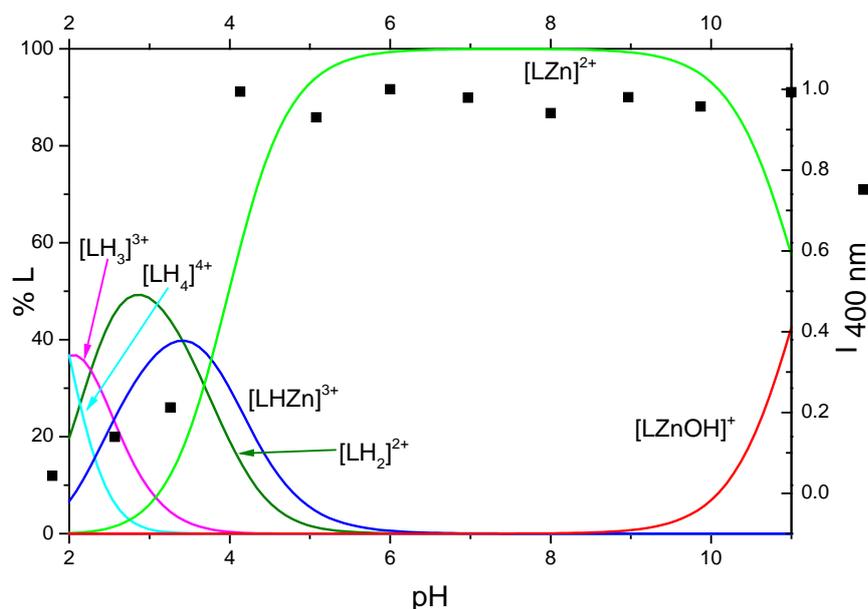


Fig.3.3.14 Variazione dell'intensità di emissione di fluorescenza a 400 nm al variare del pH sovrapposto con il diagramma di distribuzione di una soluzione acquosa di Quin-Cyclen $5 \times 10^{-4} M$ in presenza di un equivalente di Zn(II).

Riportando in grafico l'andamento del valore dell'intensità di emissione di fluorescenza a 400 nm in funzione del pH per il legante da solo e in presenza dei diversi ioni metallici (figura 3.3.15) possiamo valutare la capacità del legante di segnalare la presenza di ciascuno ione metallico e quindi il suo possibile utilizzo come chemosensore.

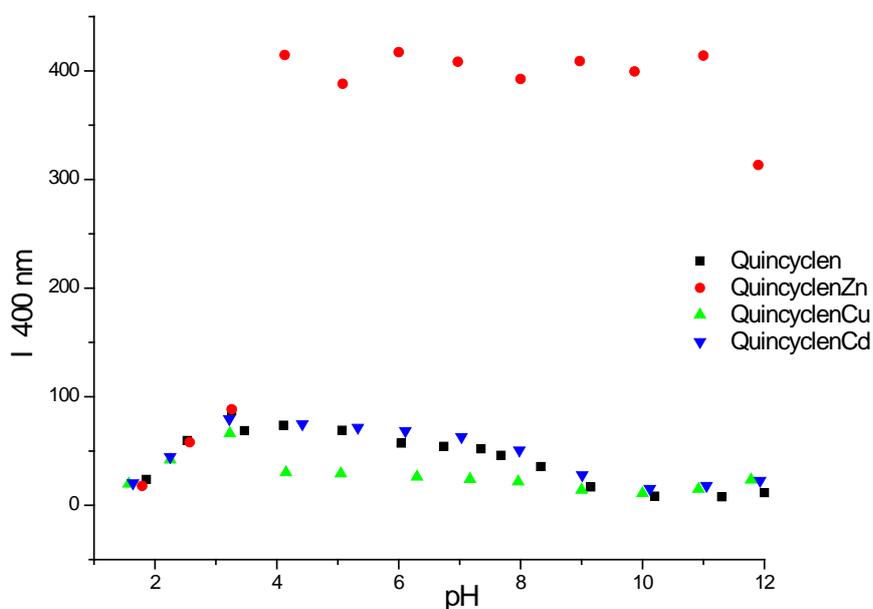


Fig.3.3.15 Variazione dell'intensità di emissione di fluorescenza a 400 nm di una soluzione acquosa di Quin-Cyclen $5 \times 10^{-4} M$ e dei complessi 1:1 del legante con i cationi Zn(II), Cu(II) e Cd(II) a differenti valori di pH

