



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in
Scienze Chimiche

***Studio delle proprietà coordinative
nuovi chemosensori di
fluorescenza basati sull'unità
[12]aneN₄***

***Study of the coordination
properties of new fluorescence
chemosensors based on the
[12]aneN₄ unit***

Relatore

Prof. Andrea Bencini

Correlatore

Dott.ssa Claudia Giorgi

Candidato

Jacopo Ceccarelli

Indice

1 – Introduzione	3
1.1 – Chimica supramolecolare	3
1.1.1 – Riconoscimento molecolare	4
1.1.2 – Leganti macrociclici	4
1.1.2.1 – Bis-aminali	7
1.2 – Chemosensori	9
1.2.1 – Chemosensori fluorimetrici	10
1.2.2 – Modulazione della fluorescenza	10
1.2.2.1 – Trasferimento elettronico fotoindotto	11
1.2.2.2 – Trasferimento energetico elettronico	12
1.2.3 – Sensori fluorimetrici per cationi metallici	13
1.2.4 – Recettori poliamminici	14
1.3 – Fluorofori utilizzati	15
1.3.1 – Chinolina	15
1.3.2 – 8-idrossichinolina	15
1.4 – Obiettivi di questo progetto di tesi	16
2 – Parte sperimentale	19
2.1 – Potenzimetri	19
2.1.1 – Metodi di calcolo	20
2.2 – Spettroscopia elettronica (UV-visibile)	22
2.3 – Spettroscopia di emissione di fluorescenza	23
2.4 – Sintesi del complesso di Terbio (III)	23
3 – Discussione	26
3.1 – Proprietà acido-base dei leganti	26
3.2 – Proprietà coordinative dei leganti	32
3.2.1 – Distribuzione delle specie e stabilità termodinamica dei composti di coordinazione	33
3.2.2 – Spettroscopia di assorbimento UV-visibile	36
3.2.3 – Spettroscopia di emissione di fluorescenza	40
3.2.3.1 – Legante H ₂ L1	40
3.2.3.2 – Legante HL2	45
3.2.4 – Struttura cristallina del complesso ZnL1	46
3.3 – Complesso di Terbio	47
3.4 – Conclusioni	50

1 – Introduzione

1.1 – Chimica supramolecolare

La chimica supramolecolare viene definita come la "chimica degli aggregati molecolari risultanti dall'associazione di due o più specie chimiche legate tra loro da forze intermolecolari"¹.

Gli addotti che si formano sono tenuti insieme da forze non covalenti, come forze elettrostatiche, interazioni di stacking, legami a ponte a idrogeno, forze di Van der Waals, hanno caratteristiche chimiche e chimico-fisiche diverse rispetto alle molecole che li compongono: i legami sono più deboli, ma più numerosi, cosa che garantisce versatilità e stabilità agli addotti.

Gli addotti supramolecolari possono perciò svolgere funzioni e realizzare processi molto complessi: essi rappresentano la chiave dei processi biologici quali l'associazione di proteine, la trascrizione del codice genetico, l'induzione di segnali da parte di neurotrasmettitori e il trasporto attraverso membrane biologiche.

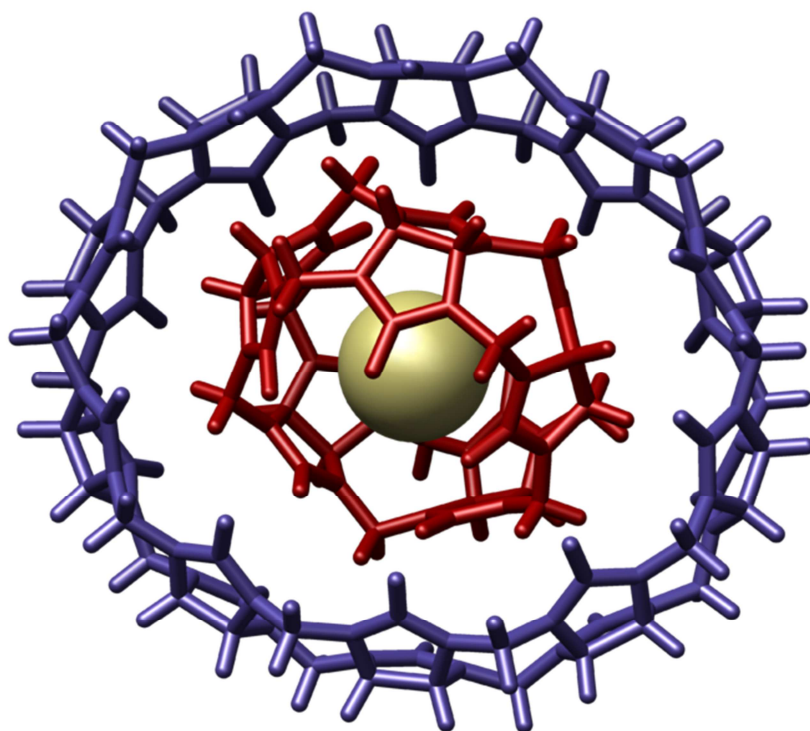


Figura 1.1: Esempio di sistema supramolecolare generato da una struttura cristallina riportata da A. I. Day, R. J. Blanch, A. P. Arnold, S. Lorenzo, G. R. Lewis, and I. Dance in *Angew. Chem. Int. Edition*, 2002, 41, 275-277. Mostra un anione cloruro incapsulato in un cucurbit[5]uril. L'addotto è poi ulteriormente inglobato in un cucurbit[10]uril. Il complesso fu definito un 'giroscopio' molecolare.

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

Generalmente un addotto supramolecolare è formato da due specie molecolari, di cui quella di dimensioni maggiori è detta "recettore" (o "host"), quella di dimensioni minori è chiamata "substrato" (o "guest"). Al fine di ottenere la formazione di un addotto stabile è necessario che le specie siano complementari da un punto di vista strutturale, perché le interazioni che vengono a crearsi in questo caso possono portare ad una selettività del processo di riconoscimento. L'interazione diventa quindi una forma di riconoscimento molecolare e, nel caso in cui il recettore possieda, oltre ai siti di legame, anche opportuni gruppi funzionali, esso può essere in grado sia di coordinare che di trasformare uno specifico substrato, comportandosi quindi come un vero e proprio reagente o catalizzatore. Oltre a questo il recettore può comportarsi da "carrier" per il substrato, trasportandolo grazie alla sua solubilità attraverso membrane lipofile.

1.1.1 – Riconoscimento molecolare

Il riconoscimento molecolare consiste nella coordinazione selettiva di una particolare specie chimica in presenza di altre specie. Questo accade perché la specie riconosciuta, il substrato, è in grado di creare il maggior numero di interazioni steriche ed elettroniche, realizzando il maggior numero di contatti di legame.

Il recettore deve avere 2 requisiti fondamentali per coordinare selettivamente un substrato:

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

È necessario quindi che il recettore abbia una superficie di contatto con il substrato più elevata possibile ovvero deve essere capace di "avvolgerlo", dando luogo a numerose interazioni non covalenti. In generale il recettore deve avere una dimensione, una forma e un'architettura specifica. Quanto più recettore e substrato sono preorganizzati, tanto più selettivo sarà il processo di riconoscimento molecolare.

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

1.1.2 – Leganti macrociclici

Un legante macrociclico è una molecola ciclica polidentata, cioè con un gruppo di atomi donatori in grado di legare un substrato di opportuna carica e/o dimensione e che presenta una cavità interna in cui si affacciano almeno tre atomi donatori, che fungono da siti di legame per substrati. Questo tipo di

molecole risultano ottimi recettori sia per specie anioniche che per specie cationiche, e sono oggetto di ricerche per design molecolare.

La natura presenta molti leganti macrociclici, i più famosi sono la clorofilla e l'emoglobina, caratterizzate da un gruppo tetrapirrolico legati tra loro da un ponte metilene ed in grado di legare rispettivamente uno ione Mg (II) ed uno ione Fe(II) con i quattro atomi di azoto eteroaromatici. Esistono anche degli antibiotici come esempi di composti macrociclici naturali.

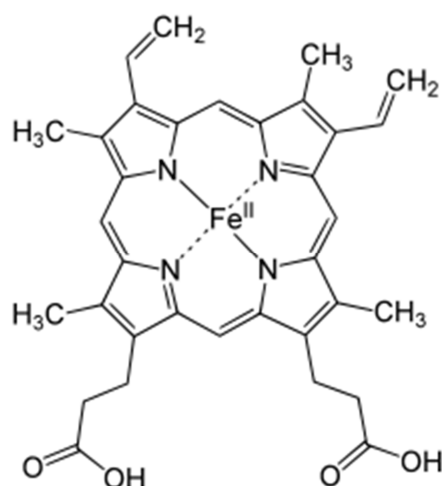


Figura 1.2: Gruppo eme, Fe-protoporfirina IX.

È anche possibile “costruire” leganti macrociclici di sintesi. I primi ad essere oggetto di studio furono gli eteri corona, che sono polieterei ciclici nei quali gli atomi di ossigeno fungono da atomi donatori². Gli studi di questo tipo di leganti, che sono in grado di interagire con cationi di metalli alcalini ed alcalino-terrosi, erano finalizzati alla ricerca di trasportatori di tali ioni attraverso la membrana cellulare. Gli eteri corona possono essere usati anche come recettori di cationi organici contenenti gruppi ammonici, con i quali interagiscono grazie alla formazione di legami a idrogeno tra gli atomi di ossigeno del macrociclo e gli atomi di idrogeno della molecola organica.

Una classe molto importante (e molto versatile) di leganti macrociclici sono i poliazaciccloalcani³, poliammine cicliche nelle quali gli atomi di azoto fungono da atomi donatori. Queste poliammine, in opportune condizioni, sono in grado di legare sia cationi di metalli di transizione che di metalli alcalini e alcalino-terrosi, e, a seconda della protonazione, l'attività coordinativa può essere modulata, perché il protone compete con i cationi dei metalli. Inoltre, se la poliammina è protonata, si può avere anche la coordinazione di anioni grazie a forze di natura elettrostatica e legami a idrogeno: si ottiene così la coordinazione anionica.

La struttura del macrociclo può essere funzionalizzata, sfruttando un design molecolare opportunamente studiato, per permettere l'introduzione di alcuni gruppi che hanno l'obiettivo di massimizzare l'interazione legante-substrato. Col termine “funzionalizzazione del macrociclo” si intende una serie di

² C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int.* 27 (1988), 1021-1027.

³ G.A. Melson, *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds*, Plenum Press, New York, 1979.

operazioni che portano all'inserimento di uno o più gruppi funzionali nella struttura del macrociclo. Il tipo di sostituenti dipendono dal guest: se questo è di tipo aromatico, verranno ad esempio aggiunti dei bracci aromatici sull'anello del recettore, oppure verranno inseriti sostituenti aromatici nell'anello del macrociclo.

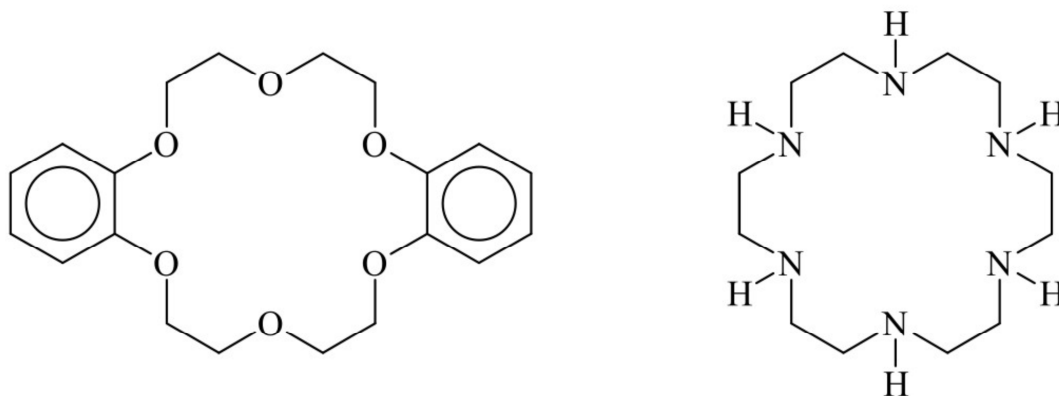


Figura 1.3: Dibenzo-[18] crown-6 e 1,4,7,10,13,16-esaazacicloottadecano.

L'importanza dei composti macrociclici all'interno delle funzioni biologiche (ad esempio in meccanismi respiratori e fotosintetici) ha contribuito allo studio e allo sviluppo di leganti ciclici in generale. La presenza in natura di questi composti è dovuta alla loro elevata stabilità cinetica e termodinamica, che permette agli ioni coordinati di essere fortemente trattenuti nella cavità macrociclica, garantendo così lo svolgimento della sua funzione biologica.

Sono state prodotte per via sintetica vaste categorie di molecole macrocicliche, che fungono da modelli per i sistemi biologici. Esiste in letteratura un elevato numero di procedure sintetiche per l'ottenimento di poliazacicloalcani^{4,5}. In molti casi si tratta di metodi mirati, data la specificità dei leganti che si vogliono ottenere, e la loro applicazione è limitata alla sintesi di uno o pochi leganti. Ma spesso nelle sintesi vengono riportati dei criteri generali, che consentono la suddivisione delle procedure adottate in due categorie principali: i metodi diretti e le sintesi metallo assistite (sintesi template). Molti sistemi macrociclici sono realizzati attraverso procedure multistep in cui si utilizzano entrambi i tipi di sintesi, perciò è difficile definire perfettamente il ruolo dello ione metallico. La sintesi diretta consiste in una doppia condensazione equimolecolare tra due frammenti opportunamente funzionalizzati^{6,7}. La prima condensazione tra le specie reagenti è una condensazione intermolecolare di tipo testa-coda, mentre nel secondo step si possono avere delle reazioni indesiderate, ad esempio reazioni di oligomerizzazione o di polimerizzazione che competono con la reazione principale. Per ovviare a questo inconveniente, si opera in genere in condizioni di alta diluizione^{8,9}: i reagenti sono aggiunti in

⁴ R. M. Izatt, J. J. Christensen, Academic Press, New York (1978).

⁵ S. Karbach, W. Löhr, F. Vögale, J. Chem. Res. (s), (1981) 314.

⁶ J. E. Richman, T. J. Atkins, J. Am. Chem. Soc. 96 (1974) 2268.

⁷ 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.

⁸ Nasir MS, Fahrni CJ, Suhy DA, Kolodnick KJ, Singer CP, O'Halloran TV. J Biol Inorg Chem. 1999 dec; 4(6):775-83.

⁹ J. E. Baldwin, P. Permuter, Top. Curr. Chem., 121 (1984), 181.

modo indipendente ed in una quantità tale che la diluizione resti alta istante per istante, in modo da favorire la condensazione intramolecolare per motivi statistici.

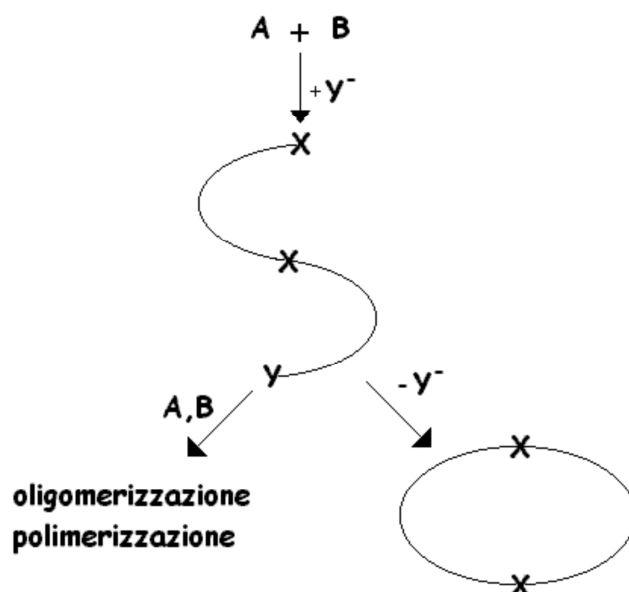


Figura 1.4: Schematizzazione della sintesi diretta di un macrociclo.

L'applicazione di questa tecnica richiede che le reazioni siano veloci dal punto di vista cinetico e che reagenti e prodotti siano stabili nei lunghi tempi di reazione richiesti. Ma nonostante tutto, così si riduce solo parzialmente la formazione di oligomeri e polimeri.

La sintesi metallo-assistita è caratterizzata dall'intervento di uno ione metallico, atto a dirigere la reazione secondo due diversi meccanismi: effetto templato cinetico ed effetto templato termodinamico. L'effetto templato termodinamico consiste nel fatto che l'intervento dello ione metallico nell'ambiente di reazione porta alla formazione di una specie ciclica nettamente più stabile del prodotto di partenza, perciò la reazione di equilibrio si sposta verso destra. L'effetto templato cinetico si ha quando lo ione metallico catalizza la formazione del composto ciclico favorendo l'organizzazione sterica dei reagenti, quindi il ruolo dello ione metallico è in questo caso quello di predisporre uno dei reagenti in una conformazione tale che permetta la collocazione ottimale dei gruppi reattivi per la successiva reazione di ciclizzazione. C'è la possibilità che questi effetti possano essere contemporanei o indipendenti l'uno dall'altro.

1.1.2.1 – Bis-aminali

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche sintetiche per realizzare sistemi macrociclici contenenti uno o più gruppi funzionali, legati alla struttura ciclica tramite opportuni spacer. Le procedure sintetiche sono numerose, perciò daremo una breve descrizione sulla procedura che utilizza i bis-aminali, utilizzata nel corso di questa tesi per introdurre uno o più gruppi funzionali su strutture tetramminiche.

Si definisce procedura dei bis-aminali^{10, 11, 12} un metodo sintetico, rapido e versatile per l'ottenimento di numerose strutture molecolari a partire da "building block" costituiti da unità poliamminiche, prevalentemente tetrammine (cicliche o acicliche).

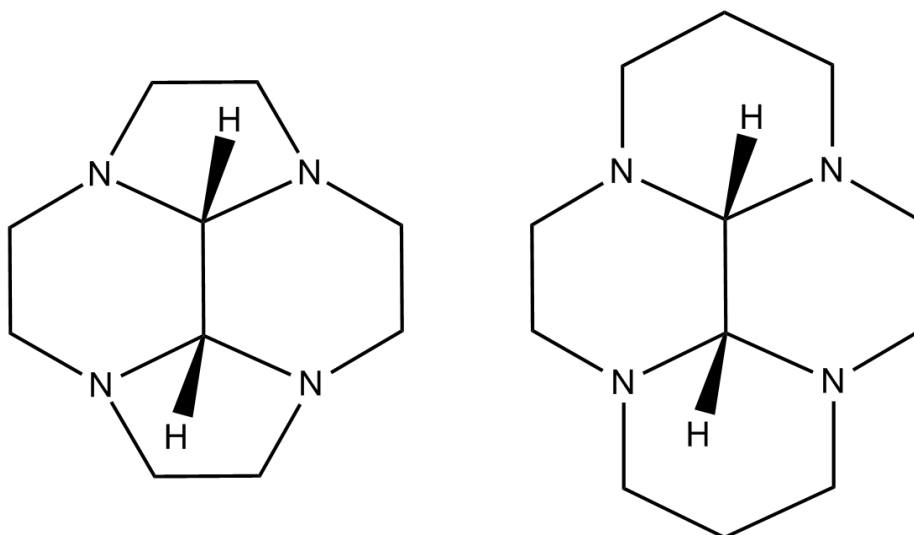


Figura 1.5: Macro cicli cyclen e cyclam protetti come bis-aminali.

