

*Università degli Studi di Firenze*

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

***Un recettore poliammonico contenente l'unità acridina  
come sensore di fluorescenza per anioni***

*An acridine-containing polyammonium receptor as fluorescent sensor for  
anions*

Tesi sperimentale di laurea  
di  
**Luca Giannerini**

Relatore  
**Prof. Andrea Bencini**

Correlatore  
**Dott.ssa Cristina Gellini**

*Anno Accademico 2012-2013*

<b>Capitolo 1, Introduzione.....</b>	<b>3</b>
1.1 La chimica supramolecolare e caratteristiche host - guest.....	3
1.2 Natura delle interazioni Supramolecolari.....	4
1.3 Il riconoscimento molecolare.....	7
1.4 I leganti macrociclici.....	9
1.5 I chemosensori.....	13
1.6 La fluorescenza e i processi radiativi.....	16
1.7 I chemosensori fluorimetrici.....	18
1.8 Il processo PET.....	19
1.9 Trasferimento energetico elettronico (EET).....	21
1.10 Sensori fluorimetrici per specie anioniche.....	22
1.11 I recettori poliamminici.....	26
1.12 Acridina.....	27
1.13 Le interazioni anione- $\pi$ .....	31
1.14 Obiettivi del progetto di tesi.....	36
<b>Capitolo 2, Parte sperimentale.....</b>	<b>38</b>
2.1 Sintesi del legante macrociclico	
2.1.1 Sintesi di 4,5-bis(bromometil)acridina.....	38
2.1.2 Sintesi di 2,5,8,11-tetratosil-2,5,8,11-tetraaza[12] -4,5- acridinofano.....	40
2.1.3 Sintesi del legante macrociclico Acry222IN(2,5,8,11-tetraza[15]-4,5-acridinofano).....	43
2.2 Ottenimento dell'ammina libera Acri222IN.....	45
2.3 Spettrofotometria UV-visibile ed emissione di fluorescenza	
2.3.1 Misure fluorimetriche a diversi valori di pH.....	46
2.3.2 Misura delle costanti di stabilità dei complessi.....	48
2.4 Misure in glove box.....	50

<b>Capitolo 3, Discussione.....</b>	<b>51</b>
3.1 Sintesi del legante.....	51
3.2 Equilibri acido-base.....	52
3.3 Spettrofotometria di assorbimento.....	54
3.4 Emissione di fluorescenza	
3.4.1 Emissione di fluorescenza dell'acridina.....	58
3.4.2 Emissione di fluorescenza del legante.....	60
3.5 Interazione del legante con anioni e sua analisi tramite spettroscopia di emissione di fluorescenza.....	64
3.5.1 Misure in presenza di ione fluoruro.....	67
3.5.2 Misure in presenza di ione cloruro.....	69
3.5.3 Misure in presenza di ione bromuro.....	71
3.5.4 Misure in presenza di ione ioduro.....	72
3.5.5 Misure in presenza di ione nitrato.....	74
3.5.6 Misure in presenza di ione solfato.....	75
3.6 Misura delle costanti di complessazione.....	77
 <b>Capitolo 4, Conclusioni.....</b>	 <b>85</b>

# Capitolo 1: Introduzione

## 1.1 La chimica supramolecolare e caratteristiche host - guest

La chimica supramolecolare<sup>1</sup> è quel settore della chimica che si propone come obiettivo lo studio della struttura e delle proprietà degli addotti che si formano tra due o più specie guidati da forze considerate deboli come il legame a idrogeno, le forze di van der Waals, interazioni di tipo elettrostatico, interazioni di stacking ed effetto idrofobo.

Gli addotti formati pur essendo costituiti da forze non covalenti, hanno caratteristiche chimico - fisiche diverse rispetto alle molecole che li compongono. Infatti solitamente i numerosi legami deboli presenti garantiscono una notevole stabilità al composto formato. La stabilità non è l'unica caratteristica di questi sistemi, la presenza di legami a bassa energia infatti dona alla molecola la capacità di dare vita a processi, talvolta anche molto complicati, di riarrangiamento. L'insieme di questi processi è la chiave alla base di tutti i meccanismi biologici, dall'associazione delle proteine alla trascrizione del codice genetico, alla trasmissione di segnali da parte di neurotrasmettitori e il trasporto di molecole o ioni attraverso membrane biologiche

La chimica supramolecolare nella sua forma più semplice considera quei sistemi in cui si verifica un' interazione non covalente tra una molecola

---

<sup>1</sup> Donald Cram (D.J. Cram, *Preorganisation - from solvents to spherands*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 1039)

accettore (host), ed una seconda molecola (guest). Nella maggior parte dei casi la specie "host" è una molecola ad alto peso molecolare oppure una macromolecola (come un enzima) che presenta una cavità in grado di ospitare la specie "guest".

Il guest può essere un catione monoatomico, un anione inorganico oppure una molecola più sofisticata. Si usa anche definire la specie host come un'entità molecolare che possiede siti di legame convergenti (basi di Lewis, e donatori di legami a idrogeno), mentre la specie guest possiede siti di legame divergenti (come un catione metallico sferico, che funziona da acido di Lewis, o un anione, o un accettore di legame ad idrogeno).

## 1.2 Natura delle interazioni Supramolecolari

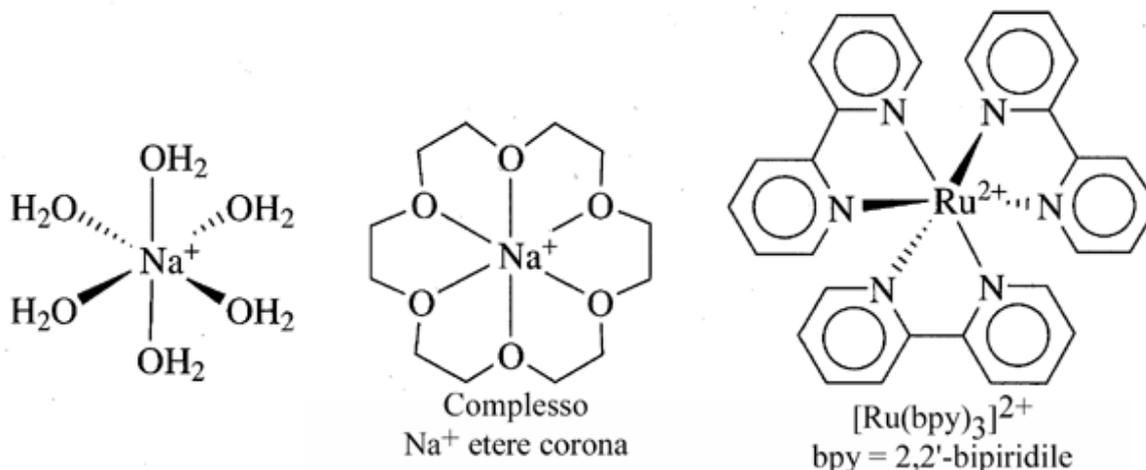
Tutto lo studio della chimica supramolecolare riguarda esclusivamente le interazioni di tipo non covalente<sup>2</sup>. Il termine non covalente comprende un'enorme gamma di forze attrattive e repulsive. In questo paragrafo prenderemo in considerazione le principali riportando esempi con le relative energie di interazione.

---

<sup>2</sup> G.A. Jeffrey, (*An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press: Oxford, 1997); D. Braga, F. Grepioni, J.J. Novoa (*Inter-anion O-H-O hydrogen bond like interactions: the breakdown of the strength-length analogy*, Chem. Commun., 1998, 1959).

- Interazione Ione-Dipolo (50-200kJ/mol)

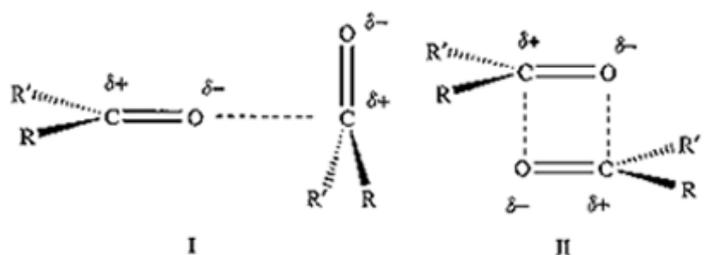
Un semplice esempio è rappresentato da uno ione come  $\text{Na}^+$  che interagisce con una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$  durante il processo di solvatazione. In campo supramolecolare, interazioni simili si osservano nelle strutture dei complessi di cationi metallici con eteri macrociclici detti eteri a corona. In quest'ultimo caso gli ossigeni dell'etere svolgono lo stesso ruolo delle molecole polari dell'acqua. Infatti i doppietti solitari dell'ossigeno sono attratti dalla carica positiva del catione.



- Interazioni dipolo-dipolo (5-50kJ/mol)

La presenza di dipoli può originare interazioni significative, sia per contatto su una singola coppia di poli posti su molecole adiacenti (caso I) sia per allineamento di un dipolo con l'altro (caso II).

Un chiaro esempio è mostrato dal comportamento dei composti organici carbonilici, che mostrano queste interazioni allo stato solido. Tramite calcoli teorici si è visto che interazioni di tipo II hanno un'energia di 20 kJ/mol, comparabile con un legame ad idrogeno moderatamente forte. Le interazioni dipolo-dipolo in fase liquida sono molto più deboli, a causa della solvatazione delle specie interagenti.

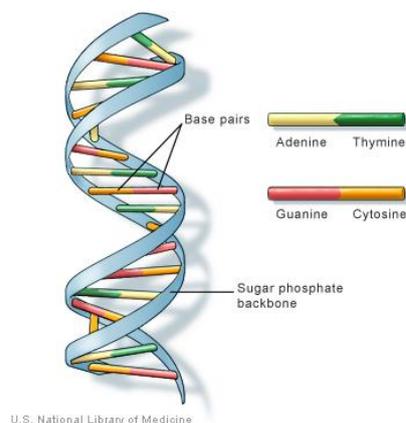


Interazioni dipolo-dipolo dei composti carbonilici

- Legame ad idrogeno (4-120 kJ/mol)

Il legame ad idrogeno può essere considerato come una particolare interazione dipolo-dipolo in cui un atomo di idrogeno, legato ad un atomo elettronegativo, viene attratto da un vicino dipolo di una molecola o un gruppo funzionale adiacente. A causa della sua natura, il legame ad idrogeno è un legame altamente direzionale ed è una delle interazioni basilari nella chimica supramolecolare. La sua forza di interazione dipende in maniera significativa dal suo intorno chimico, infatti la sua energia di legame varia da 120 a 4 kJ/mol. Questa tipologia di legame è la principale responsabile della struttura globale di molte proteine, del riconoscimento

di substrati da parte di molti enzimi e della stessa struttura a doppia elica del DNA.



*Figura 1.1:* struttura a doppia elica del DNA.

### 1.3 Il riconoscimento molecolare

Uno degli aspetti più interessanti della chimica supramolecolare è la coordinazione selettiva di una specie chimica in presenza di altre specie. La specie riconosciuta presenta la più alta complementarità strutturale ed elettronica con il recettore realizzando così il maggior numero di contatti di legame. Questa proprietà va sotto il nome di riconoscimento molecolare. I requisiti fondamentali affinché la coordinazione avvenga selettivamente sono due.

1. Complementarità stereochimica dei siti di coordinazione: i siti di legame del recettore devono avere una disposizione corrispondente ai siti di legame del substrato in modo tale da realizzare il maggior numero di interazioni non covalenti possibili e garantire la stabilità dell'addotto supramolecolare.

2. Pre-organizzazione: consiste nel mantenimento della conformazione originaria del legante quando lega il substrato; in questo modo l'energia necessaria per portare il recettore nella conformazione finale sarà minore e quindi la specie formata sarà più stabile.

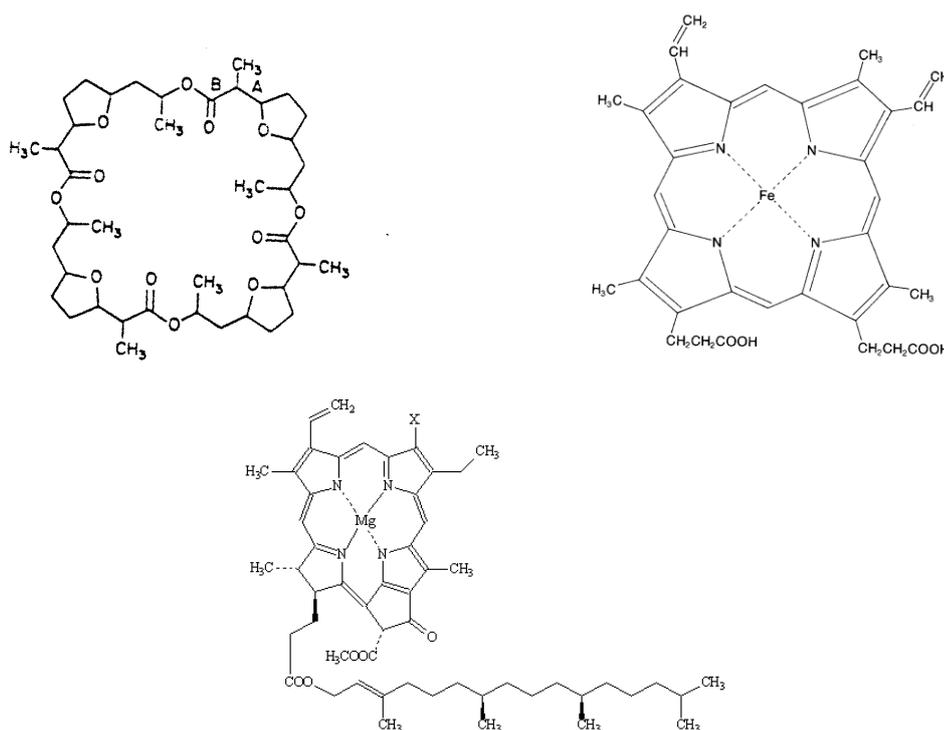
Affinchè il recettore riesca ad "avvolgere" il substrato serve che il primo abbia una forma, dimensione e architettura specifica. Tanto più il recettore ed il substrato sono complementari e pre-organizzati, tanto più sarà selettivo il processo di riconoscimento molecolare.

È possibile fare distinzioni tra i tipi di substrato che possiamo trovare. Questi possono essere sia cationici, (ioni metallici o molecole contenenti residui carichi positivamente), anionici (alogenuri, carbossilati e altri gruppi carichi negativamente) oppure molecole neutre.

L'importanza dello studio del riconoscimento molecolare ha portato alla necessità di studiare e progettare nuovi leganti ed i loro processi di interazione con diversi substrati. Questi studi hanno portato sia ad una migliore conoscenza dei requisiti stereo-elettronici che recettore e substrato devono possedere perché la coordinazione abbia luogo, sia delle forze che intervengono nella formazione del complesso recettore-substrato.

## 1.4 I leganti macrociclici

Un legante macrociclico è definito come una molecola ciclica polidentata caratterizzata da una cavità all'interno della quale sono affacciati almeno tre atomi donatori che possono funzionare da siti di legame per il substrato. Le molecole macrocicliche si sono dimostrate ottimi recettori sia per specie cationiche che anioniche e sono oggetto di numerosi studi di design molecolare. I principali esponenti dei macrocicli naturali sono: l'eme presente nei globuli rossi, la clorofilla e l'antibiotico naturale valinomicina. Quest'ultimo è capace di coordinare selettivamente lo ione potassio e veicolarlo attraverso barriere lipidiche e membrane cellulari.

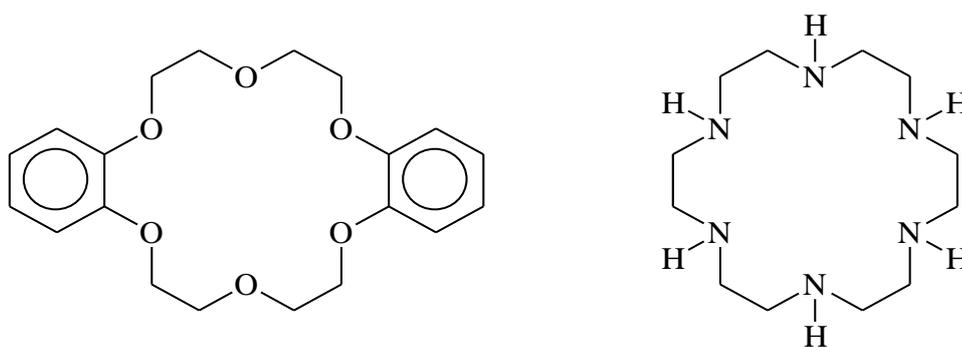


**Figura 1.2:** Alcuni macrocicli naturali valinomicina, eme e clorofilla.

I primi leganti macrociclici ad essere studiati furono gli eteri a corona, molecole cicliche contenenti atomi di ossigeno come atomi donatori. Questi leganti suscitarono un elevato interesse in quanto sono capaci di coordinare in modo selettivo metalli alcalini e alcalino-terrosi.

Più recentemente queste molecole sono state utilizzate come recettori per cationi organici contenenti gruppi ammonici con i quali gli eteri a corona interagiscono tramite legami a idrogeno.

Un' altra classe di composti particolarmente versatile è costituita dai poliazacicloalcani, molecole cicliche con atomi di azoto come atomi donatori. Queste poliammine sono capaci sia di coordinare cationi appartenenti alla serie di transizione che di formare complessi con metalli alcalini e alcalino terrosi e dare luogo a equilibri di protonazione in soluzione acquosa. Questi leganti, grazie alle specie altamente cariche che si formano in soluzione acquosa possono anche fungere da leganti per la coordinazione anionica tramite interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno.



**Figura 1.3:** Dibenzo-[18] crown-6 e 1,4,7,10,13,16-esaazacicloottadecano.

Nella struttura del macrociclo possono essere introdotti anche altri tipi di gruppi opportunamente funzionalizzati in modo da massimizzare le interazioni tra recettore e substrato; è questo lo scopo del design molecolare.

Il tipo di gruppi introdotti dipende dalla struttura del guest: ad esempio, se il substrato ha una parte aromatica, si introducono sostituenti aromatici nell'anello del macrociclo, oppure si inseriscono sull'anello dei bracci con sostituenti aromatici alle estremità.

Il riconoscimento dell'importanza di funzioni biologiche, quali meccanismi respiratori e fotosintetici svolti da composti di coordinazione di leganti macrociclici, ha dato un forte impulso iniziale allo studio di questi composti naturali ed ha successivamente contribuito a mantenere alto l'interesse per la chimica dei leganti ciclici in generale. La presenza in natura di simili composti di coordinazione è fortemente motivata dalla loro elevata stabilità cinetica e termodinamica che permette agli ioni coordinati, ad esempio il ferro nelle emoproteine o il magnesio nella clorofilla, di essere saldamente trattenuti nelle cavità macrocicliche garantendo il mantenimento delle funzioni biologiche.

La possibilità di produrre per via sintetica leganti utilizzabili come modelli per i sistemi biologici ha dato avvio alla preparazione di vaste categorie di molecole macrocicliche.

Esiste un numero elevato di procedure sintetiche per l'ottenimento di poliazacicloalcani<sup>3,4</sup>. Tuttavia, nella maggior parte delle sintesi riportate vengono seguiti dei criteri generali, che consentono la suddivisione delle procedure adottate in due categorie principali: le sintesi mediante metodi diretti e le sintesi metallo assistite, dette anche sintesi template.

---

<sup>3</sup> R. M. Izatt, J. J. Christensen, *Synthetic Multidentate Macrocyclic Ligands*, Academic Press, New York 1978.

<sup>4</sup> S. Karbach, W. Löhr, F. Vögtle, *J.Chem. Res.(s)*, (1981) 314.

Molti sistemi macrociclici sono realizzati attraverso procedure multistep, all'interno delle quali possono essere ravvisate le caratteristiche di entrambe le categorie, può quindi essere piuttosto difficile riuscire a definire con esattezza il ruolo del metallo.

La sintesi diretta è una reazione di doppia condensazione equimolecolare tra due frammenti opportunamente funzionalizzati<sup>5,6</sup>. La prima condensazione tra le specie reagenti è intermolecolare ed è seguita da una condensazione intramolecolare (testa-coda) che porta alla chiusura dell'intermedio. Durante il secondo stadio, si possono generare delle specie non desiderate, a causa di reazioni di oligomerizzazione e polimerizzazione che competono con il processo di condensazione principale. Per ovviare a questo inconveniente, generalmente si opera in condizioni di alta diluizione<sup>7,8</sup>. I reagenti sono aggiunti separatamente e contemporaneamente nell'ambiente di reazione a velocità molto basse; questo è necessario affinché, istante per istante, le condizioni siano di alta diluizione, così da favorire la condensazione intramolecolare.

L'applicazione di questa tecnica richiede che le reazioni di condensazione siano cineticamente veloci e che le specie reagenti e i prodotti siano stabili durante i lunghi tempi richiesti. In ogni caso anche questa tecnica riesce a ridurre solo parzialmente la formazione di oligomeri e polimeri.

La sintesi metallo-assistita è caratterizzata dall'intervento diretto di uno ione metallico<sup>9,10</sup>, secondo due diversi possibili meccanismi. Si parla di effetto templato termodinamico quando l'intervento dello ione metallico nell'ambiente di reazione determina la formazione di una specie ciclica

---

<sup>5</sup> J. E. RICHMAN, T. J. ATKINS, *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 2268.

<sup>6</sup> A. BIANCHI, M. CIAMPOLINI, M. MICHELONI, N. NARDI, B. VALTANCOLI, S. MANGANI, E. GARCIA-ESPAÑA, J. A. RAMIREZ, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* (1989) 1131.

<sup>7</sup> J. E. BALDWIN, P. PERMUTTER, *Top. Curr. Chem.*, **121** (1984), 181.

<sup>8</sup> B. DIEDERICH, J. M. LEHN, J. P. SAUVAGE, J. BLANZAT, *Tetrahedron*, **29** (1973) 1629.

<sup>9</sup> B. DIEDERICH, J. M. LEHN, J. P. SAUVAGE, J. BLANZAT, *Tetrahedron*, **29** (1973), 1629.

<sup>10</sup> N. F. CURTIS, *J. Chem. Soc.*, (1960) 4409.

nettamente più stabile del prodotto di partenza: è questo il motivo per cui l'equilibrio della reazione è spostato verso i prodotti. Se invece lo ione metallico favorisce la formazione del composto ciclico, guidando il decorso sterico della reazione di condensazione, si parla di effetto templato cinetico. In questo caso il ruolo dello ione metallico è quello di predisporre uno dei due reagenti in conformazione tale che i suoi gruppi reattivi siano in posizione ottimale per la successiva reazione di ciclizzazione. Questi effetti possono verificarsi sia indipendentemente l'uno dall'altro sia contemporaneamente, determinando così il decorso della reazione di ciclizzazione.

