



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE E SCIENZE
FARMACEUTICHE

CICLO XXVIII

TITOLO DELLA TESI

Nuovi chemosensori ottici aventi un derivato benzossazolico come unità
sensibile

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/03

RELATORE

Chiar.mo Prof. Vieri Fusi

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Gilberto Spadoni

DOTTORANDO

Dott. Luca Piersanti

INDICE

1	Introduzione.....	5
1.1	Chimica Supramolecolare.....	5
1.1.1	Interazioni Supramolecolari.....	8
1.1.2	Preorganizzazione, Self Assembly e Complementarità.....	14
1.1.3	Chimica “Host-Guest”.....	15
1.1.4	Effetti chelato, macrociclo e criptato.....	18
1.1.5	Teoria “Hard-Soft”.....	21
1.2	Cenni sulla Fluorescenza.....	25
1.2.1	Spettroscopia in Fluorescenza.....	30
1.2.2	Quenching della Fluorescenza.....	31
1.2.3	Fenomeni chimico-fisici / elettronici.....	32
1.3	Design recettori sintetici (Coordinazione poliedri metallorganici).....	36
1.4	Effetti solvente su assorbimento/emissionale spettrale.....	42
1.5	Chemosensing.....	45
1.6	Metalli pesanti (inquinamento ambientale e impatto sulla salute umana).....	48
1.6.1	Bioaccumulo.....	58
1.7	Scopo della tesi.....	60
2	Risultati e discussione.....	64
2.1	Sintesi.....	64
2.1.1	Sintesi 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3).....	64
2.1.2	Sintesi 2-(2-metossimetilossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (4).....	66
2.1.3	Sintesi 4-bromometil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo (5).....	67
2.1.4	Sintesi 2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)metilbenzossazolo (6).....	68
2.1.5	Sintesi 4-bromometil-2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)benzossazolo (7).....	70
2.1.6	Sintesi 2,8-ditia-5-aza-[9](2,6) piridinofano (8).....	72
2.2	Sintesi dei leganti (L1 , L2 , L3 ed L4) contenenti 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo.....	73

2.3 Proprietà spettroscopica e risposta fotochimica di 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo ai cationi metallici.....	78
2.4 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di 5-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza-[9](2,6)piridinofano (L ₁) ai cationi.....	84
2.5 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (L ₂) ai cationi.....	97
2.6 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletildiammina (L ₃) ai cationi.....	105
2.7 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N'-dietildiammina (L ₄) ai cationi metallici.....	116
2.8 Conclusioni.....	123
3 Parte sperimentale.....	125
3.1 Reagenti / Solventi da Laboratorio.....	126
3.2 Sintesi Unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3).....	127
3.3 Sintesi 2-(2-metossimetilossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (4).....	128
3.4 Sintesi 4-bromometil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo (5).....	129
3.5 Sintesi 2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)metilbenzossazolo (6).....	130
3.6 Sintesi 4-bromometil-2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)benzossazolo (7).....	131
3.7 Sintesi ,8-ditia-5-aza-[9](2,6) piridinofano.....	132
3.8 Sintesi 5-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza-[9](2,6)piridinofano (L ₁).....	133
3.9 Sintesi N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (L ₂).....	135
3.10 Sintesi N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletildiammina (L ₃).....	136

3.11 Sintesi N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)- N,N'-dietilendiammina (L4)	137
3.12 Spettroscopie.....	138
3.12.1 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR).....	138
3.12.2 Spettroscopia elettronica ultravioletto-visibile (UV-VIS).....	138
3.12.3 Titolazioni spettrofotometriche.....	138
 Riferimenti bibliografici.....	 140

1. INTRODUZIONE

La Chimica Supramolecolare definita come la chimica del legame intermolecolare, prende in esame le strutture e le funzioni di nuove entità chimiche che si formano in seguito all'associazione tra due o più specie chimiche diverse, tenute insieme da forze di interazioni non covalenti (**J.-M.-Lehn**, premio Nobel 1987). E' la chimica che va "oltre la molecola" e il suo concetto stretto. All'interno dell'aggregato supramolecolare che si viene a formare, le informazioni vengono conservate sotto forma di aspetti strutturali specifici (**F.Voegtler**, Università di Bonn).