Si vede come la formazione dei complessi con lo ione Cd(II) sostanzialmente non alteri le proprietà di emissione del legante; quindi il nostro recettore non è capace di segnalare la presenza di questo ione metallico in soluzione. Si può notare invece come la formazione dei complessi di Cu(II) dia luogo ad un leggero effetto di quenching dell'emissione di fluorescenza. Questo comportamento è atteso, considerando che ioni metallici paramagnetici, come Cu(II) tendono a favorire, quando coordinati, processi di decadimento non radiativo degli stati eccitati. Il fatto che lo ione Cd(II) non alteri le proprietà di emissione del legante è più insolito, giacché spesso la coordinazione di questo ione metallico porta ad un aumento dell'emissione di fluorescenza. Soltanto per quanto riguarda lo Zn(II) abbiamo un comportamento diverso. Gli spettri di emissione e l'andamento dell'intensità di emissione a 400 nm in funzione del pH in presenza di 1 equivalente di Zn(II) evidenziano come l'intensità di emissione di fluorescenza aumenta con la formazione del complesso $[LZn]^{2+}$. I dati sopra mostrati evidenziano quindi come il nostro legante sia capace di segnalare la presenza dello ione Zn(II) in maniera selettiva rispetto agli altri ioni metallici in un'ampia regione di pH che include la neutralità.

Successivamente sono stati registrati spettri di emissione su soluzioni del legante, tamponate a pH 9 (tampone CHES), in presenza di quantità crescente di Cu(II), Cd(II) e Zn(II). Nelle figure 3.3.16 - 3.3.18 sono stati riportati i rispettivi spettri di emissione. Gli spettri sono stati registrati in condizioni sperimentali uguali per i tre ioni metallici, cioè con la stessa concentrazione del legante e del tampone ed uguali condizioni di acquisizione degli spettri. Da queste tre figure si nota come, all'aumentare della quantità di ione metallico presente in soluzione, per lo ione Cd(II) le variazioni di emissione siano pressoché trascurabili, per il Cu(II) si abbia una leggera diminuzione dell'emissione di fluorescenza e per lo Zn(II) si osservi invece un accentuato incremento di emissione.

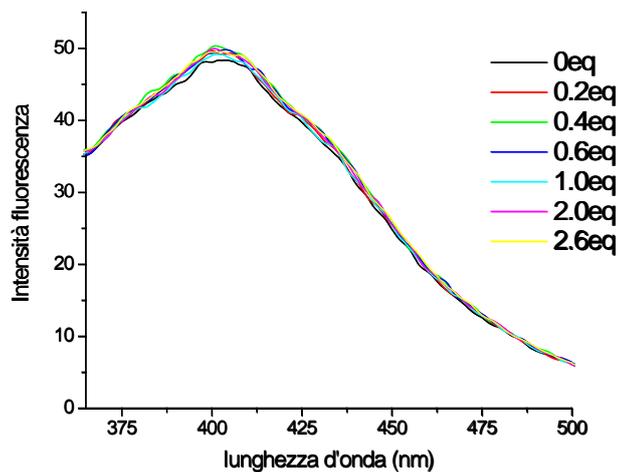


Fig.3.3.16 Spettri di fluorescenza di una soluzione del legante 5×10^{-4} M in presenza di quantità crescenti di Cd(II)

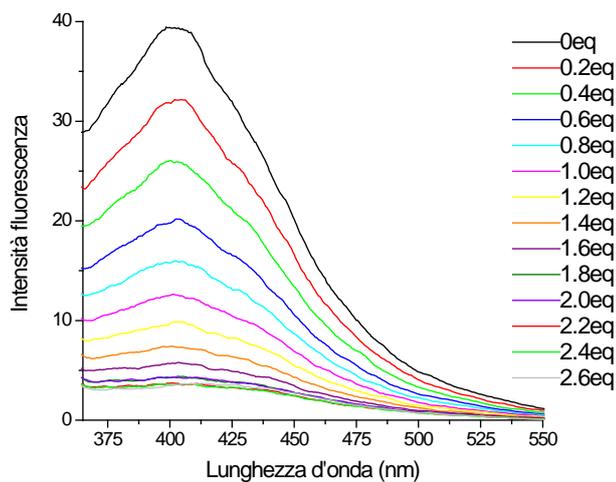


Fig.3.3.17 Spettri di fluorescenza di una soluzione del legante 5×10^{-4} M in presenza di quantità crescenti di Cu(II)