Questa procedura consente la mono o la dialchilazione 1,3 N-selettiva delle tetrammine cicliche protette come bis-aminali. Questa procedura ha permesso la realizzazione di diverse strutture molecolari come sistemi tetraazamacrociclici con un singolo o due gruppi funzionali, simmetrici o asimmetrici, o strutture composte da due macrocicli separati da un ponte singolo o doppio.

Di grande importanza è l'utilizzo del bis-aminale cyclen, dato che in questo tipo di composto solo due dei quattro gruppi amminici presenti nel macrociclo (quelli in posizione trans, cioè 1,7) sono reattivi nei confronti dei reagenti elettrofili. Questo perché la struttura orienta i doppietti di non legame degli altri due gruppi amminici verso il centro della cavità, e questo ne inibisce la reattività. Questa condizione rende le reazioni di sostituzione nucleofila stereoselettive per l'isomero sostituito in posizione 1,7. Tale metodologia è stata utilizzata per la sintesi di sistemi fluorescenti tramite l'introduzione ad una singola struttura macrociclica o a ponte tra due unità macrocicliche di sistemi fluorogenici "appesi". Questo lavoro di tesi è stato rivolto alla caratterizzazione di macrocicli contenenti due unità fluorescenti inserite su una singola struttura tetramminica di tipo cyclen.

¹⁰ J. C. Timmons, T. J. Hubin, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, 254, 1661.

¹¹ S. Develay, R. Triper, M. Le Baccon, V. Patinec, G. Sterratrice, H. Handel, *Dalton Trans.*, 2005, 3016.

¹² S. Develay, R. Triper, M. Le Baccon, V. Patinec, G. Sterratrice, H. Handel, *Dalton Trans.*, 2006, 3418.

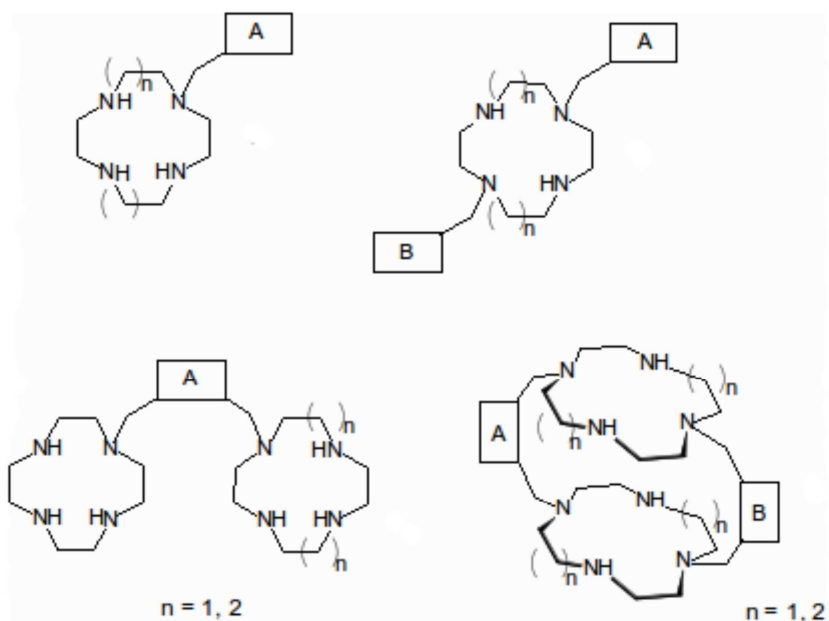


Figura 1.6: Possibili funzionalizzazioni per generici poliazamacrocicli.

1.2 – Chemosensori

Un chemosensore è una molecola capace di determinare la presenza o, a seconda dei casi¹³, la concentrazione di un analita bersaglio interagendo con esso. È necessario che l'interazione sia selettiva, reversibile e non distruttiva, e deve inoltre determinare un'apprezzabile variazione di alcune caratteristiche proprie del sensore (ad esempio l'emissione di fluorescenza) al fine di ottenere un risultato. Un sensore supramolecolare si può immaginare costituito da alcune subunità:

- Recettore: è la subunità addetta all'interazione col substrato che deve essere selettiva e reversibile.
- Unità attiva: è la responsabile della variazione di una caratteristica che segnala la presenza del substrato.
- Spaziatore: funge da raccordo strutturale tra due subunità sopra elencate quando questo è necessario.

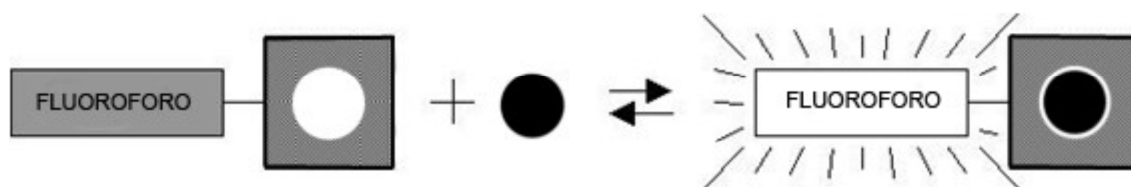


Figura 1.7: Schematizzazione di un chemosensore fluorimetrici.

Per ottenere un'interazione selettiva tra possibili specie in competizione, è necessario che tra substrato e recettore avvenga un riconoscimento molecolare secondo il principio "lock and key". La selettività è determinata dalla complementarità di alcuni fattori, come la dimensione, la forma e la disposizione dei siti di legame di substrato e recettore, in modo che sia

¹³ B. Valeur; Molecular Fluorescence, Wiley-VCH Weinheim 2002

possibile l'instaurazione del maggior numero di interazioni non covalenti tra i due. Questa influisce sulla stabilità, necessaria per poter effettuare analisi in tempi lunghi. Altro fattore importante è la preorganizzazione strutturale del recettore, che diminuisce l'energia necessaria al raggiungimento della conformazione finale ed aumenta la stabilità. Altro fattore che influenza l'efficienza del chemosensore è la superficie di contatto tra recettore e substrato, che deve essere maggiore possibile. L'unità segnalante deve infine avere una proprietà chimico-fisica facilmente rilevabile che vari a seconda della condizione del recettore: se libero o legato. Vari esempi sono la variazione di colore, variazioni di natura elettrochimica, come la variazione del potenziale di riduzione, o variazioni fotochimiche, tipo dell'emissione di fluorescenza. Quest'ultima famiglia di sensori in particolare, la cui unità attiva è chiamata fluoroforo, trova molteplici applicazioni ed è oggetto di questo progetto di tesi.

1.2.1 – Chemosensori fluorimetrici

In un chemosensore fluorimetrico, il gruppo fluorogenico funge da agente segnalante di un certo substrato, e quando questo si lega al recettore, genera cambiamenti delle caratteristiche fotofisiche tali da generare una variazione rilevabile. Un indicatore fluorimetrico offre grandi vantaggi, vista la forte gamma di fluorofori utilizzabili, che garantiscono un vasto range di lunghezza d'onda ed una risposta molto rapida a seguito della complessazione della specie bersaglio. Queste caratteristiche rendono le indagini con sensori di fluorescenza efficaci con una vasta gamma di specie chimiche: molecole neutre, cationi metallici, anioni inorganici ed organici (ad esempio ATP, ADP...). Si possono identificare 3 classi di sensori molecolari fluorimetrici¹⁴:

- Fluorofori che subiscono un quenching in seguito ad una collisione con l'analita.
- Fluorofori in grado di legarsi reversibilmente con il substrato: a seguito di ciò possono verificarsi un quenching di fluorescenza (effetto CHEQ, Chelation Enhancement of Quenching) oppure un aumento (effetto CHEF, Chelation Enhancement of Fluorescence). Nel primo caso si parla di "spengimento" del fluoroforo, mentre nel secondo caso si parla di "accensione".
- Fluorofori analoghi ai precedenti ma facenti parte di un sensore supramolecolare strutturalmente articolato. In questo caso il fluoroforo può essere direttamente collegato all'unità recettrice oppure esservi collegato mediante uno spaziatore.

Nei casi dove è necessaria la formazione del complesso col substrato, la costante di formazione del complesso dovrà essere sufficientemente elevata in modo da permettere la formazione del complesso nel range di concentrazione previsto per l'analita.

1.2.2 – Modulazione della fluorescenza

La coordinazione dell'analita, come appena visto, varia l'emissione di fluorescenza del sensore, facendola diminuire o aumentare: questo dipende dal

¹⁴ F. Pina, M. A. Bernardo; Garcia Espana E.; Eur. J. Inorg. Chem. 2000, 2143-2157.

tipo di interazione che si instaura tra substrato e recettore ed è indice di alcune caratteristiche del substrato bersaglio. Ci sono diversi tipi di effetti dovuti all'interazione:

- Trasferimento elettronico fotoindotto (PET, Photoinduced Electron Transfer)
- Trasferimento di carica interno¹⁵ (ICT, Internal Charge Transfer)
- Trasferimento energetico elettronico¹⁶ (EET, Electron Energy Transfer)
- Trasferimento protonico fotoindotto
- Formazione di eccimeri o ecciplessi¹⁷

1.2.2.1 – Trasferimento elettronico fotoindotto (PET)

Le proprietà ossidative e riduttive di una molecola possono essere esplicate nello stato eccitato in modo tale da portare a compimento processi di trasferimento elettronico sia di tipo ossidativi che riduttivo. Nel meccanismo PET di tipo riduttivo, ad esempio, un fluoroforo A è eccitato dalla radiazione ad una specie A*, nella quale un elettrone è stato promosso dal più alto orbitale molecolare occupato (HOMO) al più basso orbitale molecolare non occupato (LUMO). In seguito, dall'orbitale HOMO del quencher "elettronricco", un elettrone si sposta verso l'orbitale HOMO del fluoroforo colmando la lacuna lasciata in seguito all'eccitazione. In tal modo si ha il quenching di fluorescenza.

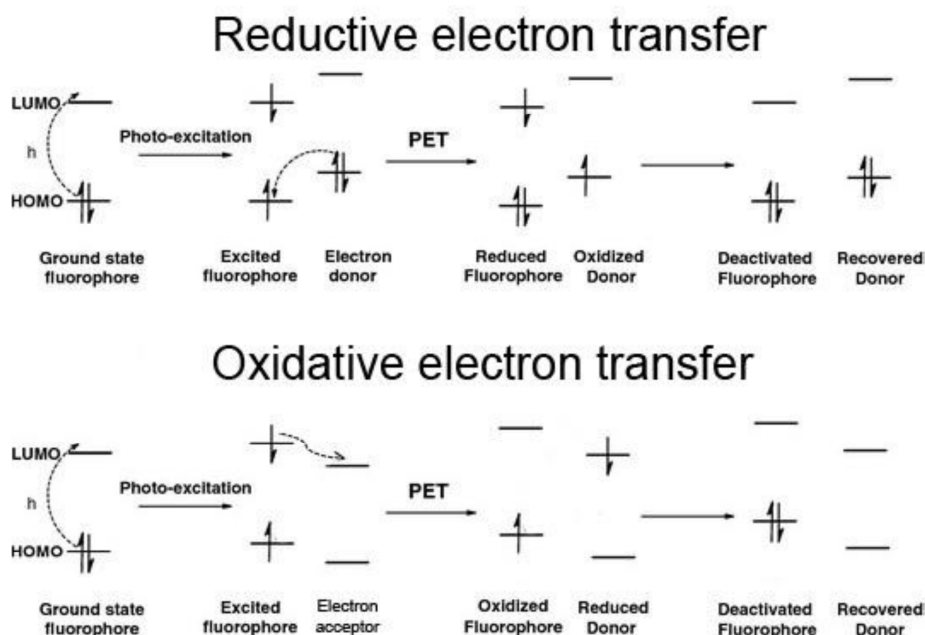


Figura 1.8: Meccanismo PET per un sistema ossidativi e riduttivo.

La maggior parte dei sensori PET sono costituiti da un fluoroforo legato ad un

¹⁵ B. Valeur; Molecular Fluorescence, Wiley-VCH Weinheim 2002.

¹⁶ J. E. Richmann, T. J. Atkins; J. Am. Chem. Soc 1974, 96, 2268.

¹⁷ 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.

gruppo poliamminico (i cui atomi di azoto fungono da donatori per la formazione dell'interazione di coordinazione) mediante uno spacer formato da una catena alchilica, generalmente metilenica. Il trasferimento elettronico fotoindotto comporta un quenching della fluorescenza ed interessa i gruppi amminici del residuo. Quando tali gruppi amminici sono protonati, oppure interagiscono fortemente con un catione (metallico), il trasferimento elettronico è inibito e si assiste ad una notevole intensificazione della fluorescenza. In analogia al caso generale, a seguito dell'eccitazione del fluoroforo, un elettrone che risiede nell'orbitale HOMO è promosso verso il LUMO, e questo attiva il trasferimento elettronico dall'HOMO dell'atomo donatore (che ricordiamo essere un'ammina libera dal legame con un eventuale protone o catione) al SOMO a minore energia del fluoroforo, e ciò determina una diminuzione della fluorescenza. Se l'ammina viene invece protonata, oppure si lega ad un catione metallico, il potenziale redox del donatore aumenta, mentre il suo orbitale HOMO scende ad energia più bassa rispetto a quello del fluoroforo, e di conseguenza non è più possibile il processo di trasferimento elettronico. Il quenching è così inibito, e si ha quindi un aumento dell'emissione di fluorescenza.

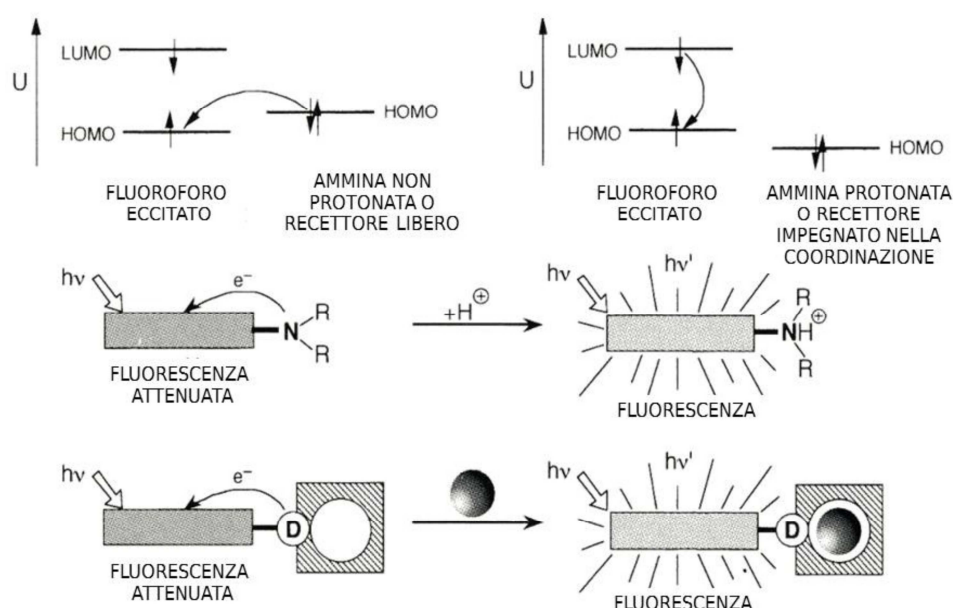


Figura 1.9: PET per un sensore fluorimetrico.

1.2.2.2 – Trasferimento energetico elettronico (EET)

Nel trasferimento elettronico energetico, a differenza del meccanismo PET, occorrono due livelli elettronici ad energia compresa tra quella di HOMO e LUMO del fluoroforo. In seguito all'eccitazione, un elettrone passa dall'HOMO al LUMO del fluoroforo, e subito dopo si realizza un decadimento simultaneo di due elettroni, di cui uno passa dal LUMO del fluoroforo al LUMO del recettore, mentre l'altro lascia l'orbitale HOMO del recettore per andare sull'HOMO del fluoroforo ripristinandone così lo stato fondamentale. Infine il sistema ritorna allo stato fondamentale anche per quando riguarda il recettore.

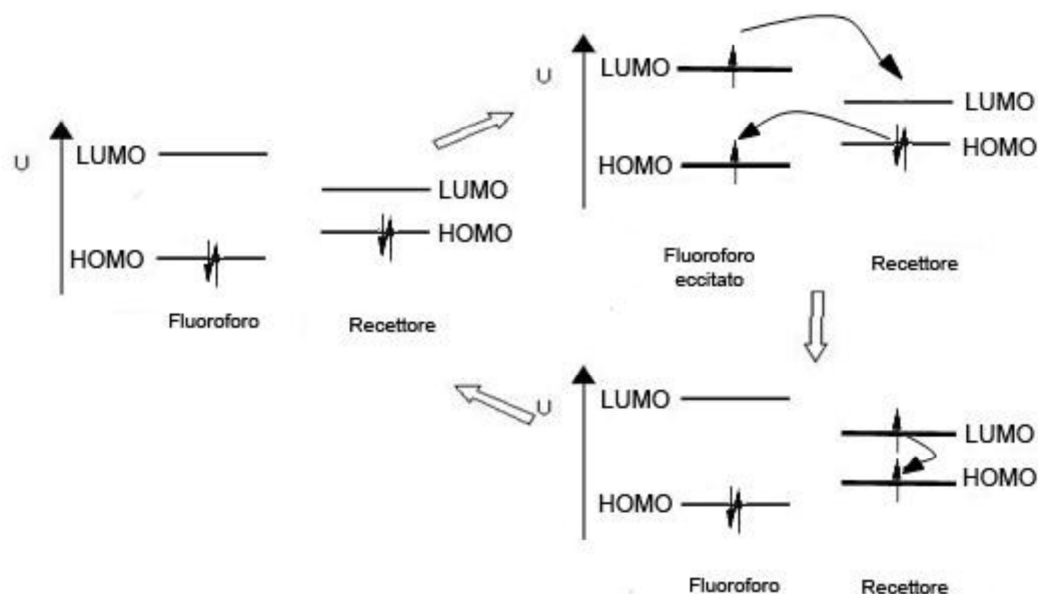


Figura 1.10: Meccanismo EET.

1.2.3 – Sensori fluorimetrici per cationi metallici

Cationi di metalli di transizione e post-transizione hanno spesso un ruolo importante in molti processi biologici e/o possono avere profondi effetti a livello ambientale^{18,19}. La necessità di determinare la concentrazione di questo tipo di substrati (simultaneamente o separatamente) in campioni di matrice biologica o clinica, o la necessità di sviluppare metodi analitici per la determinazione in situ degli ioni metallici, ha portato allo sviluppo di sensori molecolari fluorescenti capaci di rivelare in maniera quantitativa questi ioni. Per quanto riguarda la selettività, le misure che si avvalgono di sensori che si basano sull'aumento dell'intensità di emissione a seguito dell'interazione con la specie bersaglio, sono analiticamente favorite rispetto a quelle che prevedono uno spegnimento. Per le prime, infatti, non solo è maggiore il rapporto segnale rumore (che rende impossibile la rivelazione a livello delle singole molecole)^{20,21}, ma spesso un aumento della fluorescenza è accompagnato da un diverso e caratteristico tempo di vita, che può essere sfruttato per una migliore selettività di analiti con diversi tempi di vita. In genere però i cationi dei metalli pesanti e di transizione presentano delle proprietà intrinseche che causano uno spegnimento dell'emissione dei fluorofori organici. Le variazioni osservabili nello spettro di assorbimento (spostamento ipso o batocromico) sono simili per tutti gli ioni metallici e le bande dei complessi spesso si sovrappongono²². Gli spostamenti indotti dal catione riflettono l'interazione

¹⁸ A. X. Trautwein, Bioinorganic Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim (1997).

