



Università degli Studi di Firenze

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica

Anno Accademico 2011-2012

**STUDIO DELL'INTERAZIONE DI UN DENDRIMERO
POLIAMMINICO CON AMP, ADP E ATP ED I
CORRISPONDENTI ANIONI INORGANICI FOSFATO,
DIFOSFATO, TRIFOSFATO IN ASSENZA E PRESENZA DI
Zn(II).**

Tesi sperimentale di laurea in chimica

di

Duccio Tatini

Relatore

Chiarissimo Prof.

Antonio Bianchi

Correlatore

Chiarissima Prof.ssa

Claudia Giorgi

*Ad Alice, Chiara
e ai miei genitori*

Indice

1 Introduzione

1.1	<u>La chimica supramolecolare</u>	<i>pag.1</i>
1.2	<u>Chimica di coordinazione anionica</u>	<i>pag.2</i>
1.3	<u>Caratteristiche degli anioni</u>	<i>pag.4</i>
1.3.1	<i>Effetti dovuti alla carica negativa</i>	<i>pag.4</i>
1.3.2	<i>Geometria degli anioni</i>	<i>pag.5</i>
1.3.3	<i>Carattere basico</i>	<i>pag.6</i>
1.3.4	<i>Dipendenza dal pH</i>	<i>pag.6</i>
1.3.5	<i>Solvatazione degli anioni</i>	<i>pag.7</i>

2 Chimica di coordinazione anionica: interazioni host-guest e strumenti per il design di recettori.

2.1	<u>Concetti di base per la progettazione di recettori per specie anioniche</u>	<i>pag.9</i>
2.2	<u>Interazioni coinvolte in chimica di coordinazione anionica</u>	<i>pag.11</i>
2.2.1.	<i>Interazioni elettrostatiche</i>	<i>pag.12</i>
2.2.2.	<i>Forze di Van der Waals e forze di dispersione</i>	<i>pag.13</i>
2.2.3.	<i>Interazioni acido-base in chimica di coordinazione anionica</i>	<i>pag.14</i>
2.2.4.	<i>Legame a idrogeno</i>	<i>pag.14</i>
2.2.5	<i>Interazioni π-π stacking</i>	<i>pag.16</i>

3 Recettori per nucleotidi

3.1.	<u>I nucleotidi</u>	<i>pag.18</i>
3.2.	<u>Caratteristiche dei mononucleotidi</u>	<i>pag.19</i>
3.3.	<u>Recettori per nucleotidi – Recettori non contenenti gruppi aromatici</u>	<i>pag.20</i>

- 3.4. Recettori per nucleotidi – *pag.24*
Recettori contenenti unità aromatiche
- 3.5. Recettori non poliamminici *pag.26*
- 3.6. Complessi metallici come recettori *pag.27*
- 3.7. Aspetti catalitici dei recettori: attività ATPasica e chinasica *pag.29*

4 Obiettivi della ricerca *pag.31*

5 Parte sperimentale *pag.32*

- 5.1. Caratterizzazione dei complessiva *pag.32*
- 5.2. Potenziometria *pag.32*
- 5.3. Metodo di calcolo *pag.36*
- 5.4. ³¹P NMR *pag.41*

6 Risultati e discussione *pag.42*

- 6.1. Formazione di complessi anionici di L e dei suoi complessi di Zn(II) con ATP,ADP, AMP, fosfato, difosfato e trifosfato. *pag.42*
- 6.2. Interazione di L con ADP, ATP, AMP *pag.45*
- 6.3. Interazione di L con PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ *pag.52*
- 6.4. Interazione dei complessi mononucleari di Zn(II) di L con ATP, ADP, AMP *pag.57*
- 6.5. Attività catalitica del legante L e dei suoi complessi mononucleari di Zn(II) *pag.66*

7 Conclusioni e prospettive future *pag.78*

8 Bibliografia *pag.79*

1. Introduzione

1.1 La chimica supramolecolare¹⁻³

La chimica supramolecolare è quella branca della chimica che ha come oggetto di studio e di interesse aggregati molecolari risultanti dall'associazione di due o più specie chimiche legate assieme da forze intermolecolari. E' definita anche come chimica "oltre la molecola", poiché mentre la chimica molecolare si concentra sui legami covalenti tra atomi, la chimica supramolecolare studia le interazioni deboli e reversibili che si instaurano tra le molecole che costituiscono le subunità alla base degli aggregati complessi. Numerosi sono gli esempi di aggregati supramolecolari nei sistemi biologici: basti pensare al DNA la cui struttura a doppia elica è costituita da due catene identiche tenute insieme da legami a idrogeno e interazioni π - π stacking tra le nucleobasi, oppure agli addotti antigene-anticorpo anche questi tenuti assieme da forze deboli.

Dal punto di vista storico, colui che pose le basi della chimica supramolecolare fu Hermann Emil Fischer nel 1890, elaborando il modello "chiave-serratura" per le interazioni enzima-substrato e anticipando di fatto i concetti di riconoscimento molecolare e chimica host-guest.

Agli inizi del '900 si arrivò ad una comprensione più profonda delle interazioni intermolecolari (la cui esistenza era già stata postulata da Van der Waals nel 1873) con la descrizione del legame a idrogeno da parte di Latimer e Rodebush, ma la vera svolta si ebbe intorno al 1960, con la

sintesi degli eteri corona da parte di Charles J. Pedersen.

Proseguendo su questa linea Donald J. Cram e Jean-Marie Lehn iniziarono a sintetizzare recettori selettivi per diversi tipi di ioni, prestando particolare attenzione alle caratteristiche strutturali e alla complementarità tra recettore e substrato. Proprio questi lavori valsero a Pedersen, Cram e Lehn l'assegnazione del premio Nobel per la chimica nel 1987, riconoscendo ufficialmente dunque l'importanza della chimica supramolecolare e i progressi fatti in tale ambito. A partire dagli anni '90 questo settore ha conosciuto un progressivo sviluppo e ampliamento, grazie all'integrazione con altri campi come l'elettrochimica e la fotochimica e alla forte influenza delle nanotecnologie, che forniscono building blocks sempre più sofisticati per gli aggregati supramolecolari ed i sistemi autoassemblanti.

1.2 Chimica di coordinazione anionica¹⁻³

La chimica di coordinazione anionica rappresenta una tra le più grandi aree di interesse nell'ambito della chimica supramolecolare, e si occupa della progettazione, della sintesi e della caratterizzazione di recettori in grado di legarsi in maniera selettiva ad anioni specifici mediante processi di riconoscimento molecolare.

Si tratta di un campo di ricerca relativamente giovane, la cui origine viene fatta risalire comunemente al 1968, quando C.H Park e E. Simmons sintetizzarono i primi recettori macrobicyclici in grado di coordinare ioni alogenuro. Quindi, rispetto alla chimica di coordinazione cationica, che invece già nel 1913 aveva trovato i suoi fondamenti teorici grazie al lavoro di Alfred Werner, la coordinazione anionica ha conosciuto un forte sviluppo solo in tempi recenti. Le motivazioni di questo ritardo risiedono

principalmente in problematiche di tipo sperimentale, principalmente dovute al fatto che il design e la sintesi di recettori per anioni sono più impegnativi rispetto a quelli dei leganti per cationi. Inoltre, la coordinazione cationica ha trovato fin da subito importanti applicazioni nella risoluzione di problemi di tipo tecnologico, come l'estrazione dei metalli, attraendo così l'interesse di molti chimici e stimolando così il suo sviluppo.

Tuttavia, negli ultimi anni la chimica di coordinazione anionica ha subito un forte impulso dovuto a una sempre maggiore importanza attribuita agli anioni sia in campo ambientale che in campo biologico e biochimico. Da un lato infatti il grande interesse legato alla salvaguardia del nostro ecosistema promuove la ricerca di leganti selettivi per anioni inquinanti: esempi tipici sono NO_3^- e SO_4^{2-} derivanti dalla combustione di carburanti nei motori a scoppio, oppure fosfati, polifosfati e nitrati presenti in fertilizzanti, detersivi e scarichi industriali.

Da un altro la comprensione sempre più approfondita dei processi biologici ha messo in evidenza l'importanza fondamentale di diverse specie anioniche coinvolte in meccanismi di riconoscimento, trasporto e trasformazione: basti pensare ai nucleotidi come ATP e GTP, che prendono parte a un numero enorme di reazioni all'interno del nostro organismo, dal trasferimento di energia all'attivazione enzimatica, passando per la sintesi di macromolecole e proteine. In questo ambito la chimica di coordinazione si propone due diversi obiettivi:

- ~ produrre sistemi capaci di mimare l'attività biologica di molecole naturali (sistemi modello)
- ~ realizzare sistemi che funzionino da inibitore per un determinato enzima o che promuovano la formazione di un prodotto diverso da quello sintetizzato naturalmente dall'enzima.

1.3 Caratteristiche degli anioni¹⁻³

Il riconoscimento e l'interazione tra un recettore e un anione avvengono secondo gli stessi principi con cui ha luogo la complessazione di un catione, ovvero quelle regole che stanno alla base della forza e della selettività delle interazioni host-guest.

Tuttavia gli anioni possiedono delle caratteristiche del tutto particolari rispetto ai cationi, e ciò fa sì che la realizzazione e l'impiego di recettori per questo tipo di specie sia più difficoltoso.

1.3 .1 Effetti dovuti alla carica negativa

La caratteristica più evidente degli anioni è appunto la loro carica negativa, che permette loro di legarsi a specie cariche positivamente oppure a gruppi polari o polarizzabili, mediante interazioni di tipo elettrostatico. Tuttavia occorre ricordare che queste interazioni sono scarsamente direzionali e poco specifiche. Messa a confronto con i cationi, gli anioni sono relativamente più grandi, a causa dell'aumento delle dimensioni di atomi e molecole associato all'incremento di carica negativa. Tutto ciò ha delle importanti ripercussioni sul riconoscimento e l'interazione tra legante e anione: da un lato il recettore dovrà possedere una cavità più ampia per ospitare la specie anionica, dall'altro l'aumento di dimensioni degli anioni rispetto ai cationi con pari numero di elettroni determina una maggiore diffusione spaziale della carica, con conseguente diminuzione del rapporto carica/raggio e indebolimento delle interazioni elettrostatiche. Tuttavia il fatto che la densità elettronica sia maggiormente diffusa nello spazio ha anche un'altra importante conseguenza: le specie anioniche risulteranno infatti più polarizzabili, e questo dunque favorisce le interazioni di Van der Waals.

Ione	Raggio ionico (Å)	Ione	Raggio ionico (Å)
F ⁻	1.33	Na ⁻	2.20
Cl ⁻	1.81	Cs ⁻	3.50
Br ⁻	1.96	Li ⁺	0.76
I ⁻	2.20	Na ⁺	1.02
ClO ₄ ⁻	2.50	K ⁺	1.38
NO ₃ ⁻	1.79	Cs ⁺	1.67
CO ₃ ²⁻	1.78	Ca ²⁺	1.00
SO ₄ ²⁻	2.30	Zn ²⁺	0.74
PO ₄ ³⁻	2.38	Al ³⁺	0.54
H ₂ PO ₄ ⁻	2.00	La ³⁺	1.03
PdCl ₆ ²⁻	3.19	NH ₄ ⁺	1.48

Tabella 1.3.1. Raggi delle principali specie ioniche

1.3.2 Geometria degli anioni

Un'altra caratteristica fondamentale degli anioni è la loro geometria: a differenza dei cationi, anche le specie anioniche più semplici mostrano un ampio campo di geometrie. Alcune tra le forme più comuni sono: sferica (alogenuri), lineare (N₃⁻, OCN⁻), trigonale planare (NO₃⁻, R-CO₂⁻), tetraedrica (SO₄²⁻, ClO₄⁻, fosfati) e ottaedrica (M(CN)₆ⁿ⁻).

Questa molteplicità di strutture determina un numero ancora maggiore di geometrie coordinative, spesso anche complesse: ad esempio i leganti sintetici per anioni sferici come gli alogenuri interagiscono con essi mediante un numero di legami a idrogeno compreso tra 2 e 6, mentre lo ione azoturo N₃⁻ può formare con macrocicli poliamminici fino a 3 legami a idrogeno per atomo di azoto terminale.

Tutto questo determina maggiore difficoltà e impegno nel design e nella realizzazione di recettori per specie anioniche, dal momento che il riconoscimento selettivo tra ospite e ospitante necessita sia di

complementarietà elettronica tra siti di legame che di complementarietà strutturale, cioè necessita di una cavità di forma e dimensioni adatte all'interno della quale i siti di legame siano giusti e giustamente collocati.

1.3.3 Carattere basico

Differentemente dai cationi, gli anioni generalmente possiedono coppie di elettroni non coinvolti in legami chimici. Pertanto, la maggior parte delle specie anioniche sono basi di Lewis, e quindi le specie chimiche contenenti gruppi che si comportano da acidi possono funzionare da recettori per gli anioni. Queste interazioni acido-base sono fortemente direzionali e possono essere quindi sfruttate nel design di recettori altamente selettivi. Per quanto riguarda invece gli anioni debolmente acidi o con poca tendenza a donare coppie di elettroni, le uniche interazioni che si possono instaurare con il recettore sono di tipo debole, come le forze di Van der Waals, che sono scarsamente direzionali e dipendono direttamente dalla superficie di contatto host-guest.

1.3.4 Dipendenza dal pH

Un'altra proprietà di cui bisogna tener conto è che gli anioni spesso esistono solo in un ben determinato intervallo di pH, e ciò diventa particolarmente importante quando si intende utilizzare recettori che impiegano interazioni di tipo elettrostatico o legami a ponte di idrogeno derivanti da protonazione per legare le specie anioniche.

In questo caso, affinché la coordinazione avvenga con la massima efficienza, occorre individuare il corretto campo di pH in cui il legante risulti protonato mentre l'anione non lo sia.

1.3.5 Solvatazioni degli anioni

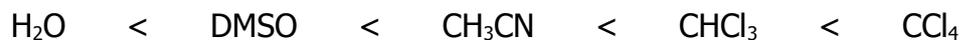
L'acqua è un buon solvente per le specie ioniche, essendo altamente polare. Se andiamo a considerare più dettagliatamente le caratteristiche dell'acqua come solvente, si vede che essa riesce a solvatare meglio gli anioni rispetto ai cationi (DN 18.0 , AN 54.8). Conseguentemente, a parità di carica e dimensioni, gli anioni mostrano ΔG° di idratazione più negative rispetto ai cationi, pertanto, risulta più difficile coordinare un anione che un catione.

Ione	$-\Delta G_h^\circ$	Ione	$-\Delta G_h^\circ$	Ione	$-\Delta G_h^\circ$
H ⁺	1089	Ba ²⁺	1318	Sc ³⁺	3885
Li ⁺	511	Mn ²⁺	1832	La ³⁺	3239
Na ⁺	411	Fe ²⁺	1910		
K ⁺	337	Co ²⁺	2006		
Rb ⁺	316	Ni ²⁺	2068		
Cs ⁺	284	Cu ²⁺	2087	F ⁻	436
Cu ⁺	568	Zn ²⁺	2028	Cl ⁻	311
Ag ⁺	473	Cd ²⁺	1801	Br ⁻	285
Tl ⁺	343	Hg ²⁺	1825	I ⁻	247
Be ²⁺	2442	Sn ²⁺	1556	OH ⁻	403
Mg ²⁺	1906	Pb ²⁺	1494	CN ⁻	310
Ca ²⁺	1593	Al ³⁺	4615	NO ₃ ⁻	270
Sr ²⁺	1447	Fe ³⁺	4513	ClO ₄ ⁻	178

Tabella 1.3.2. Energie libere di idratazione dei principali ioni (esprese in kJ/mol)

Se si considerano ad esempio anioni inorganici monovalenti, costanti di complessazione di 10^2 - 10^3 in acqua rappresentano legami forti; tuttavia legami forti si possono verificare molto più facilmente in solventi apolari, dal momento che gli anioni mostrano caratteristiche idrofiliche.

Le costanti aumentano nell'ordine:



Una valutazione qualitativa dell'idrofobicità o l'idrofilicità di uno ione è data dalla serie di Hofmeister. Questa serie, chiamata anche serie liotropica, classifica gli ioni in base alla loro capacità di dare effetto di salting out o salting in su proteine, e mostra effetti molto più marcati per gli anioni rispetto ai cationi. Gli ioni più a sinistra nella serie determinano aumento dell'ordine dell'acqua e una diminuzione della solubilità di molecole non polari (salting out), mentre gli ioni sulla destra provocano un incremento della solubilità di molecole non polari (salting in) e una diminuzione dell'ordine in acqua.



Queste proprietà sono direttamente correlabili alla forza delle interazioni ione- solvente: la serie di Hofmeister dunque fornisce una scala di ioni ordinati per energia di idratazione decrescente.

Il problema della competizione tra legante e solvente non è facilmente eliminabile: infatti anche se scegliessimo di operare in solventi organici (dove le costanti di formazione sono maggiori) la scarsissima tendenza delle molecole apolari o poco polari del solvente ad interagire con gli ioni porterebbe alla presenza del sale in soluzione sottoforma di coppie ioniche. Cioè, il controione della specie in esame sarebbe un fortissimo competitore nei confronti del recettore.

2. Chimica di coordinazione anionica: interazioni host-guest e strumenti per il design di recettori.

2.1 – Concetti di base per la progettazione di recettori per specie anioniche.¹⁻³

Esistono pochi concetti di base che possono essere impiegati nel design di un recettore per anioni in grado di eseguire un processo di riconoscimento molecolare.

Questi punti chiave sono essenzialmente due: preorganizzazione e complementarità strutturale ed elettronica tra host e guest.

- Preorganizzazione

E' una caratteristica strutturale del legante, che influisce molto sulla stabilità dei complessi, andando ad aumentare l'energia libera di coordinazione. Un legante si dice preorganizzato se prima di coordinarsi possiede già la conformazione che va ad assumere nel complesso: in questo caso non dovrà spendere energia per adattarsi alle richieste strutturali della molecola guest e per minimizzare le interazioni sfavorevoli tra i suoi siti di legame.

Inoltre anche la solvatazione amplifica gli effetti della preorganizzazione: infatti i leganti preorganizzati, possedendo già i siti di legami rivolti verso l'interno della cavità, risultano essere meno solvatati, e quindi l'energia necessaria al processo di desolvatazione per la formazione del complesso è minore.

Un inconveniente della preorganizzazione consiste nel fatto che questa può determinare rigidità molecolare. Host e guest rigidi possono trovare difficoltà a passare attraverso uno stato di transizione e la cinetica di complessazione può essere lenta. Se invece questi sono flessibili possono adeguarsi rapidamente alle necessarie modificazioni strutturali, e sia la complessazione che la decomplessazione avvengono velocemente.

- Complementarietà elettronica e strutturale

Affinché si abbia la formazione di un complesso tra un recettore e una specie anionica, la complementarietà elettronica è di importanza fondamentale, dal momento che essa determina e regola l'instaurarsi di tutte le interazioni che permettono il riconoscimento molecolare e il legame tra host e guest. Il recettore dovrà quindi possedere siti di legame con corrette caratteristiche elettroniche (polarità, hardness o softness, carattere donatore o accettore di legame ad idrogeno, carattere acido o basico, ...) che rendano possibile una perfetta complementarietà con i siti del substrato.

Per quanto riguarda la complementarietà strutturale, essa si può suddividere in complementarietà di forma e complementarietà di dimensione. La prima si riferisce alla disposizione spaziale dei siti di legame, che devono avere la giusta orientazione per garantire la corretta direzionalità delle interazioni e la selettività verso un substrato specifico; la seconda è riferita alla complementarietà prettamente geometrica tra recettore e anione, e talvolta essa può essere sufficiente per assicurare la specificità verso un anione in presenza di altre specie che non possiedono le corrette caratteristiche steriche.

2.2 – Interazioni coinvolte in chimica di coordinazione anionica¹⁻³

Andiamo ora ad analizzare le interazioni che costituiscono il fondamento della chimica di coordinazione anionica e che sono alla base del riconoscimento molecolare e del legame tra host e guest. Queste forze che regolano la formazione degli aggregati supramolecolari sono tutte interazioni di tipo non covalente: interazioni elettrostatiche, legami a ponte di idrogeno, interazioni π - π stacking e forze di dispersione e di Van der Waals.

E' bene ricordare che le interazioni intermolecolari di tipo non covalente, eccezion fatta per l'interazione ione-ione, sono caratterizzate da energie inferiori di due o tre ordini di grandezza rispetto a quella del legame covalente.

Interazione	Intensità	Energia (kJ/mol)	Funzione energia-distanza
Legame covalente	Molto forte	150-1100	Raggio d'azione molto lungo
Legame ionico	Molto forte	100-750	$1/r$
Ione-dipolo	Forte	50-200	$1/r^2$
Dipolo-dipolo	Piuttosto forte	5-50	$1/r^3$
Dipolo-dipolo indotto	Debole	<5	$1/r^6$
Forze di dispersione di London	Debole	<5	$1/r^6$

Tabella 2.2.1. Riassunto delle interazioni chimiche

Tuttavia, questa "debolezza" rispetto al legame covalente non rappresenta un limite all'impiego di queste interazioni, anzi costituisce un punto di forza: infatti un'altra caratteristica delle interazioni non covalenti è che in buona approssimazione possono considerarsi additive. Dunque, anche se l'energia messa in gioco da ogni singola forza debole è piccola, sommate insieme vanno a formare un'interazione fortissima tra le molecole dell'addotto, di gran lunga superiore a quella di un legame covalente. Inoltre un altro vantaggio è dato dal fatto che le molecole all'interno dell'aggregato supramolecolare possono cambiare facilmente la loro posizione relativa, come se "scivolassero" le une sulle altre, rompendo legami deboli e formandone di nuovi: ciò è possibile dal momento che la barriera energetica da superare ad ogni passaggio è piccola, proprio perchè dovuta a queste interazioni a carattere debole. Discutiamo ora nel dettaglio quelle che sono le interazioni non covalenti impiegate come strumenti per il design di recettori.

2.2.1 Interazioni elettrostatiche

L'intensità di queste interazioni è di grandezza comparabile con quella del legame covalente, e dunque questa forza è di importanza fondamentale per garantire la stabilità dell'aggregato host-guest.

Un'altra caratteristica di questo tipo di interazioni è la mancanza di direzionalità, in quanto si esercita in tutte direzioni dello spazio, seguendo la legge di Coulomb e diminuendo all'aumentare del quadrato della distanza: risulta dunque difficile conferire selettività ad un recettore verso un determinato substrato solo sulla base di queste interazioni. Un problema aggiuntivo che si incontra nella progettazione di un legante che sfrutti interazioni elettrostatiche per coordinare, ad esempio, un anione è dato dal fatto che i gruppi carichi positivamente presenti sul

recettore tendono a respingersi, sempre secondo il modello elettrostatico di Coulomb. Una soluzione può essere l'inserimento di un network di cariche positive all'interno di un sistema rigido, preorganizzato, che possiede già la forma che poi andrà ad assumere nel complesso: in questo modo è possibile sia sfruttare i vantaggi della preorganizzazione, sia garantire una certa selettività dimensionale, dovuta alla grandezza predefinita della cavità interna.