## 1.5 I chemosensori

In moltissimi campi, dall'agricoltura, alle scienze alimentari, scienze ambientali, fino alla medicina, il riconoscimento e la determinazione quantitativa di cationi e di anioni è di fondamentale importanza. Negli ultimi 20 anni la ricerca si è spinta nel trovare composti aventi proprietà particolari in presenza di molecole bersaglio (TARGET). Un chemosensore è una molecola capace di operare un vero e proprio riconoscimento molecolare di una specie e di segnalare l'avvenuta coordinazione attraverso la modificazione di una propria grandezza fisica relativamente facile da misurare. I principali parametri osservati per questo scopo sono cambiamenti di intensità di emissione di fluorescenza<sup>11</sup>, di colore<sup>12,13</sup>,

---

<sup>11</sup> A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.* 27 (1994), 302.

<sup>12</sup> H. G. Lohr, F. Vogtle, *Acc. Chem. Res.*, 18 (1985), 65.

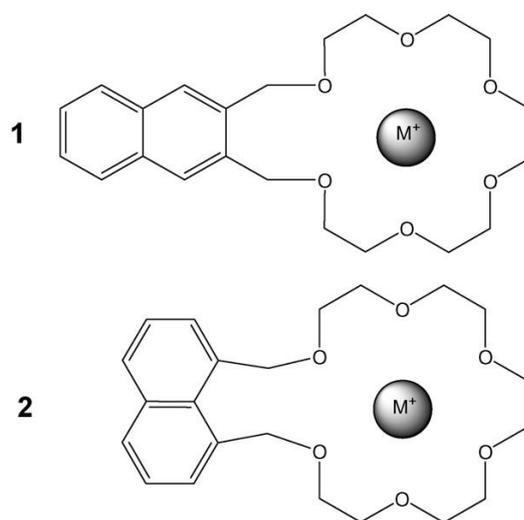
<sup>13</sup> M. Takagi, K. Ueno, *Top. Curr. Chem.*, 121 (1984), 39.

oppure variazioni di proprietà elettrochimiche come ad esempio il potenziale di riduzione<sup>14</sup>.

L'utilizzo dei chemosensori di fluorescenza permette di rivelare la presenza di determinati analiti anche in tracce; infatti questi chemosensori sono caratterizzati da una elevata sensibilità (fino a circa 10 nM) e vengono perciò largamente utilizzati per determinare specie target, in particolare cationiche o anioniche.

Il concetto di chemosensore fluorimetrico fu introdotto per la prima volta da L.R.Sousa nel 1977 che riportò in un suo lavoro la variazione dell'emissione di fluorescenza di due composti diversi in seguito alla coordinazione di cationi alcalini.

Mentre nel composto 1 l'emissione di fluorescenza risultava diminuita dalla coordinazione dello ione metallico, nel composto 2 risultava invece aumentata.



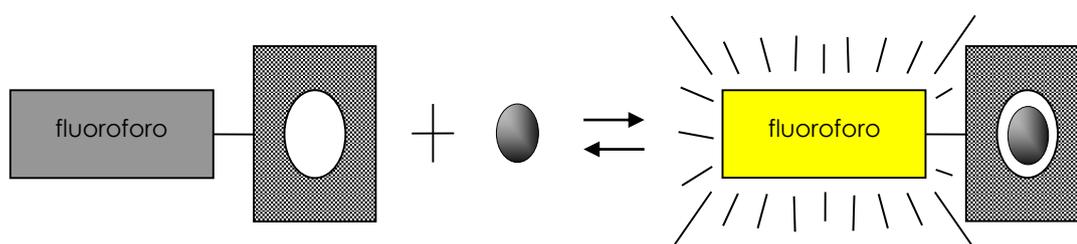
**Figura 1.4:** Il primo chemosensore: un crown-etero contenente un'unità luminescente, il naftalene.

<sup>14</sup> P. D. BEER, *Coord. Chem. Rev.*, 205 (2000), 131.

Dalla struttura dei 2 chemosensori riportati sopra possiamo distinguere almeno due sub-unità:

La prima non è altro che un recettore selettivo nei confronti delle specie che si vogliono determinare.

La seconda è costituita dall'unità che è in grado di segnalare la presenza delle specie guest. Le due sub-unità sono poi collegate da uno spaziatore, molto spesso una semplice catena alifatica.



*Figura 1.5: Schematizzazione di un chemosensore fluorimetrico.*

È possibile ottimizzare un sensore aumentandone la selettività della sub-unità host nei confronti della specie guest, progettando la sub-unità segnalante in modo che il guest sia più facilmente rivelabile e disegnando l'intera molecola in modo da ottimizzare la coordinazione nell'ambiente o nella matrice in cui la specie target si trova. Nel caso di matrici biologiche, il mezzo è generalmente acquoso. Quindi, per specie di importanza biologica questo si traduce nel cercare sensori solubili in ambiente acquoso che diano forti interazioni con il substrato anche a pH neutro. Sotto questo punto di vista le molecole contenenti frammenti poliamminici sono le migliori candidate<sup>15</sup>.

<sup>15</sup> F. PINA, M. A. BERNARDO, E. GARCÍA-ESPAÑA, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2000), 2143-2157.

## 1.6 La fluorescenza e i processi radiativi

Per introdurre il concetto di chemosensori fluorimetrici è necessario introdurre brevemente i processi di rilassamento radiativi. I fenomeni di fluorescenza e fosforescenza possono essere schematizzati attraverso il diagramma di Jablonsky illustrato in figura 1.6

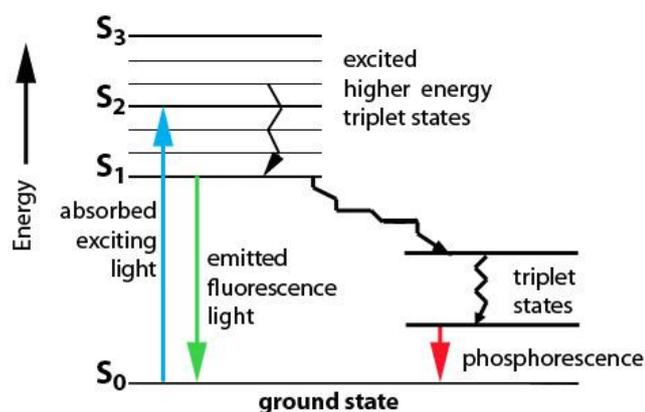


Figura 1.6: Diagramma di Jablonsky.

In questo diagramma possiamo notare lo stato di singoletto fondamentale S<sub>0</sub>, gli stati di singoletto eccitati S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> e gli stati di tripletto T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>. Ad ogni stato elettronico è associato il relativo insieme di livelli vibrazionali.

Quando la radiazione viene assorbita l'elettrone passa dallo stato fondamentale ad uno qualsiasi degli stati vibrazionali dello stato eccitato. Se i livelli S<sub>0</sub> e S<sub>1</sub> si intersecano in corrispondenza di uno stato vibrazionale, si verifica la conversione interna ed il rilassamento da S<sub>1</sub> a S<sub>0</sub> avviene in modo non radiativo dissipando l'energia tramite urti con le molecole di solvente che rimuovono i quanti di energia vibrazionale in eccesso in un tempo di 10<sup>-13</sup> - 10<sup>-12</sup> secondi.

Se viceversa non si può verificare la conversione interna, la molecola discende i livelli vibrazionali eccitati di  $S_1$  sempre dissipando energia tramite urti con il solvente. Una volta giunta sul livello vibrazionale più basso di  $S_1$  si ha l'emissione di un fotone che riporta la molecola su uno dei livelli vibrazionali di  $S_0$ . È il fenomeno della fluorescenza ed avviene nei tempi dell'ordine di  $10^{-8}$  sec.

L'emissione legata alla transizione  $S_1 - S_0$  popola a sua volta stati vibrazionali eccitati di  $S_0$  che a loro volta si rilassano in maniera non radiativa fino allo stato vibrazionale fondamentale.

A causa della dissipazione di parte dell'energia in calore, lo spettro di emissione risulta spostato verso frequenze minori rispetto a quello di assorbimento (fenomeno noto come Stokes shift).

Un altro fenomeno importante deducibile dal diagramma di Jablonsky è la fosforescenza.

Essa è dovuta all'interconversione da uno stato eccitato di singoletto, ad uno stato eccitato di tripletto, processo noto col nome di intersystem crossing. La successiva transizione dallo stato di tripletto  $T_1 \rightarrow S_0$  dà luogo all'emissione di fosforescenza. La transizione da stati di singoletto a stati di tripletto è una transizione spin proibita. Per questo motivo, i tempi in cui ha luogo l'emissione di fosforescenza sono diversi ordini di grandezza superiori a quelli della fluorescenza.

## 1.7 I chemosensori fluorimetrici

Il largo utilizzo delle tecniche fluorimetriche è senza dubbio dovuto all'elevata sensibilità di questa tecnica. La ricerca nel campo dei sensori fluorimetrici è sicuramente più promettente rispetto a quella basata sull'utilizzo di altre tecniche spettroscopiche, come ad esempio la spettroscopia di assorbimento UV-Visibile<sup>16</sup>.

Quando la specie guest viene coordinata da parte della sub-unità host del sensore, possiamo avere due diversi cambiamenti dello spettro di emissione da parte della sub-unità segnalante. Possiamo notare un aumento dell'emissione di fluorescenza, fenomeno denominato spesso effetto CHEF, (chelation enhancement of fluorescence) oppure osservare una diminuzione dell'emissione di fluorescenza (effetto CHEQ, chelation enhancement of quenching)<sup>17</sup>.

I due fenomeni dipendono dal tipo di processo promosso dalla formazione dell'addotto infatti la complessazione può aumentare o inibire la disattivazione per trasferimento elettronico fotoindotto PET (photoinduced electron transfer)<sup>18,19</sup>, per trasferimento energetico elettronico EET (electron energy transfer), per formazione di eccimeri o per effetti di rigidità strutturale<sup>20</sup>.

---

<sup>16</sup> R. MARTINEZ-MAÑEZ, F. SANCENON, *Chem. Rev.*, 203 (2003), 4419-4476.

<sup>17</sup> F. PINA, M. A. BERNARDO, E. GARCÍA-ESPAÑA, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2000), 2143-2157.

<sup>18</sup> L. FABBRIZZI, M. LICCHELLI, P. PALLAVICINI, L. PARODI, A. TAGLIETTI, *John Wiley & Sons Ltd*, (1999), 93.

<sup>19</sup> P. DE SILVA, H. Q. N. GUANARATNE, A. J. M. HUXLEY, C. P. MCCOY, J. T. RADEMACHER, T. E. RICE, *Chem. Rev.*, 97 (1997), 1515.

<sup>20</sup> P. D. BEER, *Acc. Chem. Res.*, 31 (1998), 71.

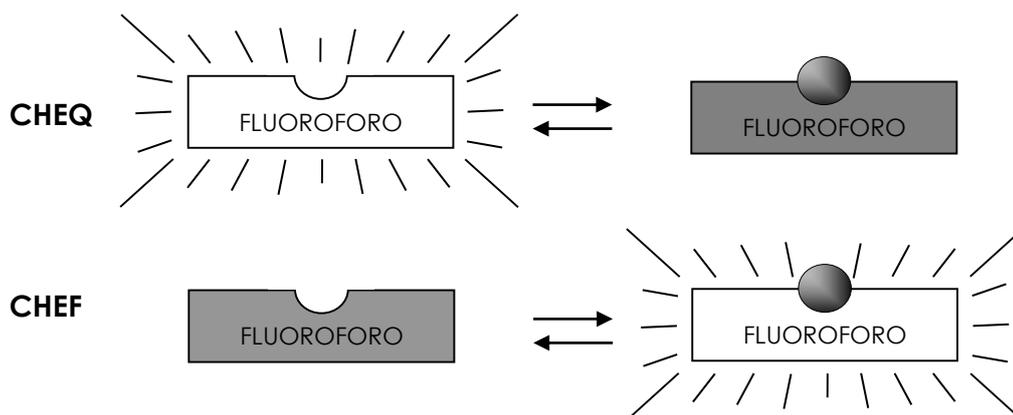
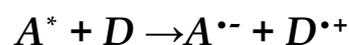
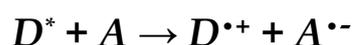


Figura 1.7: Schematizzazione degli effetti CHEQ e CHEF.

## 1.8 Il processo PET

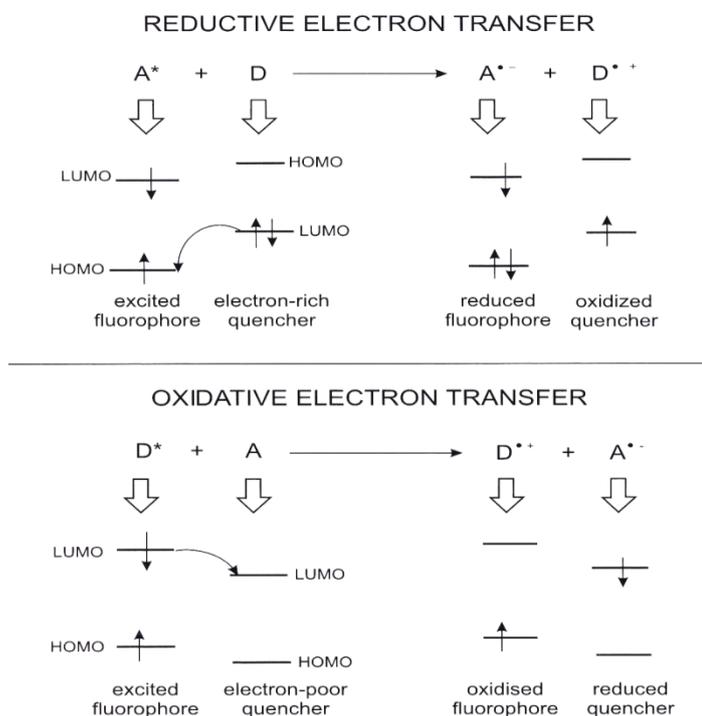
A seconda della molecola presa in esame e delle sue proprietà ossidative e riduttive, nello stato eccitato possiamo avere processi di trasferimento elettronico sia di tipo ossidativo che riduttivo in accordo con le relazioni sottoindicate.



In questo esempio indichiamo con A le molecole accettrici e con D le molecole donatrici. Nel meccanismo PET di tipo riduttivo, il nostro fluoroforo A viene portato allo stato eccitato  $A^*$  da una radiazione avente una lunghezza d'onda sufficiente a causare la transizione. Qui un elettrone è stato promosso dal più alto orbitale molecolare occupato (HOMO) al più basso orbitale non occupato (LUMO). Successivamente a questo passaggio

abbiamo un trasferimento dal LUMO del donatore elettron ricco verso l'HOMO del fluoroforo colmandone la lacuna lasciata in seguito all'eccitazione. In questo modo si realizza il processo noto come quenching di fluorescenza.

La maggior parte dei sensori PET sono costituiti da un fluoroforo connesso ad un residuo di tipo poliamminico mediante uno spacer metilenico. In queste molecole infatti il trasferimento elettronico fotoindotto interessa il gruppo amminico che cede un elettrone al fluoroforo nel suo stato eccitato, comportando un quenching della fluorescenza. Tuttavia quando questo gruppo amminico è protonato oppure interagisce fortemente con un catione metallico il trasferimento elettronico viene inibito e si assiste ad una notevole intensificazione della fluorescenza.



**Figura 1.8:** Meccanismo PET per un sistema ossidativo e riduttivo.

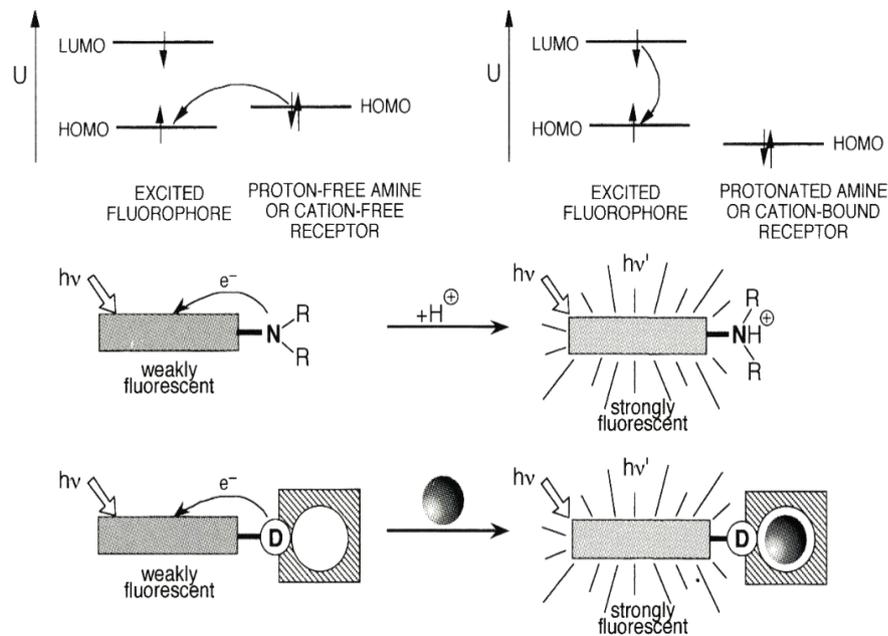
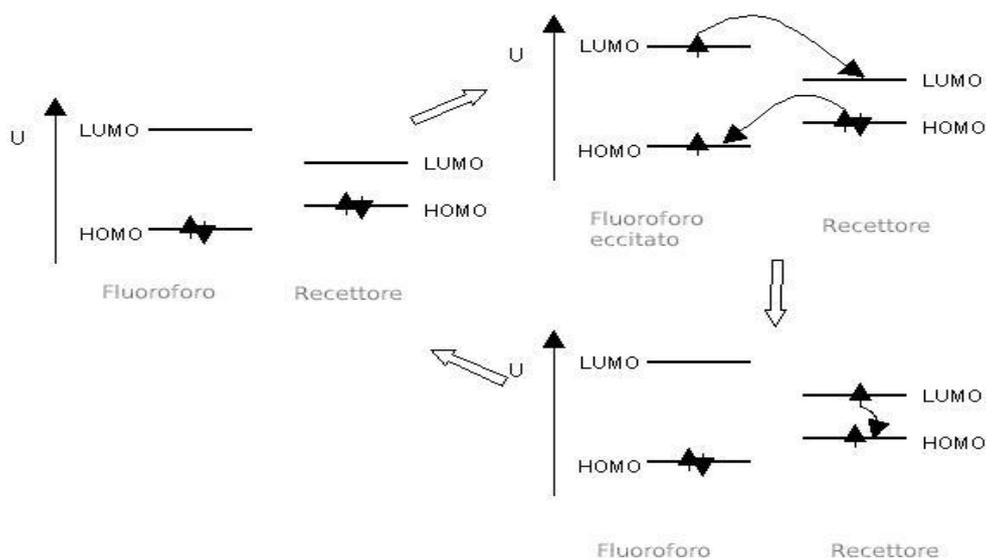


Figura 1.9: PET per un sensore fluorimetrico.

## 1.9 Trasferimento energetico elettronico (EET)

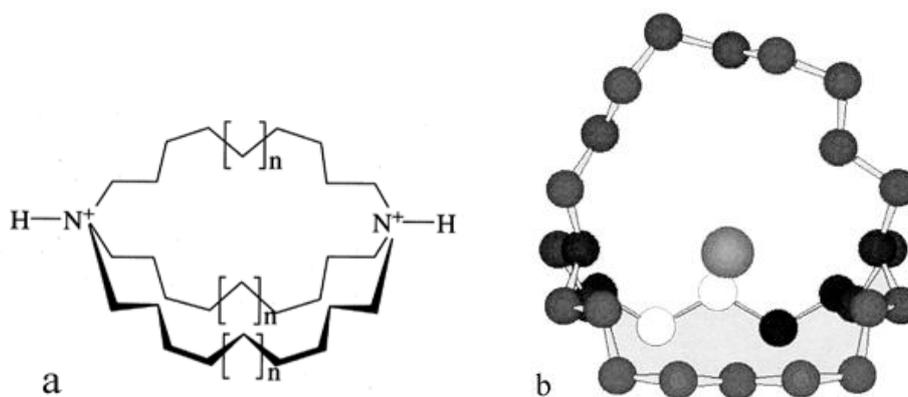
Nel meccanismo PET è necessario che al processo partecipi un solo livello elettronico intermedio all' HOMO e al LUMO. Nel processo EET ne occorrono due. Infatti in seguito all' eccitazione un elettrone passa dall' HOMO al LUMO del fluoroforo e successivamente abbiamo un movimento contemporaneo di due elettroni, di cui uno passa dal LUMO del fluoroforo al LUMO del recettore, mentre l'altro passa dall' HOMO del recettore per andare sull' HOMO del fluoroforo ripristinandone così lo stato fondamentale. A concludere il processo anche il recettore torna nel suo stato a minore energia.



*Figura 1.10: Meccanismo EET.*

## 1.10 Sensori fluorimetrici per specie anioniche

Riuscire a rilevare gli anioni è un processo molto importante, sia dal punto di vista chimico che biologico dati i numerosi campi di applicazione e di ricerca. La maggior parte dei sensori studiati per il riconoscimento anionico ha come fluoroforo un'unità aromatica come antracene, pirene, acridina o fenantrolina e derivati della piridina, come ad esempio il bipyridile. I primi ricercatori che cominciarono a studiare la coordinazione anionica furono C.H. Park e H.E. Simmonds della du Pont de Nemours tramite la pubblicazione di un articolo che riguardava la complessazione di alogenuri da parte di una famiglia di host macrociclici chiamati catapinandi (dal greco: katapino = inghiottito).



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

Questi composti possono inglobare al loro interno ioni alogenuro quando vengono protonati i due atomi di azoto. Le specie host per anioni obbediscono alle stesse regole generali degli host cationici, come ad esempio la preorganizzazione e la complementarità, ma il loro utilizzo è più complicato a causa di alcune proprietà intrinseche degli anioni.