¹⁹ E. Merian, VCH, Weinheim (1991)

²⁰ W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. Van Orden, J. H. Werner, R. A. Keller, Chem. Rev., 99 (1999), 2929

²¹ M. Prummer, C.G. Hübner, B. Sick, B. Hecht, A. Renn, U. P. Wild, Anal. Chem., 72 (2000), 443.

²² C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, V. Fusi, B. Valtancoli, M. A. Bernardo, F. Pina, Inorg. Chem., 38 (1999), 3806.

elettrostatica tra i doppietti elettronici liberi degli eteroatomi donatori e il catione stesso, anche se il coefficiente di estinzione molare del legante libero e del complesso risultano spesso molto simili. In contrasto con l'invariabilità delle caratteristiche di assorbimento, quelle di emissione risultano subire forti variazioni a seguito della coordinazione dello ione metallico. Si possono verificare tre situazioni che risultano direttamente connesse con le proprietà periodiche e la configurazione elettronica degli ioni metallici bersaglio:

1 - Il complesso è più fluorescente del legante libero (*effetto CHEF*): solo i metalli di transizione leggeri diamagnetici, ad esempio lo Zn^{2+} , danno luogo a tale effetto con la maggior parte di questi sensori

2 - Il complesso è debolmente fluorescente (*effetto CHEQ parziale*): è il tipico caso di ioni diamagnetici come Hg^{2+} e Pb^{2+} , che possono essere considerati "metalli pesanti" in termini di effetto dell'atomo pesante²³ e che determinano uno spengimento della fluorescenza più o meno pronunciato^{24,25}.

3 - Il complesso non è fluorescente (*effetto CHEQ totale*): tipico degli ioni paramagnetici con un orbitale d non completamente riempito^{26,27}, quali ad esempio Cu^{2+} e Ni^{2+} .

Mentre gli effetti di 'sensing' sono connessi con la natura dello ione metallico, l'aumento della fluorescenza può derivare da cambiamenti della geometria o nella flessibilità del legante, indotti dalla coordinazione dello ione, così come dalla diversa disponibilità, nel complesso formato, di alcuni gruppi funzionali coinvolti nei processi di disattivazione del legante libero. Inoltre, le variazioni indotte dalla coordinazione nella posizione relativa di livelli energetici ad energia simile centrati sul legante, possono precludere dei canali di disattivazione non radiativi. Nel caso di leganti flessibili, la coordinazione generalmente sopprime processi di decadimento dello stato eccitato non radiativi, come ad esempio i movimenti torsionali della molecola²⁸.

1.2.4 – Recettori poliamminici

La grande importanza rivestita dai recettori poliamminici nel campo dei chemosensori è data innanzitutto dalla loro capacità di operare in acqua, cosa particolarmente importante per i sistemi biologici, che sono a base acquosa. L'idrosolubilità del sensore è garantita dall'unità recettrice poliamminica, grazie alle caratteristiche idrofile dei gruppi amminici e all'instaurarsi degli equilibri tipici delle poliammine in acqua. La speciazione di questo tipo di sensori mostra la presenza di un insieme di forme che possono essere selezionate ed utilizzate per il riconoscimento selettivo di un dato analita. Per esempio la protonazione delle poliammine a pH acido le rende, teoricamente, potenziali recettori per gli anioni, mentre a pH basico le forme meno protonate sono in grado di complessare ioni metallici.

²³ D. S. McClure, J. Chem. Phys., 20 (1952), 682.

²⁴ A. Harriman, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, 77 (1981), 1281.

²⁵ H. Masuhara, H. Shioyama, T. Saito, K. Hamada, S. Yasoshima, N. Malaga, J. Phys. Chem., 88 (1984), 5868.

²⁶ T. L. Banfield, D. Husain, Trans. Faraday Soc., 65 (1995), 1969.

²⁷ A. W. Varnes, R. B. Dodson, E. L. Wehry, J. Am. Chem. Soc., 94 (1972), 946.

²⁸ K. Rurack, R. Radeglia, Eur. J. Inorg. Chem. (2000), 2271.

1.3 – Fluorofori utilizzati

Durante questo lavoro di tesi sono stati caratterizzati due nuovi leganti basati sull'unità poliamminica cyclen (1,4,7,10-tetraazaciclododecano), di cui uno contenente due unità chinolina e due gruppi carbossilici (in posizione trans), collegati agli atomi di azoto del sistema macrociclico con ponti metilenici, l'altro contenente un'unità chinolina ed una 8-idrossichinolina in posizione trans tra loro legate al macrociclo tramite un ponte metilene. Ci soffermeremo sui fluorofori utilizzati, chinolina e 8-idrossichinolina.

1.3.1 – Chinolina

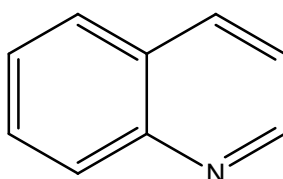


Figura 1.11: Chinolina.

La chinolina è un composto aromatico eterociclico ad anelli condensati, derivato formalmente dal naftalene per sostituzione di un gruppo CH in posizione 4 con un atomo di azoto. Ha una resa quantica di fluorescenza molto alta, perciò risulta adeguata come unità fluorescente per la realizzazione di chemosensori fluorimetrici. Inoltre, l'atomo di azoto aromatico è di tipo piridinico, cioè presenta un doppietto sul piano nodale della molecola che non può entrare nella corrente d'anello ed è quindi disponibile per le interazioni coi cationi metallici. In soluzione acquosa dà luogo ad un equilibrio acido-base. La pK_a del catione chinolinio è 4,79.

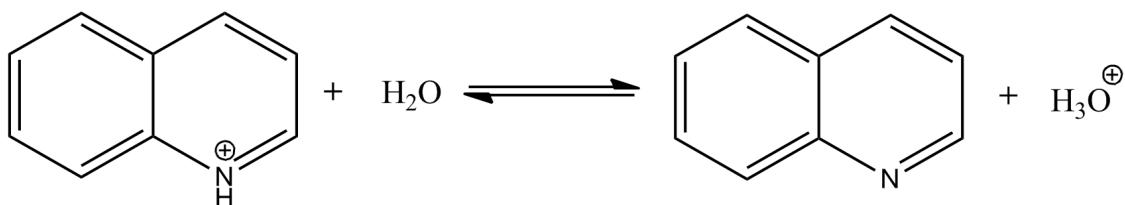


Figura 1.12: Equilibrio acido-base della chinolina.

1.3.2 – 8-idrossichinolina

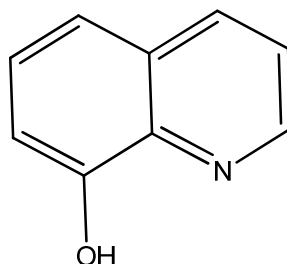


Figura 1.13: 8-idrossichinolina.

È un derivato della chinolina, che si ottiene per sostituzione dell'idrogeno in posizione 8 con un gruppo ossidrilico. Questo fluoroforo ha anch'esso una buona resa quantica, ma con una banda di emissione più spostata verso il visibile rispetto a quella della chinolina.

La 8-idrossichinolina si comporta da agente chelante bidentato, utilizzando sia il gruppo ossidrilico che l'atomo di azoto eteroaromatico nel processo di coordinazione degli ioni metallici.

In soluzione acquosa presenta due equilibri acido-base, il primo coinvolge l'atomo di ossigeno ossidrilico, con una $pK_a=9,89$, mentre il secondo coinvolge l'atomo di azoto eteroaromatico, con una $pK_a=5,13$.

1.4 – Obiettivi di questo progetto di tesi

In questo progetto di tesi sono stati caratterizzati due chemosensori di fluorescenza per valutarne le proprietà luminescenti in presenza di ioni bivalenti di metalli di transizione e post-transizione. In particolare la ricerca ha come obiettivo trovare un chemosensore per il riconoscimento selettivo dello ione Zn^{2+} . Lo zinco è un oligoelemento essenziale in ogni forma di vita e fondamentale nel mantenimento delle funzioni vitali. Le conoscenze riguardanti la sua acquisizione, il suo accumulo ed il suo utilizzo da parte delle cellule sono ancora scarse. Un chemosensore utilizzabile in vivo permetterebbe di monitorare alcuni processi metabolici e di localizzare lo ione all'interno della cellula.

In questo progetto di tesi ci siamo occupati della caratterizzazione del legante H_2L1 , sintetizzato in un precedente progetto di tesi²⁹, formato da un'unità cyclen (1,4,7,10-tetraazaciclododecano) con due gruppi chinolinici e due gruppi carbossilici in posizione trans, ognuno dei quali legato ad un atomo di azoto del macrociclo tramite un ponte metilenico.

Ci siamo inoltre occupati di caratterizzare preliminarmente il legante $HL2$, formato da un'unità cyclen con un gruppo chinolina ed un gruppo 8-idrossichinolina in posizione trans, ognuno dei quali legato ad un atomo di azoto del macrociclo tramite un ponte metilenico.

L'importanza di questi leganti poliamminici è dovuta al fatto che sono solubili in acqua e presentano una buona affinità per i cationi di metalli di transizione e post-transizione, mentre la presenza di fluorofori come la chinolina e la 8-idrossichinolina rende questo tipo di leganti potenziali chemosensori di fluorescenza. Le proprietà fotochimiche di questi sistemi possono essere influenzate dalla coordinazione con uno ione metallico o dalla protonazione degli atomi di azoto sul sistema macrociclico o chinolinico.

Lo studio del legante H_2L1 è stato quindi affrontato attraverso misure potenziometriche, spettrofluorimetriche e spettrofotometriche UV-visibile. Abbiamo analizzato la coordinazione di quattro ioni metallici, Zn^{2+} e Cd^{2+} , la cui coordinazione tende generalmente ad aumentare l'emissione di fluorescenza dei chemosensori contenenti unità poliamminiche come sito di "binding" e Cu^{2+} e Pb^{2+} , la cui coordinazione tende generalmente a diminuire l'emissione di fluorescenza dei chemosensori contenenti unità poliamminiche, il primo perché è paramagnetico, il secondo per effetto dell'atomo pesante.

²⁹ R. Rapini, Fluorescence Chemosensors For The Zn^{2+} Ion. Synthesis and Selectivity Properties.

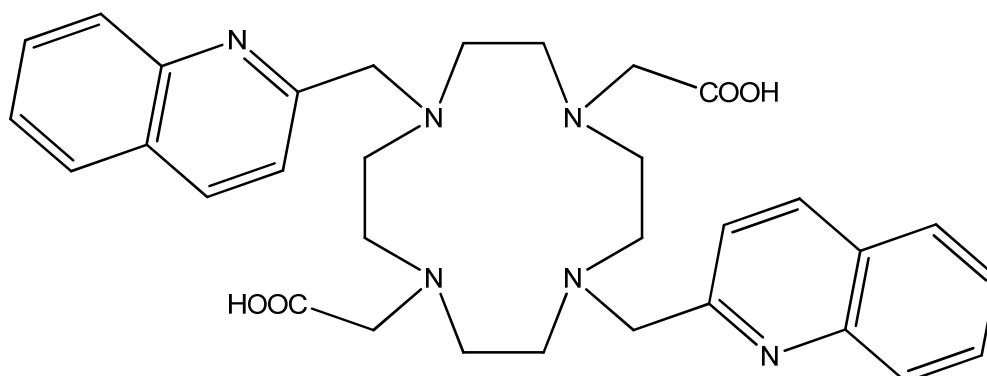


Figura 1.14: Legante H_2L1 , contenente due unità chinolina e due gruppi carbossilici.

In seguito ci siamo occupati della sintesi del complesso di terbio (Tb^{3+}) col legante H_2L1 .

Questo tipo di ricerca è stata fatta perché alcuni ioni tripositivi di lantanidi hanno proprietà di antenne molecolari³⁰, cioè il legante, quando eccitato, trasferisce parte dell'energia a questi ioni, cosa che permette un aumento dell'intensità di emissione delle loro bande caratteristiche.

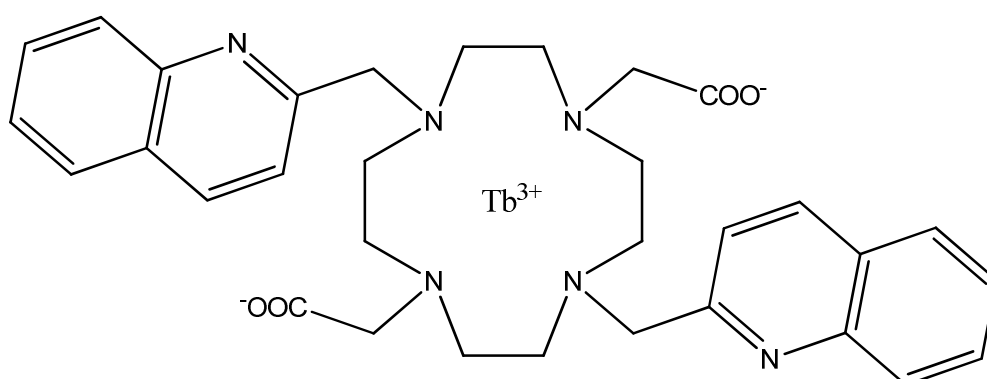


Figura 1.15: Complesso di terbio col legante H_2L1 deprotonato.

Infine, è stato fatto uno studio preliminare delle caratteristiche coordinative e di 'sensing' di ioni di metalli di transizione con il legante HL2, contenente un gruppo chinolinico ed un gruppo 8-idrossichinolinico in posizione trans.

³⁰ Cidália Maria Gomes dos Santos and Thorfinnur Gunnlaugsson, The recognition of anions using delayed lanthanide luminescence: The use of Tb(III) based urea functionalised cyclen complexes, *Dalton Trans.*, 2009, 4712–4721.

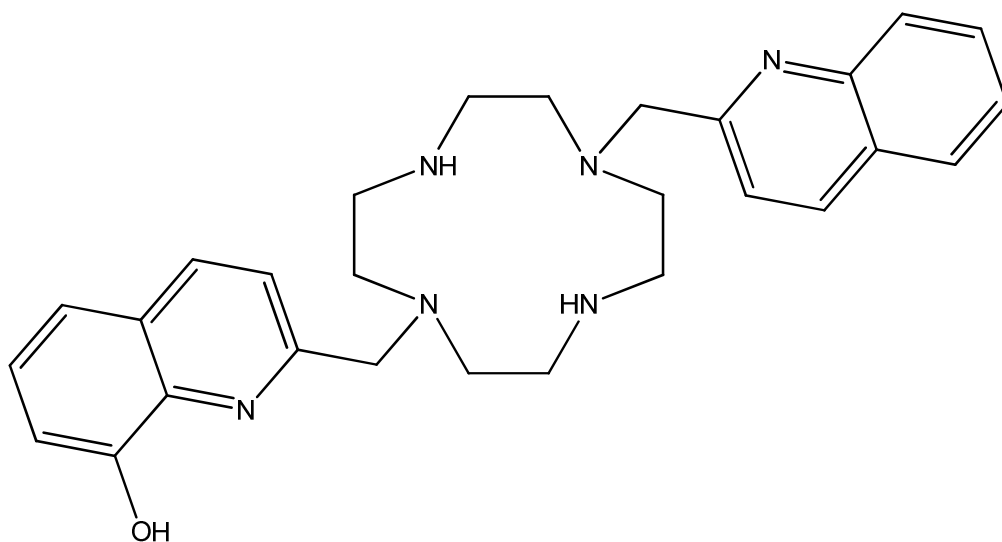


Figura 1.16: Legante HL2, contenente una unità chinolina e una unità 8-idrossichinolina.

2 – Parte sperimentale

2.1 – *Potenziometria*

Le misure potenziometriche sono state effettuate mediante un sistema potenziometrico automatizzato costruito come segue:

- Potenzimetro da ricerca Orion Mod. 701A
- Buretta automatica Mettler Mod. DV10 graduata in 10^{-2} cm
- Agitatore meccanico Mettler Mod. DV70
- Cella termostatica dalla capacità di circa 25 cm^3 termoregolata mediante circolazione di acqua
- Elettrodo a vetro da ricerca Orion Mod. 91-01
- Elettrodo di riferimento Ag/AgCl in KCl saturo
- Ponte salino tipo Wilhelm riempito con soluzione 0,15 M di NaCl
- Calcolatore

Tutte le soluzioni usate per le misure potenziometriche sono state preparate con acqua bidistillata, disareata per ebollizione, raffreddata in ambiente inerte (sotto azoto).

Le soluzioni di NaCl, HCl e NMe_4OH sono state preparate impiegando prodotti commerciali di elevata purezza, e le loro concentrazioni sono state determinate seguendo procedure analitiche standard.

Tutte le misure sono state effettuate a $35,0^\circ$. Durante le misure è stato mantenuto all'interno della cella un flusso continuo di azoto, al fine di evitare la carbonatazione delle soluzioni in esame.

Prima di entrare in cella, l'azoto viene fatto passare attraverso una bottiglia di lavaggio contenente una soluzione concentrata di NaOH, necessario per eliminare tutte le (eventuali) tracce di CO_2 presenti nel gas e di presaturare il gas in vapore acqueo prima dell'ingresso nella cella. Le misure sono condotte a forza ionica costate, grazie all'impiego di soluzioni di NMe_4Cl 0,1 M.

Il calcolatore, grazie al programma installato, controlla il sistema di misura, regolando le aggiunte di soluzione titolante ed eseguendo letture dei valori di forza elettromotrice. Quest'ultima operazione è resa possibile dall'interfaccia che collega il potenziometro al computer, il programma richiede dei parametri di input, che sono scelti in modo da definire le caratteristiche dell'acquisizione potenziometrica:

- 1 – Numero massimo di letture
- 2 – Intervallo di tempo tra due letture successive
- 3 – Tolleranza sulla deviazione standard
- 4 – Tolleranza sulla deriva
- 5 – Volume di titolante aggiunto prima della misura
- 6 – Volume di titolante da aggiungere complessivamente
- 7 – Incremento di volume del titolante

Una volta inseriti questi dati, il potenziometro misura i valori di f.e.m. che vengono raccolti dal computer. Si calcola la media tra dieci valori di f.e.m. raccolti nell'intervallo di tempo stabilito secondo il parametro 2, ed il valore medio così determinato (lettura) viene memorizzato e visualizzato sul video,

accanto ad un numero progressivo. Questa procedura è ripetuta fino a quando non si ottiene un gruppo di dieci letture, tra cui il computer calcola il valore medio e valuta se la deviazione standard sul valor medio è maggiore o minore della tolleranza imposta col parametro 3.

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

Nel caso in cui, invece, il numero di letture eseguite è inferiore al numero massimo imposto, il sistema effettua un'altra lettura, calcola il valore medio delle ultime dieci misure, ed esegue nuovamente il controllo sulla deviazione standard. Questa sequenza può protrarsi fino al raggiungimento del massimo numero di letture imposto.