2.2.2 Forze di Van der Waals e forze di dispersione

Sono forze intermolecolari di tipo attrattivo, a carattere non direzionale, e comprendono tre diversi tipi di interazione: interazione dipolo-dipolo, interazione dipolo-dipolo indotto e dipolo istantaneo-dipolo indotto.

La prima si riferisce alla forza attrattiva che si instaura tra due dipoli permanenti e dipende dall'inverso della distanza al cubo; la seconda prende in considerazione l'interazione che si verifica quando un dipolo permanente induce un dipolo istantaneo in una molecola polarizzabile, e dipende da $1/r^4$; la terza infine, detta anche forza di London, è la più debole (è proporzionale $1/r^6$) ed è dovuta all'interazione di un dipolo istantaneo con un altro dipolo da esso indotto. Queste forze, seppur molto deboli (2-50 kJ/mol), contribuiscono in modo rilevante alla stabilizzazione dei complessi recettore-substrato, soprattutto se la superficie di contatto all'interno dell'host è grande e la molecola guest risulta essere altamente polarizzabile. Tuttavia, la loro scarsa prevedibilità non rende queste interazioni promettenti come punto di partenza per recettori per anioni basati esclusivamente su di esse.

2.2.3 Interazioni acido-base in chimica di coordinazione anionica

Secondo quanto era già stato visto in precedenza, gli anioni costituiscono delle basi di Lewis, e dunque sono capaci di interagire con acidi di Lewis, ovvero specie contenenti atomi in grado di accettare doppietti elettronici donati dall'anione.

Quello che si verifica è un meccanismo di coordinazione del tutto analogo a quanto avviene nella chimica di coordinazione cationica, ed è quindi possibile sfruttare tutti gli effetti che si incontrano quando la specie complessata è una specie carica positivamente, come ad esempio l'effetto chelato, l'effetto macrociclico e la preorganizzazione del legante.

Seguendo questa strategia sono stati sintetizzati recettori contenenti eteroatomi come B, Hg o Sn che sono acidi di Lewis e quindi in grado di coordinare specie anioniche; un tipico esempio è:



Figura 2.2.1. Legante bidentato per anioni

Va ricordato però che non tutti gli anioni sono buone basi di Lewis: ve ne sono alcuni che hanno un carattere basico debolissimo, oppure non sono affatto delle basi, non possedendo nessuna coppia elettronica non condivisa (come AlH_4^-); in questi casi i recettori sopraindicati risultano del tutto inefficaci ai fini della coordinazione.

2.2.4 Legame a idrogeno

Questo legame rappresenta l'interazione basilare in chimica di coordinazione anionica, e ciò è dovuto ad alcune caratteristiche peculiari

che rendono questa forza estremamente interessante al fine di ottenere complessi host-guest altamente stabili.

Esso può essere considerato come un caso particolare di interazione dipolo-dipolo, in cui un atomo di idrogeno legato a un atomo elettronegativo (o a un gruppo elettron-attrattore) viene attratto da un vicino dipolo su una molecola o un gruppo funzionale adiacenti.

E' importante sottolineare che si tratta della più forte tra le interazioni intermolecolari, e benchè la sua intensità sia fortemente influenzata dall'intorno chimico, mostra sempre valori di energie compresi tra 10 e 60 kJ/mol, di gran lunga superiori a quelli relativi alle forze di Van der Waals.

Inoltre un'altra caratteristica di notevole rilievo è il fatto che il legame a idrogeno sia un'interazione direzionale, a differenza delle altre forze deboli fin qui esaminate: infatti nonostante sia un legame su base prevalentemente elettrostatica, un parziale carattere covalente riesce a conferire direzionalità alla forza, consentendo dunque una differenziazione degli anioni in base alle loro geometrie o richieste stereochimiche. Ciò è spiegato dalla teoria degli orbitali molecolari, che attribuisce all'atomo di idrogeno un orbitale di legame σ^* vuoto dove si va parzialmente a depositare il doppietto elettronico del donatore.

In aggiunta a questo è opportuno evidenziare che il legame a idrogeno è un'interazione cooperativa, ovvero network di legami ad idrogeno presentano stabilità superiori alla sommatoria delle energie dei singoli legami.

Tutte queste caratteristiche rendono il legame ad idrogeno l'interazione per eccellenza più impiegata nella chimica di coordinazione anionica, e una delle strategie più semplici e più utilizzate per sfruttare tale interazione ai fini della coordinazione di specie anioniche è quella di prendere un legante amminico classico, polidentato o macrociclico, e variare le condizioni di pH: agendo così infatti si passa da una molecola basica in grado di complessare cationi a una molecola acida capace di legare anioni.

Tuttavia questa linea d'azione presenta alcuni problemi di varia natura, che riguardano sia legante che anione, e che hanno portato alla messa a punto di un'ampia gamma di accorgimenti e soluzioni.

Infatti da un lato occorre prestare attenzione alle richieste dell'anione, in particolare alla sua stereochimica ed alla sua tendenza a formare legami a idrogeno, che dipende direttamente dalla forza dell'acido di cui l'anione è la base coniugata: maggiore è la forza dell'acido, cioè la tendenza a cedere protoni, minore è la capacità dell'anione di comportarsi come accettore di legame a idrogeno. Dall'altro si rende necessaria tutta una serie di accorgimenti per quanto riguarda il recettore in fase di progettazione, come il numero e la topologia dei siti protonabili all'interno della cavità: infatti troppi gruppi protonabili o gruppi troppo vicini possono impedire la completa protonazione e la loro corretta orientazione, a causa della repulsione elettrostatica, compromettendo dunque la stabilità dell'intero complesso.

A tutte queste considerazioni va infine aggiunto il fatto che, per ottenere un buon recettore per anioni, occorre che il legante sia il più possibile protonato (carico positivamente) nello stesso intervallo di pH in cui l'anione esiste come specie deprotonata.

Proprio per risolvere questo problema sono stati messi a punto recettori basati sullo ione guanidinio che, grazie alla sua pKa eccezionalmente alta (13.5), risulta essere protonato e capace di formare legami ad idrogeno in un campo di pH molto più ampio rispetto ad altri leganti.

2.2.5 Interazioni π - π stacking

Queste interazioni si instaurano tra due o più anelli aromatici, nel caso in cui uno sia relativamente elettrone-ricco mentre l'altro sia relativamente elettrone-povero.

La formazione di questo legame è principalmente di natura elettrostatica

ed è simile all'interazione fra dipoli o multipoli. Esistono due geometrie limite di interazioni π - π stacking, la face-to-face e la edge-to-face, anche se sono note moltissime geometrie intermedie.

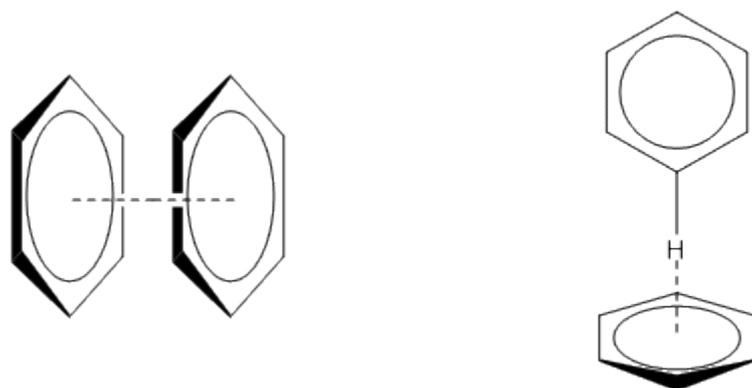
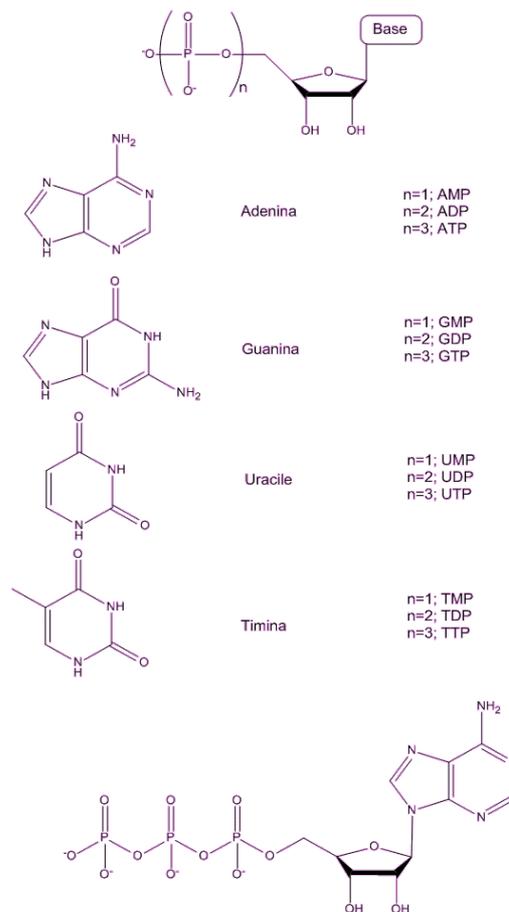


Figura 2.2.2. Interazioni face-to-face e edge-to-face

3. Recettori per nucleotidi ⁴

3.1 I nucleotidi ⁵⁻⁶

I nucleotidi costituiscono i monomeri di DNA e RNA, e sono costituiti da tre unità: una base azotata (purinica o pirimidinica), uno zucchero pentoso (ribosio per RNA e deossiribosio per DNA) e un gruppo fosfato. L'aggiunta di uno o due residui fosforici porta alla formazione dei nucleotidi difosfato e trifosfato.



Questa classe di molecole è stata una delle prime ad essere studiata come substrato anionico, e ciò è dovuto al fatto che i nucleotidi svolgono ruoli fondamentali in moltissimi dei processi biologici che avvengono nel nostro organismo. Basti pensare all'ATP, che costituisce la "moneta" di scambio energetico ed è richiesta in ogni reazione endoergonica del nostro metabolismo, oppure al GTP, che invece è coinvolto nella sintesi degli acidi nucleici e delle proteine.

3.2 Caratteristiche dei mononucleotidi

Se si vanno ad esaminare sotto l'aspetto del riconoscimento molecolare, i nucleotidi mostrano alcune caratteristiche peculiari che li rendono estremamente interessanti come target di recettori anionici.

Infatti a parte la loro carica negativa, requisito fondamentale per il design di leganti per anioni che permette di instaurare interazioni di tipo elettrostatico con il recettore, essi presentano numerosi siti accettori e donatori per legami a idrogeno, situati sulle tre diverse unità che li compongono: la catena di gruppi fosfato, lo zucchero e la base azotata.

La base azotata inoltre può dare interazioni di tipo π - π stacking con gruppi funzionali aromatici presenti sul legante, rafforzando ulteriormente il legame con quest'ultimo.

Dunque, i recettori per nucleotidi sono sviluppati cercando di soddisfare contemporaneamente tutte queste caratteristiche, come complementarietà di carica, di siti di legame a idrogeno e interazioni di stacking, al fine di massimizzare il legame tra host e guest.

3.3 Recettori per nucleotidi – Recettori non contenenti gruppi aromatici. ⁵⁻¹¹

Dal punto di vista storico questa classe di recettori, e più in particolare le poliammine protonate, è stata la prima ad essere stata studiata ed impiegata nel legame con i nucleotidi.

Uno dei primi lavori⁷ che si può trovare in letteratura risale al 1981 e riguarda il legante DABCO, che presenta due atomi di azoto quaternari legati a due catene alifatiche: esso è in grado di trasferire selettivamente l'ADP rispetto all'AMP da una soluzione acquosa a pH=3 a una fase organica costituita da cloroformio, grazie alla formazione di due ponti salini tra la catena dei gruppi fosfato e i gruppi ammonio quaternari.



Figura 3.3.1. Il legante DABCO

Successivamente altri gruppi di ricerca iniziarono a raccogliere prove sperimentali delle forti interazioni tra i nucleotidi e recettori poliamminici⁵⁻⁶. Attraverso misure di potenziometria e titolazioni-pHmetriche fu studiata l'interazione dei leganti [24]aneN₆ esaprotonato, [32]aneN₈ ottaprotonato e [27]aneN₆O₃ esaprotonato con ATP, ADP e AMP, mentre attraverso tecniche polarografiche venne studiata una serie di leganti poliazamacrociclici tra cui [18]aneN₄, [15]aneN₅, [18]aneN₆, [16]aneN₅ e il tetraazapiridinofano.

In tutti i casi i valori delle costanti di associazione mostrarono la tendenza:



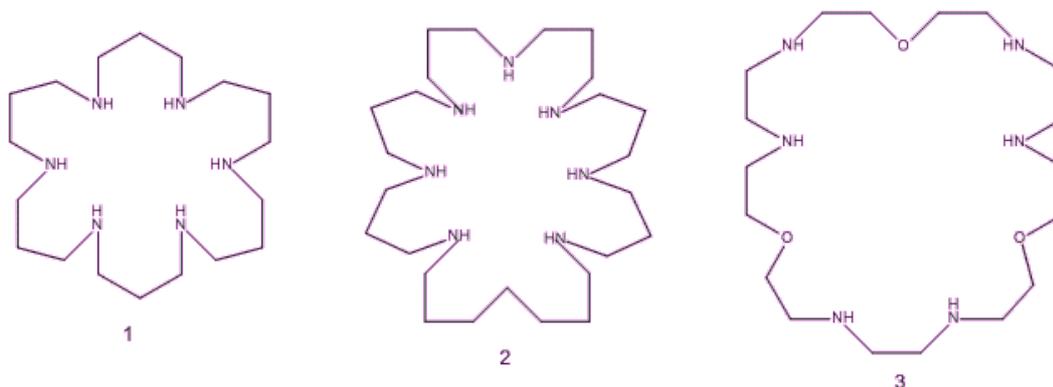


Figura 3.3.2. I leganti $[24]aneN_6$ (**1**), $[32]aneN_8$ (**2**) e $[27]aneN_6O_3$ (**3**).

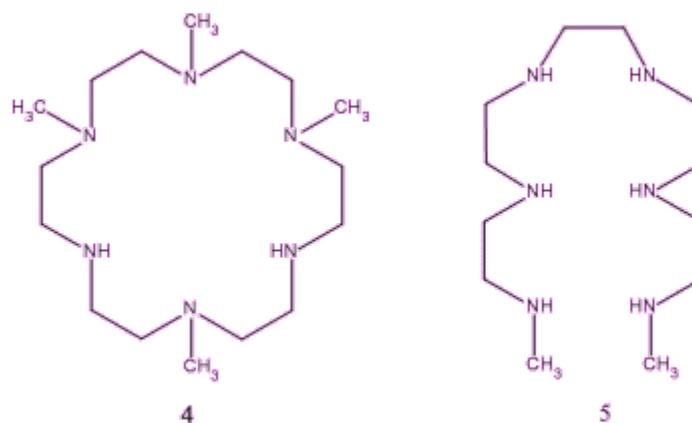
E' stato possibile dunque ricavare da questi studi una serie di informazioni e caratteristiche generali riguardanti l'interazione tra recettore e nucleotide.

Innanzitutto è da notare l'importanza della carica ai fini del legame tra nucleotidi e recettore: maggiore è la carica negativa del nucleotide, maggiore è l'interazione con il legante poliamminico. Ciò tuttavia non è completamente corretto, ed occorre considerare anche quelle che sono le caratteristiche dimensionali del legante: infatti è stato dimostrato che per una ben definita lunghezza del macrociclo esiste un matching ottimale tra la carica del recettore poliamminico e la carica della catena dei gruppi fosfato.

Inoltre si è visto che anche la lunghezza della catena di atomi di carbonio tra gli atomi di azoto nei recettori monociclici svolge un ruolo chiave nel determinare la loro basicità, e di conseguenza anche l'affinità verso specie anioniche⁸.

Può essere altresì interessante confrontare le affinità relative dei nucleotidi nei confronti di leganti ciclici e aciclici contenenti lo stesso numero di atomi di azoto.

Se si considerano ad esempio i due recettori $(\text{CH}_3)_4[18]\text{aneN}_6$ e $(\text{CH}_3)_2\text{pentaen}$, e si vanno ad analizzare le costanti di stabilità con l'ATP, si nota che il legante aciclico interagisce in maniera più forte con il nucleotide rispetto al legante ciclico.⁹



*Figura 3.3.3. I leganti $(\text{CH}_3)_4[18]\text{aneN}_6$ (**4**) e $(\text{CH}_3)_2\text{pentaen}$ (**5**)*

Vi è poi un'altra strategia, che consiste nell'utilizzare tetraazacicloalcani funzionalizzati con catene contenenti ulteriori gruppi amminici, come nel caso del TAEC. Confrontando però l'affinità relativa di questo legante nei confronti dell'ATP con quella di un macrociclo contenente lo stesso numero di atomi di azoto, si vede che le costanti di affinità del recettore macrociclico risultano essere più elevate, probabilmente a causa dell'orientazione e della maggiore energia di solvatazione dei gruppi amminici primari.¹⁰

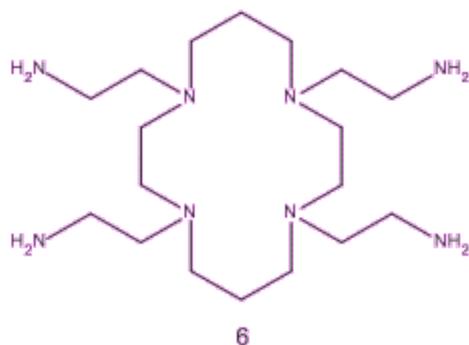


Figura 3.3.4. TAEC (6)

Per quanto riguarda infine la stechiometria dei complessi recettore-nucleotide, la maggior parte degli addotti mostra una stechiometria 1:1. Tuttavia esistono anche importanti eccezioni, come nel caso del TAL, un legante poliamminico a tripode, che forma complessi TAL:AMP con rapporti 1:1, 1:2 e 1:3.¹¹

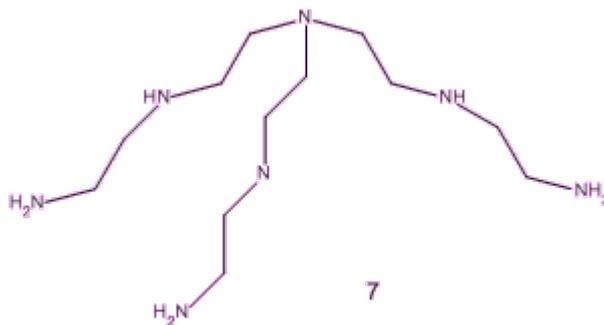


Figura 3.3.5. TAL (7)

3.4 Recettori per nucleotidi – Recettori contenenti unità aromatiche.

Come già accennato all'inizio del capitolo, l'introduzione di una o più unità aromatiche nella struttura del recettore permette l'instaurarsi di interazioni di tipo π - π stacking con l'anello aromatico della nucleobase. Una prima classe di recettori di questo tipo è stata realizzata aggiungendo al legante classico O-BISDIEN una o due unità acridina, con lo scopo di sfruttare sia interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno, sia interazioni di stacking.¹² La presenza di queste ultime è confermata da esperimenti ¹H NMR, che mostrano un'interazione maggiore dei due leganti **9** e **10** con l'ATP rispetto al semplice O-BISDIEN.

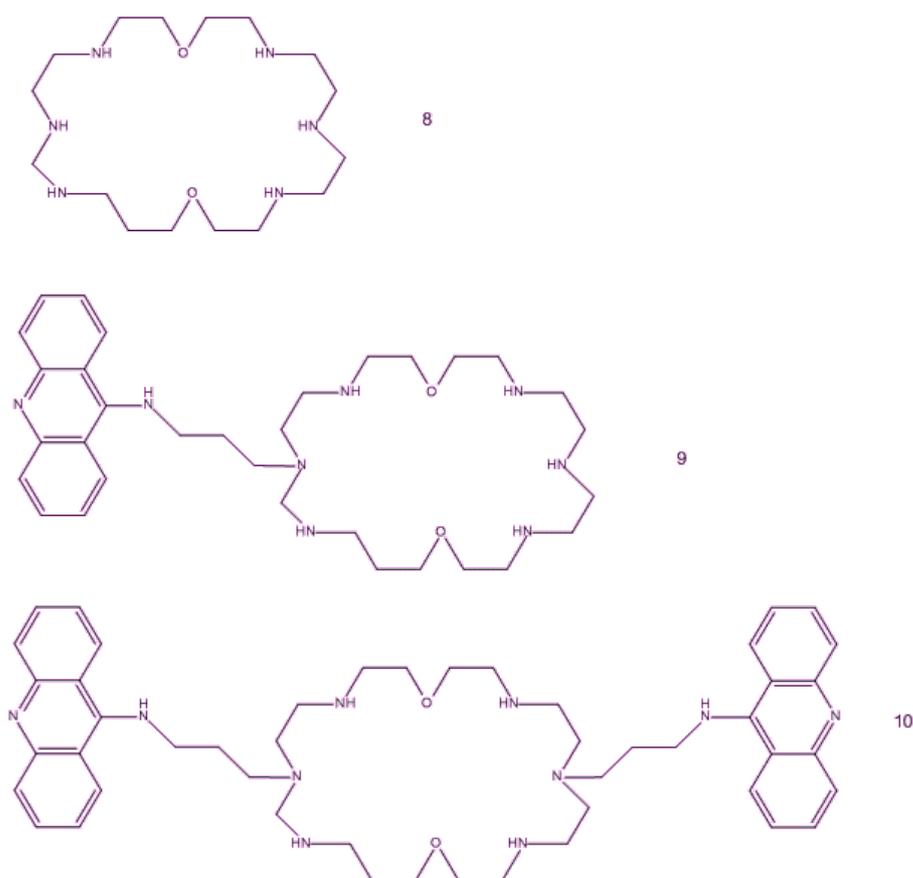


Figura 3.4.1. O-BISDIEN (**8**) e derivati (**9**, **10**)

Anche azaciclofani monociclici con opportune catene poliamminiche mostrano molteplici siti di legame per nucleotidi: questi infatti possono interagire sia attraverso la catena dei gruppi fosfato, che costituisce un ottimo sito accettore per legami idrogeno, sia attraverso la nucleobase. Un tipico esempio è il legante **12**, che rispetto al **11** mostra un'affinità maggiore verso l'ATP.¹³⁻¹⁴

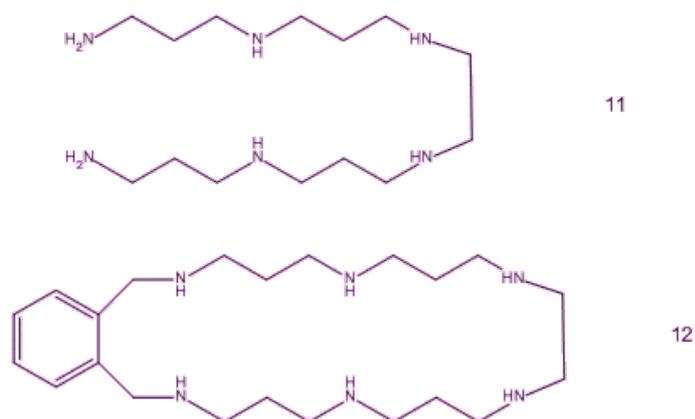


Figura 3.4.2. I leganti **11** e **12**

Recettori aciclici sono invece sintetizzati introducendo uno o due gruppi naftalene o antracene, sempre per sfruttare interazioni π - π stacking con la nucleobase (leganti **13** e **14**).¹⁵⁻²⁰

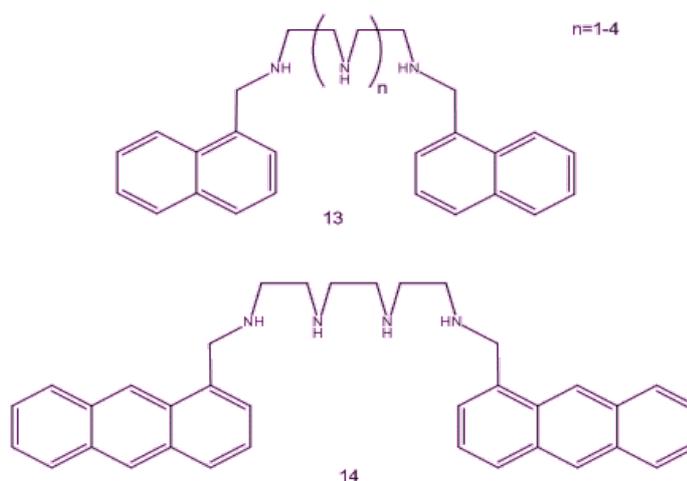


Figura 3.4.3. Leganti **13** e **14**.