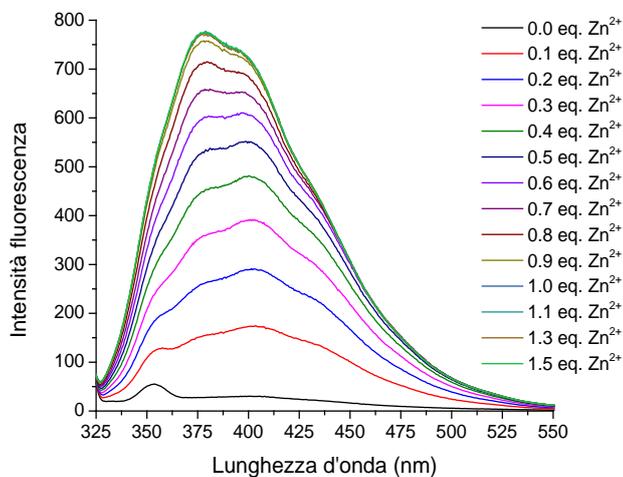


Fig.3.3.18 Spettri di fluorescenza di una soluzione del legante 5×10^{-4} M in presenza di quantità crescenti di Zn(II)

Ancora una volta, le aggiunte di Cd(II) non alterano l'emissione di fluorescenza, mentre l'aggiunta di Cu(II) porta ad un quenching dell'emissione, in linea con quanto già osservato e discusso nelle misure a diversi valori di pH. L'aspetto più interessante è il comportamento osservato in presenza di quantità crescenti di Zn(II). Infatti, l'aumento di fluorescenza è osservabile fino all'aggiunta di circa 1 equivalente di Zn(II). Aggiunte maggiori di Zn(II) non alterano l'intensità di emissione in maniera significativa.

Questa ipotesi è confermata dall'analisi degli spettri di assorbimento UV-vis, eseguiti aggiungendo quantità crescenti di Zn(II) a una soluzione di legante, nelle stesse condizioni sperimentali (pH 9, tampone CHES) delle misure spettrofluorimetriche. Come ben visibile dalla figura 3.3.19, la banda di assorbimento della chinolina a circa 320 nm aumenta in maniera pressoché proporzionale alla quantità di Zn(II) aggiunto fino all'aggiunta di un equivalente di ione metallico, per poi rimanere costante in presenza di quantità maggiori di Zn(II).

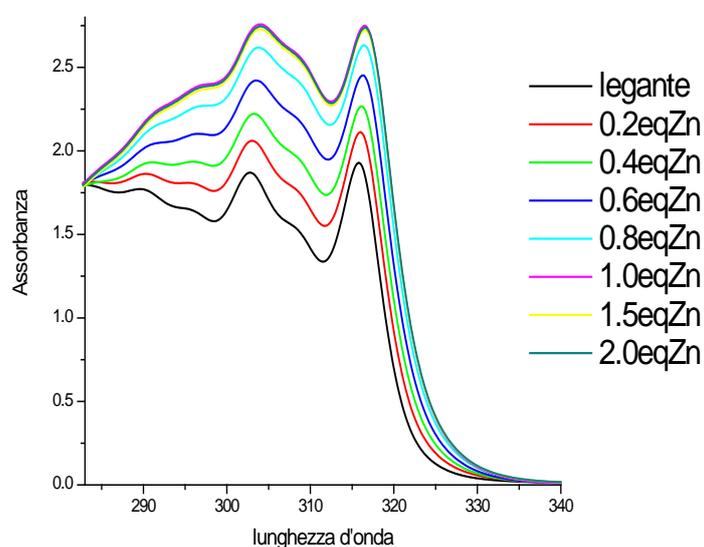


Fig.3.3.19 Spettri UV-Visibile di una soluzione acquosa del legante 5×10^{-4} M in presenza di quantità crescenti di Zn(II)

3.3.4 Spettroscopia NMR

Per apprezzare meglio eventuali interazioni sono stati registrati anche spettri ^1H NMR sul legante quin-cyclen in presenza di quantità crescenti di Zn(II) a pH=9.

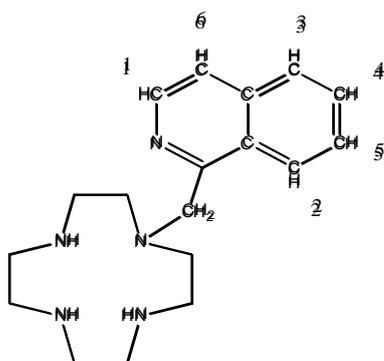


Fig.3.3.21 *Struttura del legante quin-cyclen con la numerazione degli atomi di idrogeno dell'anello aromatico. La stessa numerazione verrà usata anche negli spettri riportati successivamente.*

Purtroppo la parte alifatica presenta una notevole sovrapposizione dei segnali che ne impedisce l'interpretazione. La parte aromatica risulta invece essere chiaramente interpretabile. La figura 3.3.22 evidenzia come l'aggiunta di Zn(II) e la conseguente formazione del complesso porta alla diminuzione dell'intensità dei segnali del legante e alla formazione di un nuovo set di segnali, che può essere attribuito alla formazione di un unico complesso di Zn(II), in accordo con la presenza di un equilibrio di scambio lento sulla scala dei tempi NMR tra legante e complesso. L'aggiunta di un equivalente di Zn(II) porta alla completa scomparsa dei segnali del legante libero e i segnali rimanenti sono attribuibili alla presenza di un unico complesso mononucleare di Zn(II) in queste condizioni. L'aggiunta di un eccesso di Zn(II) non altera ulteriormente gli spettri ^1H NMR.