Se la deviazione standard sul valor medio è inferiore alla tolleranza imposta, viene calcolata la differenza fra il primo ed il decimo valore di f.e.m., usati per calcolare il valor medio, e viene controllato che il valore assoluto di questa differenza non superi il valore fissato per la tolleranza sulla deriva. In tale maniera vengono scartati quei valori che, anche se rispettano la condizione imposta sulla deviazione standard, sono il risultato di una serie di letture di f.e.m. di cui l'ultima e la prima sono molto diverse. Se quest'ultima condizione non è verificata, viene eseguita un'altra lettura, controllato il nuovo valore medio e controllati i valori della deviazione standard e della deriva. Altrimenti, il computer considera buona la misura, memorizza i dati e procede ad un'altra aggiunta.

I dati ottenuti dal potenziometro vengono quindi elaborati con il programma di calcolo HYPERQUAD2003.

2.1.1 – Metodi di calcolo

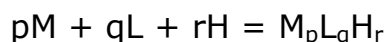
La determinazione delle costanti di equilibrio sarebbe semplice se fosse possibile ottenere una misura diretta della concentrazione all'equilibrio di tutte le specie presenti in soluzioni, cosa che generalmente non è possibile. Invece è possibile, normalmente, mettere in relazione la concentrazione di uno dei componenti con le costanti di equilibrio e le concentrazioni iniziali del sistema, per cui, in principio, la misura della variazione della concentrazione di questa sola specie, con la composizione totale del sistema, può permettere la determinazione delle costanti di equilibrio. La determinazione di tali costanti può esser fatta per via potenziometrica, attraverso la misura della differenza di potenziale tra un elettrodo di riferimento ed un altro elettrodo, il cui potenziale è funzione della concentrazione della specie considerata.

Nel caso degli equilibri di complessazione, in cui sono coinvolti un legante (anionico) protonabile, la determinazione delle costanti di equilibrio possono essere fatte mediante la misura, con un elettrodo a vetro, misurando il pH e conseguentemente la concentrazione dello ione H^+ . La concentrazione dello ione H^+ in soluzione ed il suo potenziale, sono in relazione tra loro secondo l'equazione di Nernst:

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

E° deve essere sperimentalmente determinato per le condizioni specifiche delle misure potenziometriche richieste e a breve distanza da queste. La calibrazione dell'elettrodo di riferimento nelle condizioni sperimentali impiegate, cioè la determinazione di E° , si realizza attraverso la titolazione di una quantità esattamente nota di acido forte (HCl) con una base forte (NMe₄OH), nel nostro caso si utilizza la procedura del Gran.

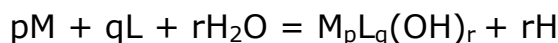
Nel caso in cui si lavori su un sistema in cui il legante interagisce con uno ione metallico o con un anione, si ha una differenza nel metodo di elaborazione dei dati. In forma generale, la formazione in soluzione di acquosa di un complesso derivante dall'interazione di uno ione metallico M con un legante L protonabile può essere espressa con la seguente equazione (dove sono state omesse le cariche per semplificare):



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

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

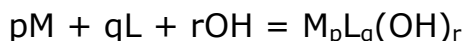
Nel caso di specie ossidrilate la costante β_{pqr} sarà riferita all'equazione:



β_{pqr} è in relazione alla costante β' :

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

Riferita all'equilibrio:



Mediante il prodotto ionico dell'acqua:

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

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

$$\begin{aligned} T_M &= [M] + \sum_{pqr} p[M_pL_qH_r] \\ T_L &= [L] + \sum_{pqr} q[M_pL_qH_r] \\ T_H &= [H] + \sum_{pqr} r[M_pL_qH_r] - [OH] \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} T_M &= [M] + \sum_{pqr} p \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r \\ T_L &= [L] + \sum_{pqr} q \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r \\ T_H &= [H] + \sum_{pqr} r \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r - [OH] \end{aligned}$$

Sperimentalmente, si misura la concentrazione dello ione H^+ libero e si ottiene la curva di titolazione sperimentale riportando il potenziale di elettrodo contro volume di titolante aggiunto. A ciascun punto sperimentale corrisponde un sistema di 3 equazioni in $(n+2)$ incognite, dove n è il numero di specie formate, che corrispondono alle n costanti di stabilità e alle concentrazioni di legante e metallo liberi.

Complessivamente, per N punti sperimentali avremo un sistema di $3N$ equazioni in $(n+2N)$ incognite. Il trattamento matematico di tale sistema viene fatto tramite metodi iterativi che richiedono l'impiego di calcolatori. Le costanti di stabilità riportate in questa tesi sono state ottenute con il programma di calcolo HYPERQUAD 2003.

2.2 – Spettroscopia elettronica (UV-visibile)

Gli spettri UV-vis sono stati registrati con uno spettrofotometro *Jasco V-670 Spectrophotometer* a doppio raggio, con cuvetta da 1 cm di spessore. Le soluzioni di lavoro sono state ottenute per pesata diretta o tramite diluizione di soluzioni madri preparate per pesata diretta.

La soluzione madre di H_2L1 è stata preparata alla concentrazione ottimale per la spettroscopia elettronica. Si ha quindi una soluzione $1,16 \cdot 10^{-4}$ M ottenuta sciogliendo 5,78 mg di legante salificato (PM = 993,33) in 50 cm³ di acqua bidistillata e disareata.

La soluzione madre di $HL2$ è stata preparata alla concentrazione ottimale per la spettroscopia elettronica. Si ha quindi una soluzione $1,046 \cdot 10^{-4}$ M ottenuta sciogliendo 4,54 mg di legante salificato (PM = 868,38) in 50 cm³ di acqua bidistillata e disareata.

Per analizzare le proprietà acido-base dei leganti e le loro caratteristiche di assorbimento al variare del pH sono stati registrati spettri su soluzioni a diversi valori di pH in assenza di ioni metallici.

Per determinare le caratteristiche coordinative del legante H_2L1 , sono state fatte delle prove a pH variabile in presenza di alcuni ioni metallici: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} . Il pH è stato regolato per ogni misura tramite aggiunta di soluzioni di HCl o NaOH (a varie concentrazioni) e misurato con elettrodo a vetro. Lo scopo di questa operazione è vedere se e come cambia il massimo di assorbimento della specie in esame in relazione ad una variazione di pH.

È stata inoltre fatta una prova a pH fisso (7,5) in tampone TRIS aggiungendo quantità crescenti di ioni Cd^{2+} e Pb^{2+} . Siccome la formazione dei complessi è risultata cineticamente inerte, è stato necessario preparare con molte ore di anticipo le soluzioni contenenti rispettivamente 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 e 2,0 equivalenti di ognuno dei due metalli. Queste sono state tenute 18 ore in un incubatore a 50°C e successivamente un'ora all'aria per tornare a temperatura ambiente prima dell'esecuzione degli spettri.

2.3 – Spettroscopia di emissione di fluorescenza

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati in emissione utilizzando uno spettrofluorimetro PerkinElmer *Luminescence Spectrofotometer LS 55* con una cella di 1 cm di spessore, utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 295 nm (punto isosbestico) o 316 nm (massimo di assorbimento), a seconda dell'esperimento.

La soluzione di H₂L1 a concentrazione $2,32 \cdot 10^{-5}$ M è stata ottenuta prelevando 10 cm³ dalla soluzione per UV-vis che è stata portata a 50 cm³ utilizzando acqua bidistillata e disareata.

La soluzione di L2 a concentrazione $2,092 \cdot 10^{-5}$ M è stata ottenuta prelevando 10 cm³ dalla soluzione usata per le misure UV-vis che è stata portata a 50 cm³ utilizzando acqua bidistillata e disareata.

Come per gli spettri di assorbimento, per analizzare le caratteristiche di emissione dei leganti al variare del pH, sono stati registrati spettri su soluzioni a diversi valori di pH in assenza di ione metallico.

Per determinare le caratteristiche coordinative del legante H₂L1 sono stati registrati spettri su soluzioni a diversi valori di pH in presenza di alcuni ioni metallici: Zn²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺. Il pH è stato regolato per ogni misura tramite aggiunta di soluzioni di HCl o NaOH (a varie concentrazioni) e misurato con elettrodo a vetro. Sono stati inoltre sintetizzati dei complessi di lantanidi (Tb³⁺, Eu³⁺ e La³⁺) al fine di studiarne le proprietà di emissione.

Per determinare le caratteristiche di selettività del legante HL2 sono stati anche registrati spettri di emissione a pH fisso (7,5) in tampone tris con un equivalente di diversi ioni metallici: Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺.

2.4 – Sintesi del complesso di Terbio (III)

All'interno del progetto di tesi è stata realizzata la sintesi del complesso di terbio. A causa della sua inerzia cinetica, l'ottenimento di tale composto non si ha semplicemente unendo la soluzione dello ione metallico con quella del legante, ma attraverso una procedura un po' più elaborata. Verrà descritta la procedura generale, e poi verrà riportata la resa.

Per la sintesi, si pesano circa 30 mg di legante, si sciogliono in 0,75 cm³ di acqua bidistillata e disareata e si regola il pH a circa 5,5. Si aggiunge un equivalente di sale (tricloruro di terbio) e si lasciano sotto agitazione a 60°C per una notte. A reazione avvenuta, si porta a secco col rotavapor e si lascia una notte in essiccatore. Per la purificazione, si scioglie il complesso solido in circa 1-2 cm³ di etanolo, si filtra su filtro a pieghe, e successivamente si aggiunge etere etilico, che provoca la precipitazione del complesso. Si lascia la sospensione ottenuta a circa 4 °C per circa 4 ore, si filtra su buchner e si lascia una notte in essiccatore³¹.

Il complesso risulta contenere una percentuale di NaCl, come dimostrato

³¹ Emma J Shiells, Louise S. Natrajan, Daniel Sykes, Manuel Tropiano, Paul Cooper, Alan M. Kenwright, Stephen Faulkner, Lanthanide complexes of DOTA monoamide derivatives bearing an isophthalate pendent arm, *Dalton Trans.*, 2011,40, 11451–11457.

dall'analisi elementare che evidenzia un contenuto in carbonio, idrogeno e azoto più basso del calcolato. Comunque lo spettro di massa e gli spettri di fluorescenza dimostrano la formazione del complesso.

Analisi elementare: Teorica per $C_{32}H_{36}N_6O_4TbCl$ (PM: 762,17) C=50,37%, H=4,76%, N=11,01%; Sperimentale, C=20,62%, H=2,50%, N=4,24%. Spettro ESI-MS: 727,21 ($TbL1^+$, Teorica, 727,20). Resa: 24,80%. Il composto risulta contenere il 59% di NaCl.

Lo spettro di massa del complesso di terbio evidenzia un picco a rapporto m/z 727,21 attribuibile al complesso monocarico $[TbL1]^+$.

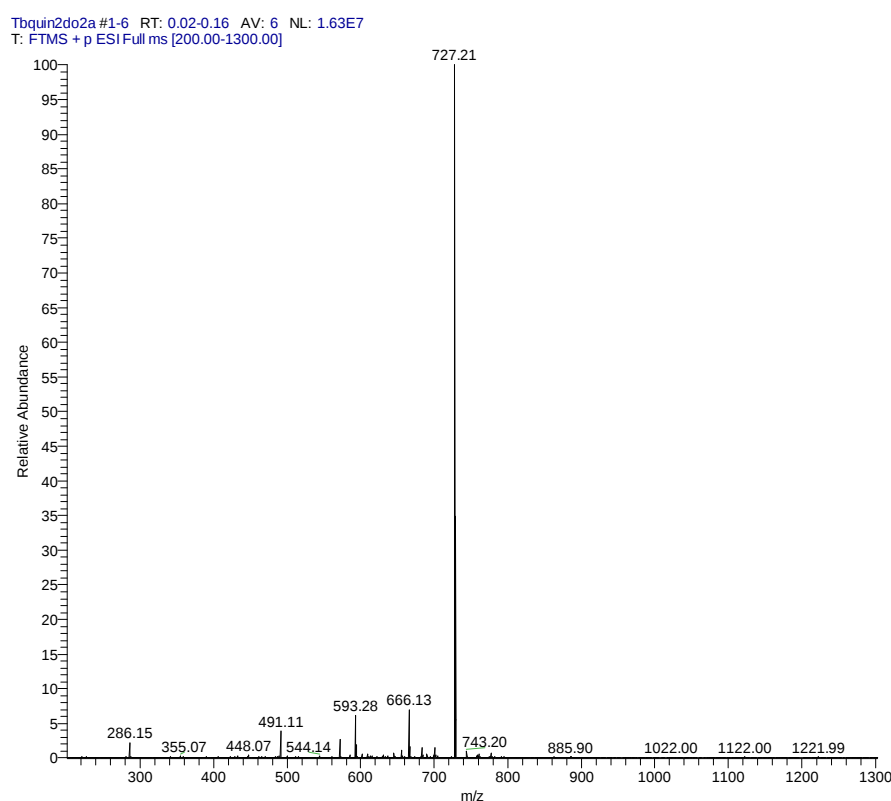


Figura 2.1: Spettro ESI-MS di $[TbL1]^+$.

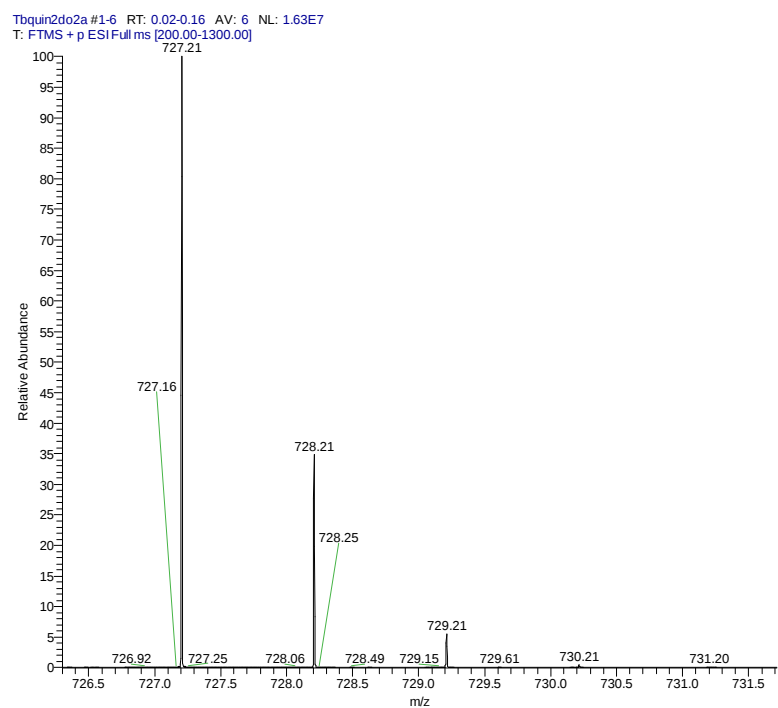


Figura 3.33: Spettro ESI-MS di $[TbL1]^+$, particolare del picco dello ione molecolare.

3 – Discussione

3.1 – Proprietà acido-base dei leganti

Essendo i leganti studiati delle poliammine cicliche, contenenti anche gruppi carbossilici, l'analisi delle loro proprietà acido-base è una premessa necessaria ad ogni successivo studio di coordinazione di ioni metallici. In soluzione acquosa questi leganti hanno la caratteristica di dar luogo ad equilibri di protonazione che competono con la coordinazione degli ioni metallici. Poiché anche le proprietà ottiche dipendono dal pH, lo studio delle proprietà acido base è stato affrontato abbinando misure potenziometriche e spettroscopiche (assorbimento UV-vis ed emissione di fluorescenza). Il legante H₂L1 dà luogo a cinque equilibri di protonazione, ma la prima costante, quella relativa all'equilibrio $L^{2-} + H^+ = [LH]^-$, non è determinabile per via potenziometrica poiché l'equilibrio ha luogo in soluzione fuori dal campo di pH studiato. Il valore della costante di protonazione può essere quindi solo stimato come maggiore di 12 unità logarithmiche.

I valori delle costanti di protonazione di H₂L1 sono riportate in tabella 3.1:

Equilibrio	log K
$L^{2-} + H^+ = [LH]^-$	> 12
$[LH]^- + H^+ = [LH_2]$	8,86
$[LH_2] + H^+ = [LH_3]^+$	5,78
$[LH_3]^+ + H^+ = [LH_4]^{2+}$	4,13
$[LH_4]^{2+} + H^+ = [LH_5]^{3+}$	3,16
$[LH_5]^{3+} + H^+ = [LH_6]^{4+}$	2,41

Tabella 3.1: Costanti di protonazione del legante H₂L1, l'errore sulle costanti riportate è inferiore alle 0,02 unità logarithmiche (308 K, 0,1 NMe₄Cl).

E' probabile che nella specie $[HL]^-$ il protone acido sia localizzato su un gruppo amminico del sistema macrociclico. Se così fosse, si avrebbe un'interazione molto forte via legame a idrogeno tra il gruppo ammonico ed un gruppo carbossilato, che può stabilizzare fortemente la specie HL^- rendendone difficile la deprotonazione in soluzione anche a pH molto basici.

L'altro legante studiato, HL2, presenta anch'esso cinque equilibri di protonazione, le cui costanti sono state determinate per via potenziometrica. La prima è probabilmente relativa alla deprotonazione dell'ossidrilie aromatico, visto che ha luogo a pH maggiore di 10, le quattro successive sono uguali a coppie, ciò fa pensare alla protonazione di due gruppi chimicamente simili. Gli equilibri di relativi alla seconda e alla terza protonazione possono essere

attribuite alla protonazione degli atomi di azoto del cyclen, mentre quelle a pH acido sono assegnate ai protoni che si legano agli atomi di azoto aromatici. I valori delle costanti di protonazione di HL2 sono riportate in tabella 3.2:

Equilibrio	log K
$[L]^- + H^+ = [LH]$	11,08 (4)
$[LH] + H^+ = [LH_2]^+$	9,35 (5)
$[LH_2]^+ + H^+ = [LH_3]^{2+}$	8,79 (6)
$[LH_3]^{2+} + H^+ = [LH_4]^{3+}$	2,16 (9)
$[LH_4]^{3+} + H^+ = [LH_5]^{4+}$	2,28 (8)

Tabella 3.2: Costanti di protonazione del legante HL2, l'errore sulle costanti riportate è inferiore alle 0,02 unità logaritmiche (308 K, 0,1 NMe₄Cl).

Dalle costanti si ricavano i diagrammi di distribuzione delle specie che si formano in soluzione al variare del pH. I diagrammi sono riportati in figura 3.1 per il legante H₂L1 e in figura 3.2 per il legante HL2. Come si vede dai diagrammi di distribuzione, non c'è mai un'unica specie prevalente in un ampio intervallo di pH per quanto riguarda il legante H₂L1, mentre per il legante HL2 si nota che è presente la specie [H₃L]²⁺ in un ampio intervallo di pH, da circa 3 a 8,5 con una percentuale superiore al 50%.