Recentemente sono state sviluppate serie di leganti in cui unità 1,4,7,10-tetraazadecano sono interconnesse e rinforzate da spaziatori costituiti da benzene o piridina.²¹⁻²³ Questi recettori e i loro complessi di Zn²⁺ mostrano un'elevata affinità per i nucleotidi, e allo stesso tempo possiedono delle interessanti proprietà, come quella di avere una notevole attività antivirale.²⁴

3.5 Recettori non poliamminici.

Oltre ai leganti poliamminici esistono altre classi di recettori molto importanti per quanto riguarda il riconoscimento di nucleotidi.

Ad esempio, molto interessanti sono i recettori basati su gruppi funzionali quali i gruppi ammidi e guanidinio, che mostrano ottime proprietà come leganti per nucleotidi.

Studi condotti sulla struttura dei legami di proteine contenenti gruppi fosfato all'interno del nostro organismo hanno messo in evidenza la presenza di numerosi residui di glicina in corrispondenza del sito di legame: infatti questi residui permettono alla catena amminoacidica di avvolgersi e piegarsi attorno ai gruppi fosfato, formando una struttura che ricorda quella di un macrociclo.

Inoltre si è visto che siti di legame collocati sulla superficie delle proteine contengono un'elevata quantità di residui amminoacidi carichi, come lisina e arginina.

Partendo da ciò sono stati sintetizzati numerosi recettori per nucleotidi introducendo gruppi guanidinio su leganti abiotici, come nel caso del legante 15, oppure combinando gruppi urea e frammenti aromatici per sfruttare nel contempo legami a idrogeno e interazioni di stacking (legante 16).²⁵

Altresì importanti per il riconoscimento di di nucleotidi sono le β -

amminociclodestrine, che mostrano un'elevata selettività, discriminando i nucleotidi in base al tipo di zucchero, alla posizione del gruppo fosfato (3' o 5') e alla nucleobase.

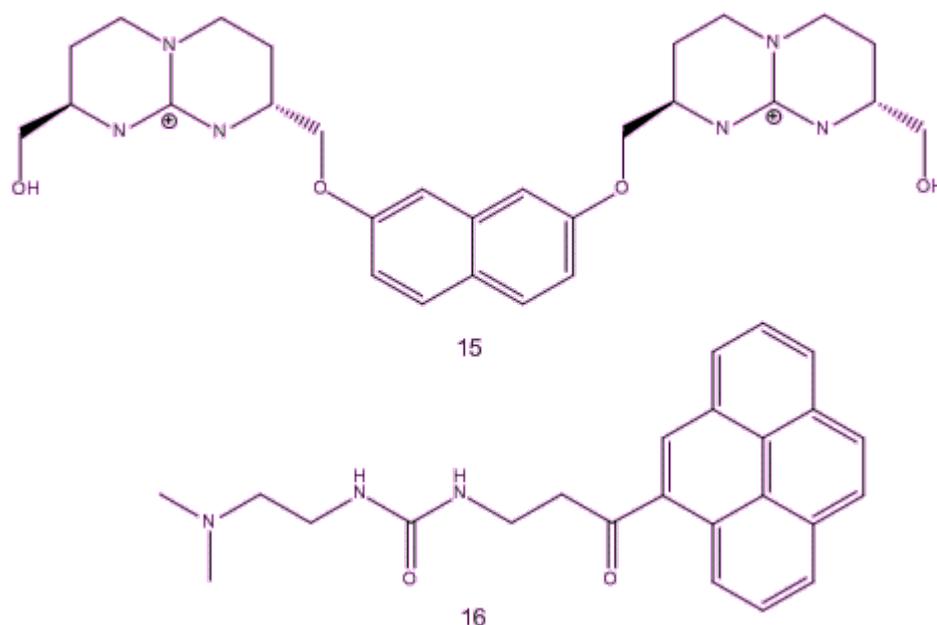


Figura 3.5.1 Leganti **15** e **16**

3.6 Complessi metallici come recettori

Ioni metallici complessati possono comportarsi da acidi di Lewis solo se sono coordinativamente insaturi o possiedono leganti labili facilmente rimpiazzabili: in questo caso infatti sono in grado di reagire con basi di Lewis, che molto spesso sono specie anioniche.

Ioni metallici sono coinvolti nella coordinazione dell'ATP in numerosi metalloenzimi, in particolare lo ione Zn^{2+} , e seguendo questa via sono state studiate le interazioni di nucleotidi con complessi dello Zn^{2+} con leganti poliamminici ciclici ed aperti.

Inizialmente sono stati presi in esame complessi di Zn^{2+} con il cyclen (17),

che hanno mostrato buona capacità di legare 2'-deossiadenuina, 2'-deossitimina, 2'-deossicitosina, 2'-deossiguanina e uracile; in seguito a questi leganti sono stati aggiunti gruppi intercalanti costituiti da unità acridina (**18**) per sfruttare anche le interazioni di stacking, determinando, come previsto, un aumento della forza del legame con i nucleotidi.²⁶ Lo stesso risultato è stato ottenuto con complessi costituiti da un'unità fenantrolinica funzionalizzata con catene amminiche in presenza sempre di Zn^{2+} (**19**), mentre il legante aciclico **20** ha mostrato un rafforzamento nell'interazione con nucleotidi in presenza dello ione Cu^{2+} .²⁷

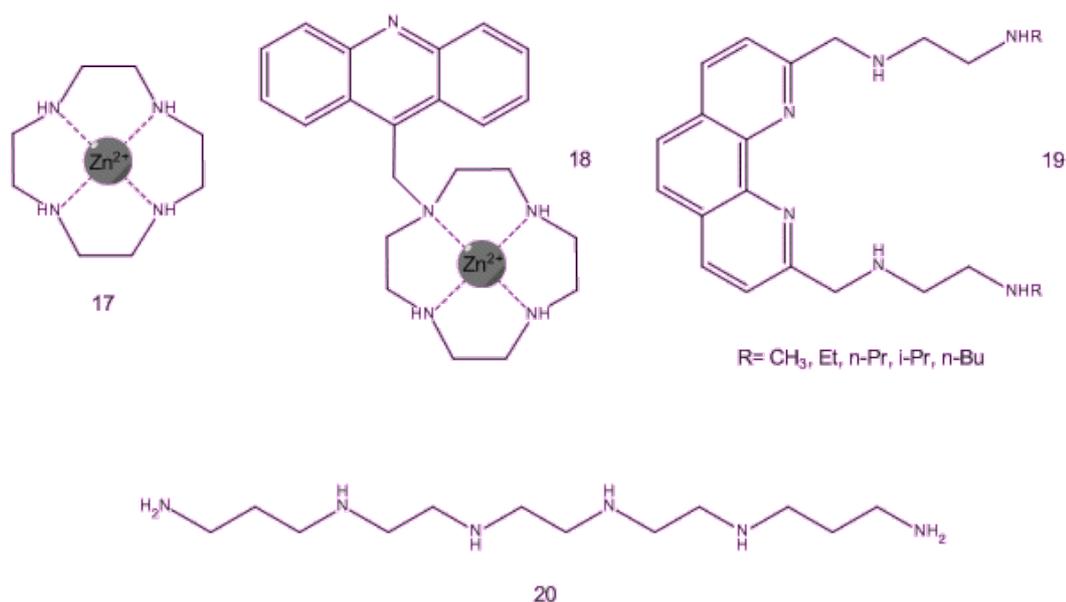


Figura 3.6.1. Complesso $[Zn(cyclen)]^{2+}$ (**17**), complesso di Zn^{2+} con cyclen funzionalizzato **18**, legante fenantrolinico funzionalizzato con catene amminiche **19**, legante aciclico **20**.

3.7 Aspetti catalitici dei recettori: attività ATPasica e chinasi

Tra le caratteristiche più interessanti che molti recettori per nucleotidi possiedono vi è sicuramente quella di essere in grado di indurre processi catalitici e mimare l'azione degli enzimi ATPasi e chinasi.

Il recettore O-BISDIEN (8) è tra quelli che mostrano la maggiore efficacia nel favorire la reazione di idrolisi dell'ATP in ADP e fosfato inorganico, attivando la reazione non solo a pH acido ma anche a valori neutri di pH, e determinando un aumento della velocità di reazione di un fattore 100.²⁸

Studi effettuati²⁹ su serie di azacicloalcani hanno messo in evidenza alcune caratteristiche interessanti a proposito del processo di idrolisi dell'ATP catalizzato da leganti poliamminici.

Innanzitutto la dimensione della cavità del macrociclo svolge un ruolo fondamentale e affinché si verifichi un aumento della velocità della reazione occorre che ci sia un perfetto matching tra legante e nucleotide.

D'altro canto sembra che la forza delle interazioni non sia di primaria importanza ai fini della reazione di idrolisi: infatti macrocicli grandi, che formano forti complessi con il nucleotide, ma che non possiedono una cavità di dimensioni adeguate, mostrano un'efficienza bassa.

Inoltre si è visto che la velocità di reazione è fortemente influenzata dal pH, ed in particolare le efficienze più elevate si hanno per bassi valori di pH. Ciò può essere spiegato dal fatto che questo processo di idrolisi appartiene alla categoria delle catalisi acide generali, e dunque un aumento del pH determina una diminuzione dell'efficienza catalitica. Per quanto riguarda il meccanismo di reazione, l'idrolisi dell'ATP a ADP e fosfato inorganico avviene attraverso la formazione di un fosforoamidato intermedio covalente (PN), che si ottiene in seguito all'attacco nucleofilo dell'atomo di fosforo in posizione γ dell'ATP su un'ammina non protonata. L'intermedio fosforoamidato è generalmente molto labile e viene rapidamente idrolizzato per dare fosfato inorganico.

In alcuni casi la sua formazione è stata evidenziata mediante esperimenti di ^{31}P NMR.

Ai fini della formazione dell'intermedio fosforoamidato la nucleofilicità delle ammine del macrociclo assume dunque un ruolo critico, e tra i fattori che la favoriscono vi sono la riduzione della carica complessiva a un dato pH, l'idrofobicità dell'ambiente in cui la reazione avviene e la presenza di sostituenti elettrondonatori.

Infine anche la presenza di ioni metallici di rilevanza biologica come Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} influenza notevolmente sia la reazione di idrolisi dell'ATP, sia la formazione dell'intermedio fosforoamidato: il metallo infatti si può coordinare a ponte tra il fosforo γ dell'ATP e l'ammina non protonata del legante, e contemporaneamente stabilizzare la specie intermedia PN sempre attraverso un meccanismo di coordinazione.³⁰

4. Obiettivi della ricerca

Molte molecole poliamminiche, sia lineari che macrocicliche, sono state studiate allo scopo di individuare la loro capacità di funzionare da recettori di nucleotidi e di promuovere la defosforilazione degli stessi agendo da modelli enzimatici di ATPasi. A tale scopo, non sono mai state analizzate le caratteristiche di poliammine iperramificate a struttura dendritica. Per questo motivo abbiamo trovato interessante studiare la capacità delle forme protonate del dendrimero di seconda generazione L di formare addotti con le forme anioniche di AMP, ADP e ATP ed analizzare l'eventuale loro coinvolgimento nelle reazioni di defosforilazione di ATP. Lo studio è stato esteso ai complessi mononucleari di L con Zn(II), poiché, come evidenziato nella parte introduttiva, la presenza di tale ione metallico può favorire l'azione catalitica del legante, analogamente a quanto osservato in varie ATPasi naturali. Abbiamo anche studiato l'interazione di L con fosfato, pirofosfato e trifosfato, gli anioni che rappresentano la parte inorganica di AMP, ADP e ATP, per evidenziare l'importanza dei gruppi fosfato nell'interazione legante-nucleotide.

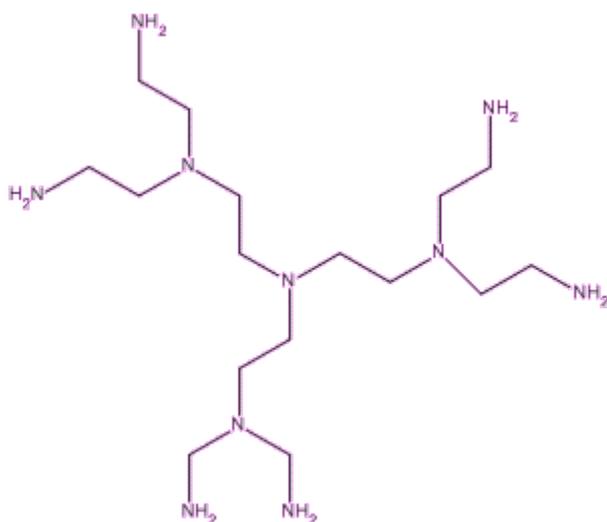


Figura 4.1. Il legante L

5. Parte sperimentale

5.1 Caratterizzazione dei complessi.

La natura del legante studiato in questo lavoro fa sì che questo interagisca con gli anioni attraverso forze elettrostatiche e legami a ponte di idrogeno, che dipendono entrambi dal grado di protonazione del legante e dall'eventuale protonazione dell'anione.

La formazione dei complessi può essere dunque seguita per via pH-metrica: si sono titolate potenziometricamente soluzioni acide contenenti legante, anione e metallo in concentrazioni note, con base forte.

Per poter ricavare le costanti di formazione dei complessi ternari è necessario conoscere le costanti di protonazione del legante e dell'anione, oltre alle costanti di formazione dei complessi legante-anione. Tutte queste a loro volta possono essere ricavate con la stessa tecnica potenziometrica.

5.2 Potenzimetria

Le misure potenziometriche (titolazioni pH-metriche) sono state effettuate utilizzando soluzioni di legante e anione o di legante, anione e Zn^{2+} in NMe_4Cl 0.1 M, preparate secondo i rapporti $L:A^{n-}$ di 1 : 2 e di $L:Zn^{2+}$ di 1 : 0.8.

Le concentrazioni dei vari componenti sono 0.001 M di L, 0.002 M di A^{n-} e 8×10^{-4} M di Zn^{2+} .

I prodotti impiegati sono stati i seguenti:

- legante STAR sintetizzato secondo la procedura riportata nel brevetto: D. A. Tomalia, J. R. Dewalt, U.S. patent 4631339, 1986; D. A. Tomalia, European patent 0115771, 1984.
- adenosina 5'-monofosfato monoidrato $\text{AMP}(\text{H}_2\text{O})$ (ALDRICH)
- adenosina 5'-difosfato $\text{ADP}(\text{Na})_{1.5}(\text{H}_2\text{O})_{1.5}(\text{EtOH})_{0.24}$ (SIGMA)
- adenosina 5'-trifosfato sale disodico monoidrato $\text{ATP}(\text{Na})_2(\text{H}_2\text{O})$ (ALDRICH)
- tripolifosfato sale pentasodico esaidrato $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA)
- monoidrogenofosfato disodico diidrato $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MERCK)
- pirofosfato tetra sodico decaidrato $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (MERCK)

Tutte le soluzioni usate nelle misure 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 e NMe_4Cl sono state preparate impiegando prodotti commerciali di elevata purezza e le loro concentrazioni sono state determinate seguendo procedure analitiche standard.

Il sistema potenziometrico automatizzato impiegato nelle misure è costituito dalle seguenti parti:

- ~ Potenziometro da ricerca Metrohm 713 pH-meter
- ~ Burette automatica Metrohm Mod. 665 Dosimat
- ~ Agitatore magnetico Metrohm 728 Stirrer
- ~ Cella termostatica della capacità di circa 25 cm^3 termoregolata mediante circolazione di acqua tipo Metrohm 6.1414.010
- ~ Termostato ad acqua Julabo F12
- ~ Elettrodo combinato a vetro da ricerca Metrohm 6.0262.100
- ~ Personal computer dotato di unità video, hard disk ed interfaccia.

Tutte le misure sono state effettuate a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ termostatando la cella potenziometrica e la stanza che accoglie la strumentazione a questa temperatura. Durante le misure si è mantenuto un flusso continuo di N_2 all'interno della cella allo scopo di evitare la carbonatazione delle soluzioni studiate. Prima di raggiungere la cella il gas è stato fatto passare attraverso due bottiglie di lavaggio contenenti, rispettivamente, una soluzione concentrata di NaOH ed il mezzo ionico impiegato nelle misure potenziometriche. Questi accorgimenti permettono di rimuovere eventuali tracce di CO_2 presenti nel gas inerte e lo presaturano di vapore acqueo prima di introdurlo nella cella potenziometrica. Tutte le misure sono state condotte a forza ionica costante usando soluzioni di NMe_4Cl 0.10 M.

Il personal computer, sulla base delle istruzioni fornitegli dal programma, controlla il sistema di misura, regola le aggiunte di soluzione titolante ed esegue le letture dei valori di forza elettromotrice utilizzando un'interfaccia che lo collega al potenziometro.

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

1. Numero massimo di letture
2. Intervallo di tempo fra due letture successive
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

Una volta 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. e ne viene calcolata la media: il valore così determinato (lettura) viene memorizzato e visualizzato

sul video accanto ad un numero progressivo. Questa procedura viene ripetuta fino ad ottenere un gruppo di dieci letture delle quali il calcolatore valuta la media e controlla se la deviazione standard sul valor medio è maggiore o minore della tolleranza imposta (parametro 3). Nel primo caso il sistema continua ad effettuare letture successive e le utilizza per fare la verifica sulle ultime dieci letture come descritto sopra: questa fase si protrae finchè non viene soddisfatta la condizione imposta sulla tolleranza o, alternativamente, finchè non viene raggiunto il numero massimo di letture impostato. In quest'ultimo caso, 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. Nel caso invece che dopo un certo numero di letture il test sulla deviazione standard dal valor medio venga superato, viene calcolata la differenza fra il primo ed il decimo valore di f.e.m. usati per la verifica: lo scarto tra i valori non deve superare il valore fissato per la tolleranza sulla deriva (parametro 4). Questo controllo ulteriore serve a scartare quei valori che, pur rispettando la condizione imposta sulla deviazione standard, sono il risultato di una serie di letture di f.e.m. nelle quali l'ultimo valore registrato è molto diverso dal primo. Se questa condizione non è verificata vengono acquisite nuove letture che a loro volta vengono impiegate per i test sulla deviazione standard dal valor medio e sulla deriva. Se le letture superano entrambi i controlli, il calcolatore considera buona la misura, memorizza i dati e procede ad un'altra aggiunta. I dati così ottenuti sono stati successivamente elaborati con il programma di calcolo HYPERQUAD³¹.

5.3 Metodo di calcolo³¹

Il problema di determinare le costanti di equilibrio in soluzione sarebbe facilmente risolvibile se fosse possibile ottenere una misura diretta della concentrazione di tutte le specie presenti in soluzione all'equilibrio. È evidente che questo non è generalmente possibile. D'altra parte si può mettere in relazione la concentrazione di uno dei componenti con le costanti di equilibrio e le concentrazioni iniziali del sistema, per cui, in linea di principio, la misura della variazione della concentrazione di questa sola specie con la composizione globale 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.

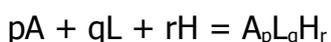
Nel caso degli equilibri di complessazione nei quali sono coinvolti un legante ed un substrato protonabili, la determinazione delle costanti di equilibrio può essere effettuata mediante la misura della concentrazione dello ione idrogeno con un elettrodo a vetro. La concentrazione dello ione idrogeno in soluzione ed il potenziale misurato sono legati dall'equazione di Nernst:

$$E = E^{\circ} + (RT/F) \ln[H^{+}]$$

Il potenziale di elettrodo standard E° fa parte delle informazioni richieste per specificare le condizioni in cui sono state effettuate le misure potenziometriche: il suo valore infatti è necessario per ricavare la concentrazione dello ione idrogeno a partire da una misura di differenza di potenziale. Per questi motivi deve essere determinato sperimentalmente in tempi ravvicinati a quelli in cui si intendono effettuare delle misure. La calibrazione dell'elettrodo di riferimento nelle condizioni sperimentali prescelte, cioè la determinazione del suo potenziale standard, si realizza

attraverso la titolazione di una quantità esattamente nota di acido forte con base forte. Queste titolazioni, i cui punti equivalenti sono stati determinati con il metodo di Gran, forniscono i valori di E° ed il prodotto ionico dell'acqua K_w .

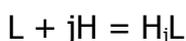
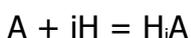
Si può esprimere in forma generale la formazione in soluzione acquosa di un complesso derivante dalla reazione tra un anione A^{n-} con un legante L entrambi protonabili con la seguente equazione (le cariche sono state omesse per semplicità):



Per uno stesso sistema anione-legante-protone possono formarsi un certo numero di complessi, ognuno con una differente combinazione dei tre coefficienti p, q ed r. Per ognuno di essi è possibile definire una costante di formazione, la cui forma generale sarà:

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

Poiché anche l'anione ed il legante possono protonarsi, andranno considerati anche gli equilibri:



le cui costanti di stabilità saranno rispettivamente:

$$\beta_i = [H_iA]/[A][H]^i$$

$$\beta_j = [H_jL]/[L][H]^j$$

Negli studi di coordinazione di anioni da parte di un legante, la procedura generalmente seguita consiste, in primo luogo, nel determinare separatamente le costanti di basicità dell'anione e del legante sempre per via potenziometrica, successivamente viene titolata con una base forte una soluzione contenente l'anione, il legante ed il protone in concentrazioni iniziali note.