- 1) Gli anioni avendo dimensioni maggiori dei cationi hanno necessariamente bisogno di recettori di dimensioni adatte ad ospitarli. Basti pensare che il fluoruro, uno degli anioni più piccoli ha un raggio ionico simile a quello del potassio.
- 2) Anche gli anioni inorganici più semplici presentano una varietà molto complessa di geometrie; possono essere ad esempio sferici (alogenuri), lineari ( $\text{SCN}^-$ ), planari ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{PtCl}_4^-$ ), tetraedrici ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), ottaedrici ( $\text{PF}_6^-$ ).
- 3) Le energie libere di idratazione degli anioni sono più negative delle energie libere dei cationi. Ad esempio, l'energia di idratazione dello

ione potassio è  $-295 \text{ kJ mol}^{-1}$ , mentre quella dell'anione fluoruro è  $-465 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Quindi gli host anionici devono competere più efficientemente con il mezzo acquoso affinché la coordinazione avvenga.

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

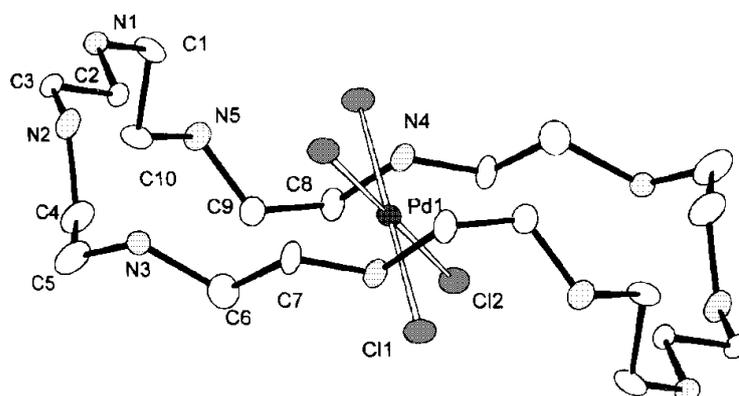
**Tab. 1.12:** confronto tra raggio atomico e  $\Delta G$  di idratazioni di alcuni ioni

L'interazione recettore-anione è quindi molto sfavorita rispetto a quella con specie cationiche e per questo lo studio della coordinazione anionica è proseguita molto a rilento fino agli anni settanta. I primi recettori di rilievo sono risultati i criptandi sintetizzati da Schmidtchen e Jean-Marie Lehn Solo alla fine degli anni settanta la coordinazione anionica ha acquistato un pieno sviluppo. La pubblicazione del primo libro in questa area (Bianchi et al. 1997)<sup>21</sup> e una vasta review di Schmidtchen e Berger (1997)<sup>22</sup> hanno contribuito a diffonderne l'interesse.

<sup>21</sup>A. Bianchi, K. Bowman-James e E. Garcia-Espana, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH: New York, 1997.

<sup>22</sup>F.P. Schmidtchen e M. Berger, 'Artificial Organic Host Molecules for Anions', *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1609

Nel tempo, è stato evidenziato come interazioni carica-carica e via legame ad idrogeno svolgano ruoli chiave nella stabilizzazione degli addotti host-guest. Ad esempio, sono stati effettuati studi sulla coordinazione di anioni inorganici complessi da parte di sistemi poliamminici, che hanno dimostrato come l'interazione sia dovuta fondamentalmente a forze di natura elettrostatica e alla formazione di legami ad idrogeno. In figura è riportata la struttura del complesso del  $\text{PdCl}_4^{2-}$  con il recettore [30]aneN<sub>10</sub> completamente protonato<sup>23</sup>. Il macrociclo assume una conformazione a 'S' e include il substrato anionico in maniera da massimizzare le interazioni legami a idrogeno  $\text{NH}\cdots\text{Cl}$ .



*Figura 1.13: Struttura cristallina del complesso di  $\text{PdCl}_4^{2-}$  incapsulato nel macrociclo [30]aneN<sub>10</sub>·10H<sup>+</sup>*

<sup>23</sup> A. Bencini, A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, P. Dapporto, P. Paoli, E. Garcia-España, J. A. Ramirez, *Inorg. Chem.*, 31 (1992) 1902.

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

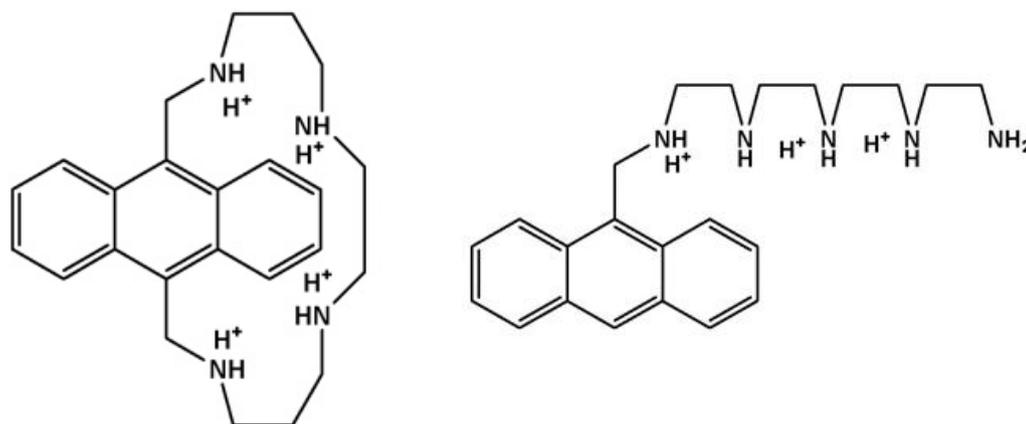
Due sono state essenzialmente le strategie adottate nel tempo per il riconoscimento anionico:

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

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

### 1.11 I recettori poliamminici

Nel campo dei chemosensori, un ruolo fondamentale è svolto dai recettori poliamminici, i quali hanno come caratteristica fondamentale la capacità di operare in acqua, un solvente importantissimo dal punto di vista dello studio dei sistemi biologici. La presenza dell'unità poliamminica rende la molecola solubile in acqua grazie alle caratteristiche idrofile dei gruppi amminici e alla possibilità di far instaurare degli equilibri di protonazione in tale solvente. Lo studio di questi leganti ha permesso di individuare delle forme che possono essere selezionate per il riconoscimento selettivo di un dato analita. Ad esempio la protonazione delle poliammine a pH acidi rende queste molecole dei potenziali recettori per specie anioniche mentre garantendo un pH basico, le forme con un basso indice di protonazione sono in grado di complessare ioni metallici.



*Figura 1.14:* Alcuni esempi di recettori poliamminici contenenti unità fluorescenti.

## 1.12 Acridina

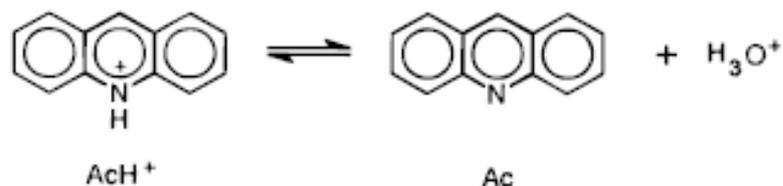
L'acridina è un composto aromatico eterociclico, che presenta tre anelli condensati. Formalmente è un derivato dell'antracene, ma al contrario di quest'ultimo presenta un atomo di azoto al posto di un gruppo CH nella parte centrale della molecola.

L'acridina è molto importante nel campo della chimica supramolecolare. Sono ormai famose le sue proprietà di intercalante nei confronti del DNA. Esistono infatti numerosi derivati di questa molecola con proprietà antivirali o antitumorali.

Un'altra proprietà notevole dal punto di vista chimico fisico è la sua resa quantica di fluorescenza, che essendo particolarmente alta, rende questa molecola un potenziale candidato come unità fluorescente per la realizzazione di chemosensori fluorimetrici. L'azoto aromatico possiede inoltre un doppietto elettronico potenzialmente disponibile per le

interazioni con cationi metallici. In soluzione acquosa questa molecola dà luogo ad un equilibrio acido base che coinvolge l'atomo di azoto.

La pKa del catione acridinio ( $\text{AcH}^+$ ) risulta avere un valore di 5.4

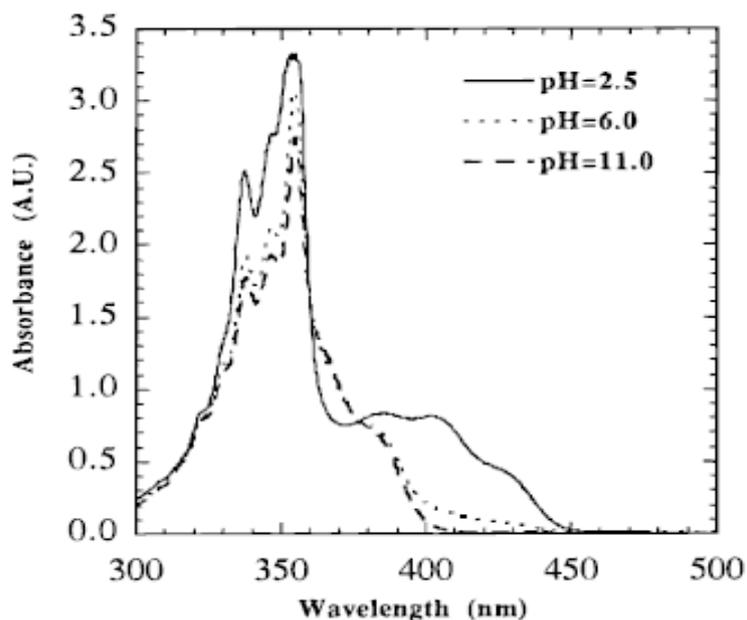


*Figura 1.15: Equilibrio di protonazione / deprotonazione dell'acridina.*

Prendendo in esame lo spettro UV-Vis possiamo vedere come il massimo dell'assorbimento sia dell'acridina che dello ione acridinio cada nel vicino UV, ad una lunghezza d'onda di 356 nm. Tuttavia lo spettro di assorbimento dello ione acridinio presenta un allargamento abbastanza pronunciato nella zona intorno a 400 nm; questo comportamento è invece assente nello spettro dell'acridina<sup>24</sup>.

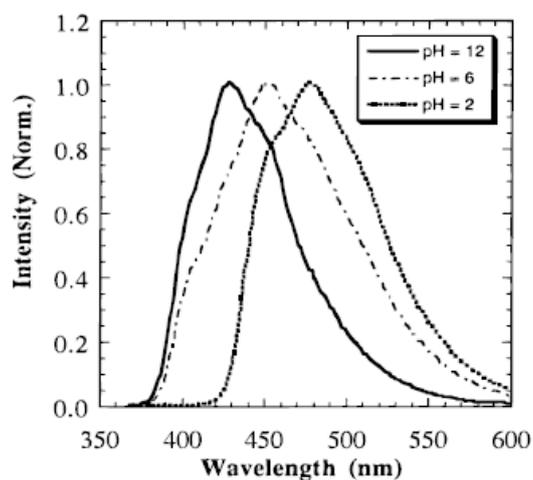
---

<sup>24</sup> E. T. RYAN, T. XIANG, K.P. JOHNSTON, M.A. FOX, *J. Phys. Chem. A*, 101(1997), 1827-1835

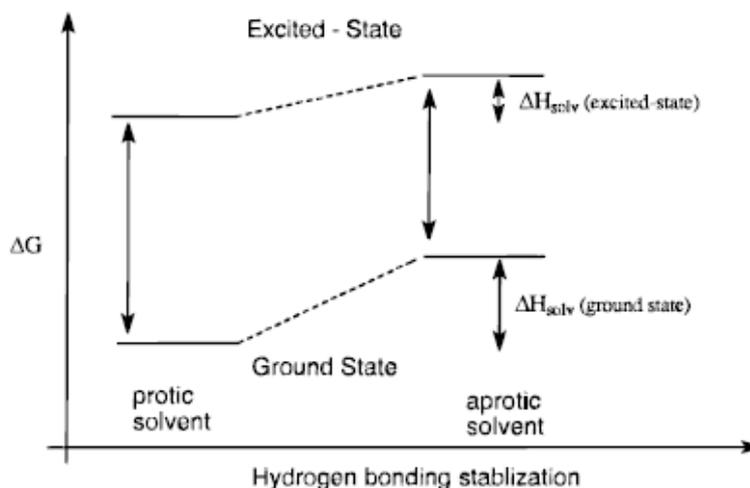


**Figura 1.16:** Spettri di assorbimento di soluzioni di acridina in acqua ( $1 \cdot 10^{-4}$  M), a temperatura e pressione ambiente, rispettivamente a pH 2.5, 6.0 e 11.0.

Prendendo in considerazione le proprietà di emissione di fluorescenza dell'acridina possiamo invece notare come eccitando a 356 nm le due specie, acridina e ione acridinio si comportino in maniera sostanzialmente diversa. Infatti l'acridina presenta un massimo di emissione a 430 nm, mentre per lo ione acridinio il massimo è spostato a lunghezze d'onda maggiori, 475 nm.



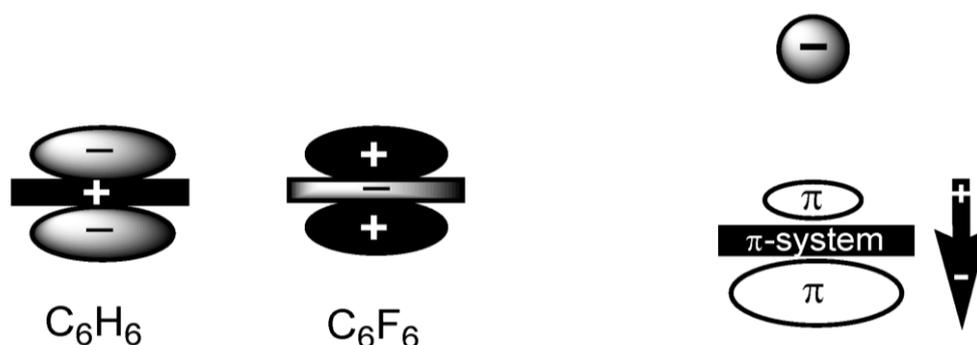
Ciò che caratterizza il valore dell'intensità di fluorescenza dell'acridina e degli altri eterocicli contenenti azoto, è la loro proprietà di dare interazioni tramite legame ad idrogeno tra il soluto e il solvente. Infatti l'acridina fluoresce maggiormente in solventi protici che in solventi aprotici. L'interpretazione di questo fenomeno è da attribuire al fatto che lo stato eccitato di singoletto ad energia minore sia  $n \rightarrow \pi^*$  in solventi aprotici, mentre sia  $\pi \rightarrow \pi^*$  in solventi che donano facilmente legami ad idrogeno. Dato che il decadimento dallo stato  $n \rightarrow \pi^*$  allo stato fondamentale di singoletto è proibito per simmetria, i processi di decadimento radiativo, verranno inibiti, quindi il ritorno allo stato fondamentale avverrà quasi esclusivamente per via non radiativa, tramite intersystem crossing oppure per conversione interna.



### 1.13 Le interazioni anione- $\pi$

Le interazioni tra anione ed elettroni di tipo  $\pi$ <sup>25</sup> sono state studiate sia a livello teorico che sperimentale e riguardano forze non covalenti che possono instaurarsi tra anioni e sistemi aromatici elettron deficienti. Dal punto di vista teorico è stato visto che queste interazioni sono energeticamente favorite<sup>26</sup>, ed il loro ruolo centrale in molti processi biologici è sempre più riconosciuto. La fase più importante di questo studio riguarda il design di recettori altamente selettivi per gli anioni. La natura fisica delle interazioni è stata studiata approfonditamente e numerosissime sono le pubblicazioni a riguardo<sup>27</sup> le quali evidenziano come i contributi principali all'energia d'interazione siano essenzialmente dovuti ad interazioni di tipo elettrostatico ed alla polarizzazione indotta dallo ione. Il termine elettrostatico è dovuto alla presenza del momento di quadrupolo permanente del sistema aromatico.

Il valore del momento di quadrupolo risulta negativo per sistemi come il benzene, che può essere convertito in un valore positivo, sostituendo gli idrogeni legati all'anello benzenico con sostituenti elettron-attrattori come ad esempio il fluoruro.



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

<sup>25</sup> D. QUIÑONERO, A. FRONTERA, P.M. DEYÀ, Chapter X

<sup>26</sup> D. QUIÑONERO, C. GARAU, C. ROTGER, A. FRONTERA, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002), 3389-3392

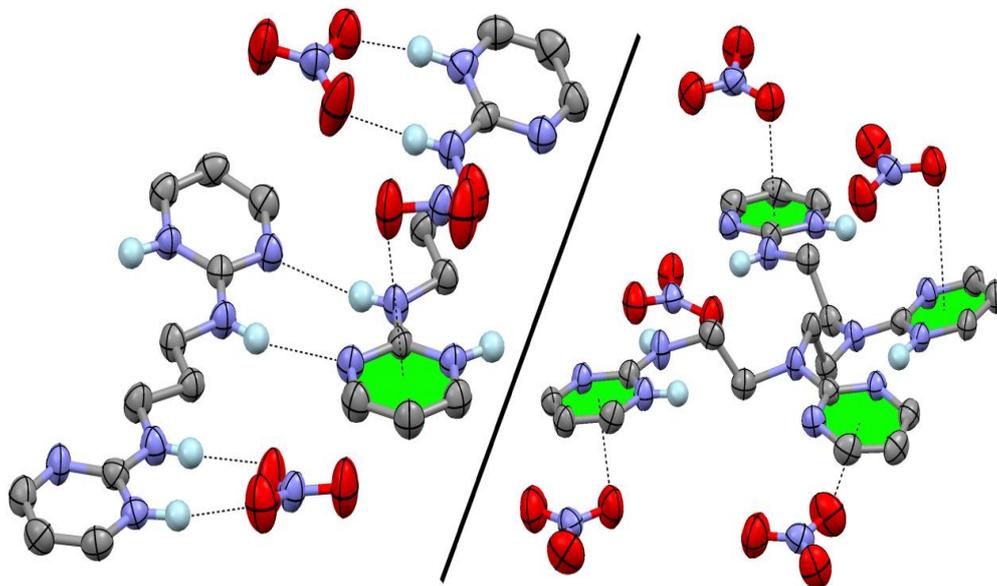
<sup>27</sup> D. KIM, P. TARAKESHWAR, K.S. KIM, *J. Phys. Chem. A*, 108 (2004), 1250-1258

In base a queste considerazioni, un'interazione di tipo anione -  $\pi$ , che a priori risulta elettrostaticamente sfavorita, può essere convertita in un'interazione favorita. La polarizzazione del sistema  $\pi$  indotta dall'anione ha un contributo molto significativo, mentre il contributo opposto, cioè la polarizzazione indotta dal sistema  $\pi$  all'anione è decisamente più debole. Il contributo delle forze dispersive all'energia totale di interazione è invece trascurabile. L'entità del momento di quadrupolo e la polarizzabilità del sistema  $\pi$  determinano la forza dell'interazione. Anche sistemi  $\pi$  con momento di quadrupolo sfavorevole ai fini dell'interazione (cioè negativo) possono interagire efficacemente con anioni se possiedono un'alta polarizzabilità.

L'energia totale di interazione sarà quindi determinata sia dal contributo elettrostatico che da quello di polarizzazione. Entrambi i contributi dipendono fortemente dalla distanza ione - arene. È quindi decisamente importante considerare non solo le proprietà del composto aromatico, ma anche le caratteristiche intrinseche dell'anione. Infatti anioni piccoli sono più polarizzanti (cioè più hard) ed hanno energie di interazione più negative e quindi più forti. Viceversa, anioni grandi saranno meno polarizzanti (carattere soft) e determineranno distanze di equilibrio maggiori. Anche ioni planari o ioni lineari, come  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{N}_3^-$ , possono interagire con l'anello aromatico in maniera simile a quanto visto sopra. Questo tipo di legame previsto teoricamente è stato confermato sperimentalmente da strutture a raggi X in un sale nitrato di un derivato dell'amminopirimidina.

COMPLESSO	E	R <sub>E</sub>
H <sup>-</sup> -----C <sub>6</sub> F <sub>6</sub>	-12.1	2.693
F <sup>-</sup> ---C <sub>6</sub> F <sub>6</sub>	-18.2	2.570
Cl <sup>-</sup> ---C <sub>6</sub> F <sub>6</sub>	-12.6	3.148
Br <sup>-</sup> ---C <sub>6</sub> F <sub>6</sub>	-11.6	3.201
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ---C <sub>6</sub> F <sub>6</sub>	-12.2	2.917
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ---C <sub>6</sub> F <sub>6</sub>	-34.7	2.720

**Tabella 1.18:** Energie di interazione ( $E$ , kcal/mol) e distanze di equilibrio ( $R_e$ , Å), calcolate tramite calcoli quantomeccanici e misurate dall'anione al centro dell'anello, in diversi complessi con esafluorobenzene.



**Figura 1.19:** Strutture a raggi X di sali amminopirimidinici in cui si notano le interazioni anione- $\pi$  tra gli ioni nitrato e gli anelli aromatici.

Contrariamente all'interazione catione -  $\pi$ , quella anione -  $\pi$  è energeticamente meno favorita. Infatti prendendo in considerazione i raggi di van der Waals degli anioni questi risultano essere più grandi di quelli dei cationi, quindi le distanze di equilibrio saranno più grandi nei complessi anione -  $\pi$  che nei complessi catione -  $\pi$ <sup>28</sup>. Per superare questo svantaggio energetico è stata proposta una soluzione che prevede l'uso combinato di legami ad idrogeno con le forze elettrostatiche per legare l'anione, ad esempio tramite l'uso di sali di guanidinio. Sono stati utilizzati composti aromatici carichi per incrementare la capacità dell'anello a dare legami anione -  $\pi$ .

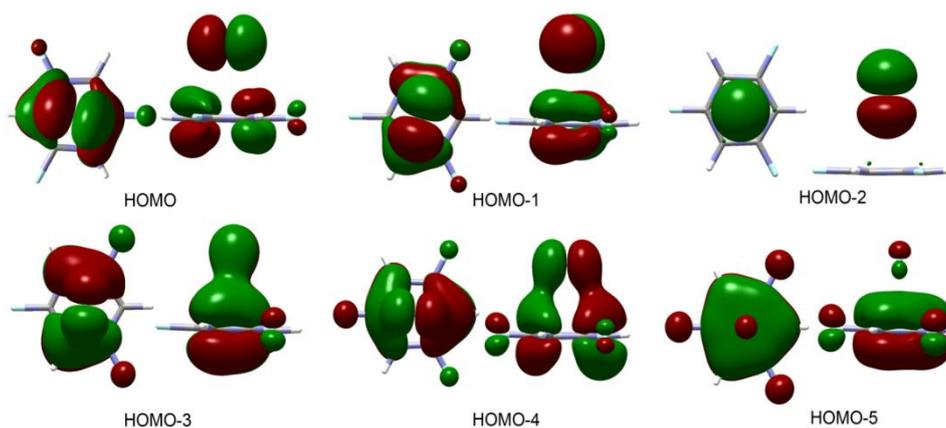
Un altro aspetto molto interessante è l'osservazione della variazione dell'aromaticità dell'anello preso in esame. Alcuni studi hanno evidenziato che le interazioni di tipo catione -  $\pi$  tendono a diminuire l'aromaticità del sistema  $\pi$  che influenzano; questa caratteristica viene invece accresciuta nei complessi anionici<sup>29</sup>. La variazione di aromaticità è stata correlata ad un indebolimento o un rafforzamento dei legami C - C rispetto al valore del benzene privo di leganti. Notevoli, sono anche i differenti risultati ottenuti studiando l'interazione tra 1,3,5-trifluorobenzene<sup>30</sup> rispettivamente con F<sup>-</sup> e con Na<sup>+</sup>. L'analisi degli orbitali molecolari mostra che mentre gli orbitali atomici del catione non partecipano in alcun modo alla formazione degli orbitali molecolari del complesso, quelli dell'anione si.