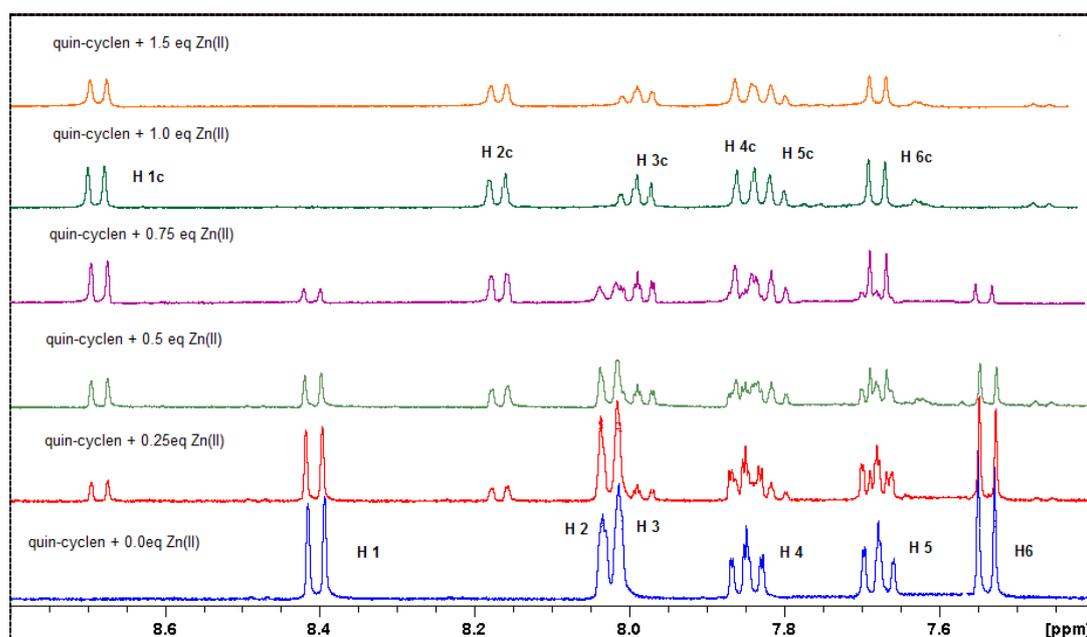


Fig. 3.3.22 *Spettri ^1H -NMR di una soluzione del legante registrati in presenza di quantità crescenti di Zn(II).*

Si può osservare inoltre che la coordinazione porta a uno shift downfield di tutti i segnali aromatici, in accordo con la coordinazione dell'unità chinolina sullo ione metallico.

3.4 Coordinazione di specie anioniche da parte del complesso di zinco

E' noto come i complessi di Zn(II) possano subire reazione di addizione di altre specie chimiche, che vengono coordinate grazie alla peculiare caratteristica di questo ione metallico di cambiare facilmente sfera e numero di coordinazione, potendo assumere facilmente numero di coordinazione da 4 fino a 6. Accanto a questo, la coordinazione di substrati sui centri metallici dei complessi con il legante quin-cyclen potrebbe farne variare le proprietà di emissione di fluorescenza portando alla realizzazione di sensori per queste specie chimiche. Abbiamo perciò analizzato le proprietà coordinative in soluzione acquosa di $[ZnL]^{2+}$, sia pure in maniera preliminare, nei confronti di anioni fosfato inorganici (mono-, di-, e trifosfato) e di un anione nucleotidico l'ATP.

3.4.1 Determinazione delle costanti di formazione dei complessi in soluzione

Per prima cosa abbiamo analizzato la coordinazione degli anioni mono-, di-, trifosfato) e ATP mediante misure potenziometriche e i risultati sono riportati in tabella 3.4.1 .

Reazione	log K			
	PO_4^{3-}	$P_2O_7^{4-}$	$P_3O_{10}^{5-}$	ATP ⁴⁻
$ZnL + A = ZnLA$	4.99(2)	6.73(2)	6.05(5)	7.98(5)
$ZnL + HA = HZnLA$	3.57(2)	5.45(2)	5.58(6)	7.20(3)
$ZnL + H_2A = H_2ZnLA$		5.15(3)	5.11(4)	
$HZnL + H_2A = H_3ZnLA$		5.98(3)	5.73(9)	6.23(7)

Tab. 3.4.1 Costanti di formazione dei adotti degli anioni con il complesso Zn(II) - quincyclen in NMe_4Cl 0.1M (308 ±0.1K).