Le concentrazioni totali di queste tre specie sono definite da:

$$T_A = [A] + \sum_{pqr} p[A_pL_qH_r] + \sum_i [H_iA] \quad (p, q, r=1,2,\dots)$$

$$T_L = [L] + \sum_{pqr} q[A_pL_qH_r] + \sum_j [H_jL] \quad (i, j=0,1,2,\dots)$$

$$T_H = [H] + \sum_{pqr} r [A_p L_q H_r] + \sum_i i [H_i A] + \sum_j j [H_j L] - [OH]$$

Ovvero, introducendo le espressioni delle β_{pqr} e delle costanti di basicità si ottiene il seguente sistema di equazioni:

$$T_A = [A] + \sum_{pqr} p \beta_{pqr} [A]^p [L]^q [H]^r + \sum_i \beta_{10i} [A] [H]^i$$

$$T_L = [L] + \sum_{pqr} q \beta_{pqr} [A]^p [L]^q [H]^r + \sum_j \beta_{01j} [L] [H]^j$$

$$T_H = [H] + \sum_{pqr} r \beta_{pqr} [A]^p [L]^q [H]^r + \sum_i i \beta_{10i} [A] [H]^i + \sum_j j \beta_{01j} [L] [H]^j + [OH]$$

Durante la titolazione, la concentrazione dello ione idrogeno libero è seguita potenziometricamente: si ottiene così la curva di titolazione sperimentale potenziale di elettrodo contro volume di titolante aggiunto. A ciascun punto sperimentale acquisito corrisponde un sistema di tre equazioni in $n+2$ incognite, che rappresentano le n costanti di formazione degli addotti cercate e le concentrazioni libere di legante ed anione. Complessivamente, se si hanno N punti sperimentali, si ottiene un sistema di $3N$ equazioni in $n+2N$ incognite. Il trattamento matematico di tale sistema è notevolmente complicato per cui si preferisce ricorrere a metodi di calcolo iterativi, che richiedono l'impiego di calcolatori, piuttosto che ricercarne le soluzioni analitiche. Attualmente sono disponibili vari programmi per il calcolo di costanti di stabilità da misure potenziometriche: in particolare, le costanti di stabilità riportate in questo lavoro sono state ottenute con HYPERQUAD²⁷. Questo programma di calcolo consiste essenzialmente in un metodo di affinamento delle costanti di stabilità dei complessi mediante minimi quadrati non lineari. La variabile U minimizzata nel calcolo è direttamente legata ai dati sperimentali, principalmente al potenziale di elettrodo, e tiene conto degli errori sul potenziale misurato e sul volume di reattivo aggiunto:

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

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

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

Dove σ_V^2 e σ_e^2 sono le varianze stimate rispettivamente sul volume di

reagente aggiunto e sulla lettura di potenziale (σ_e^2), mentre la derivata dE/dV rappresenta la pendenza della curva di titolazione potenziale contro volume.

Tale derivata ha un valore elevato in prossimità di rapide variazioni di potenziale (ad esempio in corrispondenza dei punti equivalenti): di conseguenza il peso statistico w , assegnato ai punti sperimentali corrispondenti a questa parte della titolazione potenziometrica, è piccolo; di contro avranno maggior peso i punti sperimentali ottenuti in zone tampone.

Le altre due variabili presenti nell'espressione per U , $E_i(\text{sper})$ ed $E_i(\text{calc})$, sono rispettivamente il potenziale misurato sperimentalmente ed il potenziale calcolato, cioè il potenziale teorico corrispondente a ciascun punto sperimentale calcolato a partire dalle condizioni iniziali (concentrazioni, E_0 , K_w) e dalle costanti relative agli equilibri che intervengono nel sistema studiato. Attraverso la minimizzazione di U si possono quindi determinare le costanti di equilibrio per il sistema.

Il programma risolve l'equazione matriciale:

$$\mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{A} \mathbf{s} = \mathbf{A}^T \mathbf{W} \mathbf{e}$$

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

I valori degli elementi del vettore \mathbf{s} sono le incognite che vogliamo determinare tramite la minimizzazione di U , poichè ci consentono di passare dai valori arbitrari iniziali per le costanti ai valori definitivi affinati. Il miglior raffinamento possibile con i dati sperimentali disponibili viene raggiunto quando si ottengono un gruppo di valori autoconsistenti.

Il programma di calcolo fornisce due parametri statistici per verificare la bontà del raffinamento: la deviazione standard σ e χ^2 .

La deviazione standard è definita come:

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

dove i simboli mantengono il significato precedente, m è il numero dei punti sperimentali ed n quello dei parametri da affinare.

Il miglior valore di σ è 1, ma a detta degli stessi autori del programma, sono ben accettabili tutti i valori di σ inferiori a 3. Buoni risultati possono essere ottenuti anche per valori compresi tra 6 e 10.

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

Per stabilire un valore di χ^2 che serva per tutti gli esperimenti, indipendentemente dal numero di punti e di variabili da affinare, il programma distribuisce i punti in otto classi differenti, in funzione di come gli errori si distribuiscono attorno a $\sigma = 0$. Le classi sono definite in modo da contenere lo stesso numero di punti ed assumendo una distribuzione normale degli errori. In base alla differenza fra il numero di punti sperimentali ed il numero di punti teorici, si calcola χ^2 per ciascuna classe dall'espressione:

$$\chi^2 = \sum_i \chi_i^2$$

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

con m numero totale di punti del sistema ed m_i 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 sette gradi di libertà (il numero delle classi meno uno) ed un livello di affidabilità del 95%.

5.4 ³¹P NMR

Lo studio dell'interazione tra il nostro legante e i nucleotidi è stato allargato alla cinetica della reazione idrolisi dell'ATP, che ha come prodotti ADP e fosfato inorganico.

Grazie alla presenza dei tre atomi di fosforo nella molecola dell'ATP è possibile seguire l'andamento della reazione attraverso esperimenti di ³¹P NMR: infatti man mano che la defosforilazione procede si vedono diminuire i picchi caratteristici dell'ATP e aumentare quelli di ADP e fosfato. Inoltre, dai dati ricavati dall'integrazione dei picchi è possibile determinare le costanti di velocità della reazione per i sistemi L-ATP e Lzn(II)-ATP, a pH 3 e pH 9.

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando soluzioni in D₂O di legante e ATP e di legante, ATP e Zn²⁺ a pH 3 e pH 9, con concentrazione 0.01 M in tutti i componenti. Le soluzioni sono state mantenute a 70 °C per tempi determinati e raffreddate rapidamente a temperatura ambiente prima di registrare gli spettri. Il pH delle soluzioni è stato calcolato dal valore misurato di pD attraverso la formula: $\text{pH} = \text{pD} - 0.40^{32}$ ed è stato regolato a 3 e 9 mediante piccole aggiunte di NaOD e DCI 0.1 M.

Gli spettri sono stati registrati a 25°C su uno spettrometro a 400 MHz Bruker Avance III a intervalli regolari di tempo.

6. Risultati e discussione

6.1 Formazione di complessi anionici di L e dei suoi complessi di Zn(II) con ATP, ADP, AMP, fosfato, difosfato e trifosfato.

L'interazione del legante L e dei suoi complessi di Zn(II) con i nucleotidi ADP, ATP, e AMP e l'interazione di L con fosfato, difosfato e trifosfato è stata studiata mediante titolazioni potenziometriche (pH-metriche) effettuate in soluzione acquosa 0.1 M in Me₄NCl. Le costanti di stabilità sono state ottenute elaborando i dati potenziometrici con il programma di calcolo HYPERQUAD.³¹

Per la determinazione delle costanti di stabilità di questi addotti è stato necessario usare le costanti di protonazione del legante e degli anioni e le costanti di stabilità dei complessi di Zn(II) determinate in altri studi^{33,34} e riportate nelle Tabelle 6.1.1, 6.1.2 e 6.1.3.

I complessi formati da L con i nucleotidi ed i corrispondenti anioni fosfato, difosfato e trifosfato, sia in assenza che in presenza di Zn(II), presentano un rapporto equimolare (1:1) L:nucleotide (o ZnL:nucleotide) e L:anione (o ZnL:anione) e contengono un vario numero di ioni H⁺. Il programma di calcolo HYPERQUAD utilizzato per la derivazione delle costanti di stabilità dalle misure potenziometriche fornisce la stechiometria delle specie formate, nella forma generica Z_nL_mA_iH_q (cariche omesse), ma non può dare alcuna indicazione sulla collocazione degli ioni H⁺ sul legante o sugli anioni, entrambi soggetti ad equilibri di protonazione. In precedenti studi è stato evidenziato che in sistemi simili gli ioni H⁺ si distribuiscono nel complesso secondo la successione prevista dalla basicità delle specie

interagenti isolate.³⁵ Questo criterio è stato qui adottato per definire le specie complesse formate, come mostrato nei successivi paragrafi.

	Log K					
	ATP	ADP	AMP	PO ₄ ³⁻	P ₂ O ₇ ⁴⁻	P ₃ O ₁₀ ⁵⁻
H ⁺ + A ⁿ⁻ = HA ⁽ⁿ⁻¹⁾⁻	6.77	6.24	6.19	11.72	8.9	8.51
H ⁺ + HA ⁽ⁿ⁻¹⁾⁻ = H ₂ A ⁽ⁿ⁻²⁾⁻	3.89	3.79	3.70	6.88	6.29	5.76
H ⁺ + H ₂ A ⁽ⁿ⁻²⁾⁻ = H ₃ A ⁽ⁿ⁻³⁾⁻	1.46			2.18	2.01	2.08

Tabella 6.1.1. Costanti di protonazione di AMP, ADP, ATP, PO₄³⁻, P₂O₇⁴⁻ e P₃O₁₀⁵⁻ in Me₄NCl 0.1 M a 298.0 ± 0.1 K

	Log K
L + H ⁺ = HL ⁺	10.16
HL ⁺ + H ⁺ = H ₂ L ²⁺	9.97
H ₂ L ²⁺ + H ⁺ = H ₃ L ³⁺	9.26
H ₃ L ³⁺ + H ⁺ = H ₄ L ⁴⁺	9.22
H ₄ L ⁴⁺ + H ⁺ = H ₅ L ⁵⁺	8.57
H ₅ L ⁵⁺ + H ⁺ = H ₆ L ⁶⁺	8.32
H ₆ L ⁶⁺ + H ⁺ = H ₇ L ⁷⁺	5.69
H ₇ L ⁷⁺ + H ⁺ = H ₈ L ⁸⁺	2.6

Tabella 6.1.2. Costanti di protonazione del legante L in Me₄NCl 0.1 M a 298.0 ± 0.1 K

	Zn ²⁺
	logK
$M^{2+} + L = ML^{2+}$	14.17(6)
$ML^{2+} + H^+ = MHL^{3+}$	9.92(6)
$MHL^{3+} + H^+ = MH_2L^{4+}$	8.88(6)
$MH_2L^{4+} + H^+ = MH_3L^{5+}$	8.22(4)
$MH_3L^{5+} + H^+ = MH_4L^{6+}$	6.53(4)
$MH_4L^{6+} + H^+ = MH_5L^{7+}$	5.32(4)
$2M^{2+} + L = M_2L^{4+}$	22.06(5)
$M_2L^{4+} + H^+ = M_2HL^{5+}$	8.59(5)
$M_2HL^{5+} + H^+ = M_2H_2L^{6+}$	6.78(8)
$M_2L^{4+} + OH^- = M_2LOH^{3+}$	4.50(6)
$3M^{2+} + 2L = M_3L_2^{6+}$	40.4(1)
$M_3L_2^{6+} + H^+ = M_3HL_2^{7+}$	9.4(1)
$M_3HL_2^{7+} + H^+ = M_3H_2L_2^{8+}$	8.2(1)

Tabella 6.1.3. Costanti di protonazione dei complessi di Zn(II) in Me₄NCl 0.1 M a 298.0 ± 0.1 K

6.2 Interazione di L con ADP, ATP, AMP

Le costanti di stabilità dei complessi formati da L con ATP, ADP e AMP sono riportate in Tabella 6.2.1, mentre nelle Figura 6.2.2 sono riportati i diagrammi di distribuzione dei rispettivi sistemi. Come si può vedere dalla Tabella 6.2.1, il legante richiede un grado minimo di protonazione di 4 (H_4L^{4+}) per formare complessi con questi nucleotidi. Procedendo da ambiente basico verso ambiente acido (Figura 6.2.2, Tabella 6.2.1) sia il legante che i nucleotidi sono soggetti a successiva protonazione, con L che raggiunge il grado massimo di protonazione 8 (H_8L^{8+}).

Un'analisi delle costanti di stabilità riportate in Tabella 6.2.1 mostra che, con pochissime eccezioni, la stabilità dei complessi aumenta con la carica positiva del legante, cioè aumentando il grado di protonazione del legante, e con la carica negativa dell'anione nucleotidico, cioè la stabilità aumenta nell'ordine $ATP^{4-} > ADP^{3-} > AMP^{2-}$. Questa caratteristica evidenzia che l'interazione L-nucleotide ha una natura fondamentalmente elettrostatica.

Ciò nonostante si osservano alcune eccezioni a questo comportamento generale. Ad esempio, la specie H_7L^{7+} forma complessi relativamente meno stabili con $HATP^{3-}$ e $HADP^{2-}$ e di uguale stabilità con $HAMP^-$ rispetto ad H_6L^{6+} , benché quest'ultima abbia una minore carica positiva. È stato precedentemente evidenziato che la protonazione in H_6L^{6+} coinvolge i sei gruppi amminici esterni del legante mentre il settimo ione H^+ che viene legato per formare H_7L^{7+} interessa principalmente l'atomo di azoto terziario centrale.³⁴ Ci possiamo quindi aspettare che la protonazione dell'atomo di azoto centrale produca un cambio conformazionale importante del legante che determina una peggiore complementarità strutturale fra recettore e substrato con perdita di stabilità del complesso. Per ottenere informazioni su questo punto sono stati sviluppati calcoli di modellizzazione molecolare sugli addotti $[(H_6L)HATP]^{3+}$ e $[(H_7L)HATP]^{4+}$ mediante l'uso del programma AMBER3, implementato in Hyperchem v.7.5, con trattamento implicito del

solvente ($\epsilon = 4R$) e cariche atomiche calcolate a livello semiempirico mediante PM3. In Figura 6.2.3 sono riportate le strutture dei conformeri a minore energia così calcolate.

Come si può vedere in questa figura, nell'addotto $[(H_6L)HATP]^{3+}$ (Figura 6.2.3a) tutti e sei i gruppi ammoniacali formati dagli atomi di azoto primari terminali sono coinvolti nell'interazione con i gruppi fosfato di $HATP^{3-}$, dando origine a 10 legami a idrogeno rinforzati da interazione elettrostatica (salt-bridge). La struttura è ulteriormente stabilizzata da una interazione $H\cdots N$ fra il gruppo OH terminale di $HATP^{3-}$ e la parte aromatica del nucleotide. Nel caso di $[(H_7L)HATP]^{4+}$ (Figura 6.2.3b), a causa della protonazione dell'atomo centrale del legante, solo cinque di questi gruppi ammoniacali sono coinvolti nell'interazione con $HATP^{3-}$, con la quale formano 8 salt-bridge ed un legame ad idrogeno con un atomo di azoto del residuo adenosinico del nucleotide. Complessivamente, quindi, l'interazione recettore-nucleotide risulta più forte nel caso di $[(H_6L)HATP]^{3+}$ che per $[(H_7L)HATP]^{4+}$, in accordo con le costanti di stabilità dei due addotti. Un'altra eccezione è rappresentata dalla minore stabilità dei complessi di $HADP^{2-}$ e $HAMP^-$ con H_7L^{7+} rispetto alle forme meno cariche H_2ADP^- e H_2AMP e dall'uguale stabilità dei complessi di $HATP^{3-}$ e H_2ATP^{2-} con lo stesso recettore. La protonazione dei gruppi fosfato aumenta la capacità degli stessi di agire da donatori di legami a idrogeno del tipo $-OH\cdots N$ (1). Studi precedenti hanno evidenziato che legami a idrogeno di questa tipologia apportano una maggiore stabilità agli addotti rispetto ai legami a idrogeno del tipo $-O\cdots^+HN$ (2) e $-O\cdots HN$ (3) per motivi entalpici, cioè i legami di tipo (1) producono contributi entalpici favorevoli mentre quelli di tipo (2) e (3) danno contributi entalpici sfavorevoli.³⁵ Quindi, quando sul legante ci sono ancora gruppi amminici non protonati, la protonazione dei gruppi fosfato favorisce la formazione di legami ad idrogeno di tipo (1) rispetto a quelli di tipo (2) e (3) e ciò può portare ad un aumento di stabilità del complesso.

Da questi risultati è quindi evidente che la natura dell'interazione L-nucleotide è fondamentalmente di tipo elettrostatico e che i legami a idrogeno apportano un contributo significativo, talvolta decisivo, alla stabilità dei complessi. Inoltre la complementarità legante-nucleotide, che può dipendere dal grado di protonazione del legante, ha un ruolo importante nel determinare la stabilità dei complessi.

Anion (A^{n-})	ATP ⁴⁻	ADP ³⁻	AMP ²⁻
$H_4L^{4+} + A^{n-} = [(H_4L)A]^{(4-n)+}$	3.72	2.90	2.75
$H_5L^{5+} + A^{n-} = [(H_5L)A]^{(5-n)+}$	4.23	3.25	2.38
$H_6L^{6+} + A^{n-} = [(H_6L)A]^{(6-n)+}$	5.10	3.78	3.29
$H_6L^{6+} + HA^{(n-1)-} = [(H_6L)HA]^{(7-n)+}$	5.80	4.79	4.12
$H_7L^{7+} + HA^{(n-1)-} = [(H_7L)HA]^{(8-n)+}$	5.03	4.17	4.10
$H_7L^{7+} + H_2A^{(n-2)-} = [(H_7L)H_2A]^{(9-n)+}$	4.94	4.32	4.81
$H_8L^{8+} + H_2A^{(n-2)-} = [(H_8L)H_2A]^{(10-n)+}$	4.79	4.13	4.95

Tabella 6.2.1 Costanti di stabilità dei complessi di L e ATP, ADP, AMP in Me₄NCl 0.1 M a 298.0±0.1 K

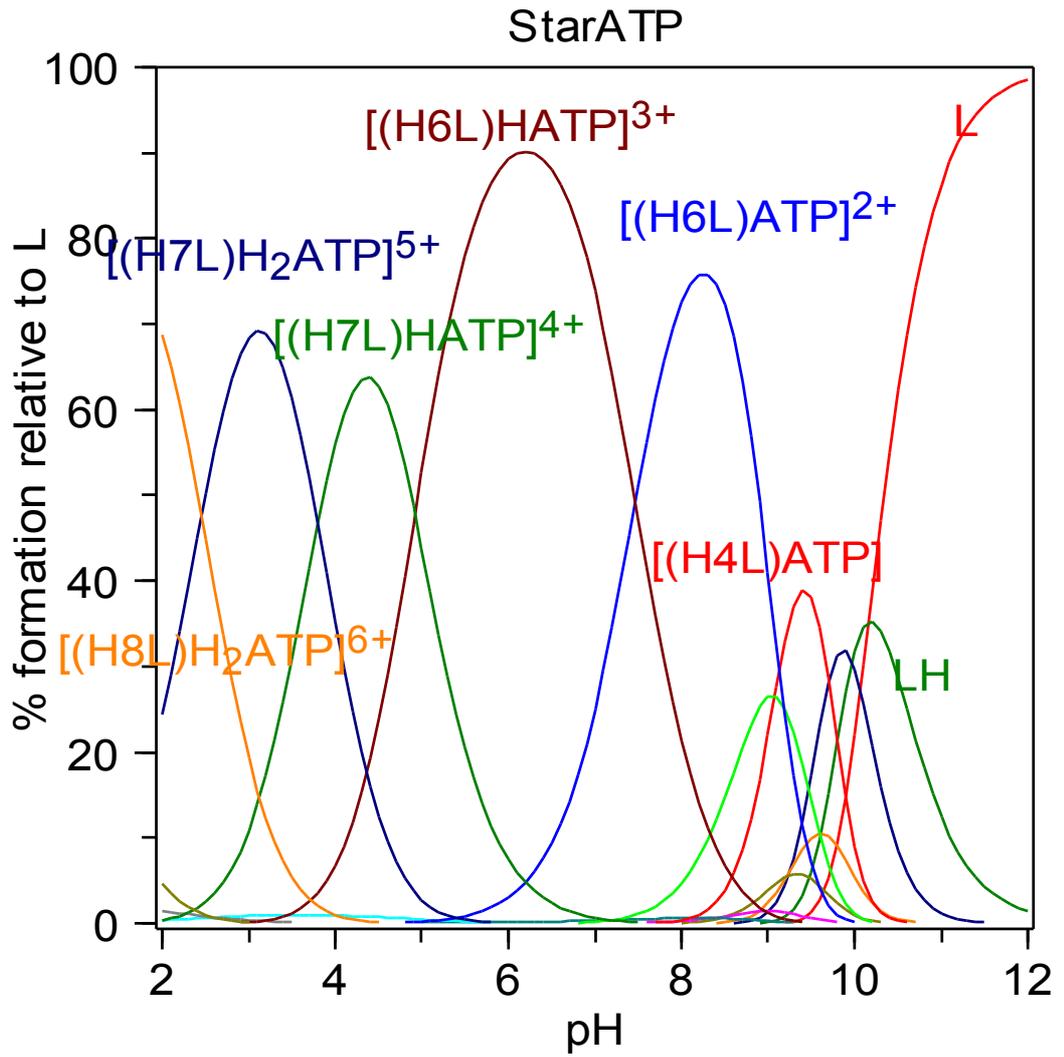


Figura 6.2.2.a Diagramma di distribuzione per il sistema L-ATP.