---

<sup>28</sup> C. GARAU, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, *J. Phys. Chem. A*, 108 (43) (2004), 9423-9427

<sup>29</sup> C. GARAU, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, *Chem. Phys. Lett.*, 392 (1-3) (2004), 85-89

<sup>30</sup> C. GARAU, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P. BALLESTER, A. COSTA, P.M. DEYÀ, *Chem. Phys. Lett.*, 399 (1-3) (2004), 220-225



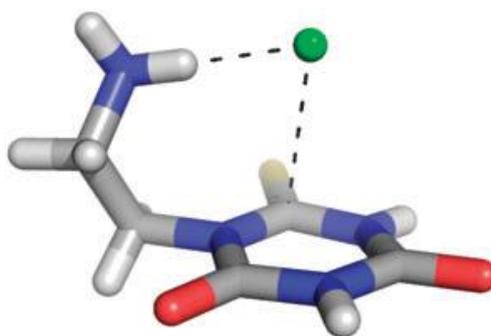
**Figura 1.20:** Rappresentazione degli orbitali di tipo  $\pi$  nel complesso  $F\cdots C_6F_3H_3$

Altri studi hanno evidenziato che nella coordinazione anionica, le interazioni tra anioni e sistemi di tipo  $\pi$ , ed i legami ad idrogeno, hanno un effetto cooperativo. Si nota cioè un rafforzamento di entrambe le interazioni se queste sono presenti contemporaneamente.<sup>31</sup>

Un esempio molto importante in cui legami ad idrogeno e interazioni anione arene operano simultaneamente è quello riportato da Frontera et al.<sup>32</sup> In questo caso è possibile notare che un anello elettronpovero (acido tiocianurico), opportunamente funzionalizzato con etilammonio, cristallizza con il controione cloruro dando una struttura cristallina con l'anione posizionato nella conformazione ottimale per dare sia interazione con l'anello aromatico elettron povero, sia legame ad idrogeno con il gruppo  $R\text{-Et-NH}_3^+$ . Le evidenze sperimentali confermano che l'interazione anione -  $\pi$  è presente se il sistema aromatico è elettronpovero.

<sup>31</sup> D. ESCUDERO, A. FRONTERA, D. QUIÑONERO, P.M. DEYÀ, *J. Comput. Chem.*, 30 (1) (2009), 75-82

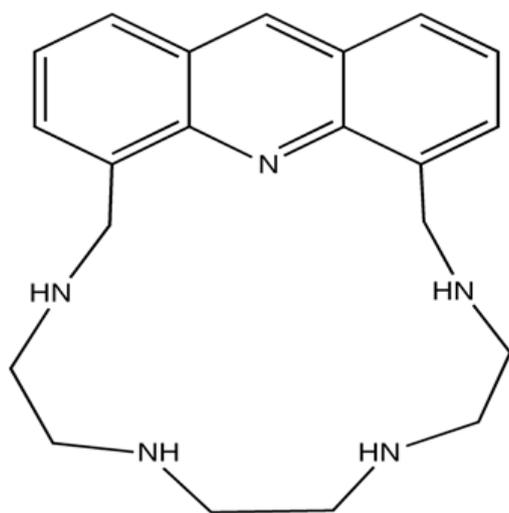
<sup>32</sup> A. FRONTERA, F. SACZEWSKI, M. GDANIEC, E. DZIEMIDOWICZ-BORYS, A. KURLAND, P.M. DEYA, D. QUIÑONERO, C. GARAU, *Chem.-Eur. J.*, 11 (2005), 6560-6567



**Figura 1.21:** Struttura cristallina dell'acido tiocianurico con un sostituito etilammonico, che illustra la contemporanea presenza di un legame ad idrogeno e di un'interazione anione- $\pi$  con lo ione cloruro (rappresentato in verde).

## 1.14 Obiettivi del progetto di tesi

In questo progetto di tesi è stato affrontato lo studio del legante Acry222<sub>IN</sub> come chemosensore di specie anioniche. Il legante è caratterizzato da una struttura poliamminica



macrociclica in cui è stata inserita un'unità acridina come parte integrante della struttura ciclica.

L'interesse verso questo recettore dipende dal fatto che i leganti poliamminici sono facilmente solubili e in soluzione possono protonarsi facilmente anche a pH neutro. Questa proprietà di generare facilmente cationi poliammonici rende questo legante particolarmente indicato per la coordinazione di substrati anionici tramite interazioni carica-carica e

legami ad idrogeno. Inoltre la presenza del gruppo acridina, un gruppo che presenta una elevata resa quantica di fluorescenza rende questa molecola un potenziale chemosensore.

Le proprietà fotochimiche del legante dipendono fortemente dallo stato di protonazione della catena e dell'azoto presente nell'acridina. Tali proprietà vengono spesso alterate dalla coordinazione di specie anioniche che in seguito al loro inserimento all'interno del legante

riescono a modificare la distribuzione e la localizzazione dei protoni sugli atomi di azoto dell' host. L'unità di acridina potrebbe inoltre essere coinvolta nel processo coordinativo tramite interazioni anione -  $\pi$ . In questo lavoro di tesi abbiamo sintetizzato di nuovo il legante, la cui sintesi era comunque già stata messa a punto nel corso di una tesi precedente<sup>33</sup>. L'obiettivo di questa tesi è stato quello di analizzare il possibile uso di questo legante come chemosensore per specie anioniche. Lo sviluppo di questo studio può essere suddiviso in due parti: La prima parte consiste nell'analisi del comportamento dell'emissione di fluorescenza di questa molecola in funzione del pH, del tipo di anione e della sua concentrazione. Nella seconda parte sono state ricavate le costanti di complessazione del legante con vari anioni ad un valore di pH fisso, scelto opportunamente per rendere più elevate le variazioni di intensità di emissione in seguito all'aggiunta dell'anione. Abbiamo preso in considerazione diversi tipi di anioni: fluoruri, cloruri, bromuri, ioduri, nitrati, solfati.

---

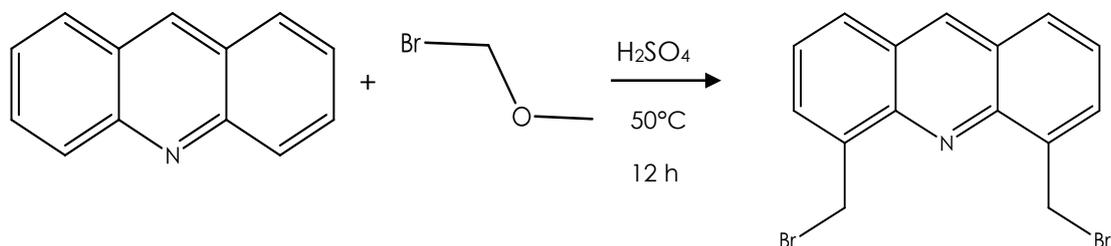
<sup>33</sup> Tesi sperimentale di laurea di Matteoandrea Lucherelli 2013 università di firenze cdl chimica Anno Accademico 2011-2012

## Capitolo 2: Parte sperimentale

Nell'affrontare la parte sperimentale inizierò l'esposizione prendendo in considerazione il metodo di sintesi utilizzato per ottenere il legante. La sintesi è stata messa a punto nel corso di una tesi di laurea precedente, ma è stata ripetuta durante il mio tirocinio per ottenere il legante Acry222<sub>IN</sub>.

### 2.1 Sintesi del legante macrociclico

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

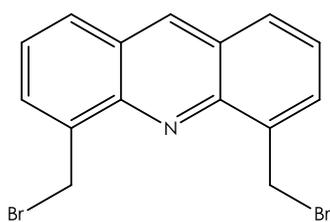


La 4,5-bis(bromometil)acridina è stata preparata utilizzando un procedimento precedentemente riportato in letteratura, opportunamente modificato<sup>1</sup>.

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

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

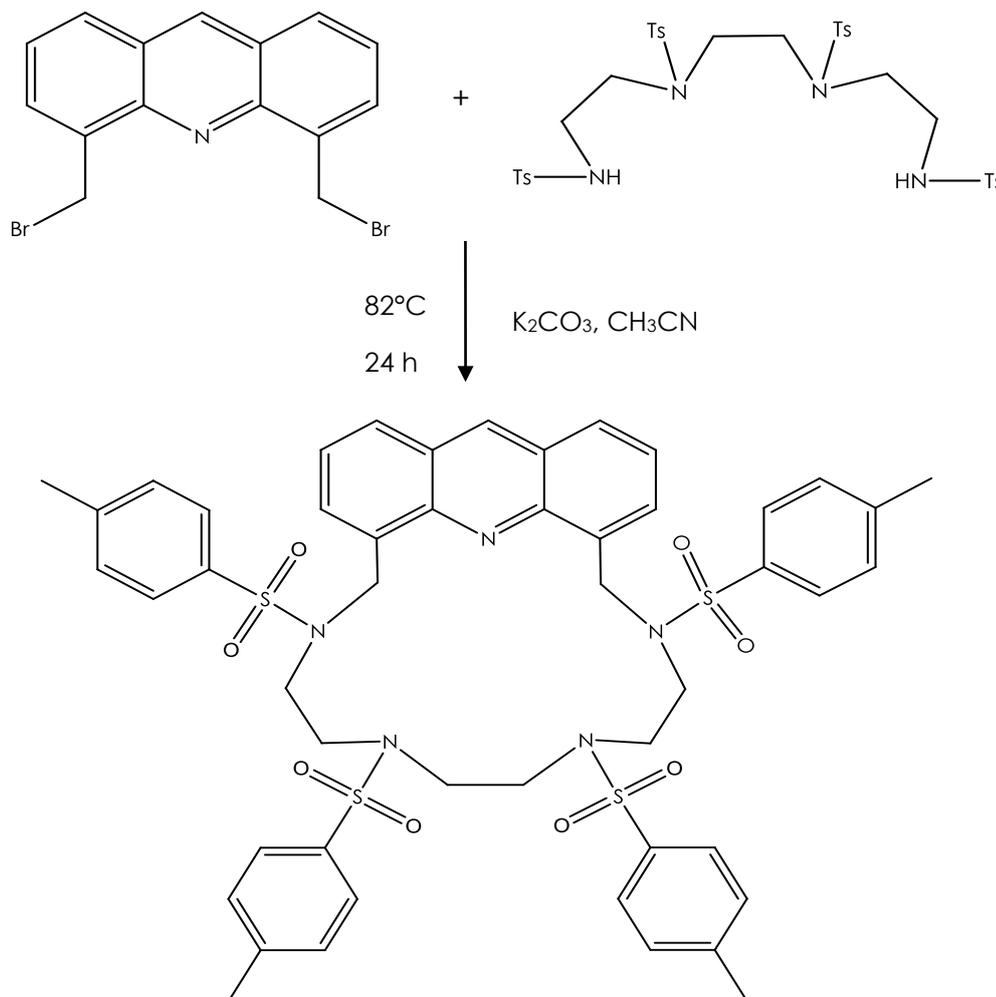
Terminata la reazione, sono stati aggiunti alla miscela 150 g di ghiaccio e il precipitato giallo formatosi è stato filtrato e solubilizzato in cloroformio (450 mL). La parte insolubile è stata eliminata e la fase organica anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dopo evaporazione del solvente il residuo è stato cristallizzato da una miscela etere etilico/cicloesano per dare un solido giallo (2.5g, resa 41,7%, PM: 365.06 g/mol )



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 5.34 (s, 4H), 7.41-7.46 (m, 2H), 7.86-7.92 (4H), 8.69 (s, 1H).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 29.91, 125.56, 126.87, 128.84, 131.0, 136.11, 143.20.

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



La reazione è stata condotta in un pallone a tre colli, munito di insufflatore per  $N_2$ , imbuto sgocciolatore con agitatore meccanico e refrigerante a bolle con tappo a  $CaCl_2$ .

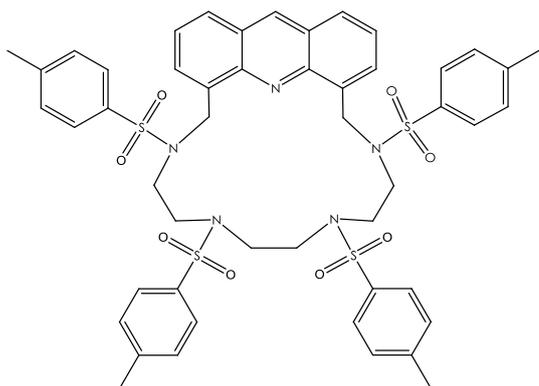
Nel pallone è stato introdotto 1,4,7,10-tetrazadecano-tetratosilato (2 g, 2.62 mmol), quindi sono stati aggiunti  $K_2CO_3$  (3 g) e  $CH_3CN$  precedentemente anidrificato su setacci molecolari (80 mL). La vetreria è stata seccata in stufa e durante la reazione è stato insufflato azoto in continuo per mantenere l'ambiente di reazione anidro.

Nell'imbutto sgocciolatore è stata introdotta la sospensione di 4,5-bis(bromometil)acridina (1 g, 2.2 mmol) in  $CH_3CN$  (160 mL); questa è stata mantenuta sotto agitazione con l'ausilio di un agitatore meccanico, perché 4,5-bis(bromometil)acridina non è perfettamente solubile nel mezzo di reazione.

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

Una volta interrotto il riscaldamento si è lasciata raffreddare la miscela fino a temperatura ambiente. Quindi il prodotto è stato filtrato su filtro a pieghe, per eliminare il solido, e la soluzione ottenuta è stata tirata a secco.

Il prodotto ottenuto è stato sciolto nella minima quantità necessaria di  $CH_2Cl_2$  e purificato mediante cromatografia su colonna di allumina (attivata di grado II/III), utilizzando come eluente una miscela  $CH_2Cl_2$ /acetato di etile, utilizzando un gradiente di concentrazione per l'acetato di etile da un rapporto di 10:0.2 a 10:2. La resa è circa del 23,5% (500 mg, 0.5mmol, PM: 966.22 g/mol)

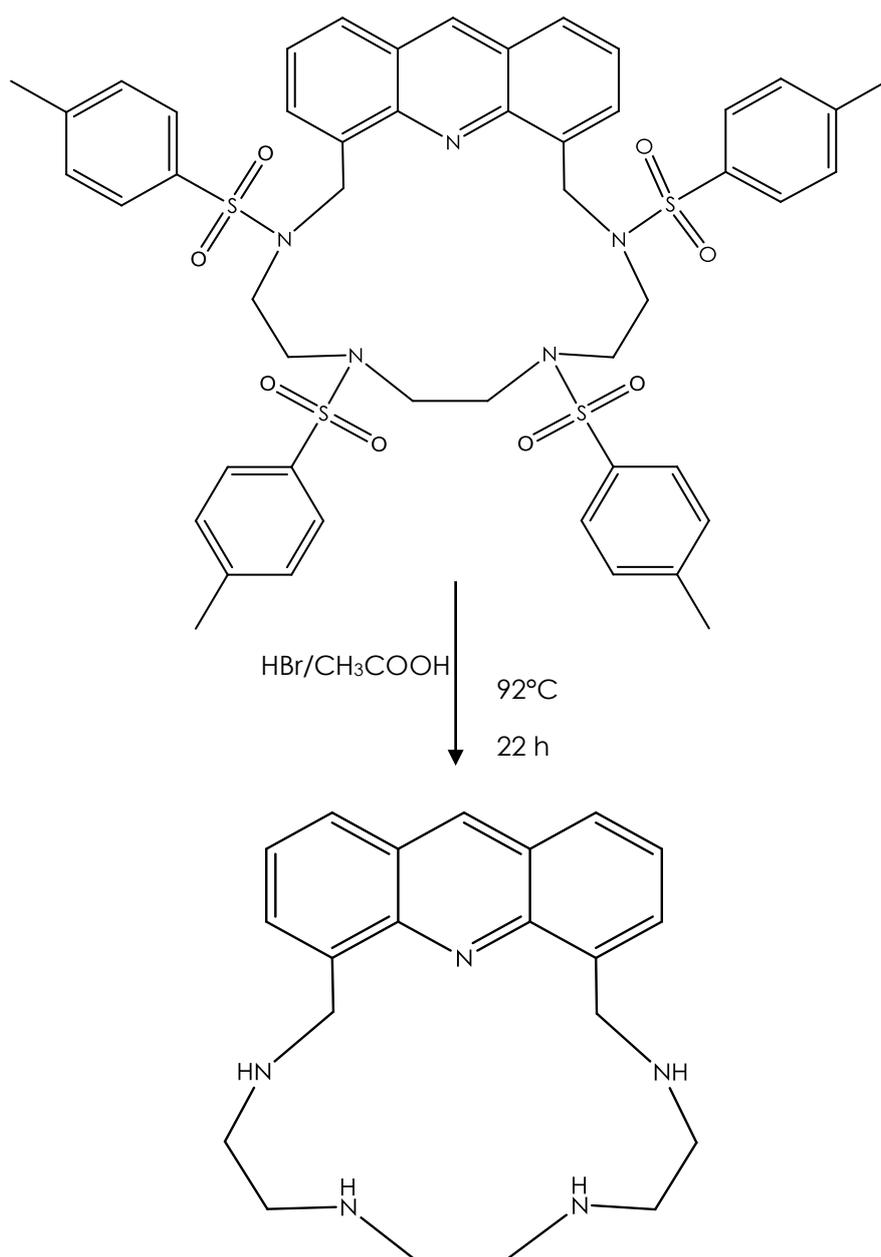


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 2.38 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 2.54 (t, 4H), 2.70 (t, 4H), 3.39 (t, 4H), 5.18 (s, 4H), 7.21 (d, 4H), 7.32 (d, 4H), 7.42 (d, 4H), 7.54 (dd, 2H), 7.76 (d, 4H), 7.89 (d, 2H), 7.95 (d, 2H), 8.72 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  21.64, 21.67,

48.22, 49.18, 49.44, 49.55, 126.06, 126.60, 127.47, 127.69, 127.71, 128.78, 129.74, 129.77, 129.95, 129.98, 132.69, 134.84, 135.19, 135.66, 137.17, 143.44, 143.53, 146.99.

### 2.1.3 Sintesi del legante macrociclico Acry222<sub>IN</sub> (2,5,8,11-tetraza[15]-4,5-acridinofano)



In un pallone ad un collo munito di due refrigeranti a bolle montati in serie, con tappo a  $\text{CaCl}_2$ , sono stati introdotti 500 mg (0.50 mmol) di 2,5,8,11-tetratosil-2,5,8,11-tetraaza[12]-4,5-acridinofano, 7 g di fenolo (74 mmol) e la miscela  $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$  al 33% (30 mL). La soluzione è stata portata a riflusso.

Trascorse 22 ore si è lasciata raffreddare la miscela di reazione fino a temperatura ambiente, quindi sono stati aggiunti 80 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Il precipitato giallo è stato filtrato su buckner e lavato con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

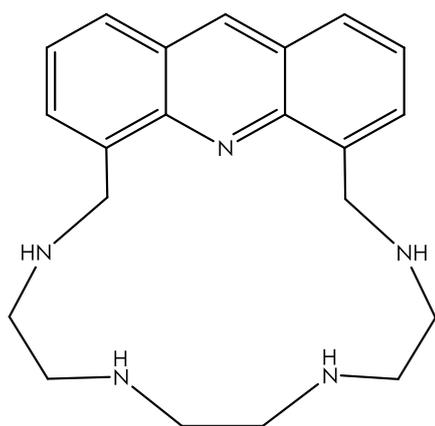
Il solido giallo ottenuto è stato ricristallizzato da una miscela di  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  acidificata con poche gocce di  $\text{HBr}$  conc.

Il legante Acry222<sub>IN</sub> è stato quindi ottenuto cristallino come bromidrato (50 mg, PM: 754.04). La resa è circa del 25%.

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

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

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



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

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

## 2.2 Ottenimento dell'ammina libera Acri222<sub>IN</sub>

Come abbiamo visto nella sintesi, il legante ottenuto è stato isolato come pentabromoidrato. È stato quindi necessario prima di qualsiasi futura operazione ottenere l'ammina libera in modo tale da permettere di studiare l'interazione del legante con gli anioni in esame. Per svolgere l'operazione di purificazione è stata usata la resina a scambio ionico DOWEX 1 x 8 che contiene gruppi ammonici con anioni cloruro come controione. (8% cross-linking, 20-50 mesh) secondo la seguente modalità:

- Si riempie circa metà della colonna cromatografica con la resina indicata
- Si lava la resina con H<sub>2</sub>O distillata
- Eseguiamo un lavaggio della resina con NaOH 1 M fino al raggiungimento di pH basico (controllato con cartina tornasole). In questa maniera gli ioni cloruro sono spostati dagli ioni OH<sup>-</sup> e la resina viene a trovarsi nella sua forma basica.
- Si lava di nuovo la resina con acqua ultrapura di tipo milliQ fino all'ottenimento di pH neutro
- Si scioglie il legante precedentemente pesato nel minor volume di acqua milliQ possibile e si deposita la soluzione in testa alla colonna
- Si eluisce con acqua, raccogliendo la soluzione passata attraverso la colonna in un matraccio da 50 ml.
- Si porta a volume il matraccio con H<sub>2</sub>O milliQ
- Si aggiusta il pH della soluzione fino ad un valore di 2 con l'aggiunta di acido metansolfonico 1 M (2-3 gocce).

L'acidificazione della soluzione è stata effettuata a causa della scarsa stabilità a pH alcalino del legante che tende a decomporsi per pH maggiori di 6. I campioni che presentavano un pH più acido invece hanno manifestato una maggiore resistenza alla degradazione.