1.1 CHIMICA SUPRAMOLECOLARE

La Chimica Supramolecolare¹, come detto, è una branca della chimica che studia specie di notevole complessità dove le componenti sono assemblate, tenute insieme, organizzate da interazioni intermolecolari. Gli obiettivi della chimica supramolecolare sono le supramolecole ed altre entità polimolecolari che risultano dall'associazione spontanea di un gran numero di componenti in una fase specifica (membrane, vescicole, micelle, strutture allo stato solido ecc.) (**definizione IUPAC Gold Book 24-2-2014**). All'interno di questa macroarea della chimica, vengono svolte ricerche e studi multidisciplinari, nella quale chimici, fisici e biologici convergono le loro conoscenze nel fornire il loro contributo alla realizzazione dei sistemi complessi² con lo scopo di contribuire significativamente al benessere dell'uomo nel migliorare le sue condizioni di vita, salute e ambiente circostante (FIGURA N.1).

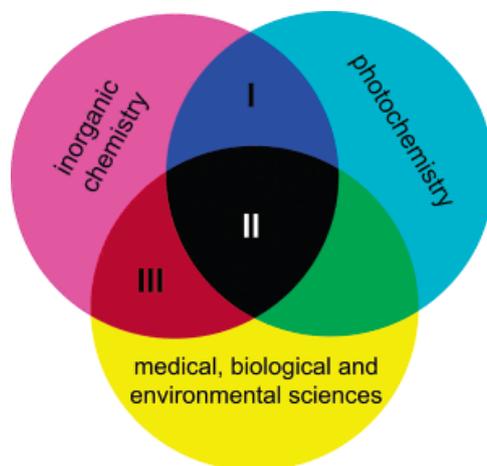


FIGURA 1 – MACROAREE DELLA CHIMICA SUPRAMOLECOLARE

La natura ha insegnato che è possibile assemblare precursori molecolari molto piccoli per la realizzazione di sistemi molto più complessi come ad esempio molte biomolecole³ aventi funzioni e azioni diverse dai precursori costituenti. Questi aggregati supramolecolari⁴ sono molto importanti per i vari processi biologici ed entità come il ripiegamento delle proteine, le membrane fosfolipidiche, l'assemblaggio di acidi nucleici e di strutture terziarie, i ribosomi ed i microtubuli.

La chimica supramolecolare è cresciuta nell'ambito della ricerca nelle ultime decadi dalla scoperta e sviluppo degli eteri corona, dei criptandi e degli sferandi da parte di Pedersen⁵, Lehn⁶ e Cram⁷ iniziata agli inizi degli anni '60. Questi risultati sono stati riconosciuti in seguito dalla comunità scientifica mediante il conferimento del premio Nobel per la chimica nel 1987.

Alla base di questo vi è lo studio delle interazioni di tipo "host-guest"⁸ tra due o più molecole complementari che avvengono sulla base del riconoscimento molecolare (input

dalla natura) per formare poi un assemblaggio supramolecolare “programmato” dove partecipano interazioni di tipo non covalente.

Gli aggregati supramolecolari che vengono a costituirsi, esibiscono delle caratteristiche distinte rispetto ai singoli componenti di partenza in termini di proprietà chimiche, ottiche, magnetiche, cataliche, biologiche, ecc..

Le sub-unità costituenti l’aggregato supramolecolare, possiedono caratteristiche chimico-fisiche e strutturali, differenti dal sistema macromolecolare finito, in quanto la loro unione determina la realizzazione di un sistema aventi proprietà diverse dai suoi costituenti iniziali.

Uno dei casi più semplici di formazione di un aggregato supramolecolare prevede la presenza di un’unità recettiva semplice o complessa, neutra o carica, “host” che attraverso interazioni di tipo non covalente assembla, riconosce, segnala una unità ospite “guest” anch’essa semplice o complessa, neutra o carica.

In questa linea si inseriscono i chemosensori che sono sistemi molecolari che presentano la caratteristica di poter modificare le proprie proprietà chimico-fisiche quali ad esempio le proprietà ottiche di emissione o di assorbimento di luce in seguito ad interazioni con la specie “guest”; tale variazione consente di essere messa in relazione sia con la presenza sia con la quantità del guest presente nel sistema. Parlando di chemosensori ottici, un classico approccio per il loro ottenimento prevede la connessione covalente di una unità fotosensibile fluoro- e/o cromofora ad un recettore mediante un legame covalente secondo una struttura del tipo unità fotosensibile-spaziatore-recettore. A seguito di interazione con l’analita, il chemosensore mostra un cambiamento delle caratteristiche chimico-fisiche (intensità d’emissione e/o di assorbimento, lunghezza d’onda e tempo di vita) in funzione di diversi meccanismi

(trasferimento elettronico, trasferimento protonico e trasferimento energetico) così da ottenere un cambiamento in assorbanza e fluorescenza a seguito dell'interazione con il guest.