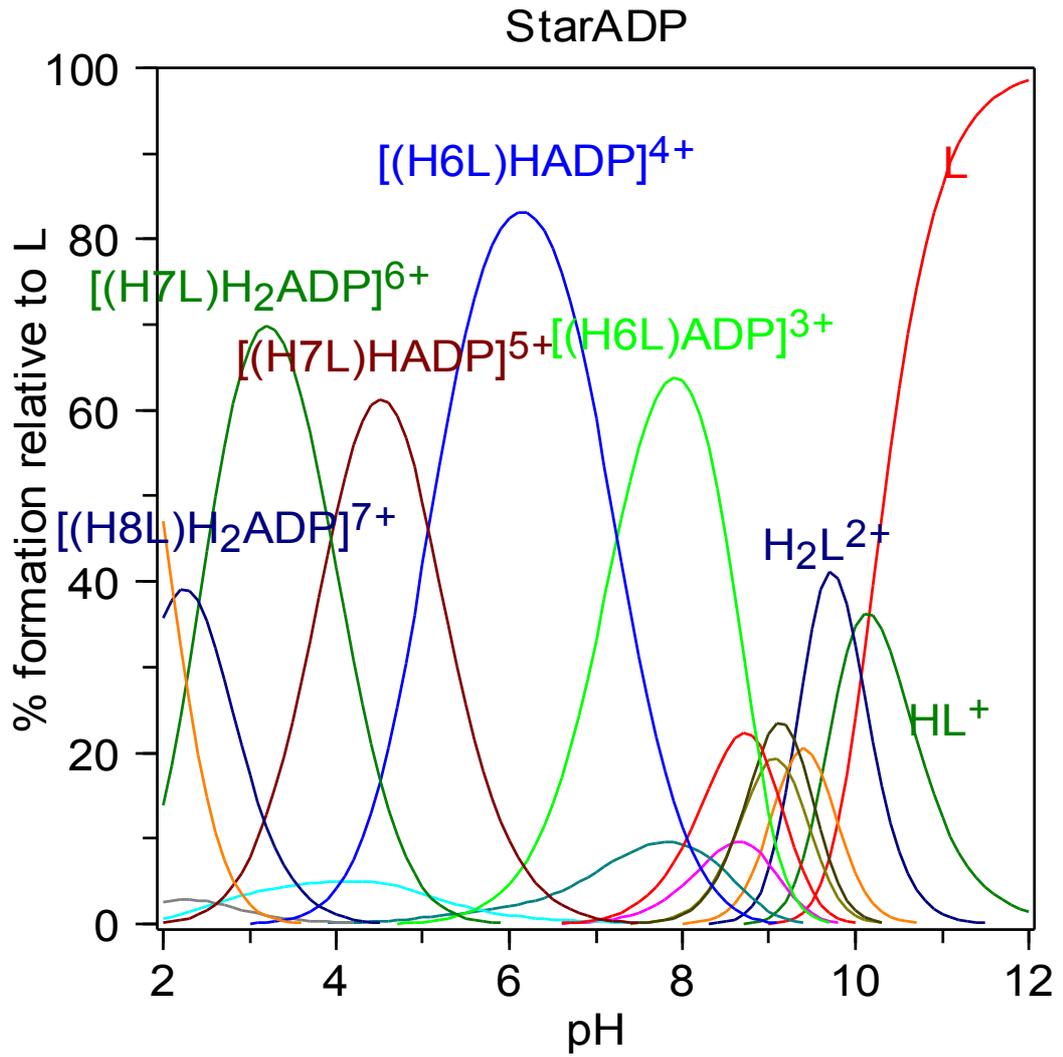


Figura 6.2.2.b Diagramma di distribuzione per il sistema L-ADP.

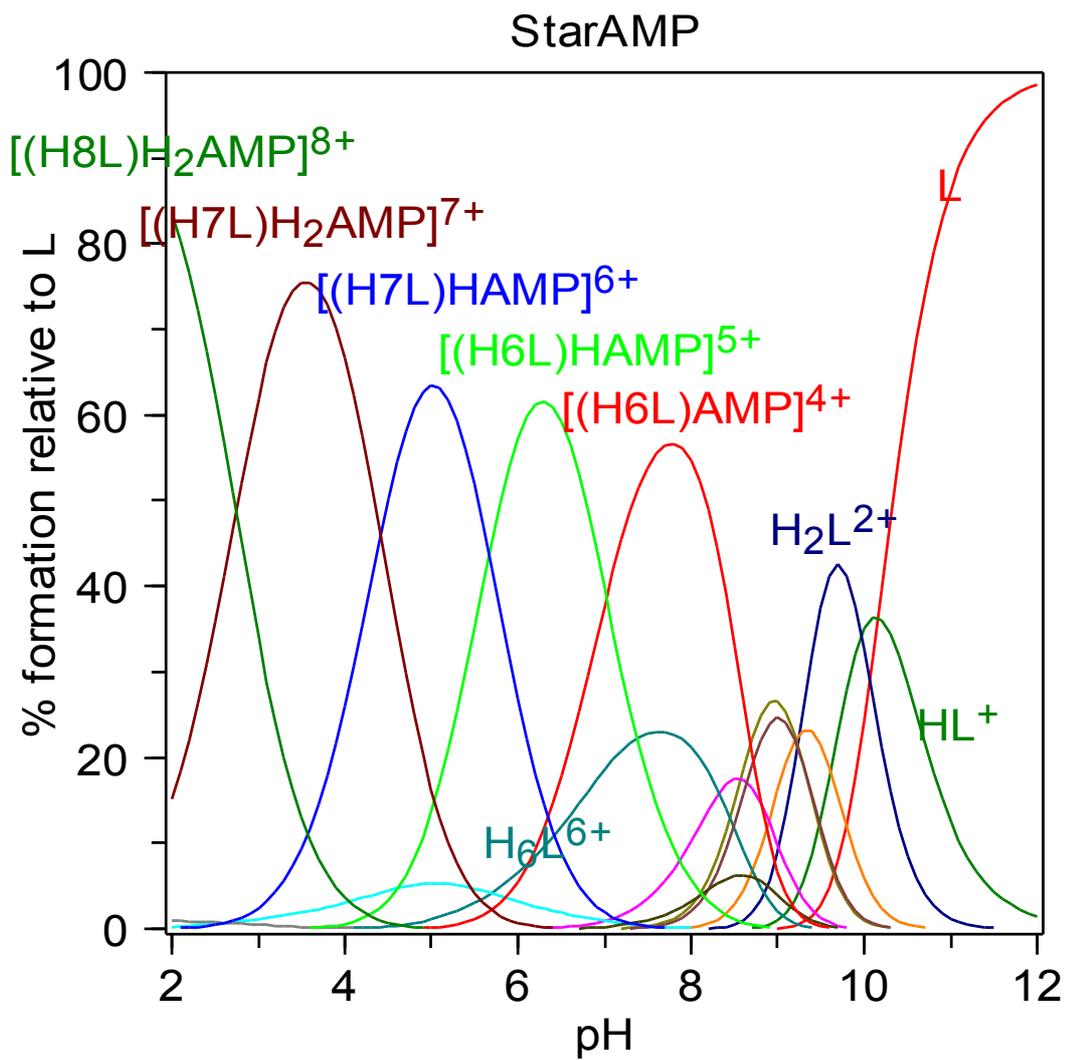


Figura 6.2.2.c Diagramma di distribuzione per il sistema L-AMP.

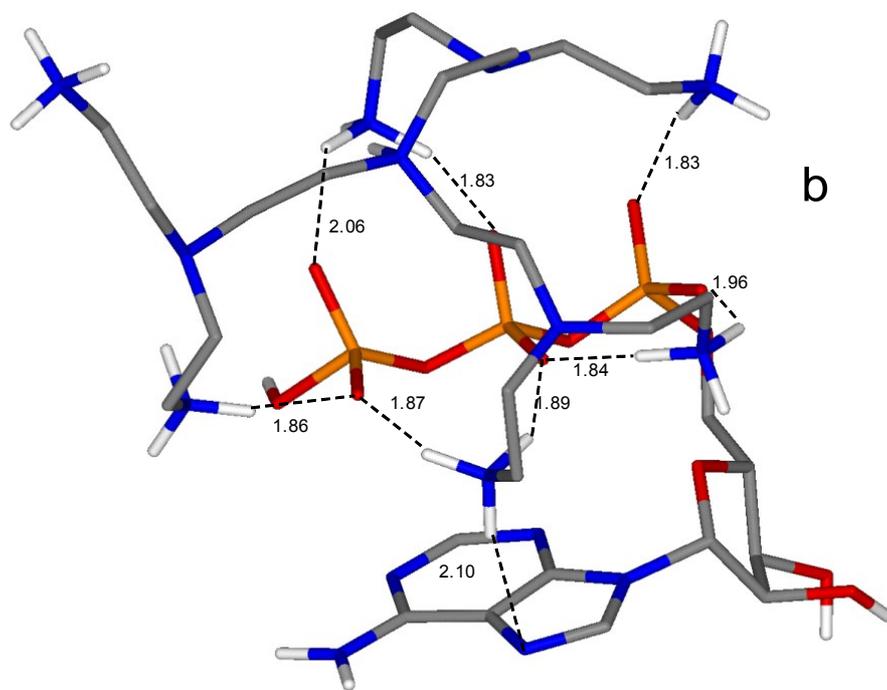
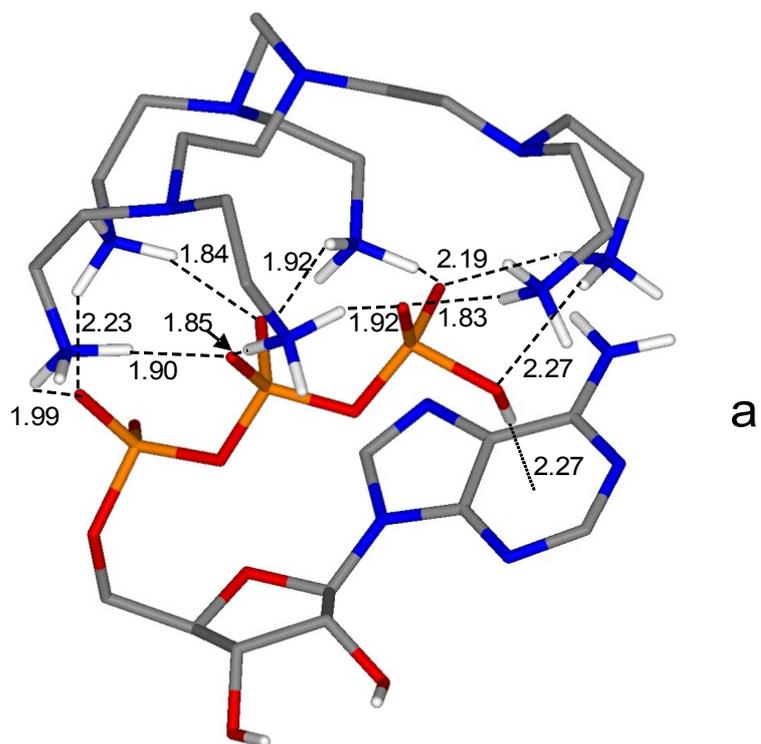


Figura 6.2.3. Conformeri a minore energia calcolati per gli addotti $[(H_6L)HATP]^{3+}$ (a) e $[(H_7L)HATP]^{4+}$ (b).

6.3 Interazione di L con PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$

Le costanti di stabilità dei complessi formati da L con PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ e $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ sono riportate in Tabella 6.3.1, mentre nella Figura 6.3.2 sono riportati i diagrammi di distribuzione dei rispettivi sistemi. Come si può vedere dalla Tabella 6.3.1, affinché possa instaurarsi una interazione osservabile fra L e questi anioni fosfato e polifosfato è necessario un grado di protonazione inferiore rispetto ai precedenti nucleotidi. Infatti, L forma complessi con PO_4^{3-} già nella sua forma diprotonata (H_2L^{2+}) mentre interagisce con $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ e $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ a partire dalla sua forma triprotonata (H_3L^{3+}).

Analogamente a quanto osservato per i nucleotidi, anche per gli anioni PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ e $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ si osserva che la stabilità dei complessi aumenta, generalmente, con la carica negativa dell'anione e la carica positiva del legante, indicando che anche in questo caso la natura dell'interazione è principalmente elettrostatica. Anche in questo caso si osservano alcune irregolarità a questo comportamento generale, la maggior parte delle quali può essere attribuita al più favorevole contributo apportato dal legame a idrogeno di tipo (1) $-\text{OH}\cdots\text{N}$ rispetto a quelli di tipo (2) $-\text{O}\cdots\text{H}\text{N}$ e (3) $-\text{O}\cdots\text{HN}$. Ad esempio, la specie H_4L^{4+} forma con HPO_4^{2-} complessi più stabili di H_5L^{5+} , mentre si ha invarianza di stabilità per i complessi con $\text{HP}_2\text{O}_7^{3-}$, in accordo con il fatto che la protonazione del legante se da una parte favorisce l'interazione elettrostatica con l'anione dall'altra riduce la possibilità di formazione di legami a idrogeno di tipo (1) rispetto a quelli meno favorevoli di tipo (2) e (3). Analogamente passando da H_7L^{7+} a H_8L^{8+} si osserva una perdita di stabilità da parte del complesso con $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{3-}$.

Quindi anche nella formazione di complessi con gli anioni PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ e $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ le interazioni elettrostatiche ed il legame a idrogeno giocano il ruolo fondamentale nel determinare la loro stabilità termodinamica. I risultati ottenuti con questi anioni presentano caratteristiche molto simili a quelli ottenuti con AMP, ADP e ATP rivelando che l'interazione dei nucleotidi con

le forme protonate di L avviene principalmente mediante i loro gruppi fosfato.

Anion (A^{n-})	PO_4^{3-}	$P_2O_7^{4-}$	$P_3O_{10}^{5-}$
$H_2L^{2+} + HA^{(n-1)-} = [(H_2L)HA]^{(3-n)+}$	3.22		
$H_3L^{3+} + A^{n-} = [(H_3L)A]^{(3-n)+}$		3.84	4.20
$H_4L^{4+} + A^{n-} = [(H_4L)A]^{(4-n)+}$		3.47	5.01
$H_3L^{3+} + HA^{(n-1)-} = [(H_3L)HA]^{(4-n)+}$	3.38		
$H_5L^{5+} + A^{n-} = [(H_5L)A]^{(5-n)+}$			5.92
$H_4L^{4+} + HA^{(n-1)-} = [(H_4L)HA]^{(5-n)+}$	4.18	5.13	
$H_6L^{6+} + A^{n-} = [(H_6L)A]^{(6-n)+}$			7.35
$H_5L^{5+} + HA^{(n-1)-} = [(H_5L)HA]^{(6-n)+}$	3.56	5.10	
$H_6L^{6+} + HA^{(n-1)-} = [(H_6L)HA]^{(7-n)+}$	4.04	4.64	6.87
$H_6L^{6+} + H_2A^{(n-2)-} = [(H_6L)H_2A]^{(8-n)+}$	4.08	4.39	
$H_7L^{7+} + HA^{(n-1)-} = [(H_7L)HA]^{(8-n)+}$			7.37
$H_7L^{7+} + H_2A^{(n-2)-} = [(H_7L)H_2A]^{(9-n)+}$	4.10	3.40	5.95
$H_8L^{8+} + H_2A^{(n-2)-} = [(H_8L)H_2A]^{(10-n)+}$			5.82
$H_7L^{7+} + H_3A^{(n-3)-} = [(H_7L)H_3A]^{(10-n)+}$			6.34

Tabella 6.3.1 Costanti di stabilità dei complessi di L con fosfato, difosfato e trifosfato in Me_4NCl a $298.0 \pm 0.1 K$

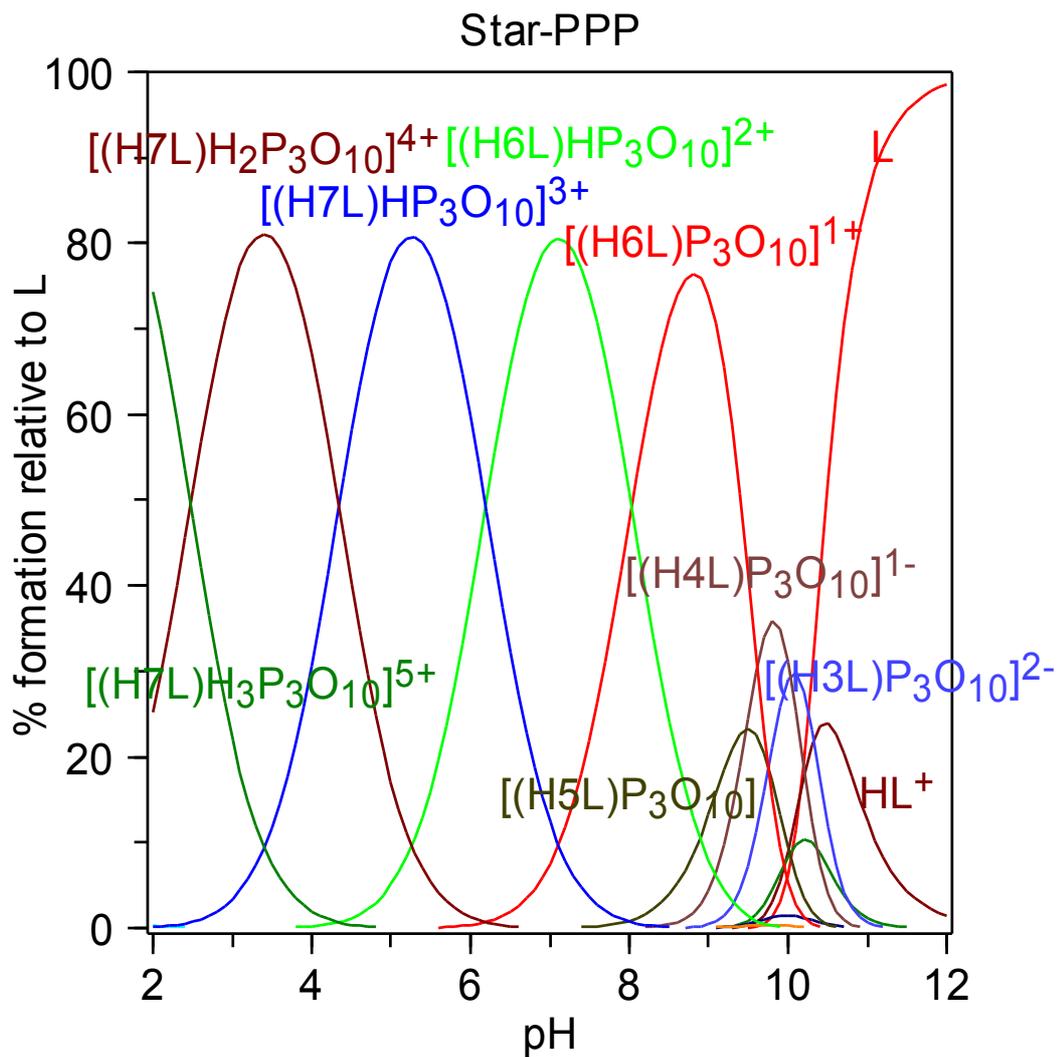


Figura 6.3.2.a Diagramma di distribuzione per il sistema $L-P_3O_{10}^{5-}$ (PPP).

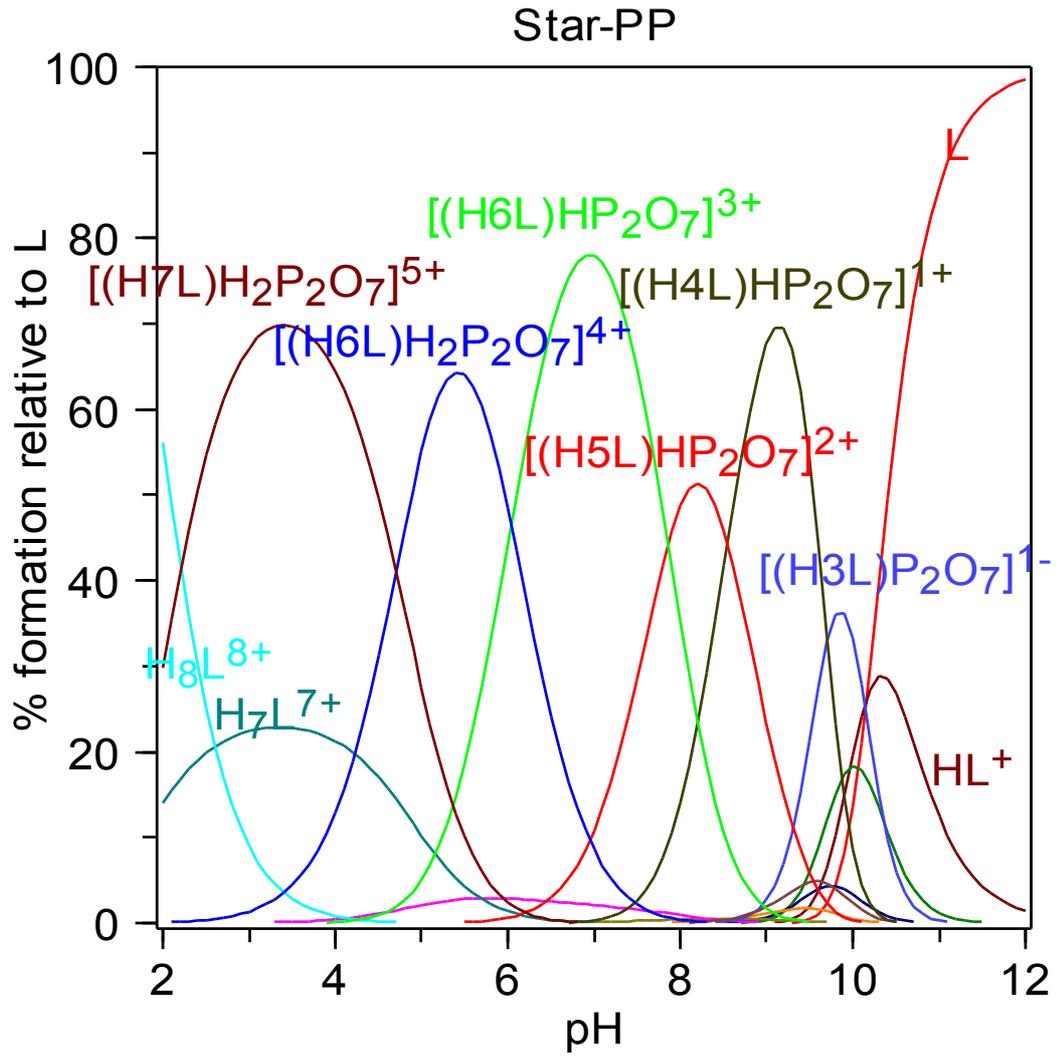


Figura 6.3.2.b Diagramma di distribuzione per il sistema $L\text{-P}_2\text{O}_7^{4-}$ (PP).