Carica omessa per semplicità. I numeri tra parentesi indicano la deviazione standard sull'ultima cifra significativa.

Il complesso in esame forma addotti ternari stabili con tutti e quattro gli anioni investigati, con stechiometria metallo-legante-anione 1:1:1. Inoltre sia il complesso nella sua forma ZnL^{2+} che nella sua forma protonata $ZnLH^{3+}$ possono formare complessi stabili con le specie anioniche in esame come tali o nelle loro forme protonate, dando luogo a numerosi equilibri simultanei in soluzione acquosa. E' evidente comunque che la stabilità degli addotti aumenta nell'ordine monofosfato < trifosfato < difosfato < ATP. Ad esempio, la costante di formazione del complesso $ZnLA^{2+x}$ è pari 4,99, 6,73, 6.05, 7.98 con $A = PO_4^{3-}$, $P_2O_7^{4-}$, $P_3O_{10}^{5-}$ e ATP^{4-} . La maggiore tendenza dell'anione difosfato a coordinarsi sul centro metallico rispetto al monofosfato è sicuramente legata alla sua più alta carica negativa e alla possibilità di agire da legante bidentato, cosa chiaramente non possibile per lo ione monofosfato. Risulta meno attesa la minore stabilità dei complessi dell'anione trifosfato rispetto a quelli formati dall'anione difosfato, nonostante quest'ultimo abbia una carica più bassa. Ciò può essere attribuito, in prima istanza, all'impossibilità dello ione trifosfato di interagire con tutti e tre i suoi gruppi fosfato con lo ione metallico. Nel complesso con il legante quin-cyclen, lo ione zinco è coordinato ai quattro atomi del macrociclo e all'atomo di azoto del sistema chinolinico. Quest'ultimo è legato più debolmente degli altri atomi di azoto e può distaccarsi facilmente dal centro metallico, protonandosi in soluzione acquosa. Viceversa, i 4 atomi di azoto amminici del sistema macrociclico sono legati in maniera forte ed è difficile pensare che il loro legame con lo ione $Zn(II)$ possa rompersi in seguito alla coordinazione di una specie anionica. Visto che lo ione $Zn(II)$ al massimo è esacordinato nei suoi complessi, ne consegue che il trifosfato può coordinarsi al più tramite due gruppi fosfato. Un gruppo fosfato è perciò quasi sicuramente non coordinato, una situazione sfavorita da un punto di vista entropico e che può spiegare la minore stabilità dei complessi del trifosfato rispetto a quelli del difosfato. Questa ipotesi coordinativa potrebbe essere usata anche per l'ATP, i cui addotti con il complesso di $Zn(II)$ sono però più stabili sia di quelli del difosfato che del trifosfato. Un'ipotesi che può spiegare la più alta stabilità dei complessi dell'ATP rispetto ai fosfati inorganici è la presenza di stabilizzanti interazioni di π -stacking tra il nucleo chinolinico del legante e l'adenina dell'ATP, cosa che abbiamo cercato di accertare tramite misure NMR.

3.4.2 Spettri ^{31}P , ^1H -NMR e di emissione di fluorescenza del complesso in presenza dei substrati anionici

- Spettroscopia NMR

Per prima cosa abbiamo registrato spettri ^{31}P NMR del trifosfato in presenza di quantità crescenti di complesso di Zn(II) (fig.3.4.1) dove si evidenzia un downfield dei segnali di entrambi i due gruppi fosfato.

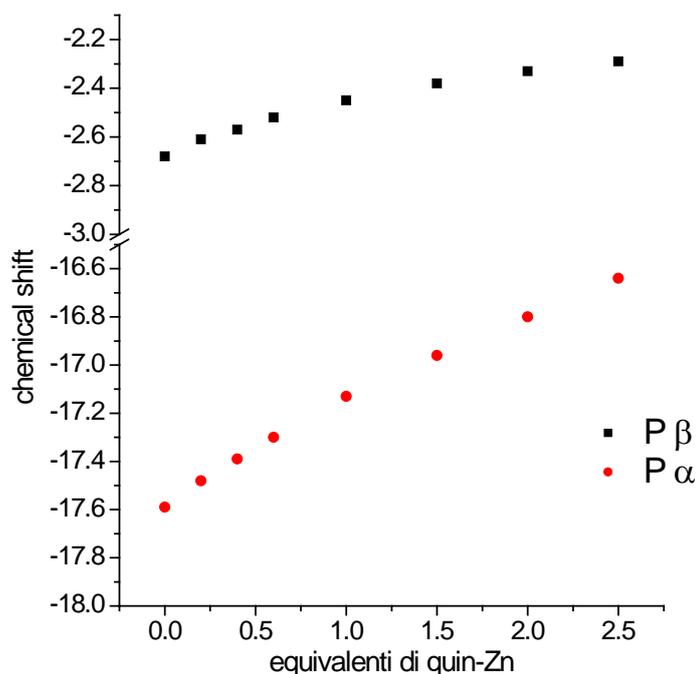


Fig.3.4.1 Chemical shift dei segnali ^{31}P NMR dei fosfori del $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ in presenza di quantità crescenti di complesso di Zn(II)