## **2.3 Spettrofotometria UV-visibile ed emissione di fluorescenza**

### **2.3.1 Misure fluorimetriche a diversi valori di pH**

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

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

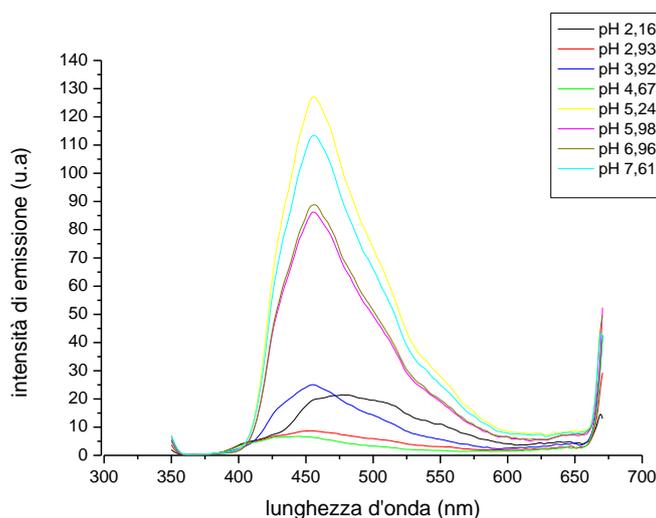
Nelle misure di assorbimento è stato sufficiente effettuare le scansioni nell'intervallo di lunghezze d'onda tra 200 a 600 nm per poter vedere i picchi di massimo assorbimento; gli spettri misurati con questa tecnica ai diversi valori di pH non hanno subito variazioni significative in seguito all'aggiunta di specie anioniche differenti.

Le misure di fluorescenza invece sono risultate più interessanti. Infatti l'emissione è molto influenzata dal pH e dalla presenza di anioni.

La  $\lambda$  di eccitazione per queste misure è di 345 nm, il che ci permette di avere un buon compromesso tra una buona intensità di assorbimento e un valore del coefficiente di assorbività molare praticamente costante al variare del pH della soluzione in esame.

Gli spettri di fluorescenza sono stati misurati tra 350 e 670 nm.

Sono stati registrati numerosi spettri di emissione a diversi valori di pH in presenza ed in assenza di varie specie anioniche. In Figura 2.1 abbiamo riportato a titolo di esempio degli spettri di emissione registrati a vari valori di pH.



*Figura 2.1: spettri di emissione a diversi valori di pH.*

Nella fase di preparazione dei vari campioni il pH è stato variato tramite l'aggiunta di soluzioni di  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$  e  $\text{NaOH}$  a diverse concentrazioni. Abbiamo deciso di utilizzare l'acido metansolfonico in quanto l'anione metansolfonato, pur essendo un potenziale competitore per i gruppi anionici di nostro interesse, generalmente mostra una affinità molto bassa nei confronti di cationi poliammonici.

Gli spettri di fluorescenza e di assorbimento UV-visibile sono stati registrati su soluzioni aventi concentrazione del legante circa  $2.5 \times 10^{-5}$  M.

Per quanto riguarda gli spettri di emissione di fluorescenza si sono utilizzate larghezze delle fenditure pari a 10 nm. Inoltre data l'alta resa quantica di fluorescenza del gruppo acridina, è stato necessario utilizzare un filtro di attenuazione all'1% del segnale in arrivo al rivelatore.

Le soluzioni degli anioni utilizzate per le nostre misurazioni sono i sali di sodio degli ioni fluoruro, cloruro, bromuro, ioduro, solfato e nitrato. Tutte le soluzioni sono state preparate in modo tale che avessero concentrazioni note e che si trovassero, una volta in soluzione, in rapporti ben precisi con il legante. I rapporti scelti tra le concentrazioni di legante e di anione usati per effettuare le misure di fluorescenza sono stati 1:1, 1:10 e 1:100.

Tutte le misure sono state eseguite tenendo costante in ogni campione la concentrazione del legante, aggiungendo ogni volta volumi molto piccoli delle soluzioni dei vari sali in maniera da trascurare l'effetto di diluizione.

### 2.3.2 Misura delle costanti di stabilità dei complessi

La misura dell'intensità di emissione di fluorescenza ai diversi pH ha costituito la prima parte della nostra serie di esperimenti. La seconda parte del nostro studio si è concentrata invece sulla misurazione delle costanti di stabilità dei complessi formati dal legante con vari tipi di anioni.

Questa serie di misure diversamente dalle precedenti sono state condotte ad un valore di pH ben preciso, 5.75, un valore nè troppo acido, dato che le fluorescenze sarebbero state poco intense e quindi avremmo avuto una minore affidabilità in questo tipo di studio, nè troppo basico, perchè la molecola di legante si sarebbe potuta degradare. Per il calcolo delle costanti abbiamo preparato soluzioni del legante a concentrazione circa  $2.5 \times 10^{-5}$  M alle quali sono state aggiunte piccole aliquote di soluzioni di ciascun anione a concentrazioni tali da garantire una stechiometria ben nota tra anione e legante durante la titolazione. I valori degli equivalenti aggiunti in ogni campione verranno riportati nei grafici successivi. Dopo ogni aggiunta

abbiamo registrato lo spettro di emissione. Gli spettri ottenuti, sono stati utilizzati per il calcolo delle costanti, facendo uso del programma Hypspec<sup>2</sup>. Questo programma utilizza il metodo dei minimi quadrati lineari per il calcolo delle costanti di stabilità di complessi a partire dagli spettri UV-Vis o di emissione di fluorescenza registrati in titolazioni a pH fisso o variabile. Nel nostro caso il programma è stato utilizzato per il trattamento di spettri di emissione registrati a pH fisso in presenza di quantità crescenti di specie anioniche. Come dati di input abbiamo inserito, oltre agli spettri ottenuti, i volumi e la concentrazione della soluzione del legante contenuto nella cuvetta e i volumi e la concentrazione della soluzione della specie anionica aggiunta durante la titolazione. Un ulteriore dato di input è stata la stechiometria del complesso formato. Nel caso particolare abbiamo trattato i dati ipotizzando la formazione dei complessi con stechiometria legante/anione 1:1, 1:2 e 1:3. Il trattamento dei dati ha escluso la formazione dei complessi con stechiometria 1:2 e 1:3, e ci ha permesso il calcolo delle costanti di stabilità dei complessi 1:1. Qualche problema è stato riscontrato effettuando queste misure in aria. E' ben noto l'effetto di spegnimento dell'emissione dovuto all'ossigeno disciolto nelle soluzioni. Per evitare allora possibili interferenze da parte dell'ossigeno, le costanti di stabilità sono state determinate in soluzioni in cui è stato fatto gorgogliare azoto per almeno 15 minuti. Tutte le operazioni di preparazione delle soluzioni sono state quindi eseguite in atmosfera di azoto dentro glove box. Questa procedura ha garantito sia valori dell'emissione maggiori che non operando in aria, sia una maggiore riproducibilità delle misure di intensità ottenute.

---

<sup>2</sup> P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Ann. Chim.*, 89, 1999, 45-49

## 2.4 Misure in glove box

La metodica per lo studio delle interazioni anione - legante prevedeva inizialmente la registrazione delle misure di fluorescenza in aria, quindi in presenza di ossigeno senza l'adozione di accorgimenti particolari. Tuttavia durante delle misurazioni su alcuni anioni è stato necessario lavorare in atmosfera di azoto, dato che i valori di fluorescenza ottenuti non avevano dato risultati facilmente riproducibili. Le misure in atmosfera di azoto sono state fatte tramite l'utilizzo del glove box, un contenitore di plexiglass munito di guanti e mantenuto nel nostro caso in atmosfera di azoto, in maniera da manipolare delle sostanze al suo interno senza che queste vengano in contatto in alcun modo con l'ambiente esterno. All'interno della glove box sono state trasferite tutte le apparecchiature per le misure di pH. Inoltre in tutte le soluzioni utilizzate nelle varie operazioni è stato allontanato l'ossigeno tramite il gorgogliamento prolungato di azoto al loro interno; queste una volta disaerate vengono portate all'interno della glove box. Qui il pH viene aggiustato come di consuetudine e successivamente la cuvetta di quarzo viene sigillata con dei setti di gomma in modo tale da mantenere l'atmosfera inerte al suo interno ed allo stesso tempo permettere le aggiunte degli anioni tramite l'uso di siringhe Hamilton fuori dalla glove box.

## Capitolo 3: Discussione

### 3.1 Sintesi del legante

La sintesi del legante macrociclico Acry222<sub>IN</sub>, già messa a punto in un lavoro di tesi precedente<sup>1</sup>, è stata condotta seguendo la procedura di Richman e Atkins<sup>2</sup>, opportunamente modificata, secondo questa serie di reazioni:

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

La sintesi è stata eseguita in ambiente totalmente anidro e in presenza di una base capace di neutralizzare l'acido bromidrico sviluppatosi nel corso della reazione per far sì che l'attacco nucleofilo avvenga più facilmente, deprotonando il gruppo amminico terminale tosilato che possiede un idrogeno con caratteristiche acide.

Una volta ottenuto il macrociclo, questo è stato purificato passandolo su una colonna cromatografica e successivamente detosilato mediante trattamento con una miscela di HBr/CH<sub>3</sub>COOH, in presenza di fenolo, seguendo una metodologia standard che viene ormai usata di consuetudine per questo tipo di composti<sup>3</sup>. Questo metodo, che consiste nella riduzione e

---

<sup>1</sup> Tesi sperimentale di laurea in Chimica di Matteoandrea Lucherelli (2013) Università di Firenze.

<sup>2</sup> J. E. RICHMAN, T. J. ATKINS, *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974), 2268

<sup>3</sup> J. CORMARMOND, P. PLUMIERÈ, J. M. LEHN, Y. AGNUS, R. LOIS, R. WEISS, O. KAHN, J. M. BADARAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982), 6330-6340.

successiva rimozione dei gruppi tosile, ha garantito una buona resa senza permettere la decomposizione del legante.

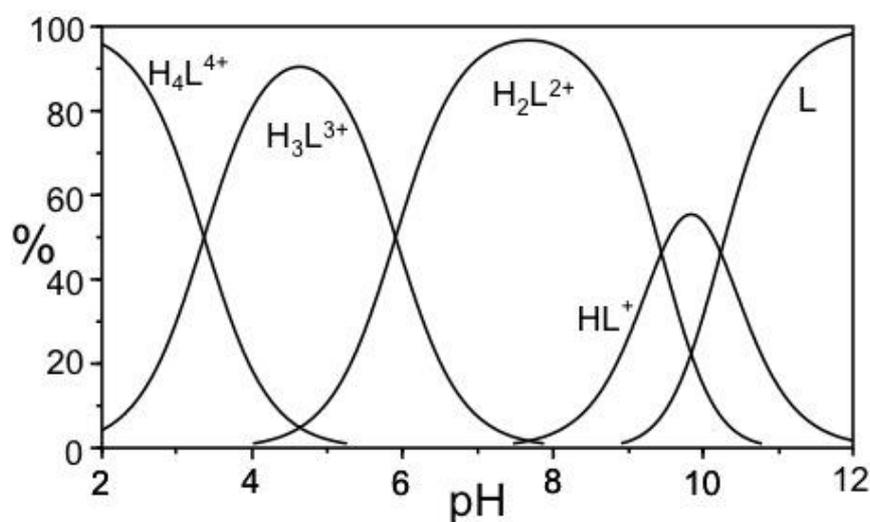
### 3.2 Equilibri acido-base

Anche i dati analizzati per la determinazione degli equilibri acido base sono stati trattati nel corso di una tesi precedente e verranno ridiscussi qui brevemente, in quanto necessari per la comprensione delle caratteristiche coordinative del legante nei confronti delle specie anioniche. In particolare i valori delle costanti di protonazione sono necessari per capire quale specie va ad interagire con l'anione se ci troviamo ad un valore di pH ben definito. I valori di queste costanti, determinate tramite l'uso di tecniche potenziometriche in soluzione acquosa di  $N(CH_3)_4NO_3$  0.1 M a  $25^\circ C$ , sono riportate nella tabella sottostante.

Reazione	logK
$L + H^+ \rightleftharpoons [LH]^+$	10.4 (1)
$[LH]^+ + H^+ \rightleftharpoons [LH_2]^{2+}$	9.44 (5)
$[LH_2]^{2+} + H^+ \rightleftharpoons [LH_3]^{3+}$	5.91 (9)
$[LH_3]^{3+} + H^+ \rightleftharpoons [LH_4]^{4+}$	3.36 (9)

**Tabella 3.1:** Equilibri di protonazione del legante Acry222<sub>IN</sub> e relative costanti (in unità logaritmiche) in soluzione acquosa ( $N(CH_3)_4NO_3$  0.1 M a  $25^\circ C$ ). I numeri tra parentesi indicano la deviazione standard sull'ultima cifra significativa.

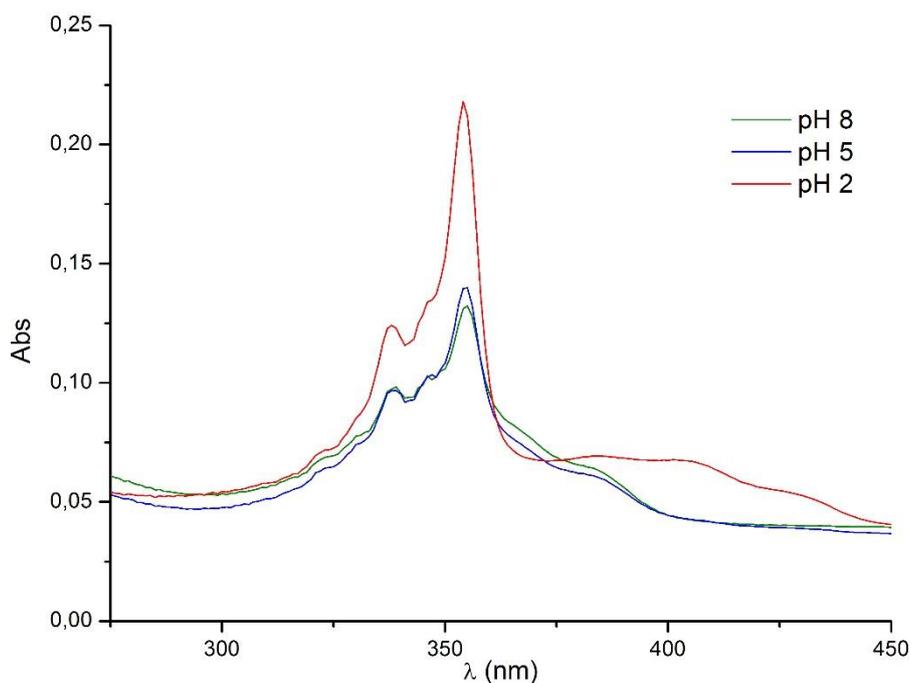
Il legante può legare fino a 4 protoni acidi in soluzione. Osservando la serie di dati a nostra disposizione è possibile notare subito la diminuzione marcata delle costanti di protonazione all'aumentare del grado di protonazione del legante. Questo comportamento è tipico dei composti poliamminici, spiegabile considerando la repulsione elettrostatica tra i gruppi ammoniacali che aumenta all'aumentare del grado di protonazione del legante. In figura 3.2 abbiamo riportato il diagramma di distribuzione delle specie protonate del legante in funzione del pH.



**Figura 3.2:** Diagramma di distribuzione delle specie protonate di L in soluzione di  $N(CH_3)_4NO_3$  0,1 M, in funzione del pH ( $[L] = 10^{-3}$  M)

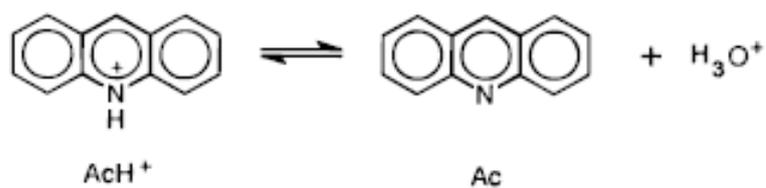
### 3.3 Spettrofotometria di assorbimento

Come visto nella parte introduttiva, la molecola di acridina dà molto facilmente un equilibrio acido-base osservabile per via spettrofotometrica. Qui sotto sono riportati 3 spettri dell'acridina a 3 differenti valori di pH.

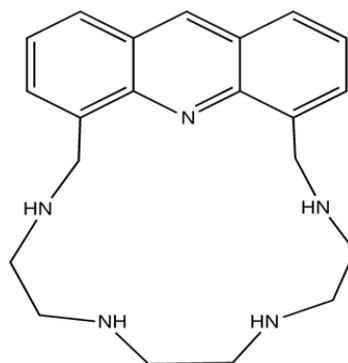


*Figura 3.3: spettri di assorbimento dell'acridina a pH 2, 5 e 8*

Questo equilibrio acido - base determina la formazione dello ione acridinio la cui presenza comporta una variazione dello spettro di assorbimento della molecola.



Infatti le transizioni elettroniche responsabili degli assorbimenti nella regione dello spettro compresa tra 450 e 300 nm possono essere di tre tipi. La prima è relativa alla presenza di un doppietto di non legame sull'azoto acridinico e le altre due coinvolgono invece orbitali di tipo  $\pi$  delocalizzati sull'anello aromatico. Eseguendo le misure in solventi polari, come ad esempio una soluzione acquosa, la transizione che risulta avere una minore energia è di tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ . A pH neutro o debolmente alcalino (pH 5-8) dove la specie predominante è l'acridina non protonata questa transizione può essere osservata a circa 385 nm. La seconda transizione da prendere in esame è quella di tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , che è associata al doppietto di non legame dell'azoto. Di norma è poco intensa dato che si tratta di una transizione non permessa e quindi non risulta chiaramente osservabile dato che viene nascosta dalla transizione precedente. L'ultimo tipo di transizione riguarda ancora l'anello ed è dunque di tipo  $\pi \rightarrow \pi^{*4,5,6}$  e presenta il suo massimo a 355 nm. Una cosa molto importante può essere notata se alla molecola di acridina viene legata la catena poliamminica.

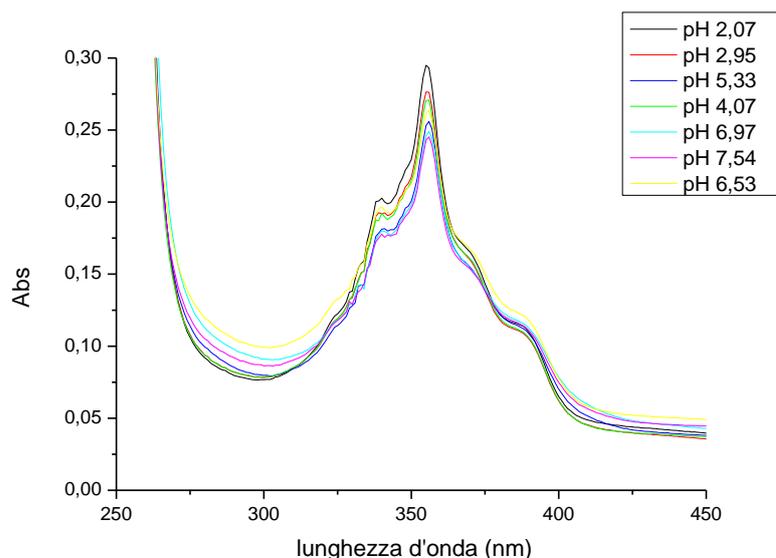


<sup>4</sup> O. Rubio-Pons, L. Serrano-Andres, M. Merchán, *J. Phys. Chem. A*, 2001 105, 9664.

<sup>5</sup> L. A. Diverdi, M. R. Topp, *J. Phys. Chem.*, 1984, 88, 3447.

<sup>6</sup> R. M. Smith, A. E. Martell, *NIST Stability Constants Database, version 4.0; National Institute of Standards and Technology: Washington, DC, 1997.*

In questo caso infatti gli spettri di assorbimento del legante non mostrano alcuna variazione dello spettro di assorbimento al variare del pH e le caratteristiche spettrali sono del tutto simili a quelle dell'acridina neutra. E' possibile infatti distinguere due tipi di bande la prima a 390 nm e la seconda più intensa con un picco a 355 nm.

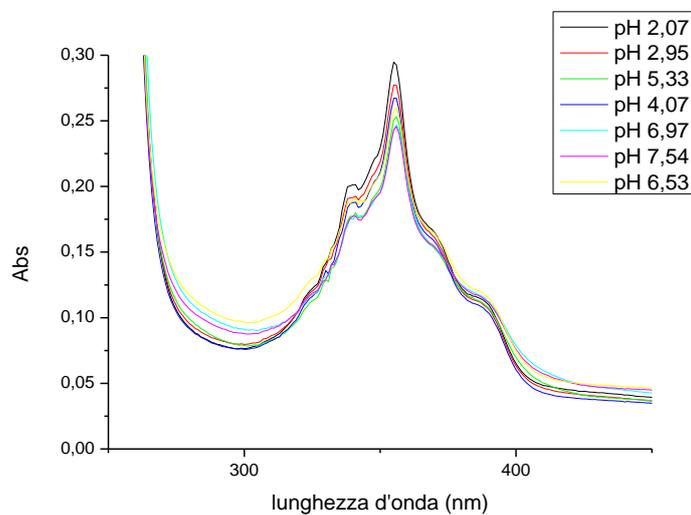


*Figura 3.4:* Spettri di assorbimento dell' Acry222<sub>IN</sub> a diversi valori di pH.

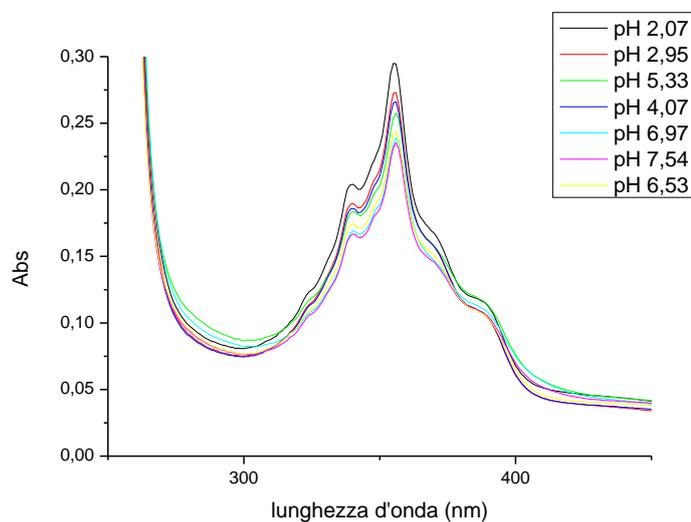
Possiamo quindi ipotizzare che l'azoto acridinico del legante non partecipi agli equilibri acido-base della molecola in soluzione acquosa e che quindi le costanti ricavate per via potenziometrica riguardino essenzialmente gli atomi di azoto della catena poliamminica.