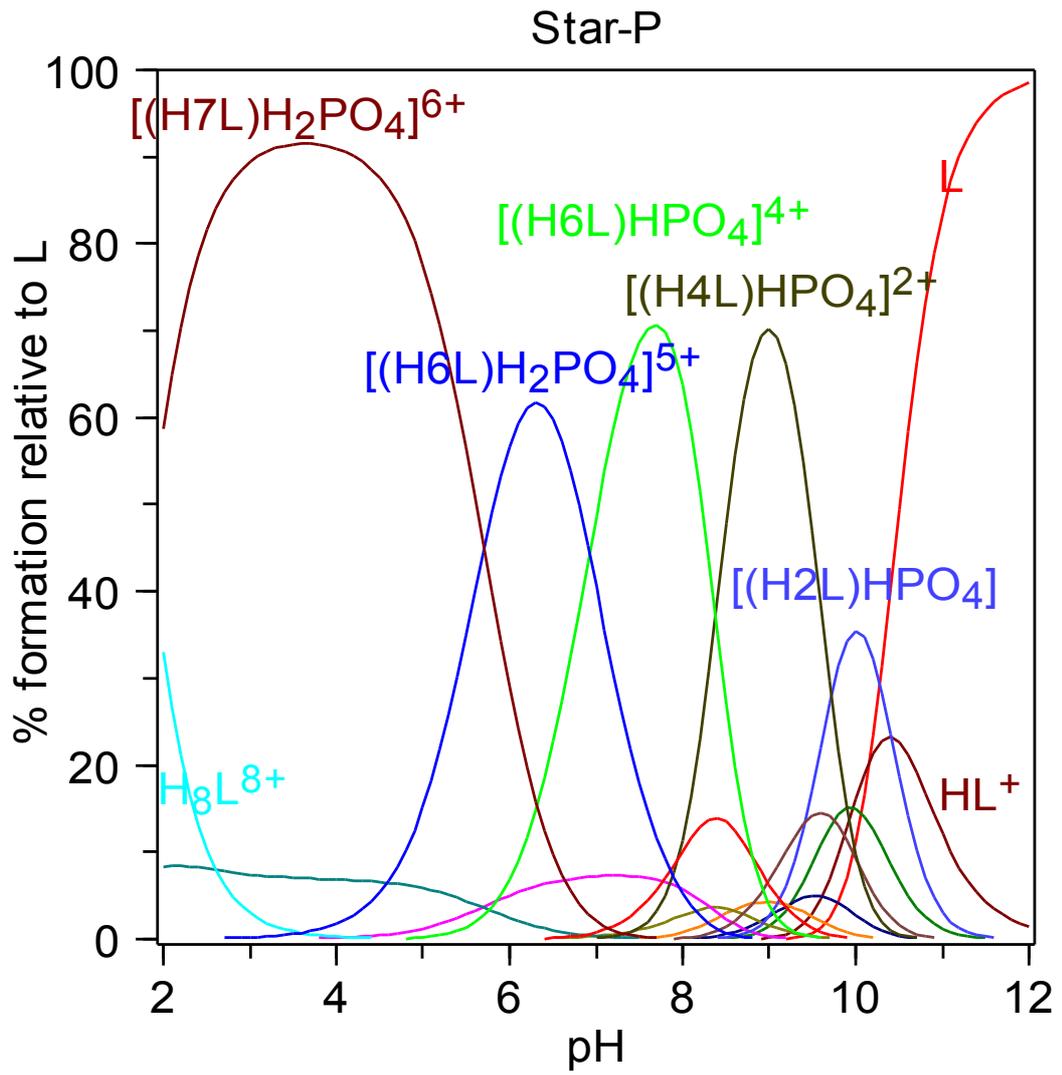


Figura 6.3.2.c Diagramma di distribuzione per il sistema $L-PO_4^{3-}(P)$.

6.4 Interazione dei complessi mononucleari di Zn(II) di L con ATP, ADP, AMP

L forma con Zn(II) complessi caratterizzati da un'ampia varietà di stechiometrie che includono specie con rapporti molari 1:1, 1:2 e 2:3 (L:Zn(II)). In soluzioni contenenti L e Zn(II) in rapporto 1:1, però, si ha la formazione quasi esclusiva di complessi mononucleari. Nello studio da noi effettuato, abbiamo lavorato con un rapporto molare 1:0.8 (L:Zn(II)) per garantire la presenza in soluzione di sole specie mononucleari.

L'analisi delle misure potenziometriche effettuate per i sistemi L/Zn(II)/nucleotide hanno evidenziato la formazione di complessi ternari con stechiometria 1:1:1 (L:Zn(II):nucleotide) in un'ampia varietà di stati di protonazione. Le costanti di stabilità ottenute per questi complessi sono riportate in Tabella 6.4.1, mentre i diagrammi di distribuzione dei rispettivi sistemi sono riportati in Figura 6.4.2.

Come si può osservare dalla Tabella 6.4.1, anche l'interazione dei nucleotidi con i complessi di Zn(II) di L presenta le caratteristiche di un fondamentale contributo elettrostatico con il legame ad idrogeno che partecipa favorevolmente, ma può generare irregolarità a seconda della sua tipologia.

Un aspetto interessante di questi sistemi è che in presenza del metallo coordinato il legante necessita un grado di protonazione inferiore per interagire con i nucleotidi. Infatti, già la forma monoprotonata del complesso interagisce con ADP e AMP, mentre già la forma diprotonata interagisce con ATP. Un altro aspetto interessante consiste nella maggiore stabilità degli addotti con i nucleotidi formati dai complessi metallici rispetto alle forme protonate del legante libero avente la stessa carica del complesso metallico. Ad esempio, il complesso H_4ZnL^{6+} forma complessi con ATP^{4-} , ADP^{3-} e AMP^{2-} con stabilità rispettivamente di $\log K = 7.00$, 5.76 e 4.47 contro i valori $\log K = 5.10$, 3.78 e 3.29 delle costanti di stabilità

degli analoghi complessi formati da H_6L^{6+} .

Queste caratteristiche suggerisco due possibilità:

- 1) lo ione metallico funziona da centro coordinativo nei confronti del nucleotide
- 2) lo ione metallico ha un effetto allosterico positivo, cioè dà al legante una conformazione migliore per interagire con i nucleotidi.

Uno studio precedente condotto sull'interazione dei complessi di Zn(II) di L con lo ione SO_4^{2-} aveva evidenziato mediante calcoli di modellizzazione quantomeccanici che entrambe queste possibilità contribuiscono alla stabilità del complesso ternario $[Zn(H_5L)SO_4]^{5+}$, del quale le due strutture di minima energia più abbondanti, calcolate, sono riportate in Figura 6.4.3. Analogamente si può pensare che anche nel caso dei complessi ternari formati dai nucleotidi entrambi questi contributi siano attivi, ragionevolmente in maniera differente per le diverse specie complesse. Infatti ci possiamo attendere che il contributo dovuto alla coordinazione dei nucleotidi al centro metallico sia più probabile e/o più significativo all'aumentare del grado di protonazione del complesso stesso quando, cioè, vi è un minor coinvolgimento di atomi donatori del legante nella coordinazione dello ione Zn(II).

Per confrontare la capacità del legante di interagire con i nucleotidi in assenza ed in presenza di Zn(II) non si può effettuare un semplice confronto delle costanti di stabilità dei complessi, ma bisogna tenere conto di tutti gli equilibri che hanno luogo in soluzione, cioè gli equilibri di protonazione di legante e nucleotidi, di formazione dei complessi in presenza ed in assenza di Zn(II) ed in presenza ed in assenza di nucleotide. Ciò può essere fatto calcolando un diagramma di distribuzione per un sistema contenente L, Zn(II) e nucleotide in rapporto molare 2:1:1, in maniera tale da consentire al nucleotide di ripartirsi fra il complesso di Zn(II) ed il legante libero, e riportando in grafico la concentrazione di

nucleotide legato ai complessi di Zn(II), in tutte le loro forme, e la concentrazione di nucleotide legato al solo legante, in tutte le sue forme, verso il pH. In Figura 6.4.4 sono riportati simili diagrammi cumulativi per i sistemi L/Zn(II)/ATP, L/Zn(II)/ADP e L/Zn(II)/AMP. Come si può vedere da questa figura, i nucleotidi risultano sempre favorevolmente legati ai complessi metallici piuttosto che al legante libero protonato. Solo nel caso del sistema L/Zn(II)/ATP si osserva una minima inversione di questa tendenza attorno a pH 9 dove la formazione del complesso $[\text{Zn}(\text{H}_3\text{L})\text{ATP}]^+$ ($\log K = 4.52$ per $\text{Zn}(\text{H}_3\text{L})^{5+} + \text{ATP}^{4-}$) compete debolmente con il complesso $[(\text{H}_6\text{L})\text{ATP}]^{2+}$ ($\log K = 5.10$ per $\text{H}_6\text{L}^{6+} + \text{ATP}^{4-}$). A valori minori di pH la coordinazione di ATP da parte del complesso di Zn(II) diventa prioritaria e sotto pH 5 il nucleotide è quasi completamente legato al complesso metallico.

Anche nel caso di ADP si osserva una buona selettività del complesso rispetto al legante libero nella coordinazione del nucleotide, mentre nel caso di AMP questo effetto si attenua.

Anion (A^{n-})	ATP ⁴⁻	ADP ³⁻	AMP ²⁻
$(\text{HZnL})^{3+} + A^{n-} = [(\text{HZnL})A]^{(3-n)+}$		3.19	2.46
$(\text{H}_2\text{ZnL})^{4+} + A^{n-} = [(\text{H}_2\text{ZnL})A]^{(4-n)+}$	3.70	3.73	2.99
$(\text{H}_3\text{ZnL})^{5+} + A^{n-} = [(\text{H}_3\text{ZnL})A]^{(5-n)+}$	4.52	4.14	3.52
$(\text{H}_3\text{ZnL})^{5+} + \text{HA}^{n-} = [(\text{H}_3\text{ZnL})\text{HA}]^{(6-n)+}$	6.76	6.05	4.81
$(\text{H}_4\text{ZnL})^{6+} + A^{n-} = [(\text{H}_4\text{ZnL})A]^{(6-n)+}$	7.00	5.76	4.47
$(\text{H}_5\text{ZnL})^{7+} + A^{n-} = [(\text{H}_5\text{ZnL})A]^{(7-n)+}$	8.61	6.66	5.28
$(\text{H}_4\text{ZnL})^{6+} + \text{HA}^{(n-1)-} = [(\text{H}_4\text{ZnL})\text{HA}]^{(7-n)+}$	7.16	5.74	4.41
$[(\text{H}_4\text{ZnL})\text{HA}]^{(7-n)+} + \text{H}^+ = [(\text{H}_5\text{ZnL})\text{HA}]^{(8-n)+}$	6.04	5.23	5.48
$[(\text{H}_5\text{ZnL})\text{HA}]^{(8-n)+} + \text{H}^+ = [(\text{H}_6\text{ZnL})\text{HA}]^{(9-n)+}$	5.65	5.63	4.66
$[(\text{H}_6\text{ZnL})\text{HA}]^{(9-n)+} + \text{H}^+ = [(\text{H}_7\text{ZnL})\text{HA}]^{(10-n)+}$	3.95	3.92	5.63
$[(\text{H}_7\text{ZnL})\text{HA}]^{(10-n)+} + \text{H}^+ = [(\text{H}_7\text{ZnL})\text{H}_2\text{A}]^{(11-n)+}$	4.11	4.55	4.3
$[(\text{H}_7\text{ZnL})\text{H}_2\text{A}]^{(11-n)+} + \text{H}^+ = [(\text{H}_8\text{ZnL})\text{H}_2\text{A}]^{(12-n)+}$	2.35		

Tabella 6.4.1 Costanti di stabilità dei complessi metallici di L, Zn(II) e ATP, ADP, AMP in Me_4NCl a $298.0 \text{ K} \pm 0.1 \text{ K}$

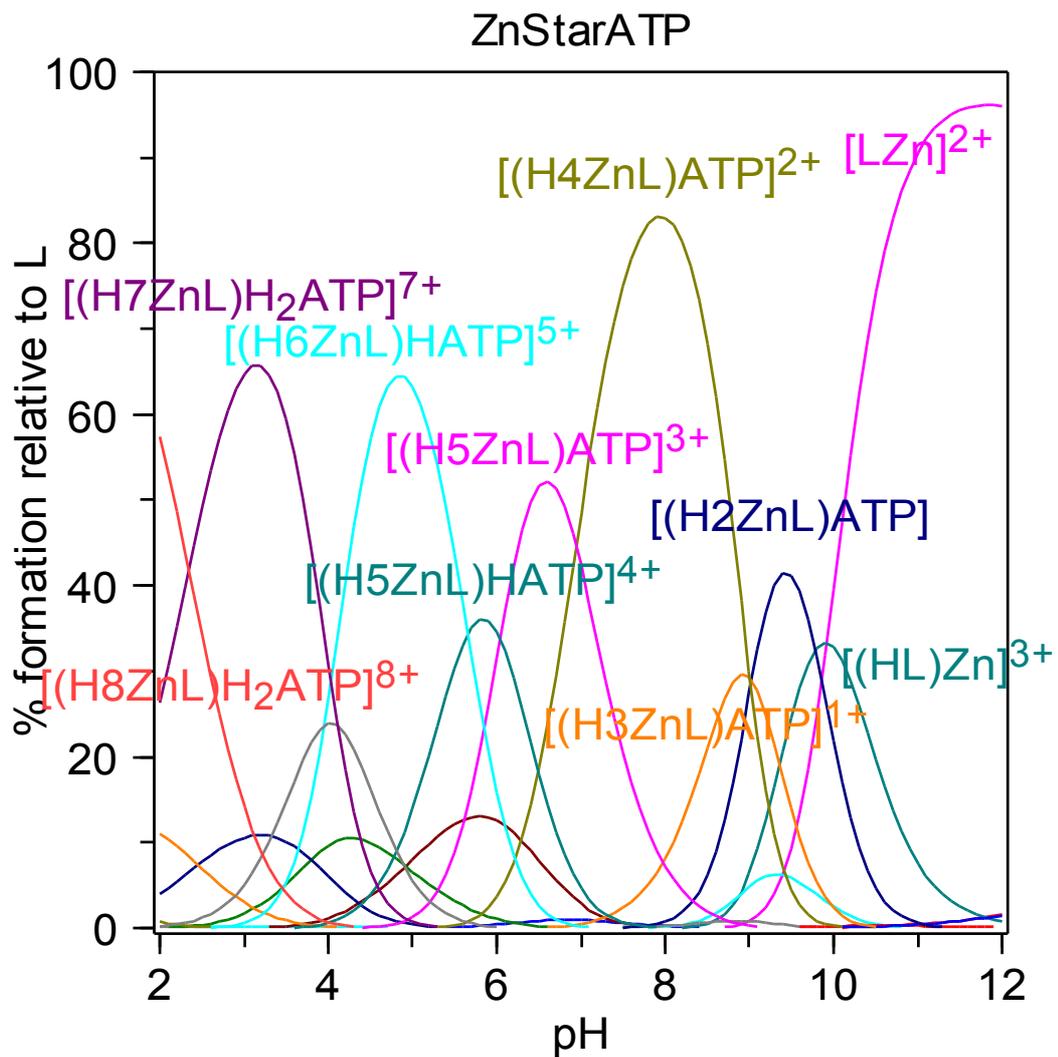


Figura 6.4.2.a Diagramma di distribuzione per il sistema LZn(II)-ATP.

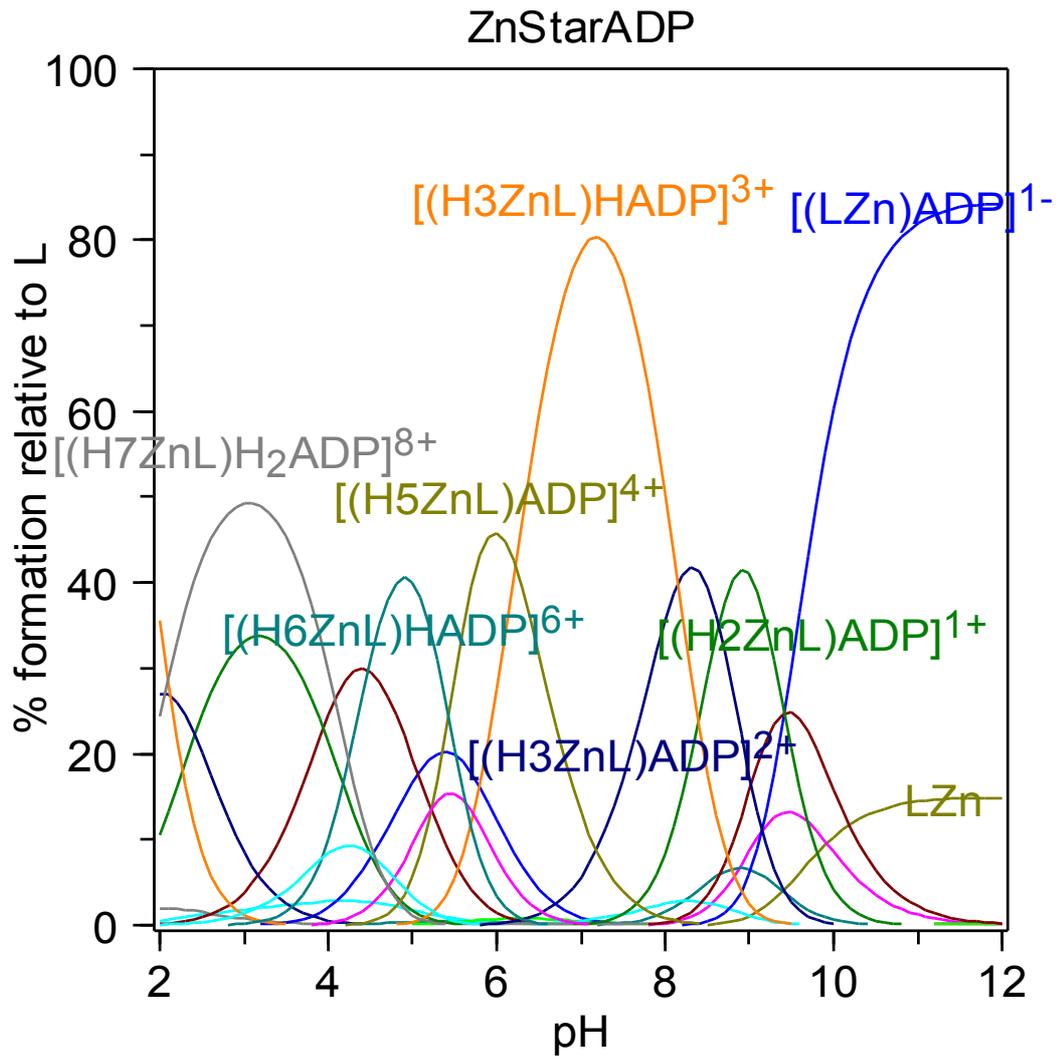


Figura 6.4.2.b Diagramma di distribuzione per il sistema LZn(II)-ADP.

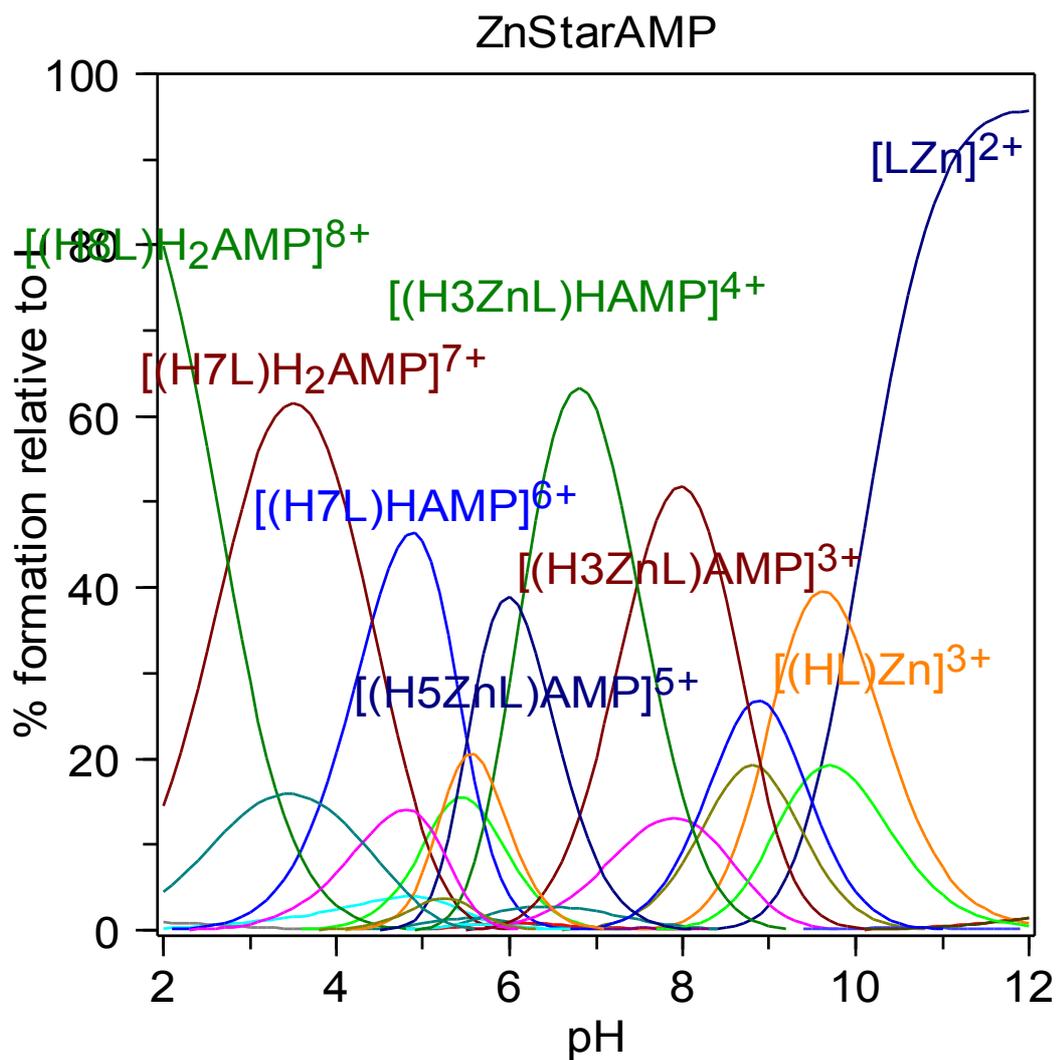
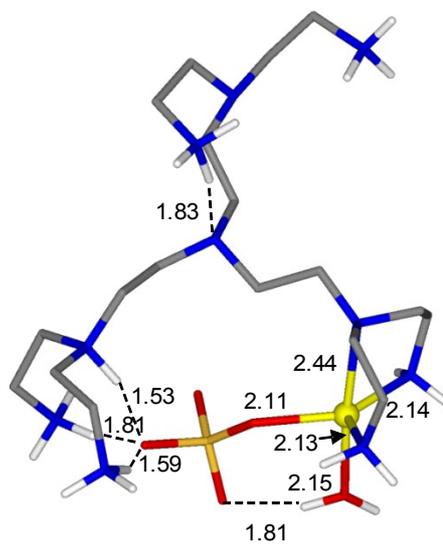
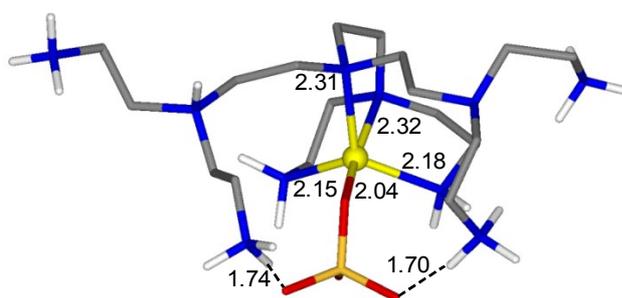


Figura 6.4.2.c Diagramma di distribuzione per il sistema LZn(II)-AMP.