Analoghi spettri sono stati registrati nel caso dell'ATP (figura 3.4.2). In questo caso si nota uno shift downfield dei segnali dei segnali P_γ e P_β , mentre il segnale del gruppo fosfato P_α non evidenzia shift rilevanti. Ciò suggerisce che l'ATP si coordina allo ione metallico tramite i gruppi fosfato in posizione γ e β , mentre il gruppo fosfato in posizione α non interviene nella coordinazione, probabilmente a causa dell'ingombro sterico dell'unità adenosina adiacente.

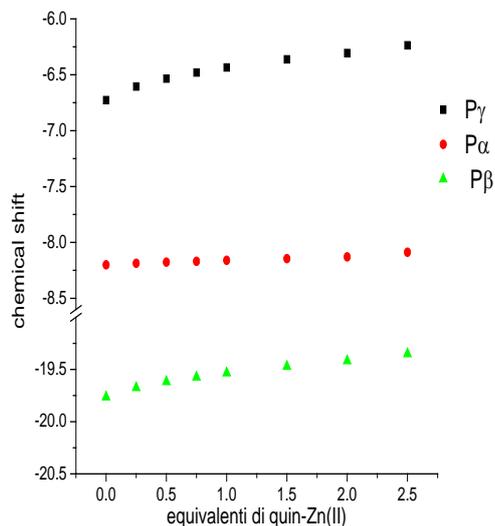


Fig.3.4.2 Chemical shift dei segnali ^{31}P NMR degli atomi di fosforo dell' ATP in presenza di quantità crescenti di complesso di Zn(II)

Nel caso dell'ATP sono stati anche registrati spettri ^1H NMR del complesso in presenza di quantità crescenti di ATP (fig.3.4.4). Questi evidenziano un progressivo shift a campi bassi dei segnali dell'unità chinolina all'aumentare di ATP aggiunto. Allo stesso modo, spettri dell'ATP registrati in presenza di quantità crescenti di complesso di Zn(II) evidenziano un marcato shift a campi bassi dei segnali dei protoni H₂ e H₈ dell'adenina in presenza del complesso. Questi dati confermano la presenza di interazioni idrofobe e/o di π -stacking tra le unità eteroaromatiche del complesso di Zn(II) e del substrato anionico.

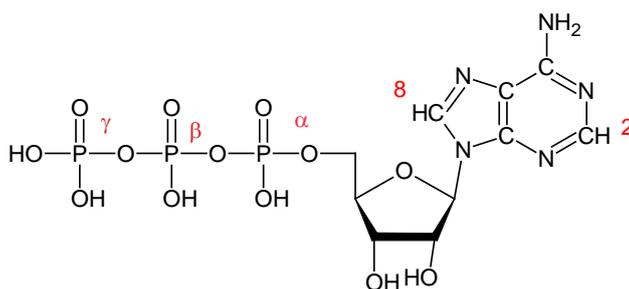


Fig. 3.4.3 Struttura dell'ATP

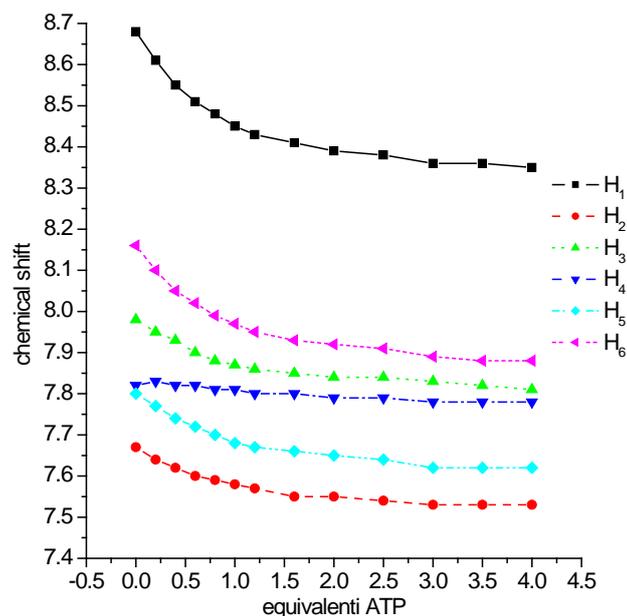


Fig.3.4.4 Chemical shift dei segnali ¹H NMR del complesso di Zn(II) in presenza di quantità crescenti di ATP. Vedi figura 3.3.21 per la numerazione segnali.