Il passo successivo è stato effettuare misure di assorbimento UV-vis sul legante in presenza di specie anioniche a diverse concentrazioni. Anche se, come vedremo successivamente, alcune specie anioniche interagiscono con le forme protonate del legante, gli spettri di assorbimento risultano del tutto analoghi a quelli del legante libero. Nelle figure sottostanti abbiamo preso in considerazione lo ione bromuro a concentrazioni 1/1 e 100/1 rispetto alla concentrazione del legante. Possiamo concludere che nella

spettrofotometria di assorbimento non si registrano variazioni di rilievo in seguito alla complessazione con l'anione.



*Figura 3.4: spettri di assorbimento del legante con aggiunta di 1 equivalente di bromuro*

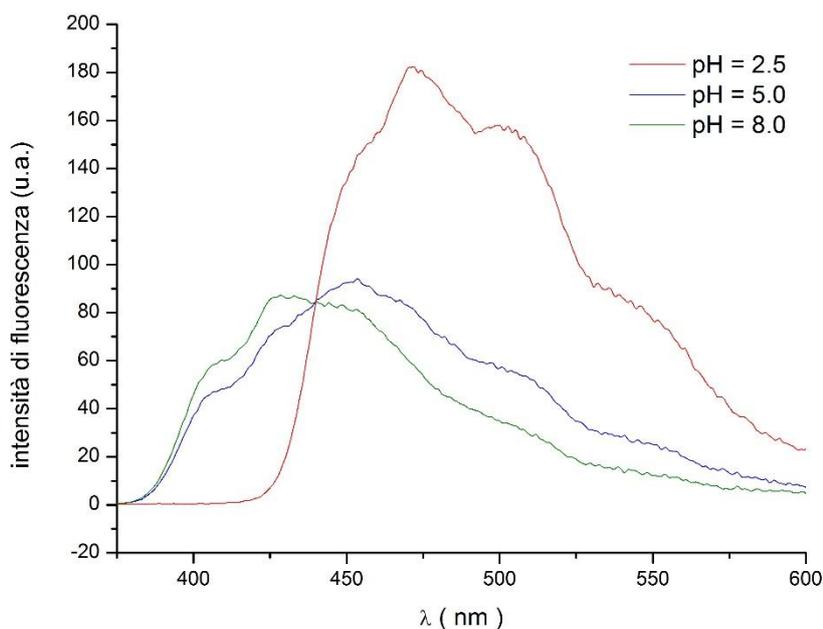


*Figura 3.5: spettri di assorbimento del legante con aggiunta di 100 equivalenti di bromuro*

### 3.4 Emissione di fluorescenza

#### 3.4.1 Emissione di fluorescenza dell'acridina

Anche in questo caso le caratteristiche di emissione dell'acridina sono state analizzate nel corso di un lavoro di tesi precedente. E' stato osservato come gli spettri di emissione di fluorescenza siano fortemente influenzati dalla concentrazione idrogenionica presente in soluzione. Eccitando a 345 nm si osserva un' emissione di fluorescenza molto diversa a seconda del valore di pH al quale ci troviamo<sup>7</sup>.



*Figura 3.6: Spettri di emissione di fluorescenza dell'acridina libera a pH 2.5, 5, 8.*

<sup>7</sup> T. Ryan, T. Xiang, K. P. Johnston, M. A. Fox *J. Phys. Chem A* 1997, 101, 1827-1835.

Dalla figura 3.6 possiamo vedere subito come a pH acidi, dove è presente lo ione acridinio  $\text{AcH}^+$ , abbiamo un massimo di emissione a circa 450 nm. Invece a pH alcalino, dove l'acridina risulta essere nella sua forma neutra  $\text{Ac}$ , il massimo di emissione è spostato a 420 nm. A pH intermedi l'emissione osservata è una combinazione delle precedenti. Questo comportamento così complesso dell'emissione di fluorescenza in funzione del pH è determinato dai valori delle costanti di dissociazione acida dello ione acridinio, nello stato fondamentale ( $\text{pK}_a$  di  $\text{AcH}^+ = 5.4$ ) ed in quello eccitato ( $\text{pK}_a^*$  di  $\text{AcH}^{*+} = 9.2$ <sup>8,9,10</sup>). Infatti avremo che quando  $\text{pH} < \text{pK}_a$ , la specie predominante sarà  $\text{AcH}^+$  e quindi l'emissione osservata sarà prodotta dalla specie  $\text{AcH}^{*+}$  il cui massimo sarà quello ad energia minore. Quando invece  $\text{pK}_a < \text{pH} < \text{pK}_a^*$  la specie presente maggiormente in soluzione acquosa è  $\text{Ac}$ . L'eccitazione di  $\text{Ac}$  produce una specie  $\text{Ac}^*$  che avrà caratteristiche di una base più forte di  $\text{Ac}$  e dunque quando questa si trova allo stato eccitato tenderà a protonarsi generando  $\text{AcH}^{*+}$ . Ne consegue che lo spettro risultante sarà costituito da due emissioni sovrapposte, una proveniente dalla specie  $\text{Ac}^*$  ed una dalla specie  $\text{AcH}^{*+}$  (spettro a pH 5). Lo spettro risultante presenterà quindi un massimo di emissione a circa 450 nm. Infine come ultimo esempio abbiamo il caso in cui  $\text{pH} > \text{pK}_a$ . Qui l'unica specie presente è  $\text{Ac}$  e l'emissione proverrà solo da  $\text{Ac}^*$  responsabile dell'emissione centrata a 420 nm (spettro a pH 8). Questi spettri manifestano un punto isosbastico a 440 nm indice di un equilibrio acido base in soluzione.

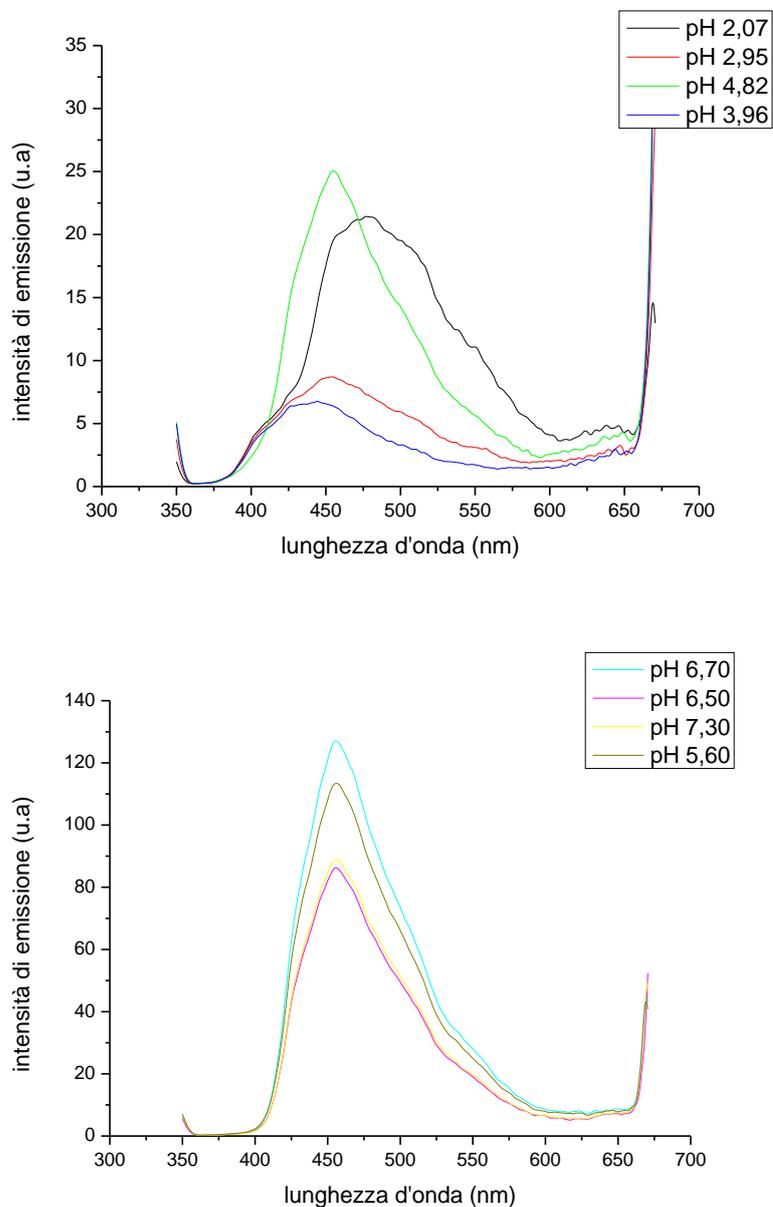
---

<sup>8</sup> A. Gafni, L. Brand, *Chem. Phys. Lett.*, 1978, 58, 346.

<sup>9</sup> E. Todd Ryan, T. Xiang, K.P. Johnston, M.A. Fox, *J. Phys. Chem. A*, 1997, 101, 1827.

<sup>10</sup> J. Rak, J. Blazejowski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1992, 92, 287.

### 3.4.2 Emissione di fluorescenza del legante



*Figura 3.7* Spettri di emissione di fluorescenza del legante registrati a vari pH

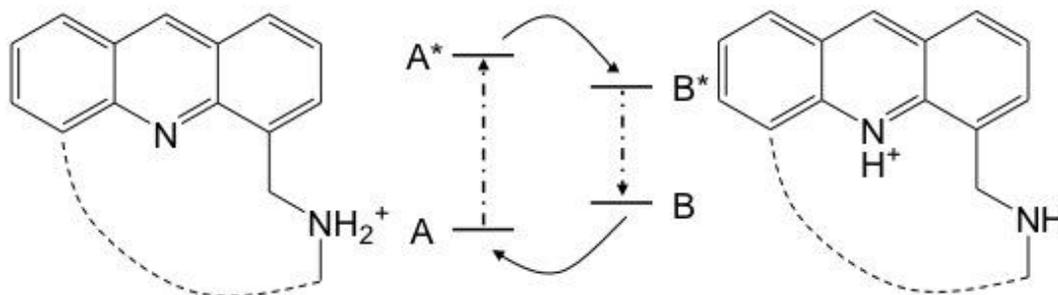
Sono state condotte misure analoghe sul legante, che mostrano un comportamento simile a quello dell'acridina. Infatti a pH molto acidi abbiamo un massimo di assorbimento sui 480 nm proprio come nel caso

dell'acridina protonata, suggerendo la presenza della specie  $H_5L_5^{5+}$ . Viceversa spostandosi a pH leggermente più alti 2.95 e 3.96 l'emissione di fluorescenza del legante mostra un comportamento opposto a quello dell'acridina avendo il massimo di emissione a circa 430 nm da mettere in relazione con la presenza in soluzione della specie  $H_4L_4^{4+}$

A pH intermedi,  $4 < \text{pH} < 8$ , dove le forme prevalenti sono  $H_3L_3^{3+}$  e  $H_2L_2^{2+}$ , il massimo si sposta a ca. 456 nm. In particolare a pH debolmente alcalino, si ha una netta diminuzione della fluorescenza, la cui forma però rimane del tutto simile alla precedente.

È possibile quindi notare come l'inserimento della catena poliamminica sulla molecola di acridina modifica sensibilmente le caratteristiche di emissione di quest'ultima. Il comportamento può essere causato non solo dalla presenza, ma anche dal numero e dalla posizione dei protoni acidi legati agli atomi di azoto della catena poliamminica. Dobbiamo effettuare quindi ulteriori osservazioni riguardo allo stato fondamentale e lo stato eccitato della molecola di legante. L'emissione di fluorescenza coinvolge il primo stato eccitato  $S_1$  della molecola. Come abbiamo osservato in precedenza, le proprietà acido base riguardanti la molecola di acridina in questo stato sono differenti rispetto alle proprietà riscontrate nello stato fondamentale, infatti in  $S_1$  l'acridina ha un maggior carattere basico. È quindi possibile ipotizzare che un aumento della basicità dell'azoto acridinico possa portare, se ci troviamo nello stato eccitato, ad un processo di trasferimento protonico intramolecolare, che coinvolge gli idrogeni legati

agli atomi di azoto della catena alifatica più vicini all'acridina, e l'azoto eteroaromatico<sup>11,12,13,14</sup>.



**Figura 3.8:** Meccanismo del trasferimento protonico e coinvolgimento degli stati eccitati.

In figura 3.8 sono rappresentati schematicamente gli stati eccitati del legante e come avviene il trasferimento protonico tra lo stato A\* e lo stato B\*.

L'eccitazione della forma A sia che ci troviamo in ambiente acido o debolmente basico, porta alla forma A\*, uno stato eccitato che in tempi brevissimi decade alla forma B\* eccitata mediante trasferimento protonico intramolecolare. Avremo quindi uno spettro di emissione dovuto al decadimento radiativo dallo stato B\*, allo stato fondamentale metastabile B, il quale ristabilisce lo stato A termodinamicamente più stabile attraverso il processo inverso di trasferimento protonico. La transizione che avviene tra gli stati A e A\* è individuabile mediante spettrofotometria di assorbimento,

<sup>11</sup> A. Gafni, L. Brand, *Chem. Phys. Lett.*, 1978, 58, 346.

<sup>12</sup> E. Todd Ryan, T. Xiang, K.P. Johnston, M.A. Fox, *J. Phys. Chem. A*, 1997, 101, 1827.

<sup>13</sup> P. Gangola, N. B. Joshi, D. D. Pant, *Chem. Phys. Lett.*, 1979, 60, 329.

<sup>14</sup> C. A. Smith, H.-C. Chang, W. S. Struve, G. J. Atwell, W. A. Denny, *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 8927.

mentre la transizione tra gli stati energetici  $B^*$  e  $B$  è rilevabile mediante emissione di fluorescenza.

L'ipotesi sopra trattata è in grado di spiegare quindi la tipica modalità di emissione dell'acridina protonata negli spettri del legante registrati a pH compresi tra 5 e 8, in cui però allo stato fondamentale, l'azoto acridinico del legante non è protonato, come mostrano gli spettri di assorbimento.

Tuttavia questo meccanismo non riesce a spiegare la diminuzione delle intensità di fluorescenza a  $\text{pH} > 7$  oppure lo spostamento verso il blu per valori di pH fino a 2. La scarsa emissione che riscontriamo a  $\text{pH} > 7$  può essere attribuita ad uno spegnimento della fluorescenza per effetto PET (vedi capitolo 1), ovvero si manifesta un trasferimento di elettroni dai doppietti di non legame degli atomi di azoto alifatici non protonati al fluoroforo dello stato eccitato. L'effetto PET è inibito dalla protonazione degli atomi di azoto della catena, come avviene già nella forma biprotonata  $\text{H}_2\text{L}^{2+}$ . È più difficile invece trovare una valida giustificazione per l'emissione osservata ai valori di pH 3.96 e 2.95. Dato che comunque l'emissione che si osserva per il legante, in questo caso è molto simile a quella dell'acridina non protonata, e poichè c'è una buona corrispondenza tra lo spettro di assorbimento e di emissione, cioè mostrano simmetria speculare, la specie che assorbe deve essere la stessa che è responsabile dell'emissione e quindi la specie A.

Nel legante tetraprotonato il trasferimento dell' $\text{H}^+$  dall'azoto vicinale della catena, all'azoto acridinico nello stato eccitato, non avviene. La ragione di questo comportamento anomalo può essere compresa prendendo in considerazione che la struttura del legante può cambiare quando un protone acido, e quindi una carica positiva, viene a legarsi sulla catena poliamminica. Avremo infatti una maggiore densità di carica e maggiori saranno quindi le forze di repulsione tra gli azoti protonati della catena che tenderanno ad allontanarsi il più possibile tra loro. L'effetto ottenuto sarà

quindi quello di allargare la catena poliamminica allontanando anche i relativi atomi di azoto alifatici protonati dall' atomo di azoto acridinico, rendendo di fatto impossibile il trasferimento protonico nello stato eccitato.

### **3.5 Interazione del legante con anioni e sua analisi tramite spettroscopia di emissione di fluorescenza**

La prima parte dello studio riguarda la complessazione di vari anioni con il legante a diversi valori di pH. Gli anioni che sono stati presi in considerazione sono fluoruro, cloruro, bromuro, ioduro, solfato e nitrato. Questo processo è stato eseguito per avere un'idea del pH necessario a cui lavorare per avere le condizioni ottimali per determinare le costanti di complessazione. A questo pH dobbiamo quindi avere un valore di intensità di emissione di fluorescenza possibilmente alta, ed allo stesso tempo, con l'aggiunta di quantità note degli anioni presi in considerazione, l'intensità di emissione dovrà mostrare dei cambiamenti significativi. I pH a cui sono state effettuate le misure sono 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. A pH più alcalino abbiamo notato che le misure erano poco riproducibili. Inoltre, il pH non rimaneva costante nel tempo. Ciò può essere indicativo di una parziale decomposizione del legante ad alti valori di pH. Per questo abbiamo limitato le nostre misure nel campo di pH 2 - 8.

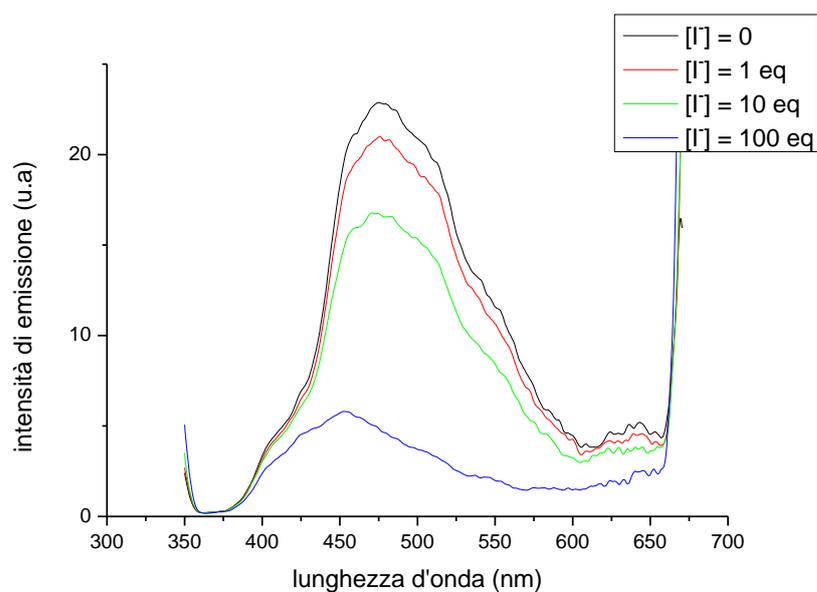
Il processo nel suo insieme ha visto nell'ordine diversi stadi.

Abbiamo preparato delle soluzioni di anione a concentrazioni tali da ottenere un rapporto finale legante/anione pari a 1/1, 1/10 e 1/100, utilizzando il minimo volume possibile.

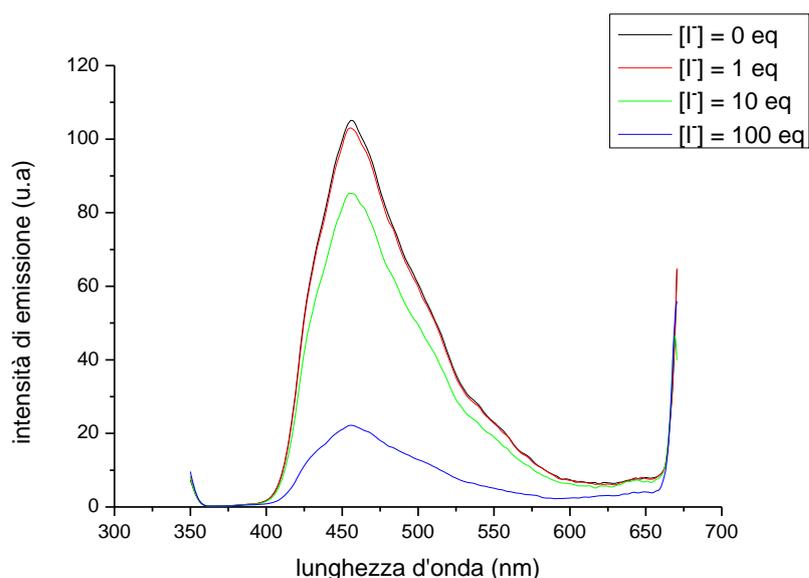
Sono state preparate 8 cuvette di quarzo ciascuna contenente 2 ml di legante. La soluzione di ogni cuvetta è stata opportunamente portata al pH

voluto tramite l'aggiunta di soluzioni di NaOH o acido metansolfonico precedentemente preparati a diverse concentrazioni (1 M, 0.1 M e 0.01 M). Abbiamo poi proceduto aggiungendo la soluzione dell'anione, in genere come sale sodico, in ordine crescente di concentrazione, misurando dopo un intervallo di 20 minuti circa dopo ogni aggiunta, i nuovi spettri di fluorescenza.

A titolo di esempio della metodologia utilizzata, nelle figure 3.8 e 3.9 abbiamo riportato gli spettri ottenuti su soluzioni del legante a due valori di pH diversi a cui è stato aggiunto ioduro, sottoforma di NaI, in rapporti molari legante/anione 1:1, 1:10 e 1:100.



*Figura 3.9: Spettri di emissione di fluorescenza del legante con aggiunte di 1, 10 e 100 equivalenti di ioduro a pH 2.07*



*Figura 3.10: Spettri di emissione di fluorescenza del legante con aggiunte di 1, 10 e 100 equivalenti di ioduro a pH 5.82*

Gli spettri ottenuti permettono subito di fare alcune osservazioni.