(a)



(b)

Figura 6.4.3. Strutture di minima energia più abbondanti calcolate per il complesso ternario $[Zn(H_5L)SO_4]^{7+}$

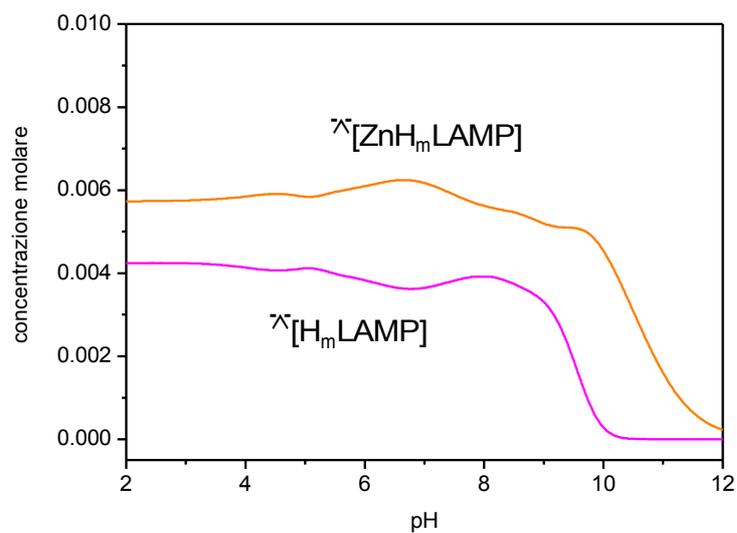
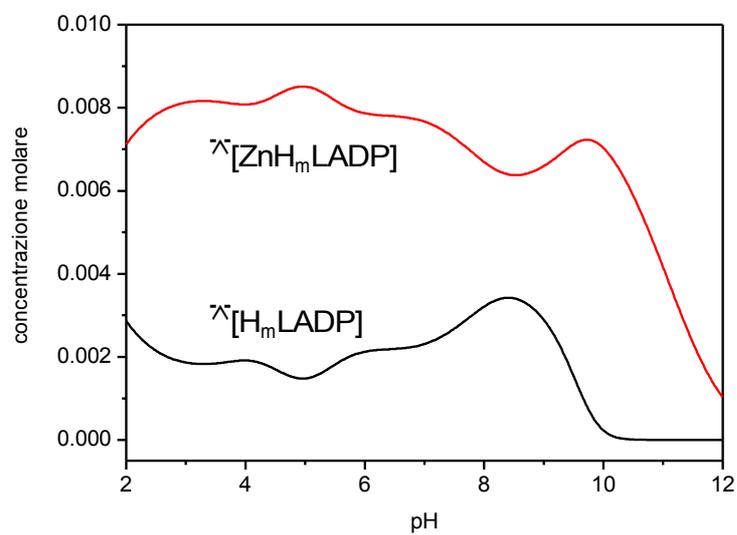
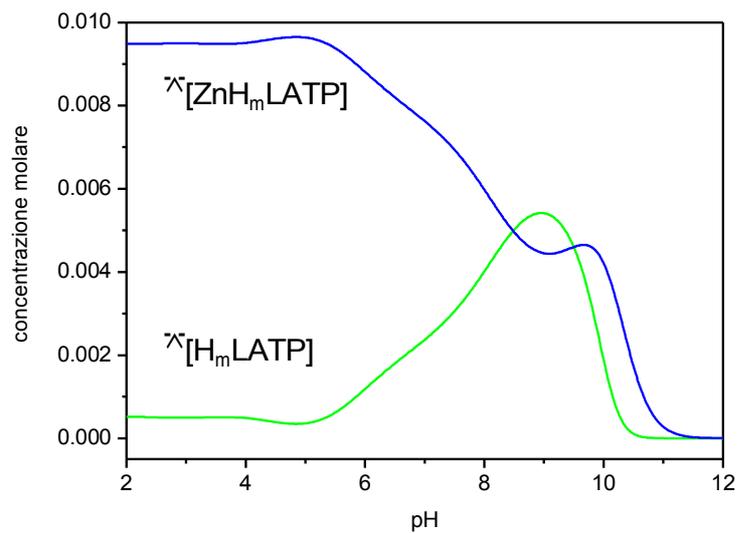
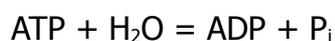


Figura 6.4.4.
 Diagrammi di
 distribuzione
 cumulativi
 rappresentanti la
 concentrazione
 totale di nucleotide
 legato ad L ed ai
 complessi di Zn(II)
 in sistemi composti
 da $[L] = 0.02 M$,
 $[Zn(II)] =$
 $[nucleotide] =$
 0.01 .

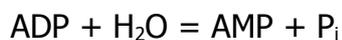
6.5 Attività catalita del legante L e dei suoi complessi mononucleari di Zn(II)

La capacità del legante L e dei suoi complessi mononucleari di Zn(II) di catalizzare la defosforilazione di ATP è stata studiata a pH 3 e pH 9 ed alla temperatura di 70°C mediante spettri NMR di ^{31}P . A scopo comparativo è stata studiata con la stessa tecnica e nelle stesse condizioni sperimentali anche l'idrolisi spontanea di questo nucleotide. Nelle Figure 6.5.4 e 6.5.5 sono riportati gli spettri ^{31}P NMR di ATP a pH 3 e pH 9, mentre nelle Figure 6.5.6 - 6.5.9 sono riportati gli spettri per i sistemi L/ATP ed L/Zn(II)/ATP agli stessi valori di pH.

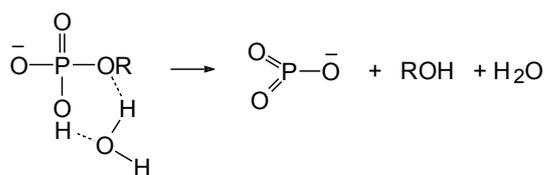
Come si può vedere da queste figure, in tutti i casi considerati, con il procedere del tempo, si osserva una riduzione dei segnali tipici di ATP accanto alla comparsa ed alla crescita dei picchi tipici di ADP e del fosfato inorganico (P_i), quale manifestazione di una progressiva defosforilazione di ATP secondo la reazione



Nell'idrolisi spontanea di ATP a pH 3, dove ATP si trova nella forma diprotonata $\text{H}_2\text{ATP}^{2-}$, si osserva accanto al picco del fosfato inorganico la comparsa tardiva di un secondo picco attribuibile alla formazione di AMP secondo la reazione



Tali reazioni sono favorite in ambiente acido dove il gruppo fosfato è protonato ed avvengono attraverso la formazione di metafosfato monomero quale intermedio labile.³⁶



Anche in presenza del legante L (Figura 6.5.6) e dei complessi di Zn(II) con L (Figura 6.5.8) a pH 3 si osserva la formazione di AMP. In accordo con ciò, in tali condizioni di pH, ADP si trova nella sua forma diprotonata H_2ADP^- (Tabella 6.1.1).

A pH 9, invece, non si osserva la formazione di AMP, nei tempi da noi osservati, nonostante che nei sistemi L/ATP e L/Zn(II)/ATP siano presenti specie nelle quali ADP è in forma monoprottonata HADP^{2-} .

E' stato osservato che quando sono presenti atomi di azoto non protonati nel legante, il meccanismo di defosforilazione di ATP catalizzato da leganti poliammonici decorre attraverso la formazione di un intermedio fosforamidato, molto labile e raramente osservabile negli spettri ^{31}P NMR.³⁷ Questo meccanismo (Figura 6.5.1) prevede l'attacco nucleofilo di un gruppo amminico non protonato sull'atomo di fosforo terminale di ATP seguito dalla formazione del fosforamidato che successivamente si idrolizza per dare fosfato inorganico. Un meccanismo analogo interviene nella catalisi di defosforilazione di ADP per dare AMP e fosfato inorganico. Tenuto conto che a pH 9, sia in assenza che in presenza di Zn(II), il legante contiene atomi di azoto non protonati, si può assumere che la reazione di defosforilazione decorra secondo il meccanismo appena descritto (Figura 6.5.1). Come nella maggior parte dei casi precedentemente studiati, anche nel presente non si osserva la formazione dell'intermedio fosforamidato, che è atteso essere molto labile.

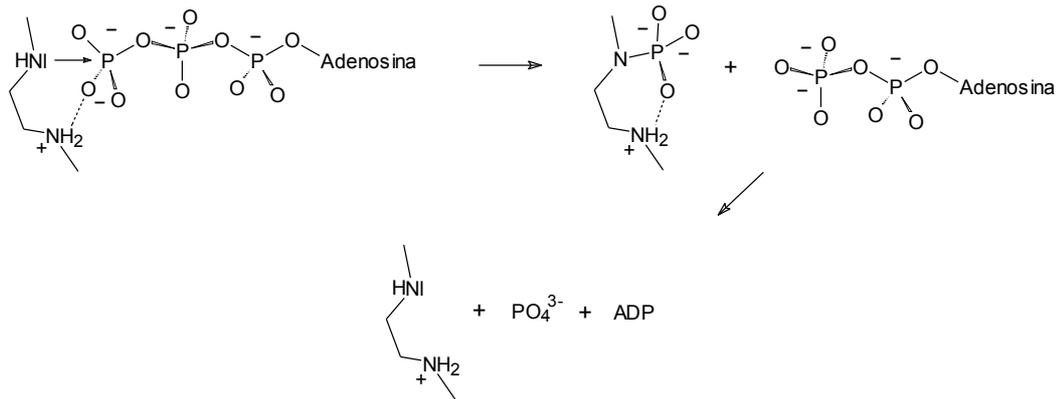


Figura 6.5.1. Meccanismo di de fosforilazione di ATP coinvolgente la formazione di un intermedio fosforamidato.

Utilizzando gli spettri riportati nelle Figure 6.5.4 - 6.5.9 è stato possibile determinare le cinetiche di defosforilazione di ATP nelle diverse condizioni sperimentali. Utilizzando il segnale dell'atomo di fosforo di ATP in posizione β per determinare la frazione di ATP che si idrolizza nel tempo è stato osservato che l'idrolisi del nucleotide avviene secondo una cinetica di primo ordine, soddisfacendo l'equazione:

$$\ln([ATP]/[ATP]_0) = -kt$$

dove $[ATP]$ = concentrazione di ATP a tempo t e $[ATP]_0$ = concentrazione iniziale di ATP, cioè a $t = 0$. In Figura 6.5.10 sono riportati i corrispondenti grafici, mentre i valori delle costanti di velocità sono stati raccolti in Tabella 6.5.2.

	pH	k ($\text{min}^{-1} \cdot 10^3$)
ATP	3	0.68 ± 0.02
ATP	9	0.041 ± 0.004
L + ATP	3	1.3 ± 0.1
L + ATP	9	0.19 ± 0.01
L + ATP + Zn^{2+}	3	2.8 ± 0.2
L + ATP + Zn^{2+}	9	0.25 ± 0.01

Tabella 6.5.2. Velocità di defosforilazione di ATP in presenza di L e dei suoi complessi con Zn(II) ottenute in soluzione acquosa a 70°C.

Come si può vedere da questa tabella, le velocità di defosforilazione sono maggiori a pH acido anche in presenza di L e dei suoi complessi con Zn(II). La velocità di defosforilazione del nucleotide in presenza di L aumenta di circa 2 volte a pH 3 e 5 volte a pH 9 rispetto alle analoghe reazioni in assenza di L. In presenza dei complessi di Zn(II) tale aumento è di circa 4 volte a pH 3 e 6 volte a pH 9.

Tali incrementi della velocità di defosforilazione sono piccoli se confrontati con quelli (circa 100 volte) mostrati dai leganti sintetici più efficienti, ma sono confrontabili con quelli ottenuti per molti leganti poliamminici sia macrociclici che aciclici.³⁸ Contrariamente a quanto comunemente osservato, nel caso di L il maggior incremento della velocità di defosforilazione si ottiene a pH alcalino, quando è possibile l'attuazione del meccanismo di idrolisi che coinvolge la formazione dell'intermedio fosforamidato. E' inoltre interessante notare che la presenza di un centro metallico (Zn(II)) favorisce la reazione di defosforilazione del nucleotide. Comunemente, la presenza di Zn(II) rallenta le reazioni di defosforilazione

di ATP in conseguenza della stabilità dei complessi ternari Zn(II)/L/ATP formati. In pochi casi la presenza di questo ione metallico ha prodotto un'accelerazione del processo, ed in tali casi questa accelerazione è stata attribuita ad una stabilizzazione dell'intermedio fosforamidato mediante sua coordinazione al centro metallico. Questa evenienza può spiegare l'accelerazione della reazione di defosforilazione osservata a pH 9 in presenza di Zn(II), mentre sembra improbabile che ciò sia possibile a pH 3 quando nel complesso non ci sono atomi di azoto disponibili per la formazione dell'intermedio fosforamidato. Si può ragionevolmente supporre che a pH 3 sia la coordinazione del fosfato terminale di ATP al centro metallico che catalizza la reazione di defosforilazione. La coordinazione di un atomo di ossigeno di questo gruppo fosfato determinerebbe uno spostamento di densità elettronica verso il metallo, con conseguente aumento della carica positiva sull'atomo di fosforo che così risulterebbe più disponibile all'attacco di una molecola di acqua (Figura 6.5.3).

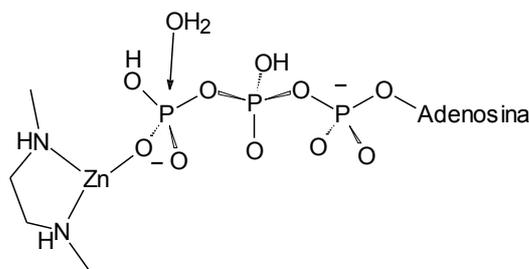


Figura 6.5.3. Meccanismo proposto per la defosforilazione di ATP in presenza dei complessi di L con Zn(II) a pH 3.

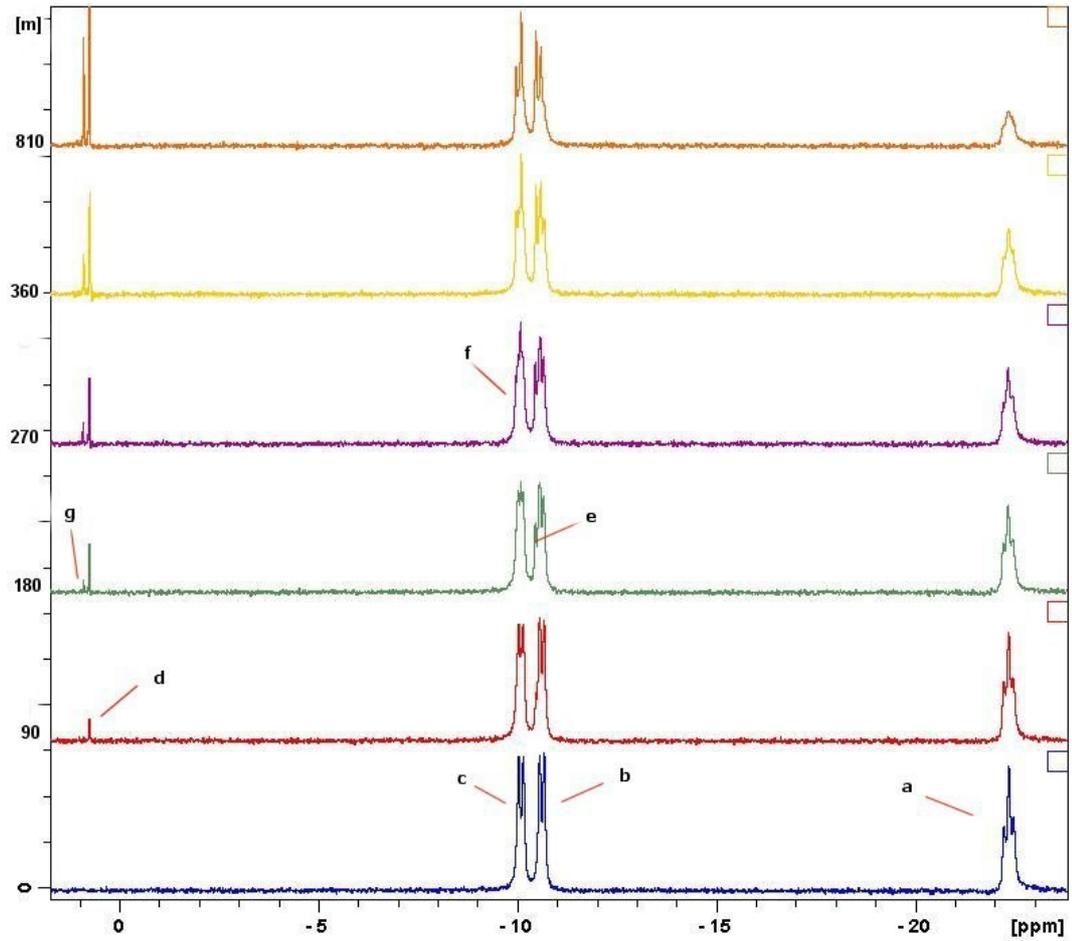


Figura 6.5.4. Spettro ^{31}P NMR di ATP a pH 3.

Segnale	Atomo di fosforo
a	$\text{P}_{\beta}^{\text{ATP}}$
b	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ATP}}$
c	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ATP}}$
d	P_i
e	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ADP}}$
f	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ADP}}$
g	p^{AMP}

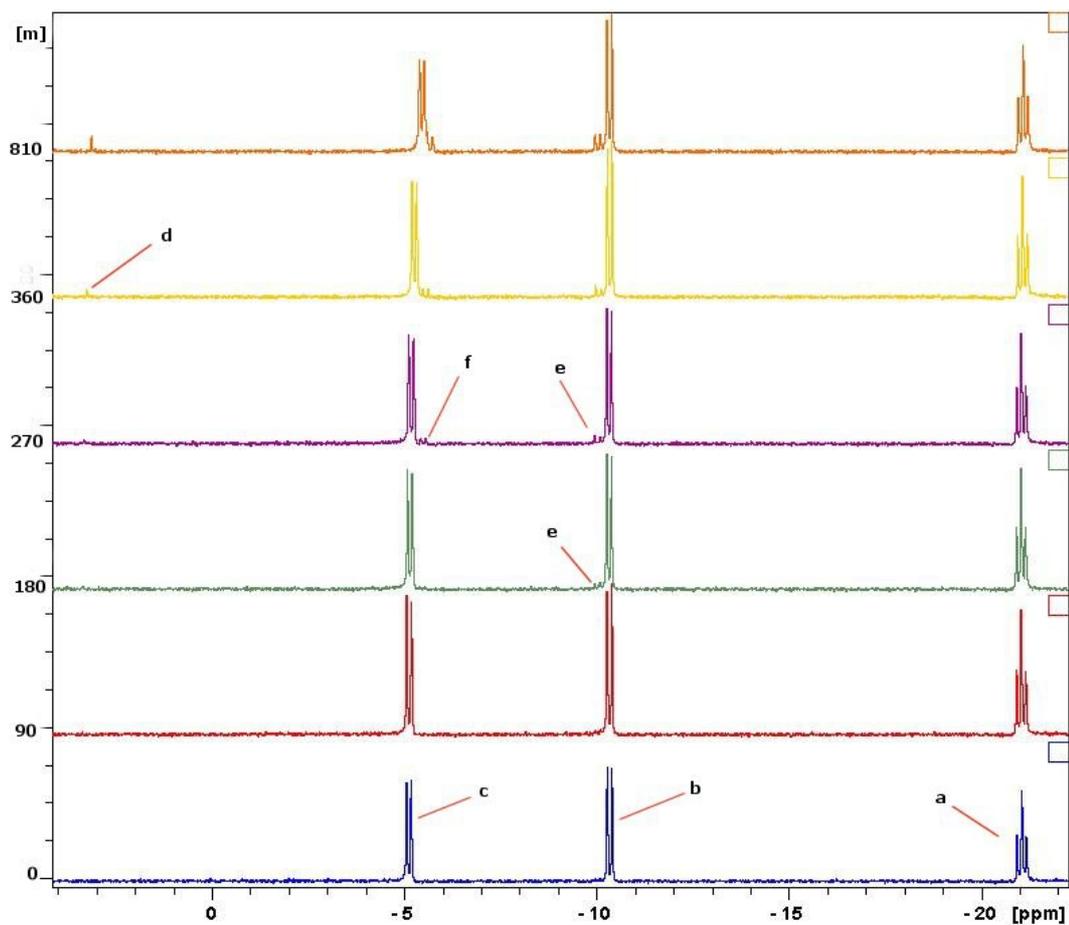


Figura 6.5.5. Spettro ^{31}P NMR di ATP a pH 9.