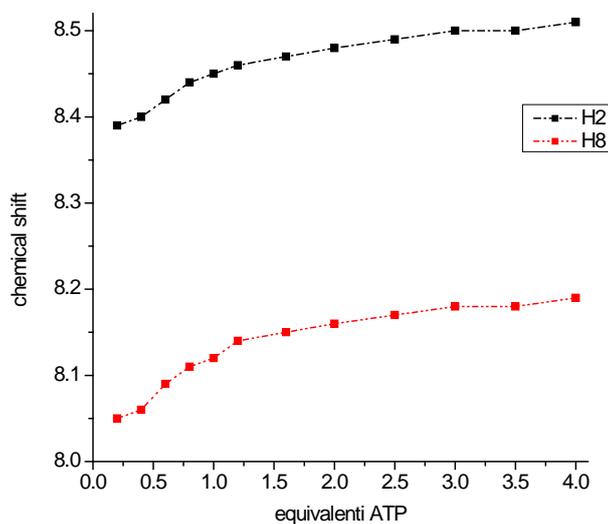


Fig.3.4.5 Chemical shift dei segnali ¹H NMR dell'adenina dell'ATP in presenza di quantità crescenti di complesso di Zn(II)

- Spettroscopia di emissione di fluorescenza

Sono stati eseguiti spettri di fluorescenza del complesso di Zn(II) in presenza degli anioni PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e ATP e i risultati vengono riportati nelle figure 3.4.6 - 3.4.8.

Le variazioni dell'intensità di emissione non sono particolarmente marcate per gli anioni PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ mentre risultano apprezzabili per l'anione ATP in accordo con la maggiore interazione dell'anione nucleotidico con il complesso di Zn(II).

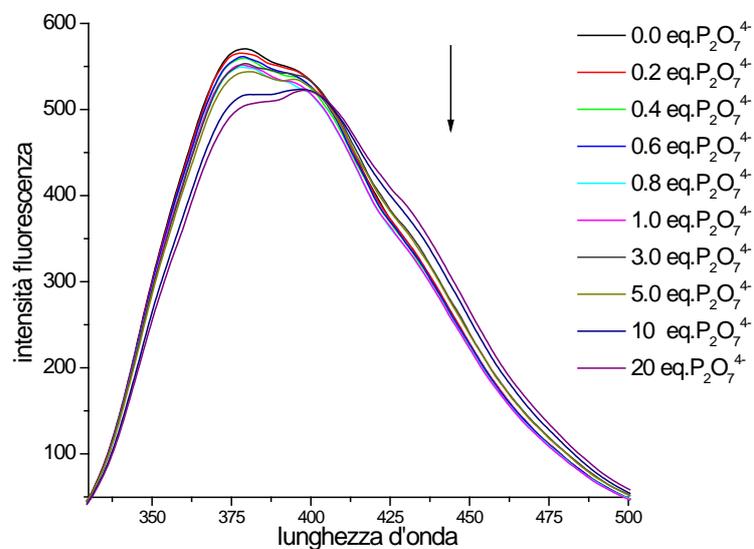


Fig.3.4.6 Spettri di emissione di una soluzione del complesso di Zn(II) $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ in presenza di quantità crescente di anione $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$

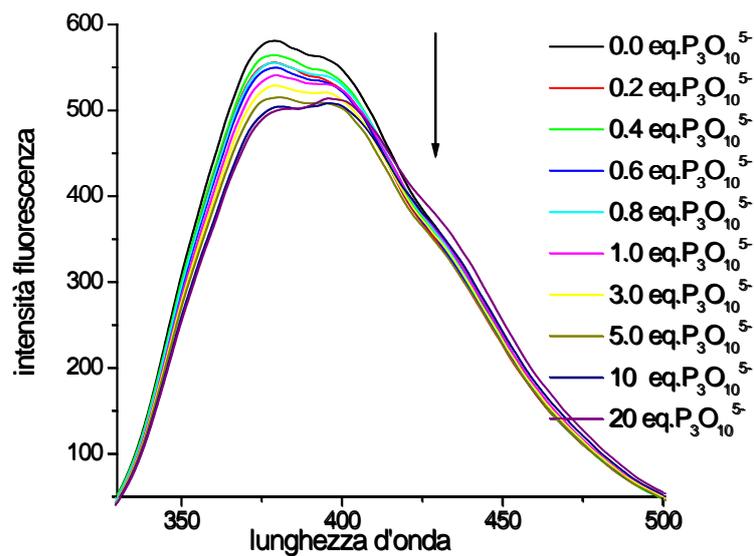


Fig.3.4.7 Spettri di emissione di una soluzione del complesso di Zn(II) $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ in presenza di quantità crescente di anione $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$