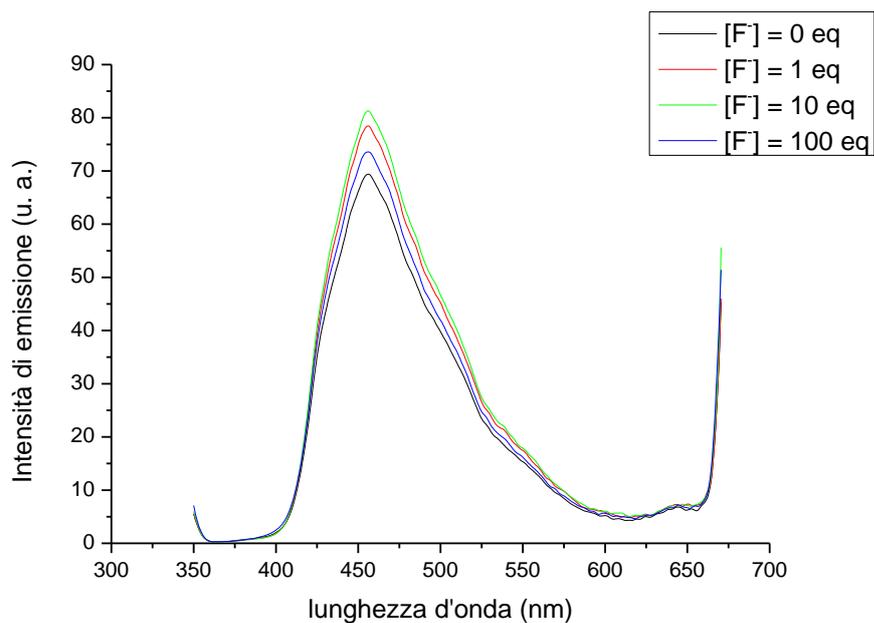
L'aggiunta di quantità crescenti di ioduro porta a un progressivo 'quenching' dell'emissione di fluorescenza. Inoltre, come abbiamo già avuto modo di notare nel paragrafo precedente, gli spettri registrati in assenza di ioduro hanno caratteristiche diverse al variare del pH. A pH molto acidi (2.07 nell'esempio soprariportato) notiamo un massimo di emissione a 480 nm. Ripetendo la misura a pH più alcalino, come ad esempio 5.82, vediamo che il valore massimo del picco si trova a 456 nm ed inoltre l'intensità di emissione in corrispondenza del massimo prima dell'aggiunta dell'anione è di gran lunga maggiore dell'intensità misurata alla stessa lunghezza d'onda pH 2. Tutte le misure sono state svolte inizialmente in aria.

Per ogni anione, abbiamo analizzato prima le variazioni spettrali al variare del pH in presenza di quantità diverse di specie anionica, con rapporti molari legante anione pari a 1/1, 1/10 e 1/100, determinando così il campo di pH in cui si avevano le maggiori variazioni spettrali. Abbiamo così

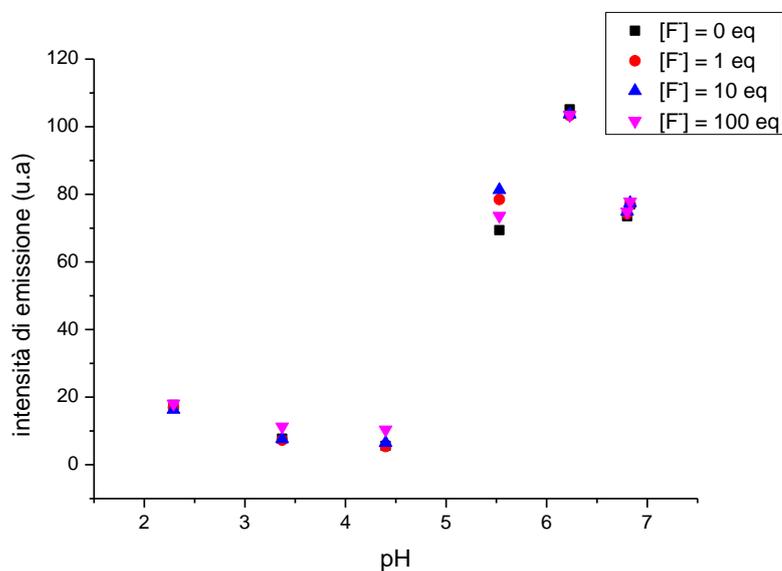
evidenziato che le maggiori variazioni spettrali in presenza dei differenti anioni avvenivano nella regione di pH compresa tra 5 e 6. Abbiamo deciso perciò di analizzare più in dettaglio questa regione di pH. Di tutte le soluzioni è stato misurato il pH prima e dopo l'aggiunta dei diversi sali, per verificare che il pH non cambiasse in seguito all'aggiunta.

### **3.5.1 Misure in presenza di ione fluoruro.**

In Figura 3.11 abbiamo riportato gli spettri di emissione di fluorescenza del legante in presenza di diverse quantità di ione fluoruro misurati a pH 5.53 in condizioni aerobiche. Si può osservare come in queste condizioni l'aggiunta di fluoruro non comporti variazioni sostanziali dell'emissione. Un comportamento analogo è osservato anche negli esperimenti, condotti nelle stesse condizioni in aria, a valori di pH differenti, come ben evidenziato dalla Figura 3.12, dove abbiamo riportato in funzione del pH i valori di intensità di emissione (in unità arbitrarie, u. a.) del legante da solo e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di anione. I valori sono stati misurati in corrispondenza del massimo della banda a 456 nm. Vedremo più avanti come il comportamento sia ben diverso lavorando in atmosfera di azoto in glove-box.



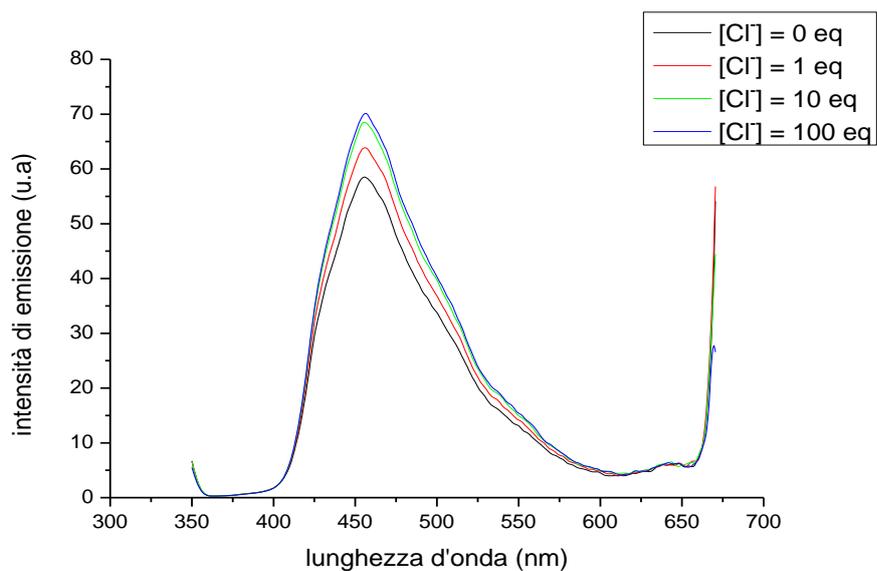
*Figura 3.11: Spettri di emissione di fluorescenza del legante a pH 5.53 in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di fluoruro*



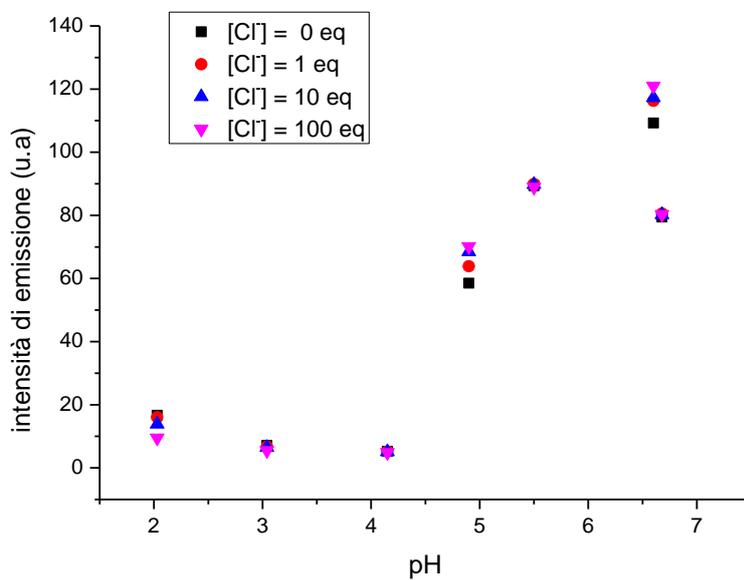
*Figura 3.12: Intensità di emissione di fluorescenza del legante a 456 nm a vari valori di pH in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di fluoruro*

### 3.5.2 Misure in presenza di ione cloruro.

Analoghi esperimenti sono stati eseguiti con l'anione cloruro. Come è possibile osservare in Figura 3.14, l'intensità di emissione a 456 nm subisce cambiamenti significativi in presenza di cloruro solo a pH 4.9, mentre a pH più acidi o più alcalini, le caratteristiche spettrali non sono alterate dalla presenza di cloruro anche in forte eccesso. A differenza di quanto osservato con lo ione fluoruro, gli spettri riportati in Figura 3.13 evidenziano come l'intensità di emissione aumenti in maniera evidente all'aumentare della concentrazione dell'anione. In particolare, l'aggiunta di un equivalente di NaCl fa passare l'intensità di emissione a 456 nm da 59 (in unità arbitrarie, u.a.) a 64. In presenza di 10 equivalenti di NaCl fa aumentare l'intensità a circa 68 u.a, mentre l'incremento ottenuto tramite l'aggiunta di 100 equivalenti fa aumentare l'intensità solo fino a 70 u.a.. Questi dati possono suggerire che si abbia la formazione di un complesso stabile in soluzione, già quasi completamente formato dopo l'aggiunta di 10 equivalenti di cloruro.



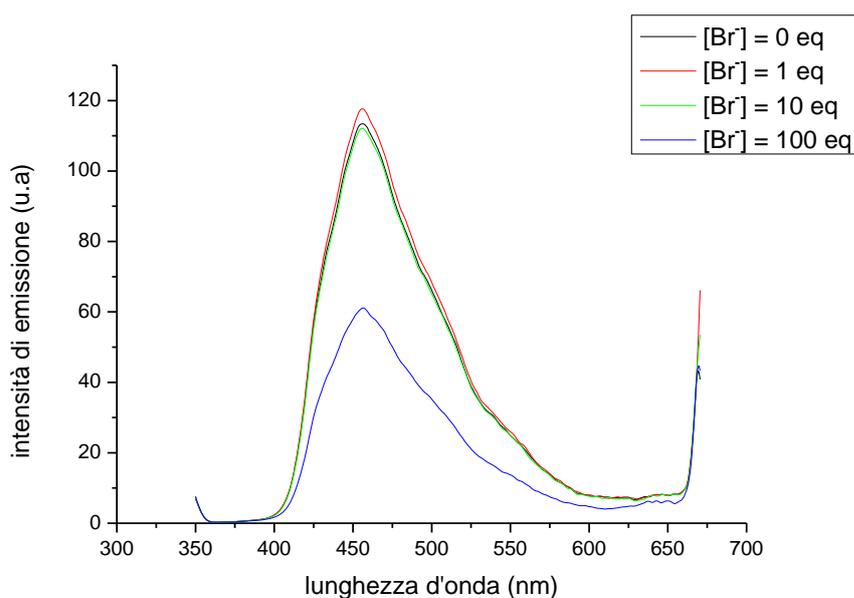
**Figura 3.13:** Spettri di emissione di fluorescenza del legante a pH 4.9 in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di cloruro



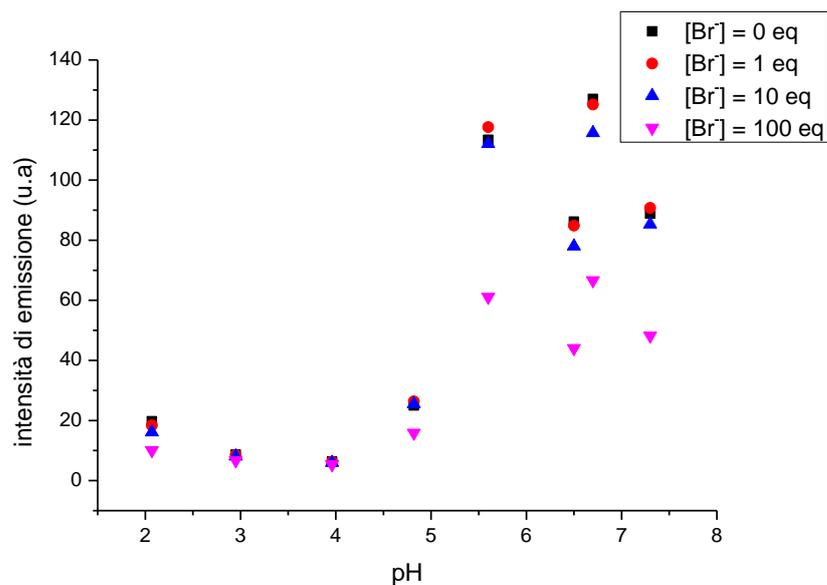
**Figura 3.14:** Intensità di emissione di fluorescenza del legante a 456 nm a vari valori di pH in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di cloruro

### 3.5.3 Misure in presenza di ione bromuro.

A differenza dello ione cloruro, l'aggiunta di bromuro, sotto forma di NaBr, a una soluzione del legante, porta ad uno spengimento dell'emissione di fluorescenza ben evidente in presenza di 100 equivalenti di anione, come evidenziato in figura 3.15, dove sono riportati lo spettro del legante da solo ed in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di ione bromuro a pH 5.6. Lo stesso comportamento si osserva (figura 3.16) anche a pH maggiori di 5.6, mentre a pH più acidi l'emissione del legante è poco influenzata dalla presenza anche di forti eccessi (100 equivalenti dell'anione).



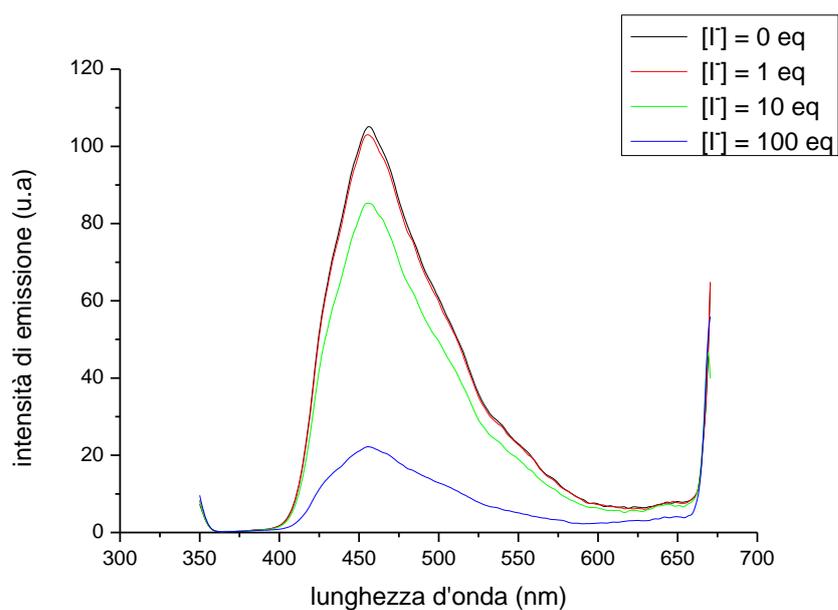
*Figura 3.15: Spettri di emissione di fluorescenza del legante a pH 5.6 in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di bromuro.*



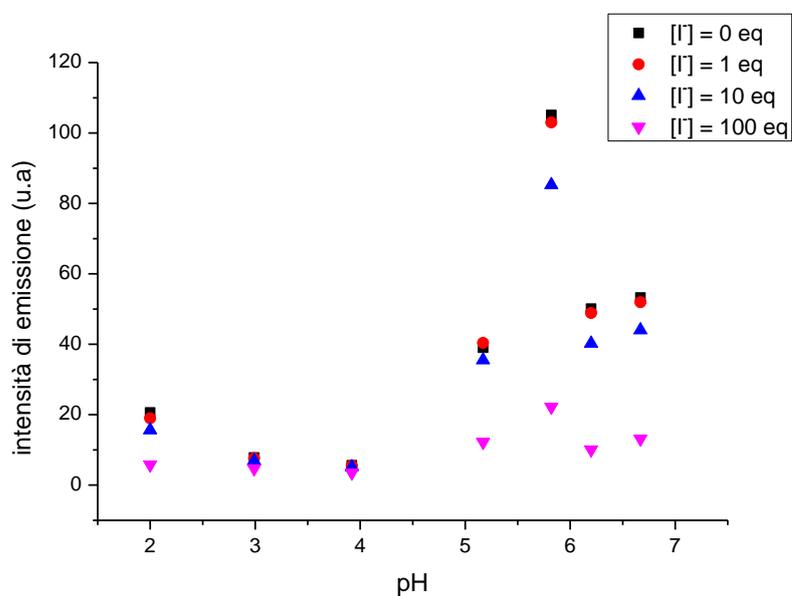
*Figura 3.16: Intensità di emissione di fluorescenza del legante a 456 nm a vari valori di pH in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di bromuro.*

### 3.5.4 Misure in presenza di ione ioduro.

Analoghi esperimenti con l'anione ioduro hanno anch'essi dato risultati interessanti. Come possiamo notare nella figura 3.17 si osserva uno spegnimento dell'emissione di fluorescenza analogo al caso riportato precedentemente per il bromuro. Il caso esaminato in questa figura è stato analizzato portando il campione ad un pH di 5.82. E' interessante notare la diminuzione molto accentuata dell'intensità di fluorescenza per l'aggiunta di 100 equivalenti di anione. Si passa da un valore di 105 u.a ad un valore di 22, una diminuzione di circa l'80%. Prendendo in considerazione invece le misure condotte a valori diversi di pH (figura 3.18), andando a misurare le intensità di fluorescenza a 456 nm possiamo notare che a pH più acidi di 4.5 le caratteristiche spettrali non sono state alterate sostanzialmente dalla presenza dell'anione.



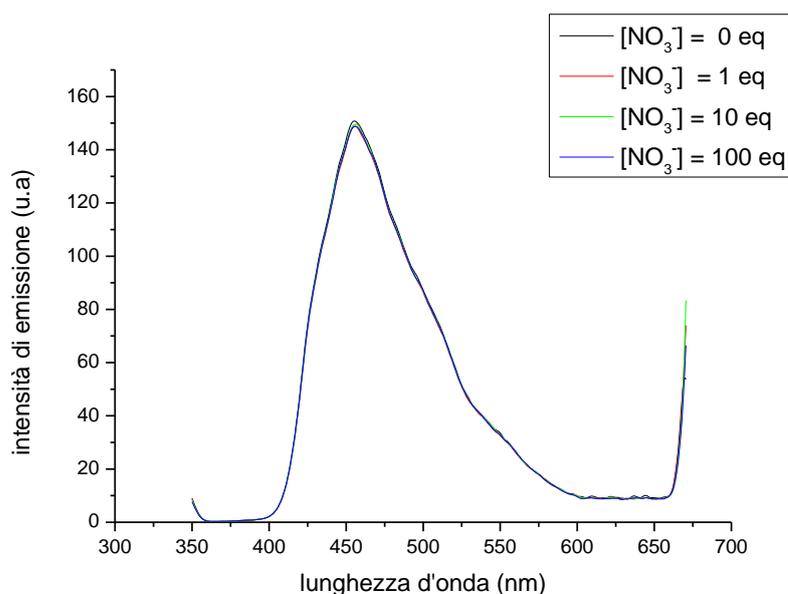
*Figura 3.17: Spettri di emissione di fluorescenza del legante a pH 5.82 in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di ioduro.*



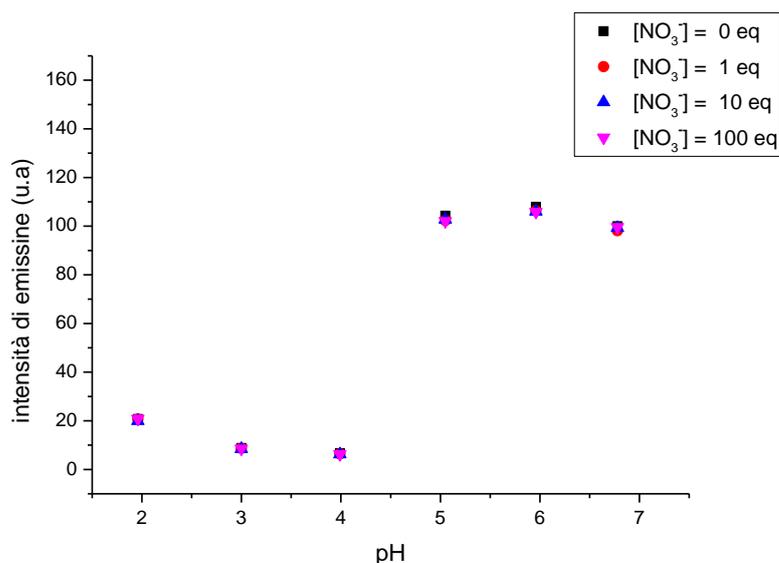
*Figura 3.18: Intensità di emissione di fluorescenza del legante a 456 nm a vari valori di pH in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di ioduro.*

### 3.5.5 Misure in presenza di ione nitrato

Gli spettri di emissione di fluorescenza registrati su soluzioni del legante contenenti lo ione nitrato hanno evidenziato come questo anione non dia luogo ad alcun effetto sull'emissione di fluorescenza del legante a nessun valore di pH. Il fatto che l'emissione di fluorescenza del legante non risenta della presenza di nitrato fa sì che il legante non possa essere considerato una sonda per la sua determinazione anche solo qualitativa. Questo anione non verrà quindi preso in considerazione per le successive misure delle costanti di complessazione.



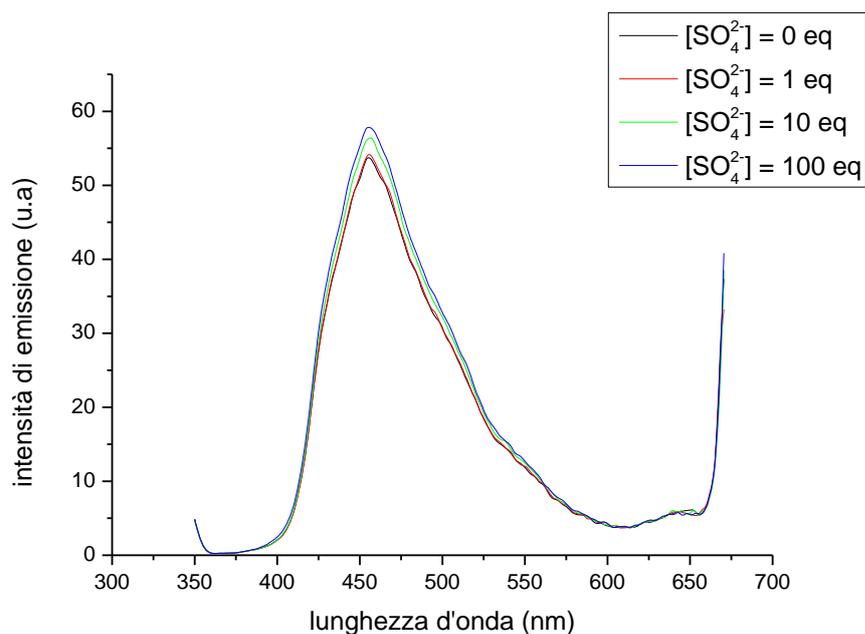
**Figura 3.19:** Spettri di emissione di fluorescenza del legante a pH 5.96 in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di nitrato.