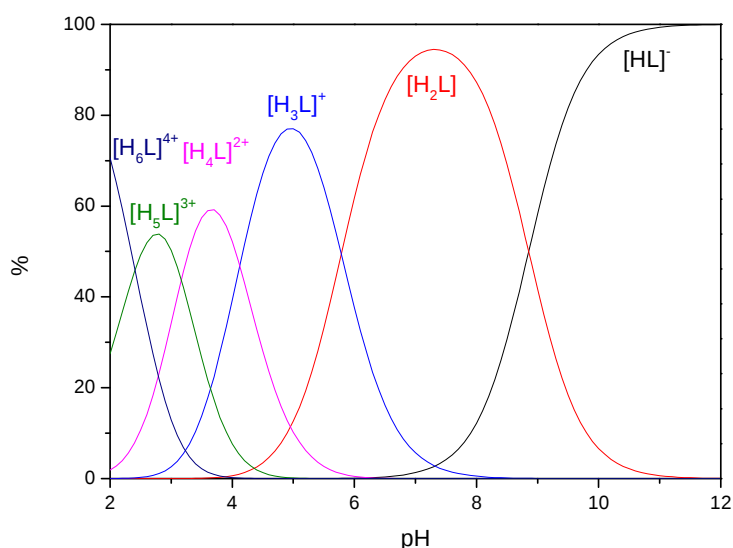


Figura 3.1: Diagramma di distribuzione delle specie protonate H₂L1 (T = 308K, [NMe₄Cl] = 0,1 M).

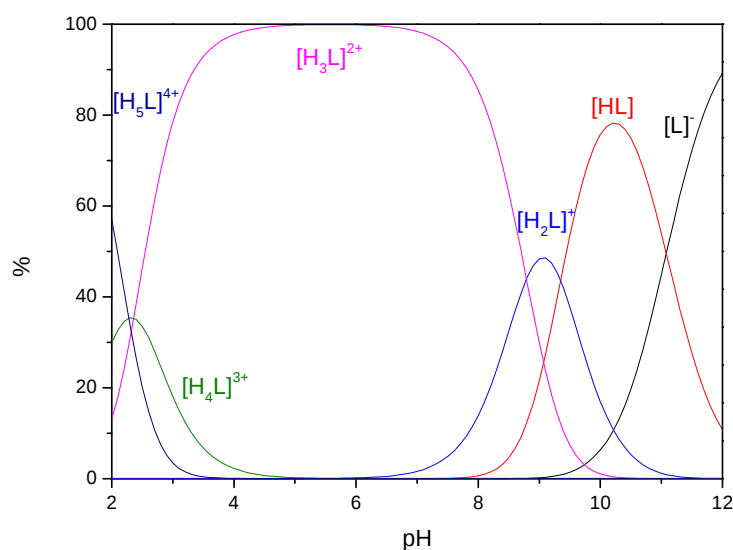


Figura 3.2: Diagramma di distribuzione delle specie protonate HL2 ($T = 308K$, $[NMe_4Cl] = 0,1 M$).

Abbiamo anche analizzato gli spettri di assorbimento UV-vis dei leganti in soluzione acquosa a diversi valori di pH. Il legante H_2L1 a pH acidi è caratterizzato da un'unica banda molto intensa con massimo a 316 nm (figura 3.3), mentre spostandosi verso pH alcalini si può notare che l'intensità dell'assorbimento diminuisce e la banda si struttura in due picchi, uno a 316 nm ed uno a 304 nm.

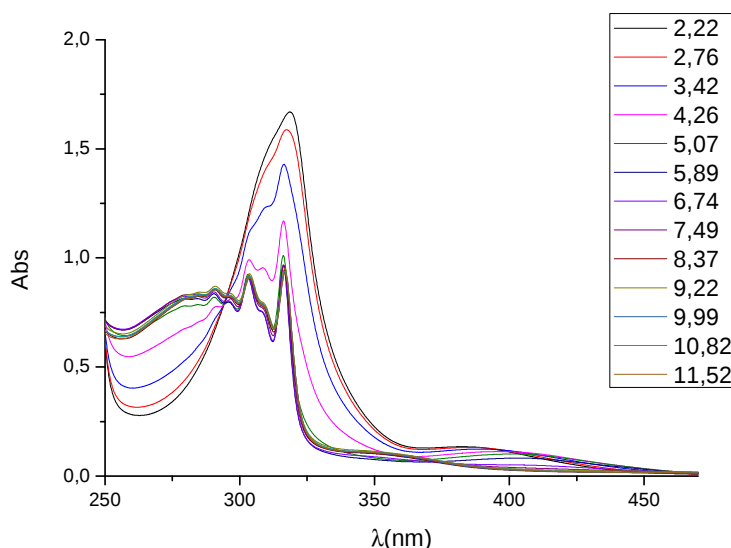


Figura 3.3: Spettro di assorbimento UV-vis del legante H_2L1 ($1,16 \cdot 10^{-4} M$) al variare del pH.

Gli spettri del legante HL2 presentano caratteristiche simili a quelli del legante H_2L1 . Infatti HL2 presenta, nel range di pH 2,60-12,11 una banda strutturata con due picchi, di cui uno, più intenso, a 316 nm. Inoltre, a pH maggiori di 10, si osserva la formazione di un'ulteriore banda a circa 340 nm, dovuta probabilmente alla deprotonazione dell'ossidrilico aromatico.

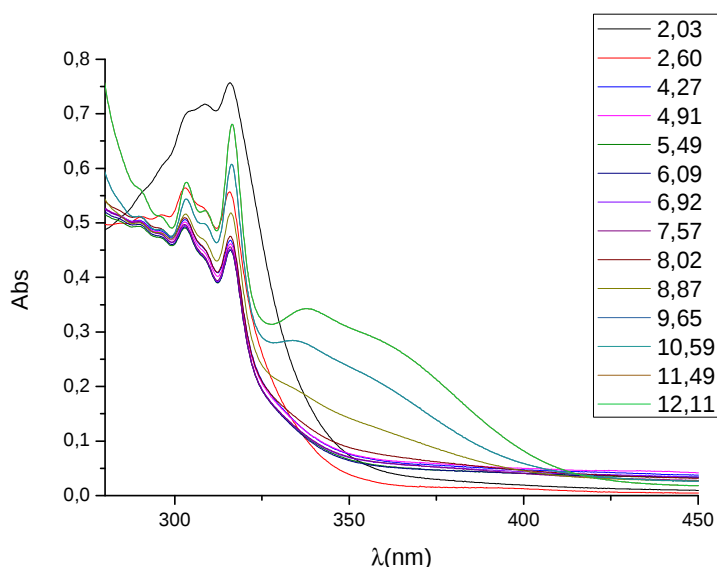


Figura 3.4: Spettro di assorbimento UV-vis del legante HL2 ($1,046 \cdot 10^{-4}$ M) al variare del pH.

Osservando la figura 3.5, che riporta il diagramma di distribuzione del legante H_2L1 sovrapposto con l'andamento dei massimi di assorbimento a 303 e 316 nm, si nota che le specie ad alto grado di protonazione sono caratterizzate da bande più intense. L'assorbimento diminuisce con la formazione della specie LH_3^+ e rimane pressoché costante per valori di pH maggiori di 5. Ciò suggerisce che nelle specie a più alto grado di protonazione almeno uno degli atomi di azoto eteroaromatici sia protonato.

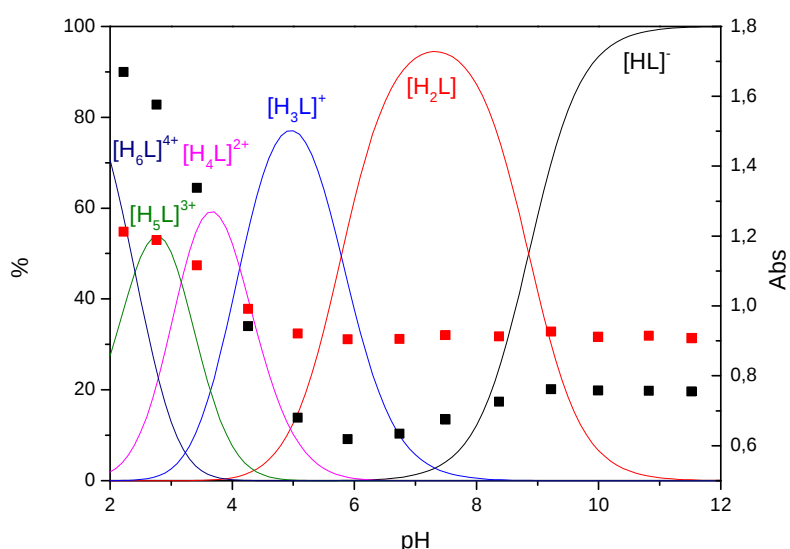


Figura 3.5: Intensità di assorbimento a 316 nm (▪) e a 304 nm (▪) di H_2L1 in funzione del pH sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie.

Osservando la figura 3.6, che riporta il diagramma di distribuzione del legante HL2 sovrapposto con l'andamento dei massimi di assorbimento a 303 e 316 nm, si nota che le specie che assorbono maggiormente sono quelle agli estremi del campo di pH considerato, mentre la specie $[H_3L]^{2+}$, presente in un ampio range di pH, ha un assorbimento piuttosto basso. L'aumento di assorbanza a

pH molto acidi è attribuibile alla protonazione di almeno uno degli atomi di azoto eteroaromatici, in buon accordo con quanto dedotto dalle misure potenziometriche.

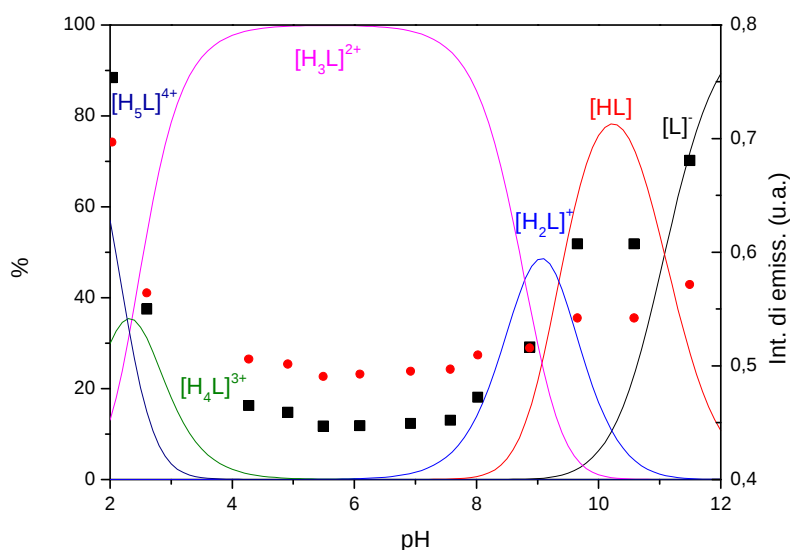


Figura 3.6: Intensità di assorbimento a 316 nm (▪) e a 303 nm (▪) di HL2 in funzione del pH sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie.

Considerando le caratteristiche di emissione di fluorescenza per il legante H_2L1 , gli spettri registrati a pH alcalino tra 7,5 e 11 mostrano una marcata emissione di fluorescenza a circa 350 nm, dove le specie $[HL]^-$ e $[H_2L]^+$ sono largamente prevalenti in soluzione (figure 3.7 e 3.8). Ciò fa pensare che in queste specie i protoni acidi siano localizzati sui gruppi amminici del sistema macrociclico, in particolare sugli atomi di azoto terziari a cui sono legati, in posizione 1 e 7, i due gruppi chinolina, inibendo così l'eventuale effetto PET che potrebbe spengere l'emissione del legante. L'intensità di emissione a 350 nm diminuisce per valori di pH compresi tra 6 e 7,5, cioè con la formazione della specie triprotonata $[H_3L]^+$. Questa diminuzione è difficile da spiegare con i dati in raccolti in questo lavoro, ma è comunque possibile presupporre che nella specie triprotonata si abbia una "ridistribuzione" dei protoni acidi tra i due gruppi carbossilato e i quattro gruppi amminici del sistema macrociclico, che porti alla riduzione della carica positiva localizzata sui due atomi di azoto 1 e 7, rendendo questi ultimi capaci di spegnere di nuovo la fluorescenza dei fluorofori chinolina nel loro stato eccitato per effetto PET. Infine, la formazione delle specie a più alto grado di protonazione $[H_5L]^{3+}$ e $[H_6L]^{4+}$ a $pH < 5$ conduce alla comparsa di una nuova banda di emissione a 410 nm, che può essere attribuita alla protonazione delle due unità chinolina.

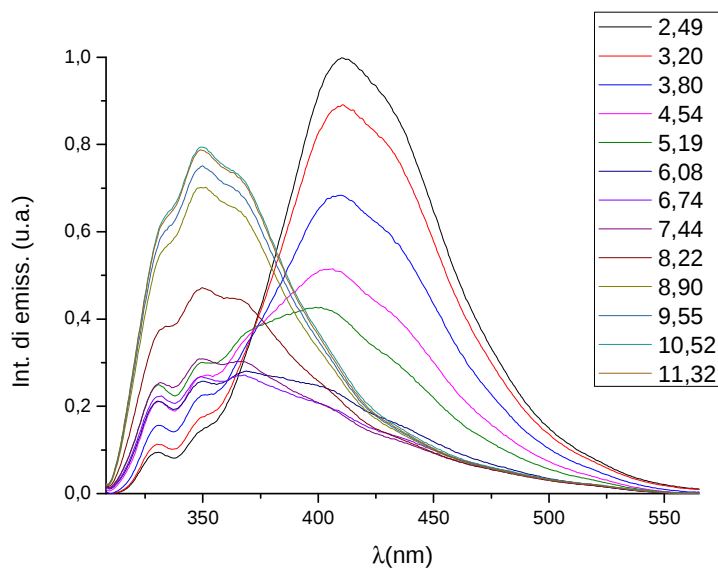


Figura 3.7: Spettro di emissione di fluorescenza del legante H_2L1 ($2,32 \cdot 10^{-5} M$) al variare del pH.

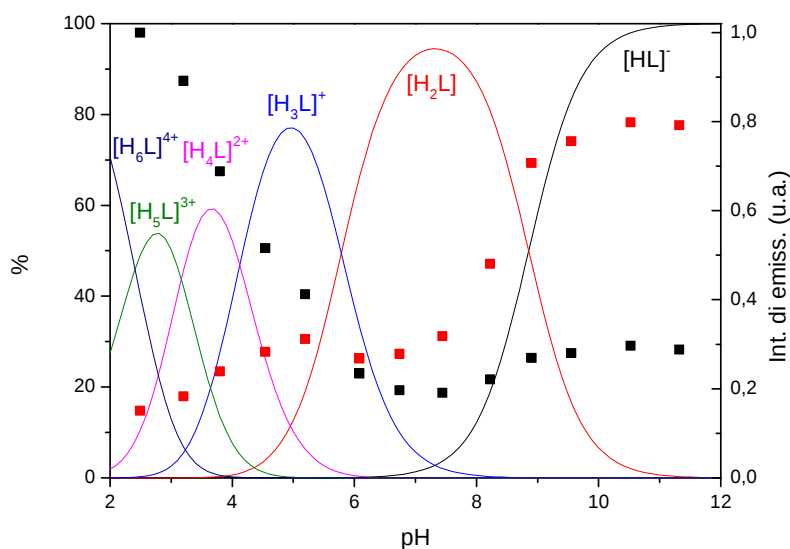


Figura 3.8: Intensità di emissione a 410 nm (■) e a 350 nm (■) di H_2L1 in funzione del pH sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie protonate.

Per quanto riguarda il legante HL2, l'intensità di emissione di fluorescenza è molto bassa rispetto al legante H_2L1 e caratterizzata da una banda con massimo a circa 415 nm. Osservando la figura 3.9 si nota che la banda di emissione subisca uno shift verso il rosso passando da pH acido a pH basico, ed un incremento dell'intensità di fluorescenza. Il fenomeno si può spiegare osservando la figura 3.10, che mostra il diagramma di distribuzione delle specie sovrapposto all'andamento dell'intensità di emissione del massimo a 439 nm, dove si vede che la comparsa in soluzione della specie $[L]^-$ provoca un aumento dell'emissione di fluorescenza. Questo fenomeno può essere spiegato considerando che l'ossigeno, deprotonandosi, viene ad avere un doppietto libero che può entrare nella corrente d'anello e rendersi disponibile per prendere parte al processo di emissione radiativa.

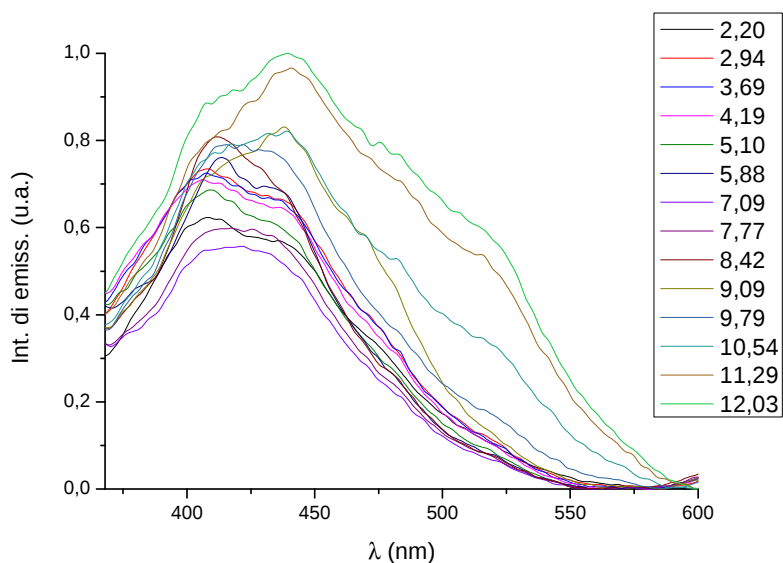


Figura 3.9: Spettro di emissione di fluorescenza del legante HL2 ($2,092 \cdot 10^{-5}$ M) al variare del pH.

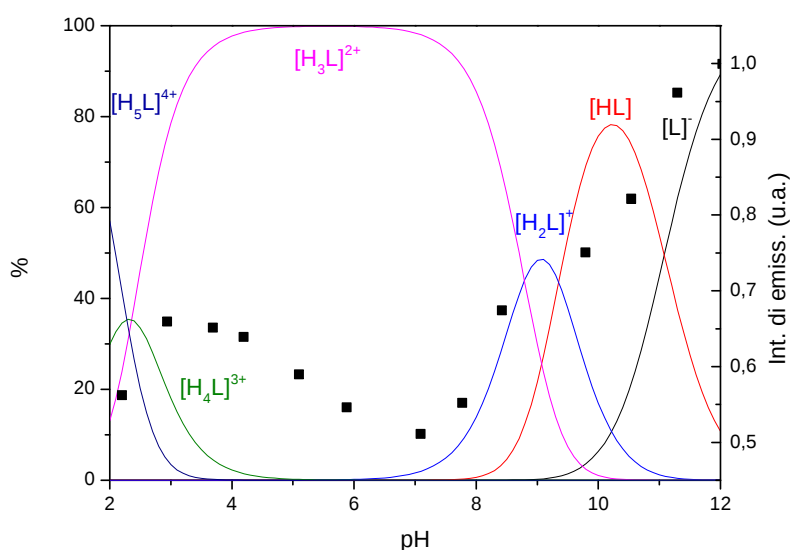


Figura 3.10: Intensità di emissione a 439 nm (▪) di HL2 in funzione del pH sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie protonate per lo stesso legante.