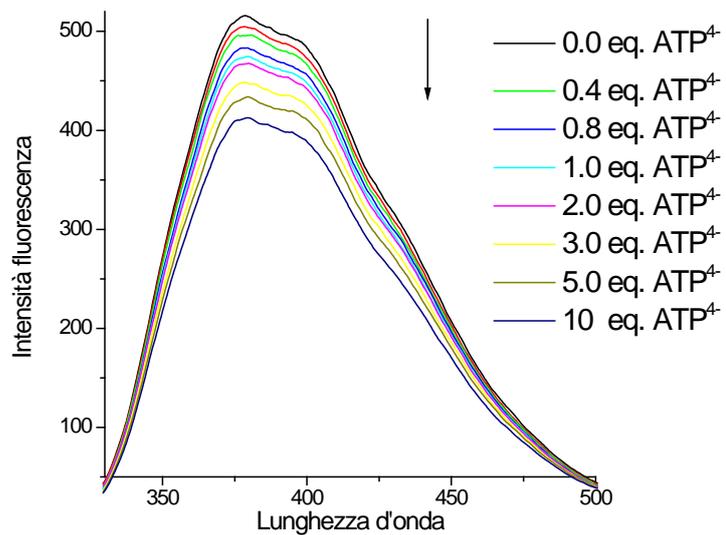


Fig.3.4.8 Spettri di emissione di una soluzione del complesso di Zn(II) 5×10^{-4} M in presenza di quantità crescente di anione ATP⁴⁻

3.5 Conclusioni

L'analisi delle proprietà coordinative del legante Quin-Cyclen ha portato a due risultati rilevanti:

- Il legante forma complessi mononucleari con gli ioni Cu(II), Zn(II) e Cd(II). In questi complessi lo ione metallico è coordinato sia dall'unità cyclen che dal sistema chinolinico. Da un punto di vista termodinamico, il legante mostra una stabilità dei complessi di Zn(II) maggiore rispetto a quelli di Cd(II). Ciò è probabilmente dovuto alle più piccole dimensioni dello ione Zn(II) che gli permette di adattarsi meglio alla cavità di dimensioni ridotte dell'unità cyclen, dando luogo a legami metallo-azoto più forti.
- Questo recettore forma, principalmente nella sua forma diprotonata, complessi mononucleari con gli ioni PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e ATP^{4-} con stechiometria legante-anione 1:1. Sono presenti anche complessi stabili con il legante e gli anioni a diverso grado di protonazione. E' evidente comunque la stabilità degli addotti aumenti nell'ordine monofosfato < difosfato < trifosfato < ATP

Gli effetti della coordinazione sulle proprietà fotofisiche del legante sono stati studiati tramite spettri di emissione di fluorescenza sia a pH fisso che variabile. Tra i metalli analizzati, è stato visto come la maggiore variazione di emissione, nei confronti del legante libero, è stata riscontrata in presenza dello ione Zn(II) che provoca un notevole aumento dell'intensità di emissione di fluorescenza. Abbiamo anche evidenziato come questo recettore sia in grado di segnalare selettivamente lo ione Zn(II) rispetto a Cu(II) e Cd(II). Questi studi in conclusione ci permettono di dire che il recettore Quin-Cyclen è un promettente chemosensore per lo ione Zn(II) in matrici reali. L'analisi delle sue proprietà di segnalazione dello Zn(II) in ambiente intracellulare sono attualmente in corso.

Lo studio è stato successivamente proseguito con la valutazione delle proprietà coordinative in soluzione acquosa del complesso legante-Zn, sia pure in maniera preliminare nei confronti di anioni fosfato inorganici (mono-, di-, e trifosfato) e del noto anione nucleotidico ATP.

Il complesso in esame forma addotti ternari stabili con tutti e quattro gli anioni investigati, con stechiometria metallo-legante-anione 1:1:1. Inoltre sia il complesso nella sua forma ZnL^{2+} che nella sua forma protonata ZnLH^{3+} possono formare complessi stabili le specie anioniche in esame come tali o nelle loro forme

protonate, dando luogo a numerosi equilibri simultanei in soluzione acquosa. E' evidente comunque la stabilità degli addotti aumenti nell'ordine monofosfato < trifosfato < difosfato < ATP. Gli effetti della coordinazione sulle proprietà fotofisiche del complesso sono stati studiati tramite la registrazione di spettri di emissione di fluorescenza. Nonostante l'interazione risulti evidente dalle misure potenziometriche è stato evidenziato come l'emissione di fluorescenza sia poco influenzata dalla formazione degli addotti con le specie anioniche.