1.1.1 INTERAZIONI SUPRAMOLECOLARI

Un aspetto interessante dei sistemi “supramolecolari” consiste nell'individuazione di interazioni “non covalenti” che costituiscono la base della chimica supramolecolare.

Tra le interazioni “non covalenti” si possono citare:

- Interazione Ione-Ione

Il legame ionico è di energia confrontabile con quella del legame covalente ($E_{\text{legame}} = 100-500 \text{ KJ mol}^{-1}$) ed interessa principalmente ioni metallici combinati con leganti anionici (funzionalità ossidriliche, carbossiliche) (FIGURE N.2 e N.3);

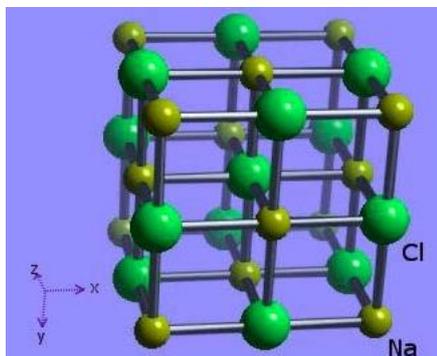


FIGURA N.2 – STRUTTURA CRISTALLINA NaCl

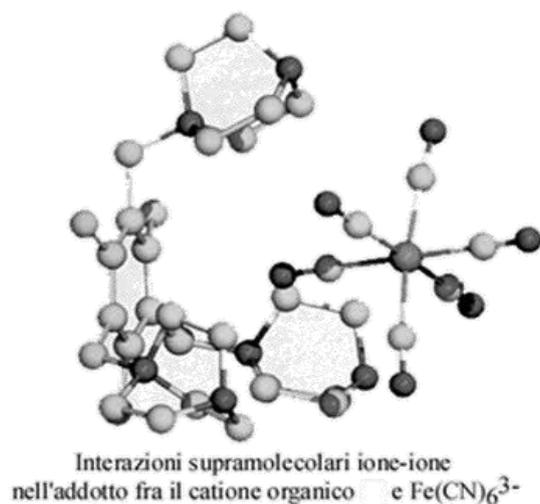


FIGURA N.3 – INTERAZIONE CATIONE ORGANICO CON $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

- Interazioni Ione-Dipolo (50-200 KJ/mol)

Tali interazioni interessano un catione Na^+ che interagisce con una molecola polare come l' H_2O , dove i doppietti solitari dell'ossigeno vengono "attratti" dalla carica positiva dello ione metallico. Le interazioni tra catione metallico e leganti di tipo "hard" (interazioni hard-hard) sono essenzialmente di tipo elettrostatico (FIGURA N.4).

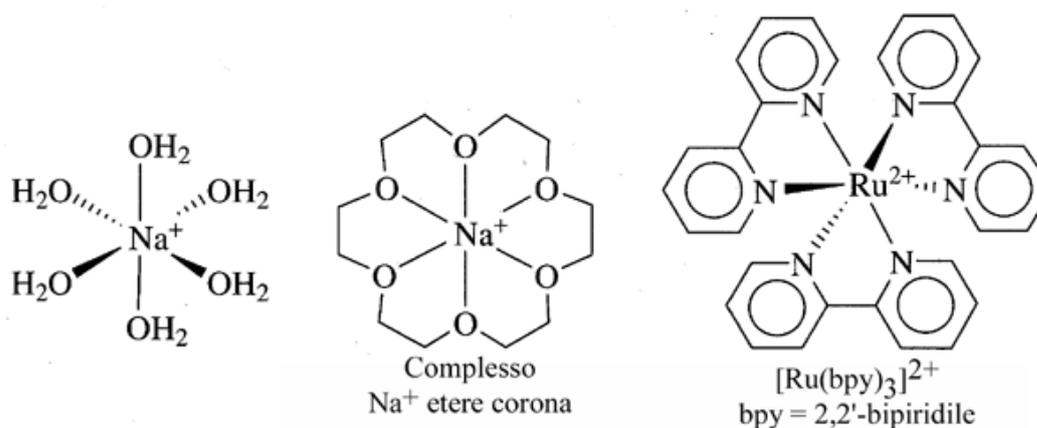
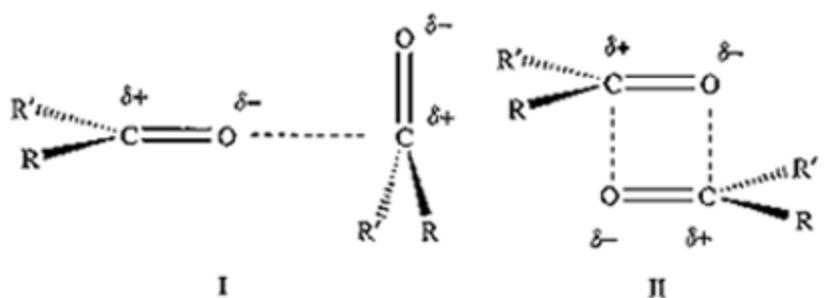