3.2 – Proprietà coordinative dei leganti

Lo studio delle caratteristiche coordinative dei leganti con i cationi dei metalli presi in esame stata effettuata abbinando tecniche potenziometriche e spettrofotometriche, sia di assorbimento UV-vis, che di emissione di fluorescenza in soluzione acquosa. Abbiamo determinato le specie formate e le loro costanti di stabilità grazie all'utilizzo di misure potenziometriche. Inoltre abbiamo valutato, se la coordinazione degli ioni metallici influisca o meno sulle

caratteristiche di assorbimento dei leganti, registrando spettri di assorbimento UV-vis a vari pH. Infine, tramite misure fluorimetriche, è stato analizzato l'effetto della coordinazione sulle proprietà di emissione del legante, sia a pH fisso che a pH variabile, per verificare se questi sistemi possano essere considerati chemosensori di fluorescenza utilizzabili per la determinazione dei cationi metallici investigati.

3.2.1 - Distribuzione delle specie e stabilità termodinamica dei composti di coordinazione

Il legante H_2L1 ha presentato problemi di inerzia cinetica nella formazione dei complessi, e ciò ha impedito la completa speciazione dei sistemi metallo/legante in soluzione acquosa.

Tutti i complessi risultano comunque più stabili rispetto a quelli ottenuti con il semplice macrociclo cyclen non funzionalizzato (ad esempio $\log K = 15,3$ per la formazione del complesso $[Zn-cyclen]^{2+}$). Questa proprietà è da attribuire, probabilmente, al coinvolgimento dell'azoto chinolinico, dei carbossilati e dell'ossidrile della 8-idrossichinolina (questi ultimi due gruppi funzionali, ove presenti) nella coordinazione dello ione metallico, che in genere portano ad una stabilizzazione dei complessi.

La tabella 3.3, dove sono riportati i logaritmi delle costanti di stabilità con i quattro ioni metallici investigati, evidenzia che la stabilità dei complessi $[ML]$ aumenta nell'ordine $Zn^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$. La maggiore stabilità dei complessi di Cu^{2+} rispetto a quelli di Zn^{2+} e Cd^{2+} è un fatto normalmente osservato nei complessi con le poliammine e può essere attribuito all'effetto stabilizzante della CFSE (crystal field stabilization energy) sul complesso di Cu^{2+} , essendo uno ione d^9 . Seguendo questo ragionamento si arriva alla conclusione che è corretto che Zn^{2+} e Cd^{2+} abbiano una stabilità simile perché hanno entrambi la configurazione elettronica d^{10} . L'elevata stabilità del complesso di Pb^{2+} è un po' strana in un complesso con un legante poliamminico: però si osserva che il Pb^{2+} dà luogo facilmente a complessi con numero di coordinazione maggiore di 6, cosa piuttosto rara per gli altri metalli. Si può ipotizzare perciò che nel complesso di Pb^{2+} ci sia un numero maggiore di atomi donatori che lo stabilizzano termodinamicamente rispetto agli altri tre cationi studiati.

Equilibrio	Zn^{2+}	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Cd^{2+}
$[L]^{2-} + M^{2+} = [LM]$	21,2(1)	24,47(8)	23,6(1)	22,0(1)

Tabella 3.3: Costanti di formazione dei complessi con Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} per il legante H_2L1 (308 K, 0,1 M NMe_4Cl).

Analizzando la figura 3.11, che riporta il diagramma di distribuzione delle specie complesse con lo ione Zn^{2+} in funzione del pH (preso come modello per i quattro ioni metallici investigati), si nota che l'unica specie complessa formata $[\text{ML}]$ è presente in un ampio range di pH.

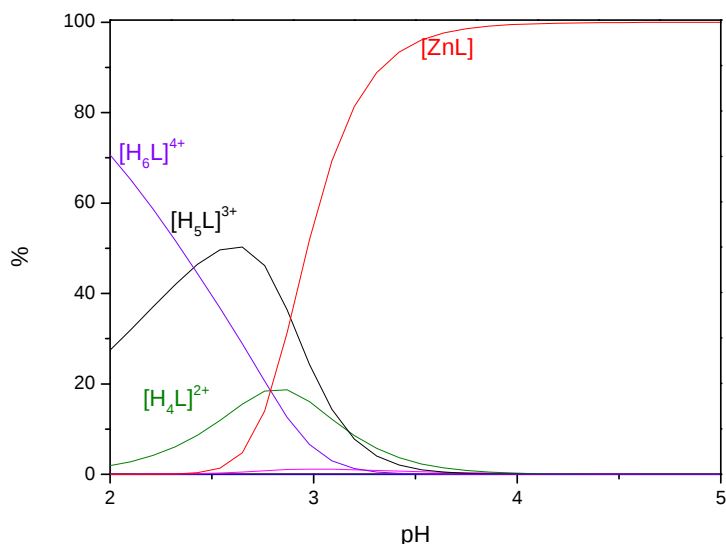


Figura 3.11: Diagramma di distribuzione per il sistema $\text{H}_2\text{L1-Zn}^{2+}$ ($[\text{H}_2\text{L1}] = [\text{Zn}^{2+}] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{NMe}_4\text{Cl} = 0,1 \text{ M}$, 308 K).

Per il legante HL2 abbiamo la formazione sia dei complessi $[\text{ML}]^+$ che delle specie monoprotonate $[\text{HML}]^{2+}$ per tutti e tre gli ioni metallici considerati. Il complesso con lo ione Zn^{2+} è in grado di formare anche una specie ossidrilata $[\text{ZnL}(\text{OH})]$.

I logaritmi delle costanti di stabilità, ottenute per via potenziometrica, sono riportati in tabella 3.4.

Equilibrio	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Cu^{2+}
$[\text{L}]^- + \text{M}^{2+} = [\text{LM}]^+$	15,5 (1)	9,9 (1)	15,5 (1)
$[\text{ML}]^+ + \text{H}^+ = [\text{HML}]^{2+}$	10,21 (6)	11,0 (1)	10,4 (1)
$[\text{ML}]^+ + \text{OH}^- = [\text{ML}(\text{OH})]$	2,59 (9)	-	-

Tabella 3.4: Costanti di formazione dei complessi con Zn^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} per il legante HL2 (308 K , $0,1 \text{ M NMe}_4\text{Cl}$).

Analizzando le figure 3.12, 3.13 e 3.14, che riportano rispettivamente i diagrammi di distribuzione dei sistemi HL2-Zn^{2+} , HL2-Cd^{2+} e HL2-Cu^{2+} , si nota che questi complessi formano la specie $[\text{HML}]^{2+}$. A pH 10, inizia a formarsi la specie ossidrilata $[\text{ZnL}(\text{OH})]$. La formazione della specie $[\text{HML}]^{2+}$, particolarmente stabile, ci fa presupporre che in questi complessi lo ione metallico sia coordinato dai gruppi amminici dell'unità cyclen e probabilmente anche da uno o due atomi di azoto dei sistemi eteroaromatici, mentre il gruppo

-OH dell'unità idrossichinolina non venga coinvolto nella coordinazione, cosa che comporterebbe la sua depronazione.

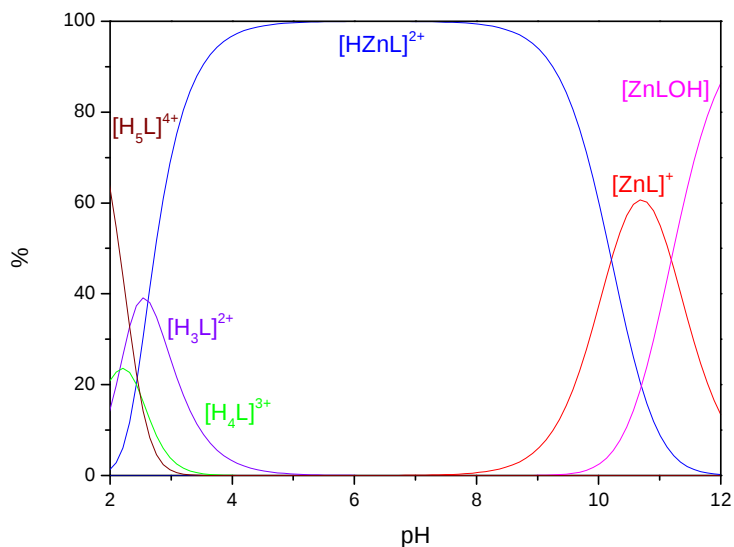


Figura 3.12: Diagramma di distribuzione delle specie ($[HL2] = [Zn^{2+}] = 1 \cdot 10^{-3} M$, $NMe_4Cl = 0,1M$, 308 K).

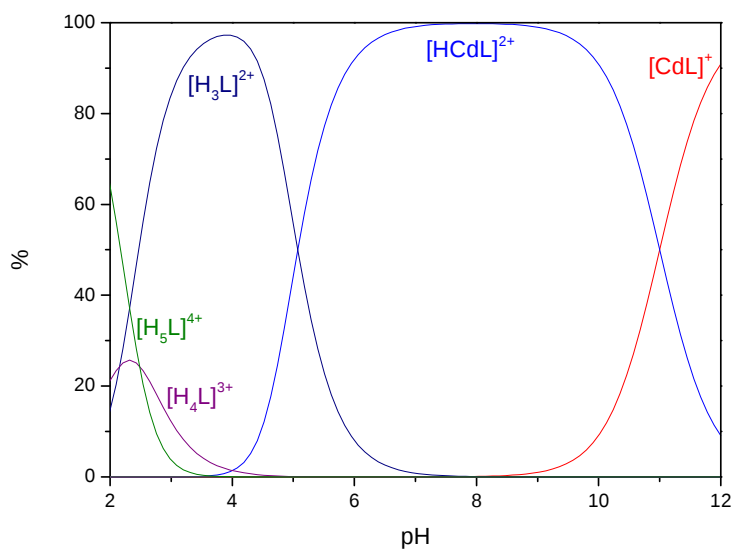


Figura 3.13: Diagramma di distribuzione delle specie ($[HL2] = [Cd^{2+}] = 1 \cdot 10^{-3} M$, $NMe_4Cl = 0,1M$, 308 K).

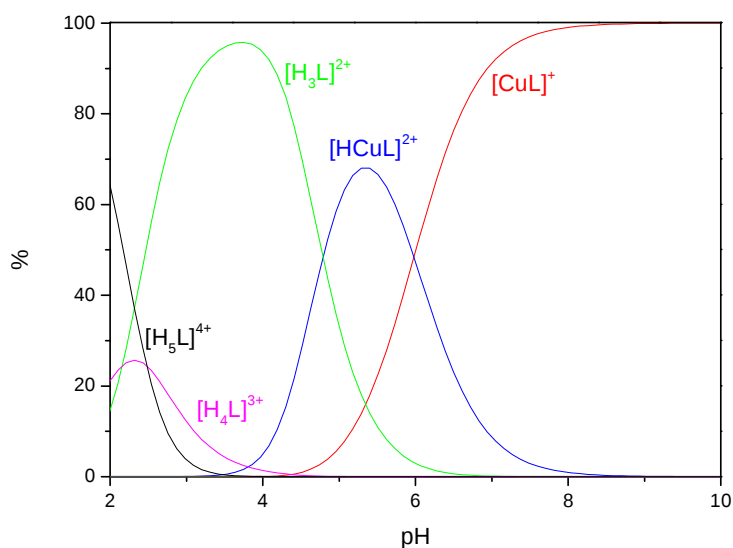


Figura 3.14: Diagramma di distribuzione delle specie ($[HL2] = [Cu^{2+}] = 1 \cdot 10^{-3} M$, $NMe_4Cl = 0,1M$, $308 K$).

3.2.2 – Spettroscopia di assorbimento UV-visibile

Analizzando gli spettri di assorbimento UV-vis si ottengono informazioni sui complessi formati in soluzione acquosa. Le bande di assorbimento delle unità cromofore sono sensibili agli equilibri di protonazione e deprotonazione che le coinvolgono, come si osserva nei due leganti studiati. Analizzando le figure 3.15, 3.16, 3.17 e 3.18, che mostrano gli spettri del legante H_2L1 con i cationi metallici Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , si nota che questi non si differenziano molto tra loro, per quanto riguarda la forma delle bande e l'assorbanza delle specie. Si nota che a pH minore di 4 i complessi presentano delle caratteristiche di assorbimento diverse rispetto a quelli registrati a pH più alcalini. A pH inferiori a 4 i complessi non sono ancora formati e l'aumento dell'assorbanza a circa 316 nm è semplicemente dovuto alla protonazione degli atomi di azoto chinolinici del legante libero.

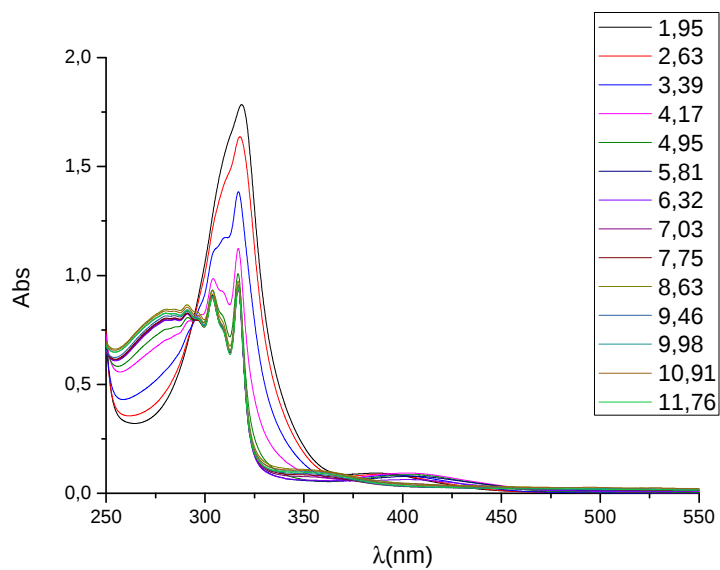


Figura 3.15: Spettro di assorbimento UV-vis di H_2L1 in presenza di un equivalente di Zn^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 1,16 \cdot 10^{-4} M$).

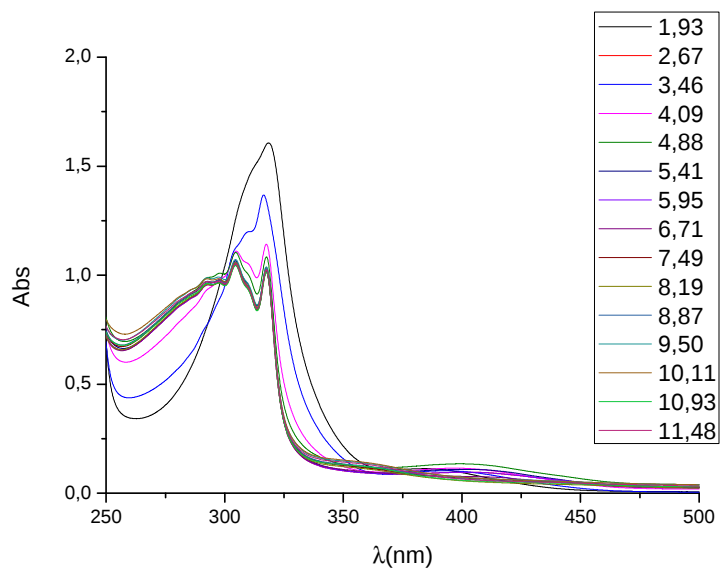


Figura 3.16: Spettro di assorbimento UV-vis di H_2L1 in presenza di un equivalente di Cd^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 1,16 \cdot 10^{-4} M$).

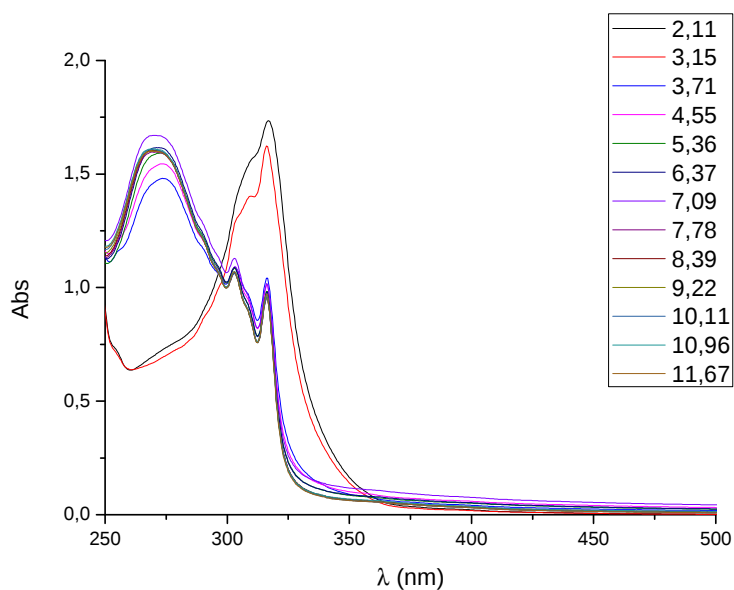


Figura 3.17: Spettro di assorbimento UV-vis di H_2L1 in presenza di un equivalente di Pb^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 1,16 \cdot 10^{-4} M$).

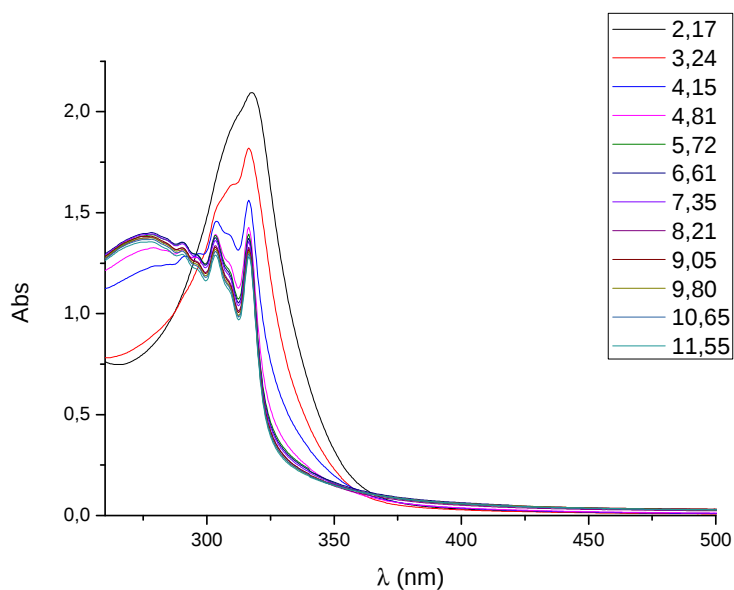


Figura 3.18: Spettro di assorbimento UV-vis di H_2L1 in presenza di un equivalente di Cu^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 1,16 \cdot 10^{-4} M$).

La figura 3.19 mostra l'andamento dei massimi di assorbimento a 316 nm in funzione del pH del legante libero e dei complessi coi cationi metallici Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} . Si può osservare che tutti questi complessi evidenziano un'assorbanza a 316 nm maggiore rispetto a quella del legante libero.