Segnale	Atomo di fosforo
a	$\text{P}_{\beta}^{\text{ATP}}$
b	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ATP}}$
c	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ATP}}$
d	P_i
e	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ADP}}$
f	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ADP}}$

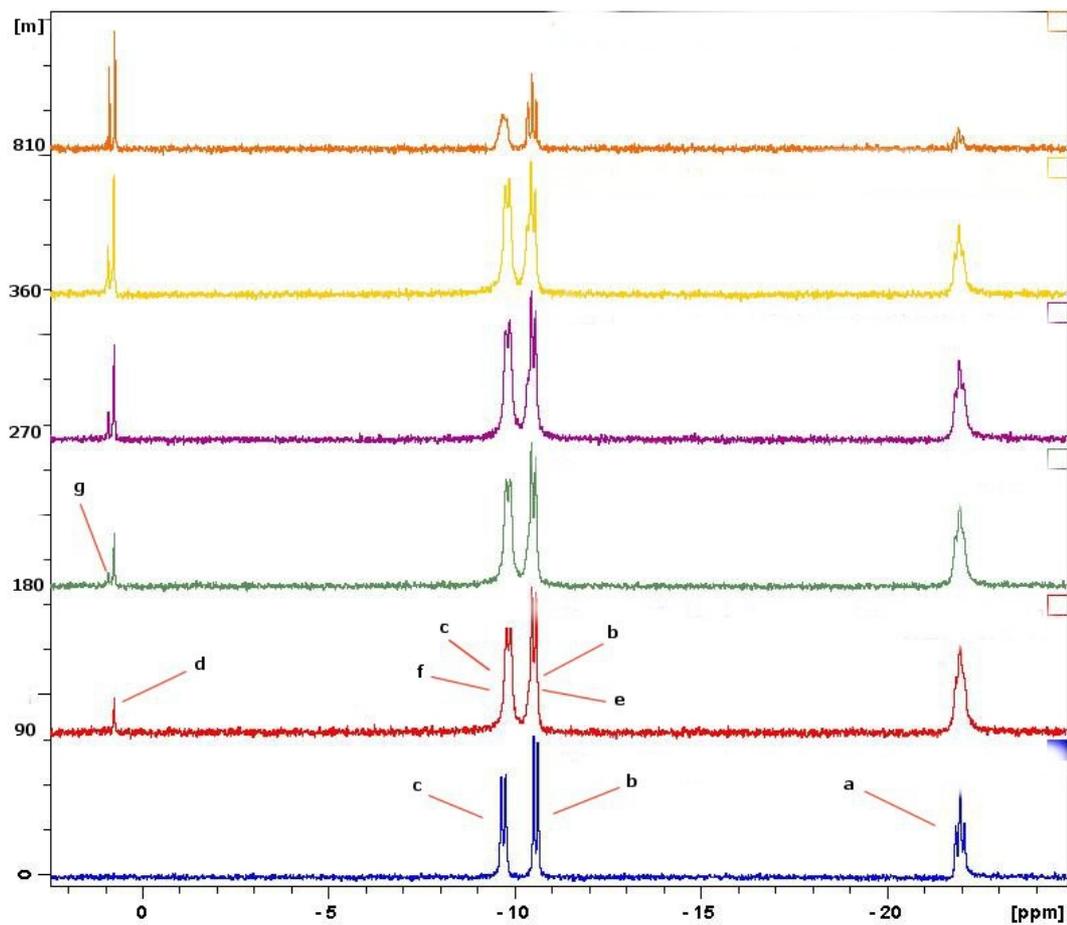


Figura 6.5.6. Spettro ^{31}P NMR di L-ATP a pH 3.

Segnale	Atomo di fosforo
a	$\text{P}_{\beta}^{\text{ATP}}$
b	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ATP}}$
c	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ATP}}$
d	P_i
e	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ADP}}$
f	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ADP}}$
g	p^{AMP}

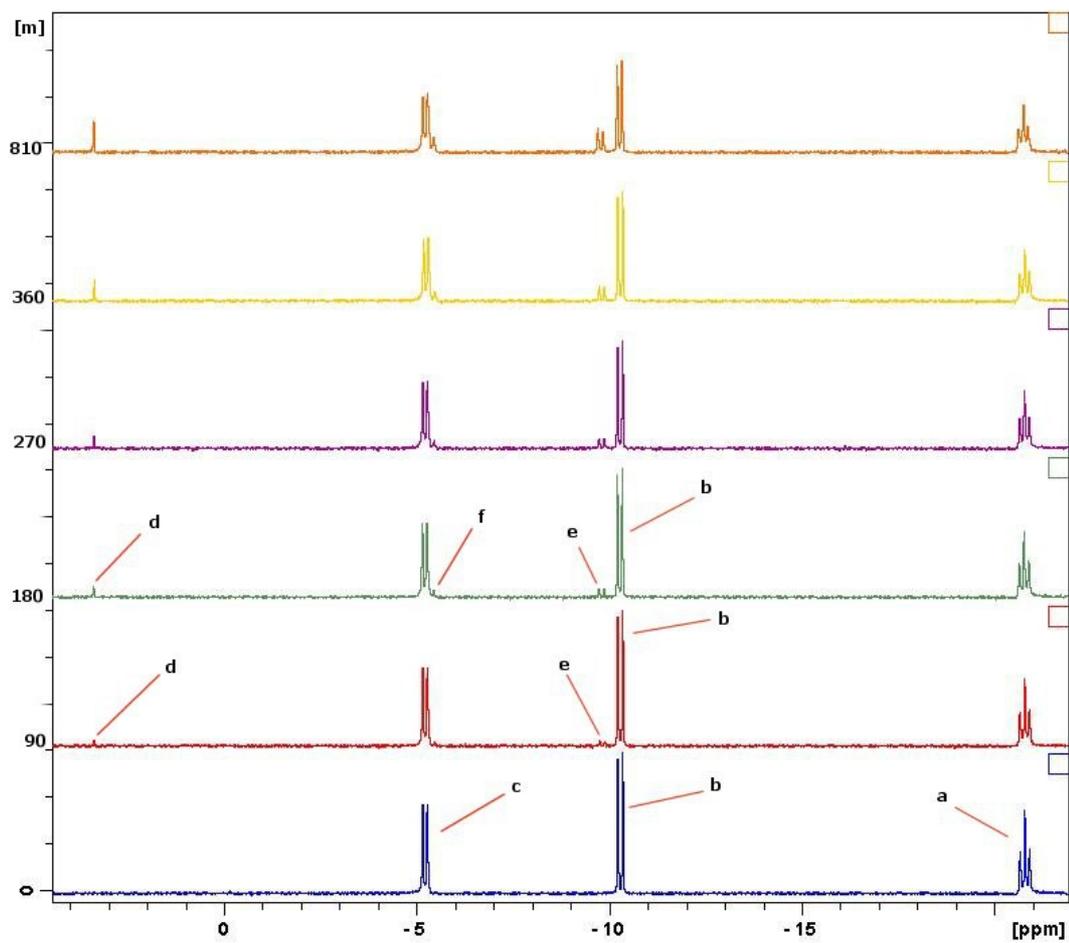


Figura 6.5.7. Spettro ^{31}P NMR di L-ATP a pH 9.

Segnale	Atomo di fosforo
a	$\text{P}_{\beta}^{\text{ATP}}$
b	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ATP}}$
c	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ATP}}$
d	P_i
e	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ADP}}$
f	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ADP}}$

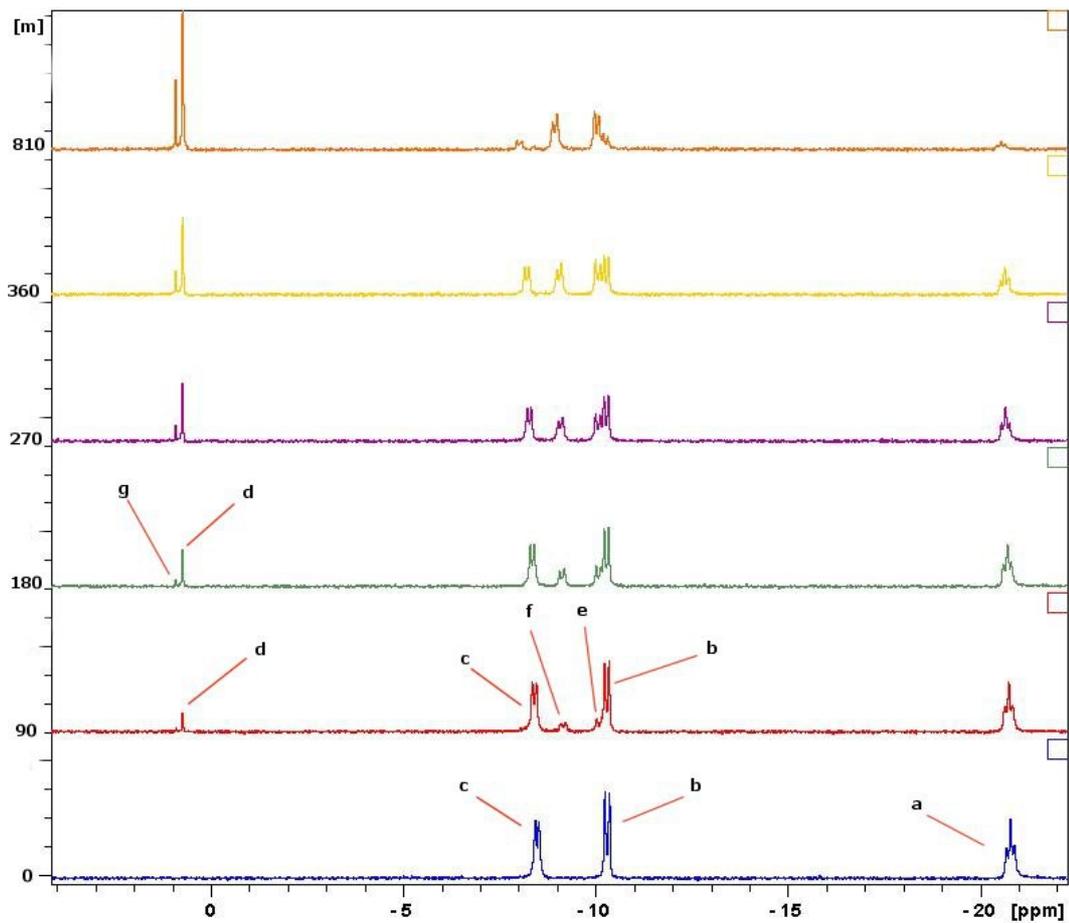


Figura 6.5.8. Spettro ^{31}P NMR di LZn(II)-ATP a pH 3.

Segnale	Atomo di fosforo
a	$\text{P}_{\beta}^{\text{ATP}}$
b	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ATP}}$
c	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ATP}}$
d	P_i
e	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ADP}}$
f	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ADP}}$
g	P^{AMP}

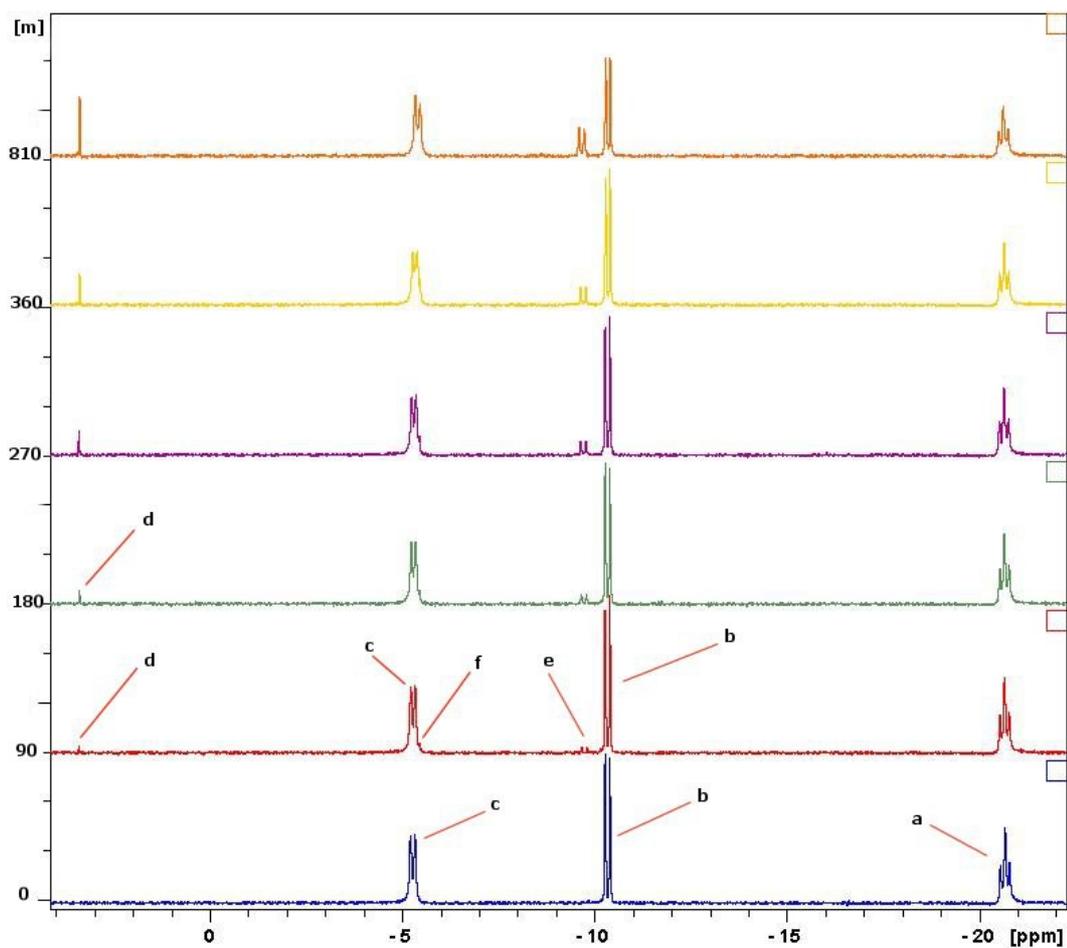
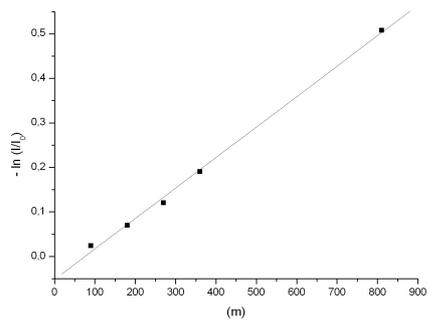
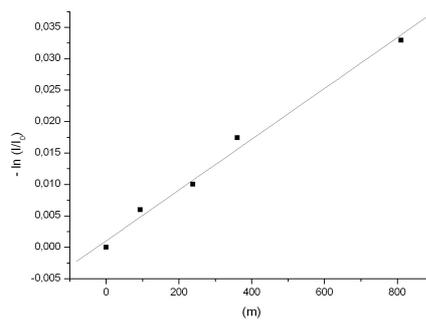


Figura 6.5.9. Spettro ^{31}P NMR di LZn(II)-ATP a pH 9.

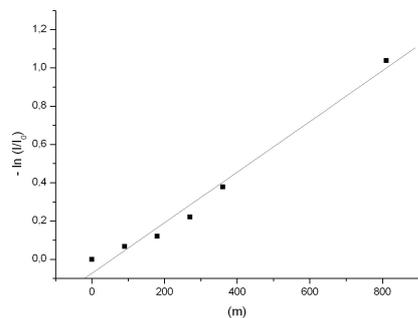
Segnale	Atomo di fosforo
a	$\text{P}_{\beta}^{\text{ATP}}$
b	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ATP}}$
c	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ATP}}$
d	P_i
e	$\text{P}_{\alpha}^{\text{ADP}}$
f	$\text{P}_{\gamma}^{\text{ADP}}$



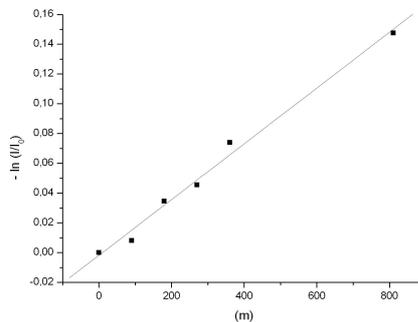
ATP pH 3



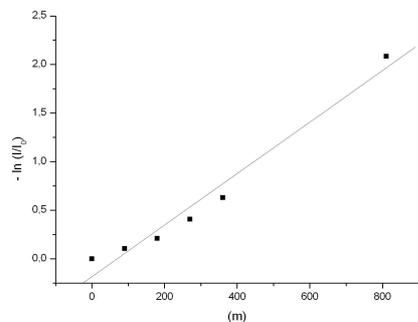
ATP pH 9



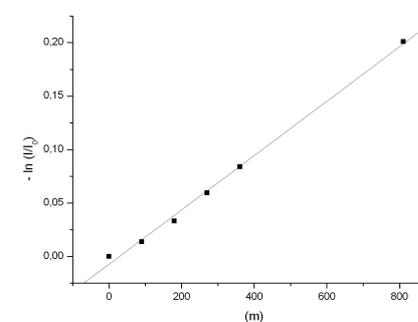
L-ATP pH 3



L-ATP pH 9



LZn(II)-ATP pH 3



LZn(II)-ATP pH 9

Figura 6.5.10. Cinetica di defosforilazione di ATP in presenza di L e dei suoi complessi di Zn(II) a pH 3 e pH 9.

I = concentrazione di ATP a tempo t, I₀ = concentrazione di ATP a a tempo t=0.

7. Conclusioni e sviluppi futuri

Questo lavoro di tesi ha evidenziato che:

- 1) il dendrimero poliamminico L interagisce efficientemente sia con anioni fosfato, difosfato e trifosfato che con le forme anioniche di AMP, ADP e ATP;
- 2) i complessi di Zn(II) con L sono migliori recettori delle specie protonate del legante in assenza di ione metallico;
- 3) sia L che i suoi complessi di Zn(II) accelerano la reazione spontanea di defosforilazione di ATP fino a 6 volte;
- 4) I complessi di Zn(II) con L sono più efficienti di L nell'accelerare la reazione di idrolisi di ATP sia a pH acido (pH 3) che a pH basico (pH 9)

Nel futuro questo lavoro sarà esteso:

- 1) allo studio delle cinetiche di defosforilazione di AMP in presenza di L e dei suoi complessi di Zn(II)
- 2) allo studio dei complessi di L con altri ioni metallici, quali Cd(II), Cu(II), Ca(II), Mg(II);
- 3) allo studio dei complessi polinucleari che L forma con gli ioni metallici;
- 4) all'inserimento in L di funzionalità aromatiche che facciano da siti di interazione con la parte aromatica dei nucleotidi.

8. Bibliografía

- ¹ Paul D. Beer, Philip A. Gale and David K. Smith, "Supramolecular Chemistry", Oxford University Press, 1999
- ² Jonathan L. Sessler, Philip A. Gale and Won-Seoh Cho, "Anion Receptor Chemistry", RSC Publishing, 2006
- ³ J.W. Steel and J.L. Atwood, "Supramolecular chemistry", 2nd edition, John Wiley & Sons, Ltd, 2009
- ⁴ E. Garcia-España, R. Belda, J. Gonzalez, J. Pitarch and A. Bianchi, "Supramolecular chemistry: from molecules to nanomaterials" Online John Wiley & Sons, Ltd 2012
- ⁵ B. Dietrich, M. W. Hosseini, and J.M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 1282-1283
- ⁶ E. Kimura, M. Kodama and T. Yatsunami, *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 3182-3187
- ⁷ I. Tabushi, Y. Kobuke and J.I. Imuta, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 6152-6157
- ⁸ A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-España *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 188, 97-156
- ⁹ A. Andres, J. Aragò, A. Bencini *et al.*, *Inorg. Chem.*, 1993, 32, 3418-3424
- ¹⁰ A. Bencini, A. Bianchi, M.I. Burguete, *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2* 1991, 1445-1451
- ¹¹ M.T. Albelda, E. Garcia-España, H. R. Jimenez, *et al.*, *Dalton Trans.*, 2006, 4474-4482
- ¹² M. W. Hosseini, A.J. Blacker and J.M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*,

- 1990, 112, 3896-3904
- ¹³ J. Aguilar, E. Garcia-España, J.A. Guerrero, *et al.*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, 2237-2239
- ¹⁴ J. Aguilar, E. Garcia-España, J.A. Guerrero, *et al.*, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, 246, 287-294
- ¹⁵ M. T. Albelda, M. A. Bernardo, E. Garcia-España, *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1999, 2545–2549
- ¹⁶ A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-España, *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 188, 97–156
- ¹⁷ A. Bianchi, M. Micheloni, and P. Paoletti, *Inorg. Chim. Acta*, 1988, 151, 269–272
- ¹⁸ J. F. Marececk and C. J. Burrows, *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 5943–5946.
- ¹⁹ E. Kimura, Y. Kuramoto, T. Koike, *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 42–46.
- ²⁰ A. Bencini, A. Bianchi, M. I. Burguete, *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1991, 1445–1451.
- ²¹ A.-S. Del'ephine, R. Tripier, and H. Handel, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 1743–1750.
- ²² A. Bencini, S. Biagini, C. Giorgi, *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 5610–56121.
- ²³ A. Bencini, S. Biagini, C. Giorgi, *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 5610–56121.
- ²⁴ (a) G. J. Bridger, R. T. Skerlj, S. Padmanabhan, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1996, 39(1), 109–119; (b) Z. Guo, and P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, 2000, 48, 183–306; (c) E. Kikuta, S. Aoki, and E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 7911–7912.
- ²⁵ (a) P. Schiessl and F. P. Schmidtchen, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 2449–2452; (b) P. Schiessl and F. P. Schmidtchen, *J. Org. Chem.* 1994, 59, 509–511; (c) M. Haj-Zaroubi and F. P. Schmidtchen,

- ChemPhysChem*, 2005, 6, 1181–1186
- ²⁶ (a) M. Shionoya, E. Kimura, and M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 6730–6737; (b) M. Shionoya, T. Ikeda, E. Kimura, and M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 3848–3859; (c) S. Aoki, Y. Honda, and E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 1018–1026; (d) E. Kikuta, M. Murata, N. Katsube, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 5426–5436; (e) S. Aoki and E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 4542–4548; (f) S. Aoki and E. Kimura, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 769–787
- ²⁷ J. Aguilar, P. Díaz, F. Escartó, *et al.*, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, 339, 307–316
- ²⁸ M. W. Hosseini, J.M. Lehn S.R. Duff, *et al.*, *J. Org. Chem.* 1987, 52, 1662-1666.
- ²⁹ A. Bencini, A. Bianchi, E. García-España, *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 1992, 20, 8–29
- ³⁰ P. G. Yohannes, M. P. Mertes, and K. B. Mertes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 8288–8289
- ³¹ P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* 1996, 43, 1739-1753
- ³² A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.* 1968, 40, 700-706
- ³³ C. Bazzicalupi, A. Bianchi, C. Giorgi, P. Gratteri, P. Mariani, B. Valtancoli, risultati in corso di pubblicazione
- ³⁴ R. M. Smith, A. E. Martell, NIST Stability Constants Database, Version 4.0, National Institute of Standards and Technology, Washington, 1997.
- ³⁵ 4) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, M. Cecchi, B. Escuder, V. Fusi, E. García-España, C. S. V. Giorgi, Luis, G. Maccagni, V. Marcelino, P. Paoletti, B. Valtancoli, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 6807-6815
- ³⁶ F. Ramirez, J. F. Marecek, *Pure & Appl. Chem.* 1980, 52, 1021-1045.

- F. Ramirez, J. F. Marecek, J. Szamosi, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4748-4752.
- ³⁷ M.W. Hosseini, *Supramolecular Catalysis of Phosphoryl Anion Transfer Processes in Supramolecular Chemistry of Anions*, A. Bianchi, K. Bowman-James, E. Gracia-España (Eds.), Wiley-VCH, New York, 1996, pp. 421-448.
- ³⁸ A. Bencini, A. Bianchi, E. Gracia-España, E. C. Scott, L. Morales, B. Wang, T. Deffo, F. Takusagawa, M. P. Mertes, K. Bowman Mertes, P. Paoletti, *Bioorg. Chem.* 1992, *20*, 8-29. A. Andrés, J. Aragón, A. Bencini, A. Bianchi, A. Domenech, V. Fusi, E. Gracia-España, P. Paoletti, J. A. Ramírez, *Inorg. Chem.* 1993, *32*, 3418-3424