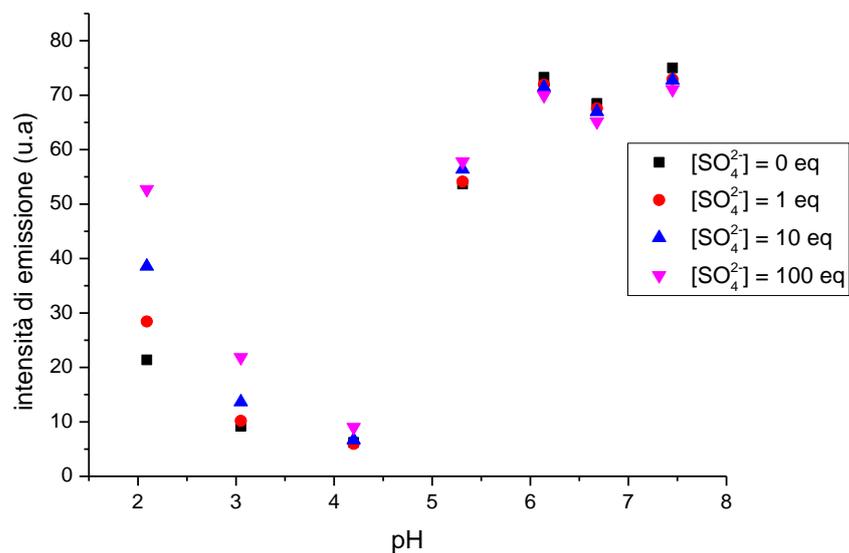
*Figura 3.20: Intensità di emissione di fluorescenza del legante a 456 nm a vari valori di pH in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di nitrato.*

### 3.5.6 Misure in presenza di ione solfato

Come possiamo notare dal grafico riportato in figura 3.22, il solfato influenza l'emissione del legante solo a  $\text{pH} < 3.5$ . Qui possiamo assistere ad una graduale accensione della fluorescenza in seguito alle aggiunte dell'anione. Tuttavia nella zona di nostro interesse, cioè a pH debolmente acido, vediamo che l'emissione non risente molto delle aggiunte. In particolare a  $\text{pH} 5.31$  (figura 3.21) è possibile vedere solo una debolissima accensione, mentre a pH più alcalini vediamo solo dei deboli spegnimento dell'emissione fluorescenza. L'analisi di questi dati ci ha indotto, come nel caso del nitrato, a non considerare questo anione per le misure delle costanti di stabilità.



*Figura 3.21: Spettri di emissione di fluorescenza del legante a pH 5.96 in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di solfato.*

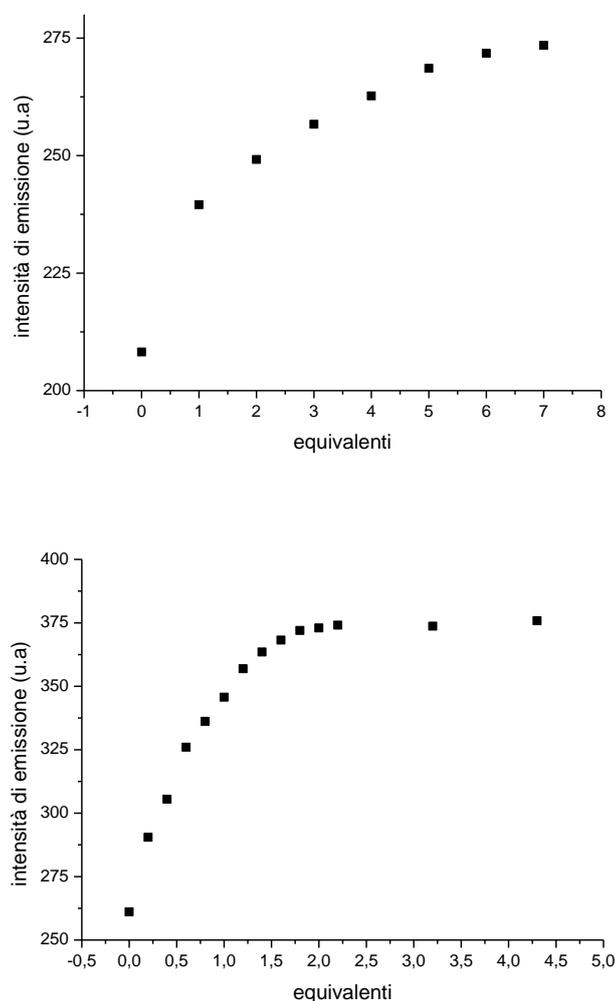


*Figura 3.22: Intensità di emissione di fluorescenza del legante a 456 nm a vari valori di pH in assenza e in presenza di 1, 10 e 100 equivalenti di solfato*

### 3.6 Misura delle costanti di complessazione

La serie di dati raccolti con le misure effettuate, è servita a capire il campo di pH in cui la molecola dà luogo a cambiamenti spettrali facilmente osservabili e misurabili in presenza di quantità crescenti di specie anioniche. La successiva fase di lavoro è stata mirata invece alla determinazione della stechiometria degli eventuali complessi formati con Acry222<sub>IN</sub> e delle loro corrispondenti costanti di stabilità. Per questo studio si è deciso di lavorare ad un pH ben preciso che nel nostro caso è stato 5.75. Si è preparata una soluzione del legante a questo valore di pH e si sono eseguite in successione aggiunte di volumi minimi di soluzioni di anione a titolo noto. Dopo ogni aggiunta si è atteso circa 5 minuti e si è registrato lo spettro di fluorescenza. Una volta registrati gli spettri, abbiamo misurato le intensità di fluorescenza in corrispondenza del massimo della banda a 456 nm. I valori ottenuti sono stati poi riportati in grafico in funzione del numero di equivalenti di anione aggiunto. Il trattamento di questi dati con il programma Hypspec permette di determinare sia la stechiometria dei complessi che le loro costanti di stabilità. A pH 5.75 il legante si trova in due forme diverse,  $[H_2L]^{2+}$  e  $[H_3L]^{3+}$ , per cui le costanti di equilibrio che verranno determinate saranno relative all'interazione di entrambe le specie con i differenti anioni. Ciò rende difficile calcolare le costanti relative all'interazione di una singola specie con una specie anionica e le costanti calcolate saranno di fatto delle costanti condizionali, ossia riferite solo al valore di pH a cui sono state determinate. Comunque, poiché tutte le misure sono state effettuate allo stesso valore di pH, i valori ottenuti sono confrontabili tra loro e possono essere utilizzati come misura dell'affinità del legante nei confronti dei diversi anioni. Come abbiamo visto precedentemente, in alcuni casi le misure effettuate all'aria portano a delle variazioni di intensità di emissione poco evidenti, in particolare nel caso

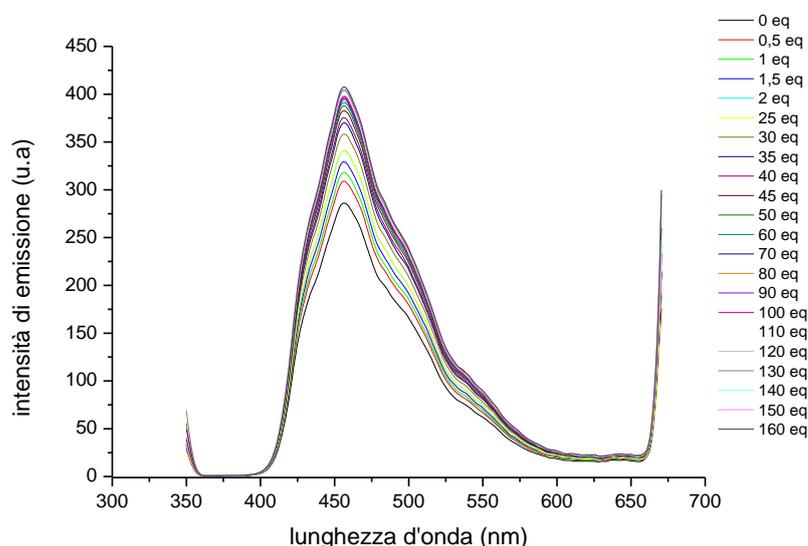
dello ione cloruro e soprattutto nel caso dello ione fluoruro. Misure preliminari effettuate disareando con azoto le soluzioni di legante, NaCl e NaF hanno evidenziato come l'aggiunta di questi anioni porti a un marcato aumento dell'emissione di fluorescenza. Ciò è ben evidente dai risultati mostrati in Figura 3.23, dove abbiamo riportato il risultato di due diversi esperimenti, condotti rispettivamente in ambiente aerobico e disareato allo stesso pH. In entrambi i casi l'intensità di emissione del legante a 456 nm aumenta all'aumentare del numero di equivalenti di NaCl aggiunti, ma l'incremento è ben maggiore in ambiente disareato.



*Figura 3.23. Intensità di emissione di fluorescenza del legante in presenza di quantità crescenti di cloruro all'aria (sopra) e in ambiente disareato (sotto).*

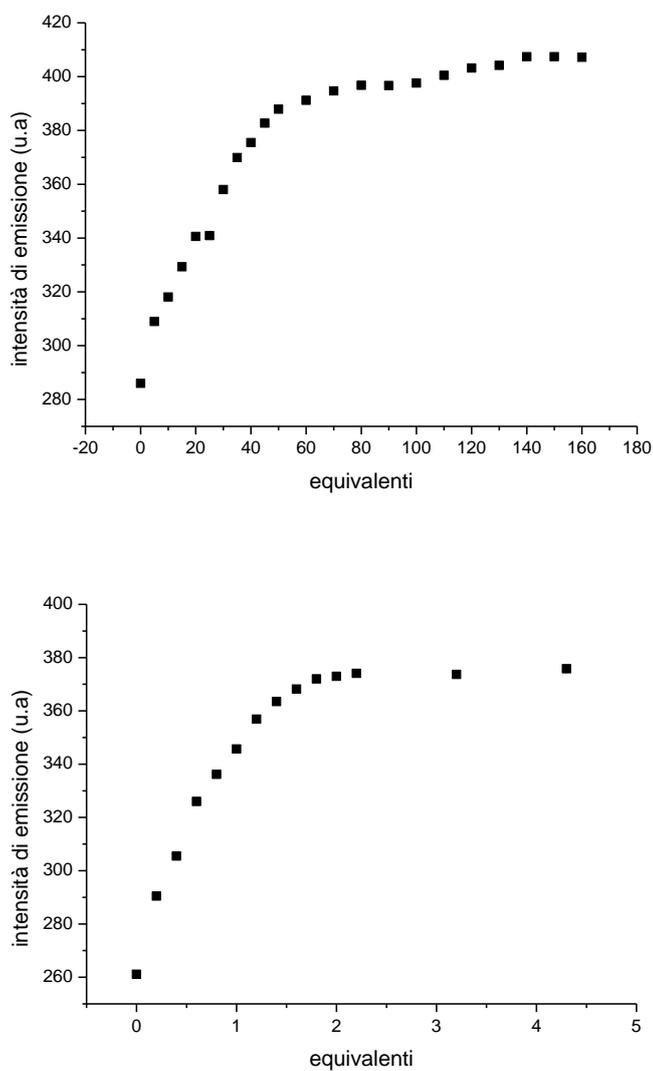
Possiamo presupporre quindi che l'ossigeno presente nelle soluzioni influenzi l'emissione di fluorescenza del fluoroforo, a causa delle ben note capacità di spengere l'emissione di fluorescenza, capacità dovute sostanzialmente al paramagnetismo di questa piccola molecola. Ciò si risente particolarmente nel caso di fluoruro e cloruro, in cui possiamo pensare che l'incremento dell'emissione dovuta all'interazione con questi anioni sia contrastato e reso quasi nullo dall'interazione con l'ossigeno molecolare. Abbiamo perciò deciso di effettuare tutte le nostre titolazioni su soluzioni opportunamente disareate. A tale scopo le soluzioni sono state prima disareate tramite insufflamento di azoto per circa 15 minuti e poi trasferite in glove-box, dove sono state effettuate le aggiunte nel corso delle diverse titolazioni.

A titolo di esempio riportiamo in figura 3.24, gli spettri ottenuti in seguito all'aggiunta di quantità crescenti di ione fluoruro in ambiente disareato a pH 5.75. E' evidente come aggiunte successive portino ad un marcato aumento dell'intensità di fluorescenza del legante.

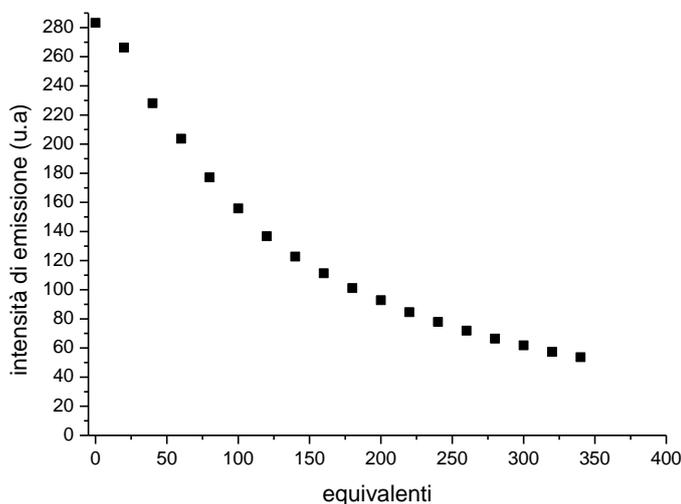
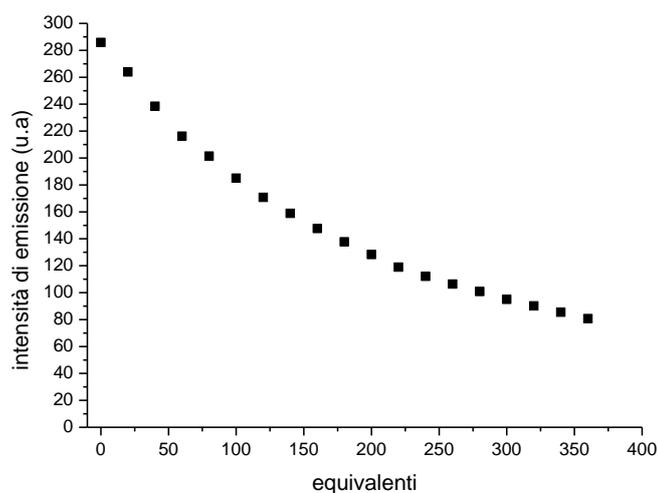


*Figura 3.24: Spettri di emissione di fluorescenza del legante in presenza di quantità crescenti di fluoruro.*

In figura 3.25 e 3.26 abbiamo invece riportato l'intensità di emissione di fluorescenza misurata a 456 nm in presenza di quantità crescenti di fluoruro, cloruro, bromuro e ioduro. Tutte le titolazioni sono state effettuate disareando le soluzioni con azoto.



*Figura 3.25. Intensità di emissione di fluorescenza misurati su soluzioni disareate in presenza di quantità crescenti di fluoruro (in alto) e cloruro (in basso).*



**Figura 3.26:** Intensità di emissione di fluorescenza misurati su soluzioni disareate in presenza di quantità crescenti di bromuro (in alto) e ioduro (in basso).

Risulta subito evidente come le aggiunte di fluoruro e cloruro portino a un marcato effetto di aumento dell'intensità di emissione, mentre bromuro e ioduro diano luogo anche in queste condizioni ad un 'quenching' dell'emissione. E' interessante notare come nel caso di fluoruro e cloruro, l'intensità di emissione del legante subisca un notevole incremento in

seguito alle prime aggiunte di anione. Con le aggiunte successive l'incremento diventa sempre meno accentuato ed infine l'intensità di emissione raggiunge un valore di 'plateau' pressochè costante.

Questo andamento è generalmente indicativo della formazioni di addotti stabili tra recettore e substrato anionico. Nel caso di ioduro e bromuro, il valore di 'plateau' non viene mai raggiunto, neppure in seguito all'aggiunta di 250 equivalenti di substrato anionico, suggerendo la formazione di complessi meno stabili.

Abbiamo a questo punto trattato i dati ottenuti con il programma Hypspec, usando come dati di input gli spettri ottenuti, il volume e la concentrazione della soluzione del legante, i volumi aggiunti e la concentrazione della soluzione degli anioni e la stechiometria proposta per i complessi formati. Il trattamento dei dati ha permesso di evidenziare come il legante formi complessi con stechiometria 1:1 con tutti e 4 gli anioni. Modelli con stechiometrie differenti non sono stati 'accettati' dal programma il quale ci ha fornito infine le costanti di stabilità dei complessi, che sono riportate, in unità logaritmiche in tabella 3.27

Anione	LogK
Fluoruro	3.90(1)
Cloruro	3.67(1)
Bromuro	2.21(1)
Ioduro	2.48(1)

**Tabella 3.27:** valori delle costanti di complessazioni dei complessi 1:1 in unità logaritmiche calcolate con il programma Hypspec. Tra parentesi gli errori sull'ultima cifra significativa.

La formazione di soli complessi con stechiometria 1:1 non è stupefacente ed è normalmente osservata in chimica di coordinazione anionica, soprattutto in soluzione acquosa. Infatti, la formazione di complessi con stechiometrie diverse è generalmente sfavorita per motivi entropici, anche se in alcuni casi cationi poliammonici si sono rivelati capaci di legare due specie anioniche formando complessi con stechiometria 1:2. Per quanto riguarda la stabilità dei complessi, i dati in Tabella 3.27 evidenziano come le costanti di formazioni del legante aumentino secondo la sequenza  $\text{Br}^- < \text{I}^- < \text{Cl}^- < \text{F}^-$ . Ciò fa pensare che l'interazione tra substrato anionico e recettore poliammonico sia legata prevalentemente da interazioni carica-carica e via legame ad idrogeno. Infatti la densità di carica degli anioni analizzati aumenta passando dal più grande ione ioduro al più piccolo fluoruro, portando ad interazioni elettrostatiche via via più forti al diminuire della dimensione dell'anione. In maniera analoga, anche la capacità di interagire via legame ad idrogeno aumenta nell'ordine  $\text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{F}^-$ . Ciò comunque non spiega il fatto che il complesso con lo ione bromuro sia, anche se di poco, meno stabile di quello con lo ione ioduro. Allo stesso tempo risulta difficile spiegare, con i dati in nostro possesso, il motivo per cui lo ione cloruro abbia una costante di stabilità solo 0,2 unità logaritmiche più bassa rispetto all'anione fluoruro, mentre si nota una diminuzione di stabilità ben più marcata passando dallo ione cloruro a agli ioni bromuro ed ioduro. Questo fa pensare che altri effetti possano influenzare la stabilità degli addotti come, ad esempio, un eventuale cambiamento della distribuzione dei protoni acidi sulla struttura alifatica del legante e cambi dimensionali e/o conformazionali del legante in seguito alla coordinazione, il possibile parziale incapsulamento di alcuni anioni all'interno della cavità macrociclica ed infine possibili interazioni tra l'anione e la nuvola elettronica di tipo  $\pi$  dell'unità acridina. Tutti questi effetti possono rendere conto anche dei diversi effetti sull'emissione di

fluorescenza osservati in presenza dei quattro anioni. Da questo punto di vista va però ricordato che l'interazione con specie atomiche pesanti, e tra queste gli anioni bromuro e ioduro, in genere favorisce meccanismi di decadimento degli stati eccitati di tipo non radiativo. Ciò potrebbe spiegare la diminuzione di intensità di emissione osservata in presenza di questi anioni.

## Capitolo 4: Conclusioni

Nel corso di questa tesi è stato preso in considerazione un sistema macrociclico poliamminico costituito da una unità acridina ed una catena tetraamminica per testarne il suo utilizzo come chemosensore per anioni. Gli anioni studiati sono stati: fluoruro, cloruro, bromuro, ioduro, nitrato e solfato. Le proprietà di emissione di fluorescenza di questa molecola sono fortemente dipendenti dal pH, siamo quindi andati inizialmente a cercare il valore di pH più adatto per osservare forti variazioni dell'emissione in seguito ad aggiunte di diversi equivalenti dei suddetti anioni. Il valore di pH che ha suscitato maggior interesse nel corso del nostro studio è stato nell'intervallo 5 - 6. A questo valore di pH solfati e nitrati non hanno dato variazioni apprezzabili nell'emissione di fluorescenza del legante e sono stati scartati come target del nostro chemosensore. Lo studio è invece proseguito sugli alogenuri. Con questi anioni il legante manifesta comportamenti caratteristici, in particolare di accensione dell'intensità di emissione di fluorescenza nel caso di fluoruro e cloruro, e di spegnimento dell'intensità di fluorescenza nel caso di bromuro e ioduro. Il comportamento di emissione è influenzato inoltre anche dalla presenza di ossigeno atmosferico. Infatti lavorando dentro glove - box abbiamo osservato che cloruri e fluoruri davano risultati riproducibili solo in assenza di ossigeno, mentre bromuro e ioduro hanno dato comportamenti molto simili sia in aria che sotto azoto. Con il programma Hypspec, le costanti di complessazione sono state determinate tramite l'uso di un particolare algoritmo. I valori ottenuti per le costanti di complessazione hanno mostrato come l'interazione tra substrato anionico e recettore poliammonico sia dovuta prevalentemente ad interazioni carica-carica e via legame ad idrogeno. Infatti il valore della costante di complessazione più alto è stato osservato nel caso del fluoruro, mentre bromuro e ioduro hanno dato valori di costanti di un'unità logaritmica inferiore al primo. Come conseguenza ai dati sperimentali ottenuti possiamo concludere che l'Acry222<sub>IN</sub> si sia dimostrata una buona sonda fluorimetrica per gli alogenuri dando emissioni di fluorescenza caratteristiche a seconda dell'anione legato.

Sarà interessante in futuro andare a vedere il comportamento di questo legante con altri anioni monovalenti o polivalenti continuandone a studiare le caratteristiche spettroscopiche.