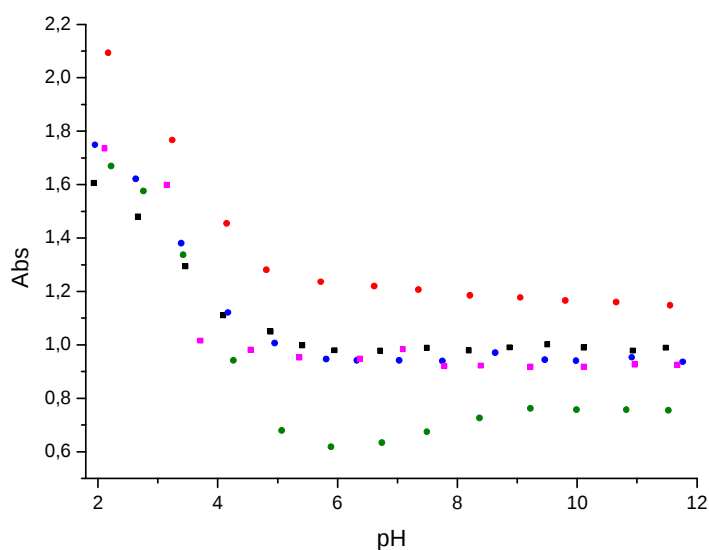


Figura 3.19: Andamento dei massimi di assorbimento a 318 nm per gli ioni metallici Cd^{2+} ($\blacksquare$), Cu^{2+} ($\bullet$), Zn^{2+} ($\bullet$), Pb^{2+} ($\blacksquare$), $\text{H}_2\text{L1}$ ($\bullet$).

Con il legante HL2 sono stati registrati spettri di assorbimento UV-visibile a diversi valori di pH in presenza di un equivalente di Zn^{2+} . A differenza di quanto visto per il legante $\text{H}_2\text{L1}$, a $\text{pH} > 9$ si può notare (figura 3.20) la formazione di una nuova banda di assorbimento a circa 360 nm, dovuta alla deprotonazione del gruppo -OH dell'idrossichinolina.

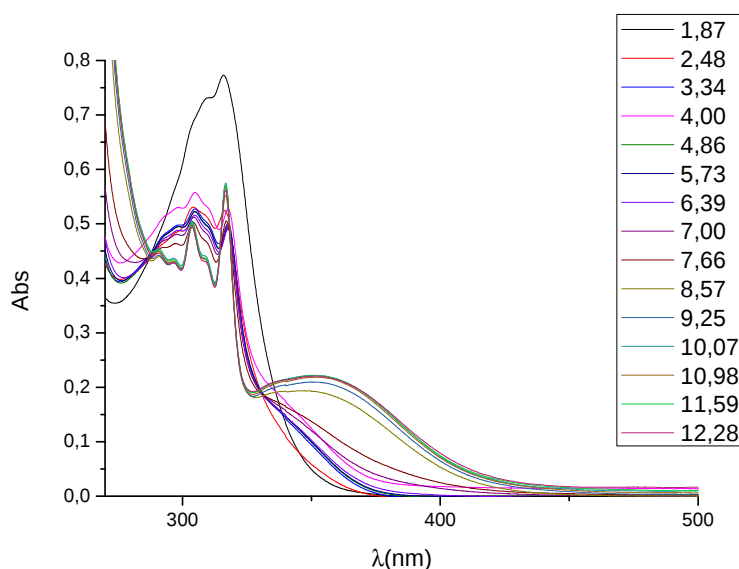


Figura 3.20: Spettro di assorbimento UV-vis di HL2 in presenza di un equivalente di Zn^{2+} a diversi valori di pH ($[\text{HL2}] = 1,046 \cdot 10^{-4} \text{ M}$).

Dalla figura 3.21, che riporta il diagramma di distribuzione delle specie complesse sovrapposto ai massimi di assorbimento a 303 e 350 nm, si può notare che il massimo di assorbimento a 303 nm è pressoché costante in tutto l'intervallo di pH studiato, mentre invece quello a 350 nm aumenta di intensità spostandosi da pH acido verso pH alcalino. Questo fatto è in linea con l'ipotesi

che la formazione della banda della banda a 350 nm, che avviene a pH maggiore di 8, sia dovuta alla deprotonazione dell'ossidrilico aromatico.

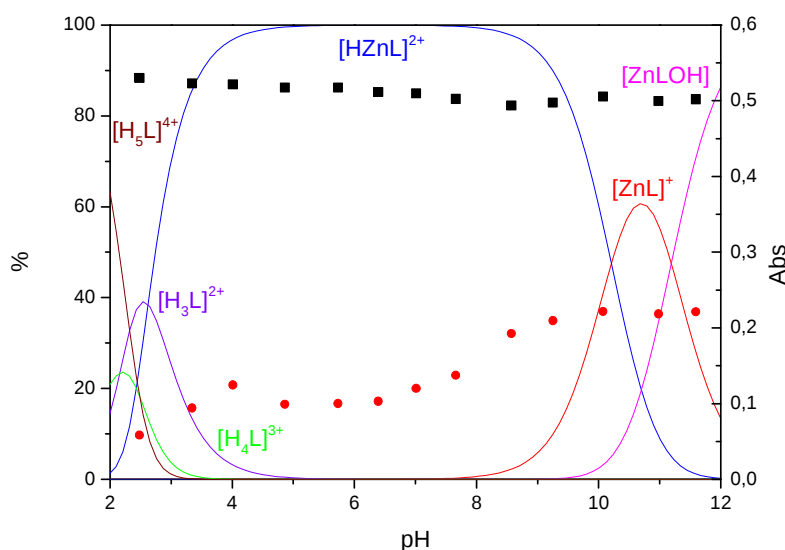


Figura 3.21: Assorbimento UV-vis a 303 nm (▪) e a 350 nm (▪) di HL2 in presenza di un equivalente di Zn^{2+} in funzione del pH sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie complesse HL2- Zn^{2+} .

3.2.3 – Spettroscopia di emissione di fluorescenza

Sono state studiate le proprietà del legante come chemosensore di fluorescenza nei confronti degli ioni metallici già illustrati. Ciò è stato fatto registrando spettri di emissione di fluorescenza di una soluzione acquosa del legante in presenza di ciascuno ione metallico sia a pH fisso che a pH variabile. Inizialmente sono stati registrati gli spettri di emissione di fluorescenza dei leganti in presenza di un equivalente di ciascuno ione metallico, variando il pH in soluzione acquosa: in tal modo è stato possibile definire le caratteristiche di emissione delle varie specie complesse formate dai due leganti con ciascuno ione metallico.

3.2.3.1 – Legante H_2L1

È stata studiata l'emissione di fluorescenza del legante H_2L1 in presenza dei quattro ioni metallici al variare del pH. Gli spettri hanno più o meno tutti lo stesso andamento: si nota in tutti grafici che il complesso non si forma a pH acido, in quanto le bande a $pH < 3$ sono analoghe a quelle del legante libero allo stesso pH e praticamente tutte sovrapponibili tra loro. In generale, la coordinazione dello ione metallico, che avviene a pH debolmente acidi, porta uno spostamento verso il blu e una diminuzione dell'intensità di emissione.

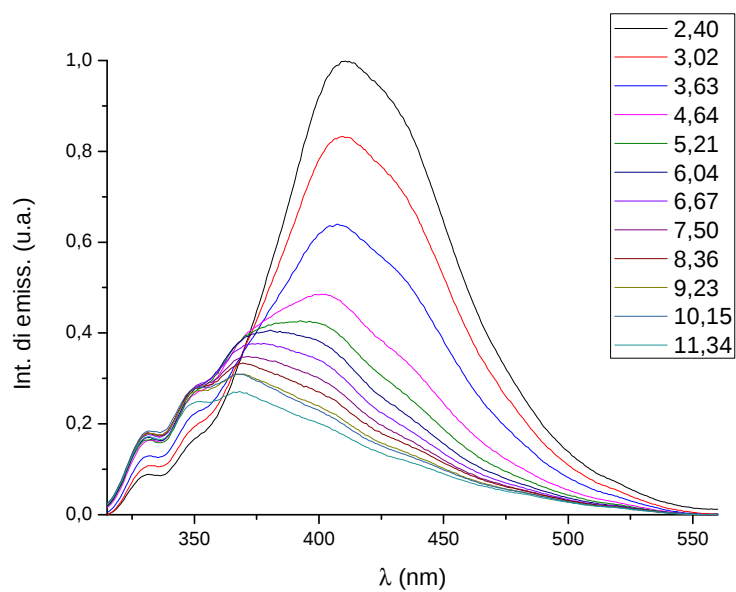


Figura 3.22: Spettro di emissione di fluorescenza di H_2L1 in presenza di un equivalente di Zn^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 2,32 \cdot 10^{-5} M$).

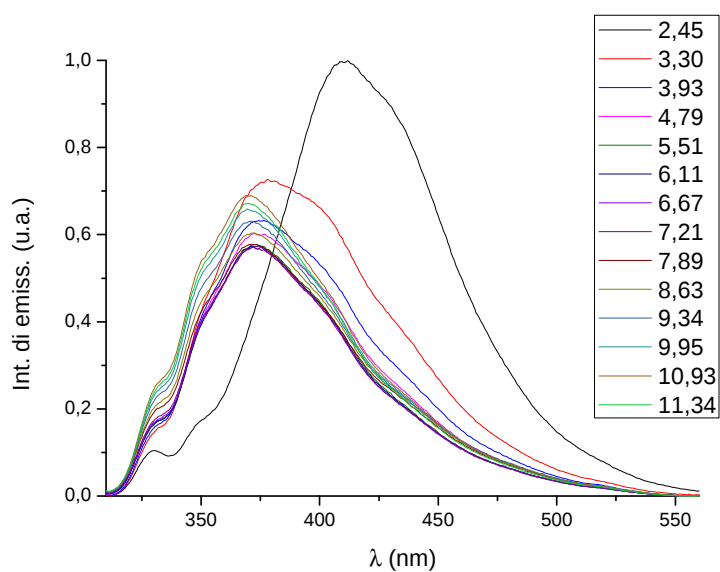


Figura 3.23: Spettro di emissione di fluorescenza di H_2L1 in presenza di un equivalente di Cd^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 2,32 \cdot 10^{-5} M$).

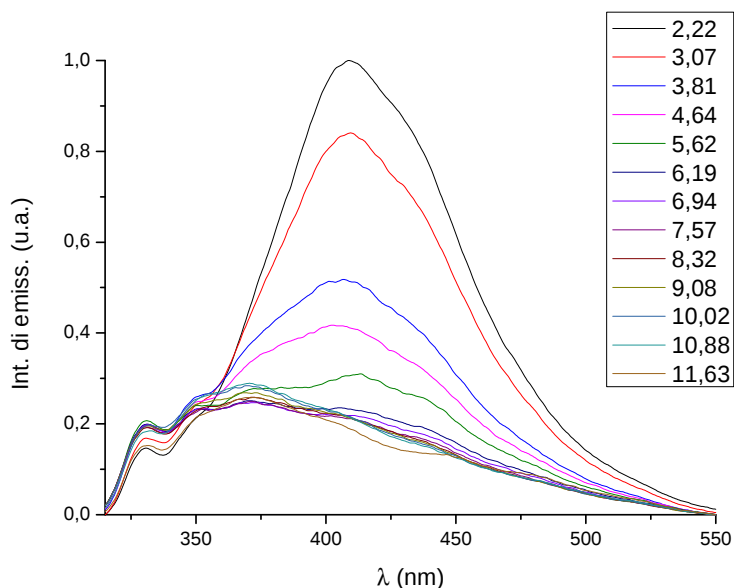


Figura 3.24: Spettro di emissione di fluorescenza di H_2L1 in presenza di un equivalente di Pb^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 2,32 \cdot 10^{-5} M$).

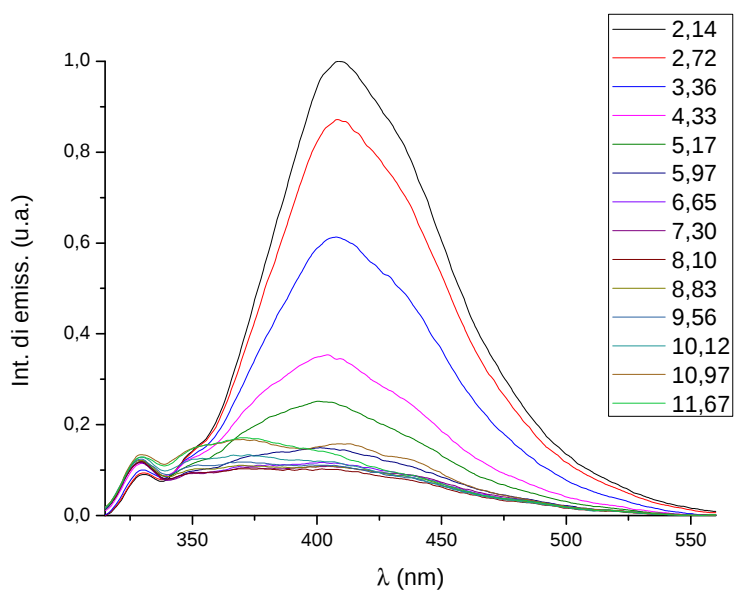


Figura 3.25: Spettro di emissione di fluorescenza di H_2L1 in presenza di un equivalente di Cu^{2+} a diversi valori di pH ($[H_2L1] = 2,32 \cdot 10^{-5} M$).

Abbiamo quindi analizzato la variazione dell'emissione del legante in presenza di numerosi ioni metallici (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Na^{+} e Mg^{2+} , figura 3.26). L'intensità di emissione aumenta in presenza di Zn^{2+} e Cd^{2+} . L'emissione, nel dettaglio, aumenta di poco più di 3 volte in presenza di un equivalente di Cd^{2+} e di circa 2 volte in presenza di un equivalente di Zn^{2+} . La fluorescenza sostanzialmente non cambia in presenza di Mg^{2+} , Ca^{2+} e Na^{+} e diminuisce con gli altri ioni investigati, sia per effetto dell'atomo pesante (Pb^{2+} e Hg^{2+}), sia a causa del paramagnetismo degli altri ioni di metalli di transizione testati.

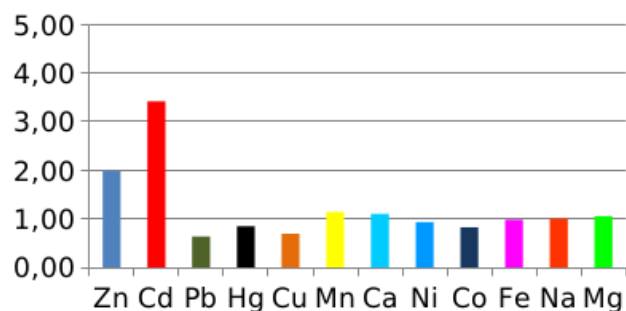


Figura 3.26: Valore di I/I_0 del legante H_2L1 in presenza di ioni metallici diversi. I è l'intensità di emissione in presenza di un equivalente di ione metallico e I_0 l'intensità di emissione di H_2L1 ($pH = 6$, tampone MES).

Sono stati anche registrati spettri di H_2L1 in presenza di quantità crescenti Cd^{2+} a $pH = 6$ (figura 3.27). La coordinazione dello ione metallico porta ad un aumento lineare dell'intensità di emissione fino all'aggiunta di circa un equivalente di Cd^{2+} , come ben visibile anche in figura 3.28, dove è stata riportata l'intensità di emissione del legante a 474 nm in funzione degli equivalenti di Cd^{2+} aggiunti. L'aggiunta di quantità maggiori del catione metallico non comporta ulteriori variazioni spettrali, a conferma, anche in questo caso, della formazione di complessi con stechiometria 1:1 in soluzione.

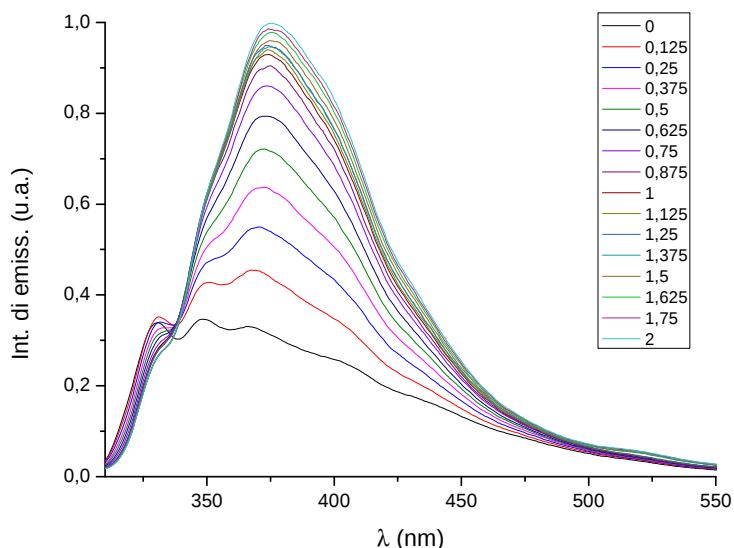


Figura 3.27: Spettri di emissione di una soluzione di H_2L1 a $pH = 6$ in presenza di quantità crescenti Cd^{2+} .

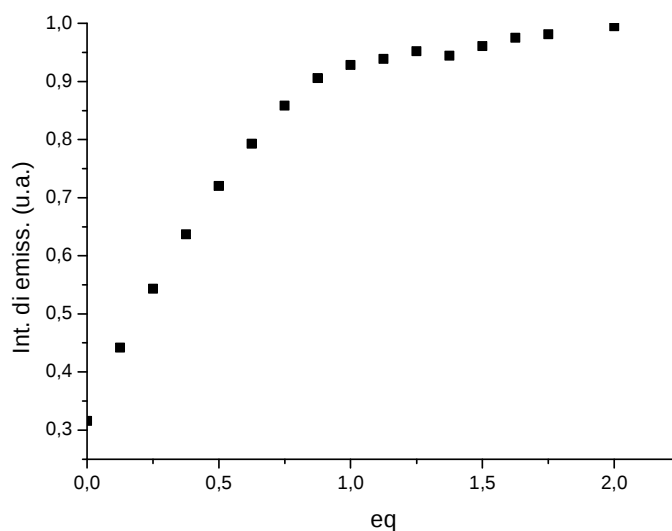


Figura 3.28: Intensità di fluorescenza a 474 nm di una soluzione di H_2L1 a $pH = 6$ in presenza di quantità crescenti Cd^{2+} .

Sono stati registrati gli spettri di H_2L1 in presenza di quantità crescenti di Pb^{2+} a $pH\ 7,5$ (figura 3.29). All'aumentare della quantità di Pb^{2+} si ha uno 'spengimento' dell'emissione di fluorescenza, finché, raggiunto il rapporto stechiometrico 1:1, gli spettri non variano, confermando la formazione di specie mononucleari.

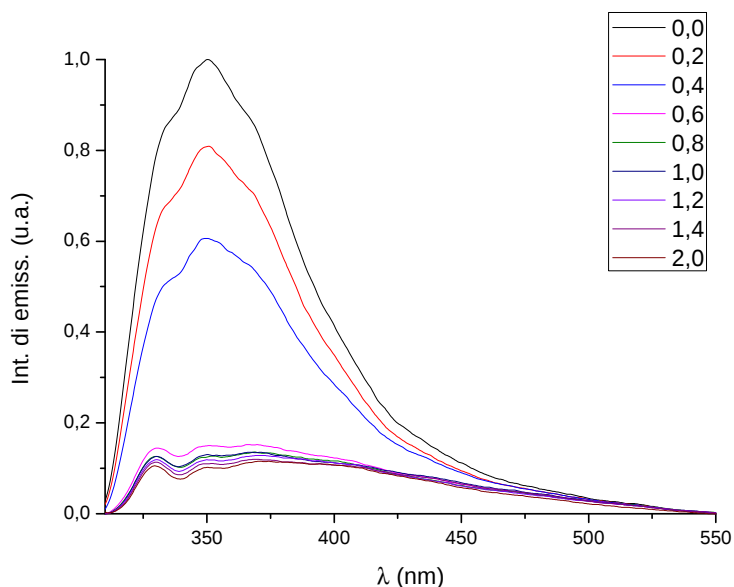


Figura 3.29: Spettro di emissione di fluorescenza di H_2L1 in presenza di quantità crescenti di Pb^{2+} a $pH\ 7,5$ ($[H_2L1] = 2,32 \cdot 10^{-5}\ M$).

3.2.3.2 – Legante HL2

Prove analoghe a quelle viste nel caso del legante H₂L1 sono state effettuate anche nel caso del legante HL2.

In figura 3.30 sono riportati gli spettri di emissione registrati a diversi valori di pH in presenza di un equivalente di Zn²⁺. Il sistema dà luogo ad emissioni di intensità a 413 nm più bassa rispetto a quella di H₂L1. L'intensità di emissione aumenta a pH alcalino, dove si ha la formazione delle specie [ZnL]⁺ e [ZnL(OH)] (figura 3.31), a causa della deprotonazione del gruppo ossidrilico dell'unità 8-idrossichinolina.

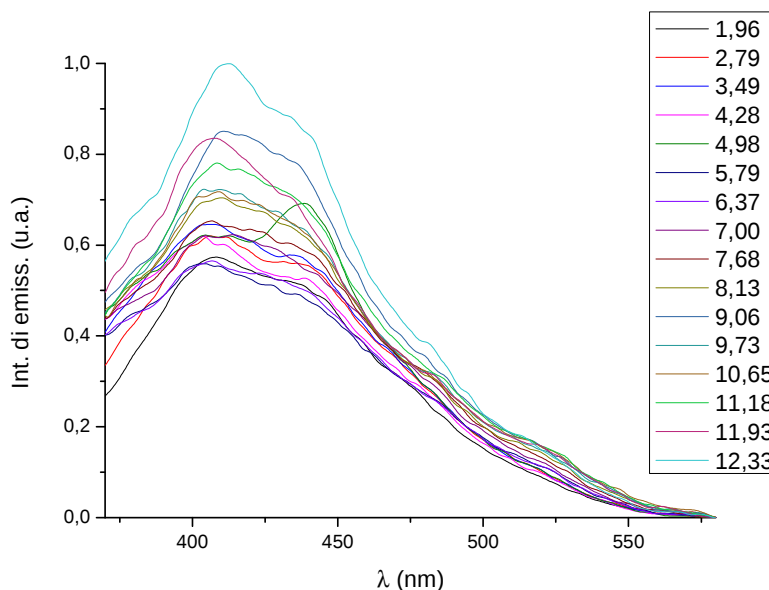


Figura 3.30: Spettro di emissione di fluorescenza di HL2 in presenza di un equivalente di Zn²⁺ a diversi valori di pH ([HL2] = 2,092 · 10⁻⁵ M).

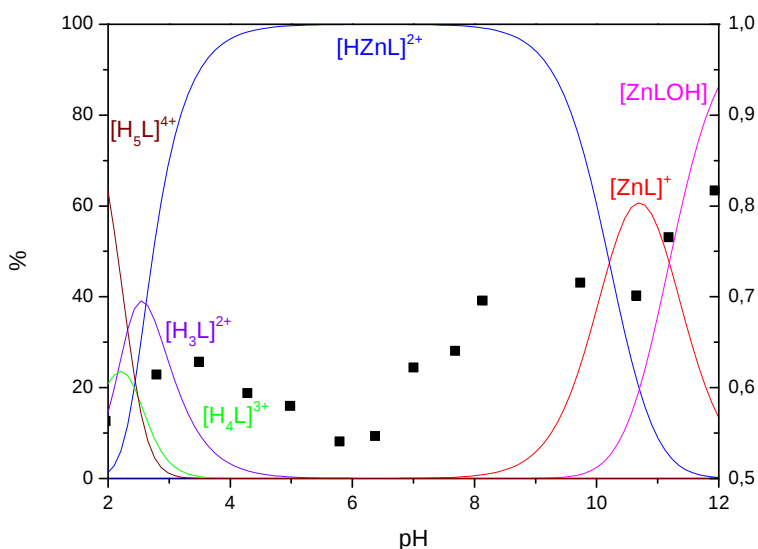


Figura 3.31: Intensità di emissione a 413 nm (•) di HL2 in presenza di un equivalente di Zn²⁺ in funzione del pH sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie complesse HL2-Zn²⁺.

Abbiamo poi registrato spettri di emissione a pH fisso (tampone TRIS, pH=7,17) in presenza di diversi ioni metallici (Figura 3.32). A questo pH, l'intensità di emissione del legante non varia in maniera significativa in presenza dei diversi ioni metallici, ad indicare come HL2 non presenta specificità nel riconoscimento di questi ioni metallici a pH fisiologico attraverso le proprietà fluorimetriche.

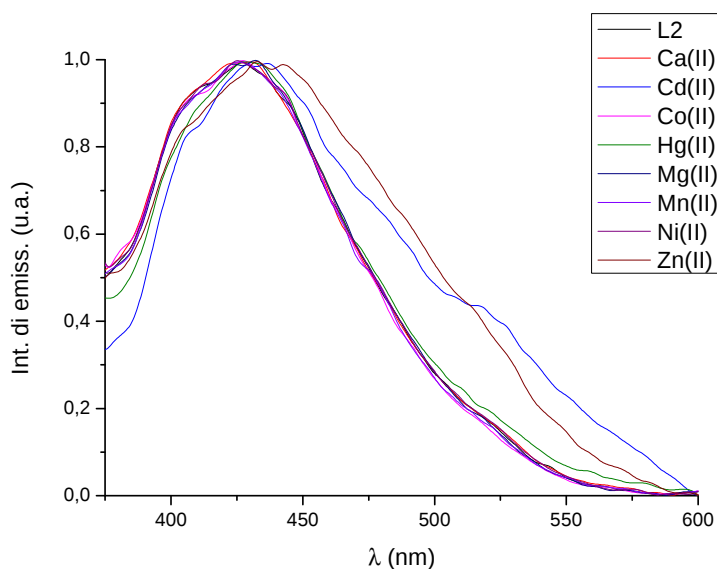


Figura 3.32: Spettro di emissione di fluorescenza del legante HL2 ($2,092 \cdot 10^{-5} M$) a pH fisso in presenza di un equivalente di Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} .

3.2.4 – Struttura cristallina del complesso ZnL1

Nel corso di questo lavoro di tesi abbiamo ottenuto dei cristalli singoli del complesso ZnL1, grazie ad una lenta evaporazione di una soluzione acquosa contenente H_2L1 e $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ in rapporto equimolecolare a pH=7. Tramite diffrazione di raggi X su cristallo singolo è stata ottenuta la sua struttura cristallina. Una rappresentazione del complesso è riportata in figura 3.33, mentre angoli e distanze di legame sono riportati in tabella 3.5.

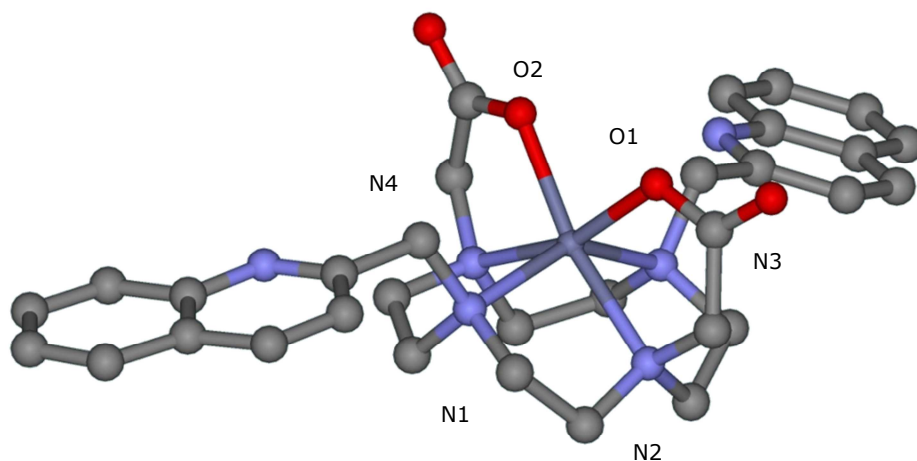


Figura 3.33: Struttura cristallografica di ZnL1.

Atomo	Distanza di legame (Å)
N1	2,19
N2	2,29
N3	2,24
N4	2,19
O1	2,00
O2	2,11

Atomi	Angolo di legame (°)
N1-Zn-N2	82,6
N2-Zn-N3	80,0
N3-Zn-N4	79,4
N4-Zn-N1	79,6
N1-Zn-N3	142,2
N2-Zn-N4	117,9
N1-Zn-O1	108,2
N1-Zn-O2	104,2
N2-Zn-O1	79,7
N2-Zn-O2	164,7
N3-Zn-O1	98,4
N3-Zn-O2	104,4
N4-Zn-O1	161,4
N4-Zn-O2	77,4
O1-Zn-O2	85,1

Tabella 3.5: Distanze ed angoli di legame del cristallo di ZnL1.

Lo ione metallico risulta esa-coordinato dai quattro atomi di azoto dell'unità cyclen e da due atomi di ossigeno dei due gruppi carbossilici nella loro forma deprotonata. La geometria è sostanzialmente ottaedrica distorta. Le due unità chinolina invece non sono coinvolte nella coordinazione, ad indicare la preferenza del metallo alla coordinazione dei due gruppi anionici carbossilato rispetto agli atomi di azoto eteroaromatici dei sistemi chinolinici.

3.3 – Complessi di Terbio

Infine, abbiamo sintetizzato i complessi di H₂L1 con Tb³⁺ e abbiamo eseguito un'analisi preliminare delle sue caratteristiche di emissione. Il complesso è stato caratterizzato tramite analisi elementare e con uno spettro di massa ESI. Lo ione Tb³⁺ in soluzione acquosa a pH 6,5, eccitato a 360 nm, dà luogo a quattro picchi di emissione a 487 nm (intenso), 543 nm (intenso), 584 nm (mediamente intenso) e 619 nm (debole).

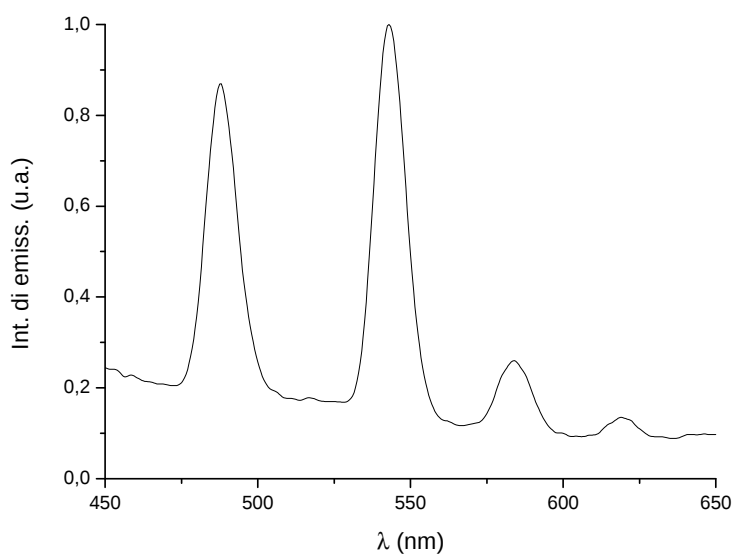


Figura 3.34: Spettro di emissione di $TbCl_3$ eccitato a 360 nm.

La formazione del complesso dà luogo ad un aumento, di molti ordini di grandezza dell'intensità di emissione del Tb^{3+} libero (figura 3.35) e del cromoforo del legante.

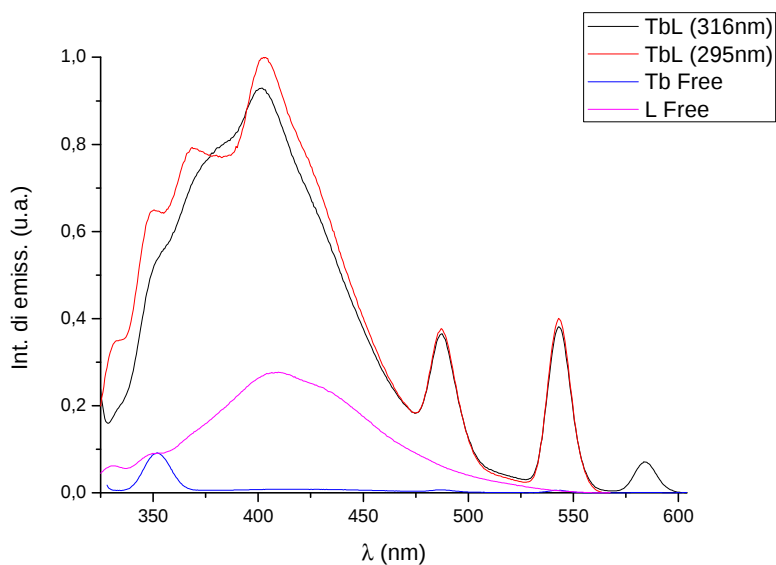


Figura 3.35: Confronto tra l'emissione di fluorescenza delle specie $TbCl_3$, H_2L1 ($1,16 \cdot 10^{-5} M$) e $[TbL1]^+$ ($1,16 \cdot 10^{-5} M$).

Abbiamo poi registrato spettri del complesso in soluzione acquosa a vari valori di pH, per valutare come l'emissione di fluorescenza fosse influenzata dall'acidità del mezzo. Purtroppo non è stato possibile eseguire una titolazione a pH fisso sul legante in presenza di quantità crescenti di Tb^{3+} perché la formazione del complesso è cineticamente troppo lenta.

Come si può vedere dalle figure 3.36 e 3.37, le bande di emissione del metallo

non risentono del pH, mentre l'intensità di emissione del legante tende a diminuire all'aumentare del pH. I dati in nostro possesso non ci permettono di dare una chiara spiegazione di questo comportamento, anche se è noto come i lantanidi possano facilmente formare specie ossidrilate a pH anche debolmente acidi. Ciò potrebbe portare al distacco degli atomi di azoto eteroaromatici del legante, sostituiti da ioni OH^- , spiegando la diminuzione dell'intensità di emissione dello stesso.

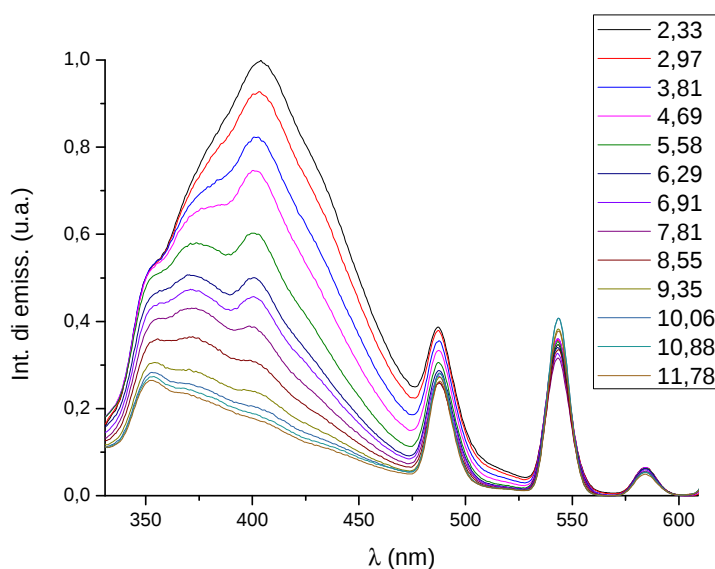


Figura 3.36: Spettro di emissione di fluorescenza del complesso $[\text{TbL1}]^+$ ($1,165 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) al variare del pH.

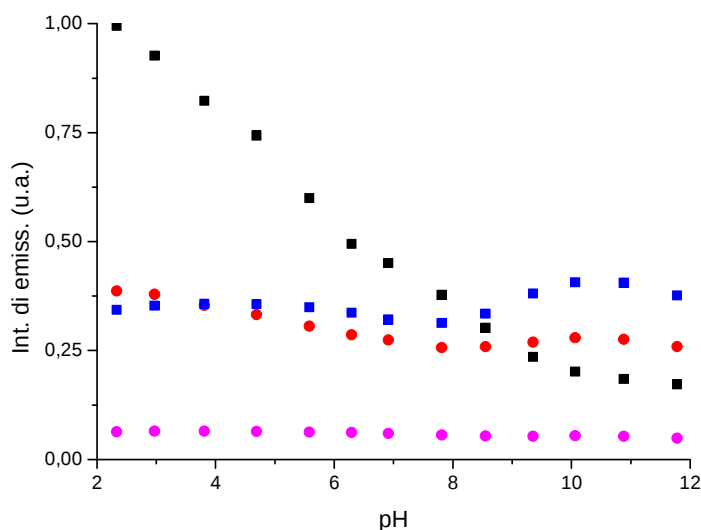


Figura 3.37: Intensità di emissione a 403 nm ($\blacksquare$), a 487 nm ($\bullet$), a 544 nm ($\blacksquare$) e 584 nm ($\bullet$) di $[\text{TbL1}]^+$ in funzione del pH.

3.4 – Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state analizzate le proprietà coordinative del legante H₂L1 nei confronti di Zn²⁺ e Cd²⁺, due ioni metallici la cui coordinazione porta ad un aumento dell'intensità di emissione da parte dei leganti fluorescenti, e di Pb²⁺ e Cu²⁺, rispettivamente come esempi di ioni di metalli pesanti e di transizione che normalmente 'spengono' l'emissione di fluorescenza quando legati da recettori fluorescenti. La coordinazione di questi ioni è stata studiata tramite misure potenziometriche e spettrofotometriche. Per il legante HL2 lo studio è stato solo preliminare. Sono state determinate le costanti di stabilità dei complessi di Zn²⁺, Cd²⁺ e Cu²⁺ e le caratteristiche di emissione del complesso di Zn²⁺.

È stato evidenziato come i due leganti formino dei complessi stabili con stechiometria 1:1, nei quali l'ione metallico è coordinato dagli atomi di azoto del sistema macrociclico, anche se gli altri gruppi funzionali presenti possono intervenire nella coordinazione, come i due gruppi carbossilato per il legante H₂L1.

Nel caso di H₂L1, abbiamo evidenziato come questo legante dia luogo ad un aumento dell'intensità di emissione in presenza di Zn²⁺ e soprattutto Cd²⁺. La presenza di ioni di metalli pesanti (Pb²⁺) o paramagnetici (Cu²⁺) dà luogo ad un quenching della fluorescenza. In presenza dello ione terbio, si è notato che questo è in grado di aumentare molto significativamente l'intensità di fluorescenza del legante.

Per quanto riguarda HL2, questo non ha mostrato alcuna variazione di intensità di fluorescenza in presenza di un equivalente di Zn²⁺.