FIGURA N.4 – ESEMPI DI INTERAZIONE IONE – DIPOLO

- Interazioni Dipolo-Dipolo (5/50 KJ/mol)

Esistono interazioni tra un doppietto di un atomo donatore e un atomo accettore dove esistono interazioni tra coppie di poli allineate in maniera opposta o posizionate in maniera adiacente (FIGURA N.5).



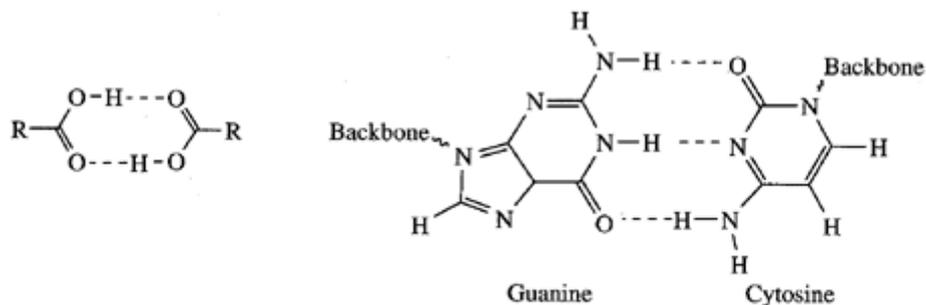
Interazioni dipolo-dipolo dei composti carbonilici

FIGURA N.5 – INTERAZIONI DIPOLO - DIPOLO

- Legame a idrogeno (4/120 KJ/mol)

Il legame a idrogeno, può essere considerato una particolare interazione dipolo-dipolo, nella quale l'atomo di idrogeno è attaccato ad un atomo elettronegativo (o ad un gruppo elettrone-attrattore). Il legame a H presenta una natura direzionale e presenta interazioni con atomi quali N ed O. Un esempio interessante, è la formazione di interazioni tra un dimero degli acidi carbossilici, con conseguente spostamento della frequenza di stretching ν (OH) da circa 3400 cm^{-1} a circa 2500 cm^{-1} con conseguente allargamento della banda. I legami a H, sono molto presenti in chimica supramolecolare, sono responsabili della struttura delle proteine, del riconoscimento di substrati da parte di enzimi ed anche della struttura a doppia elica del DNA. I legami a H svolgono un ruolo

fondamentale nella stabilizzazione di alcune strutture in particolare quando agiscono in maniera cooperativa (FIGURA N.6).



Legami d'idrogeno nei dimeri degli acidi carbossilici e nell'appaiamento delle basi del DNA

FIGURA N.6 – ESEMPIO INTERAZIONI A H

- Interazioni di Van derWalls (<5 KJ/mol)

Esistono interazioni deboli dovute a forze debolmente attrattive tra atomi vicini, dove una nube elettronica di un atomo subisce l'attrazione da parte di un nucleo di un altro atomo, arrivando alla distanza per la quale vengano minimizzate le forze di repulsione da parte della nube elettronica dell'atomo vicinale. Le forze di vanderWalls sono importanti nella formazione di composti d'inclusione, dove piccole molecole organiche vengono incorporate in reticoli cristallini o cavità molecolari.

- Interazioni catione-II (5-80 KJ/ mol)

Interazioni tra cationi alcalini ed alcalini terrosi con sistemi olefinici sono importanti specialmente in ambito biologico anche se presentano un minor carattere covalente e sono molto deboli (FIGURA N.7).

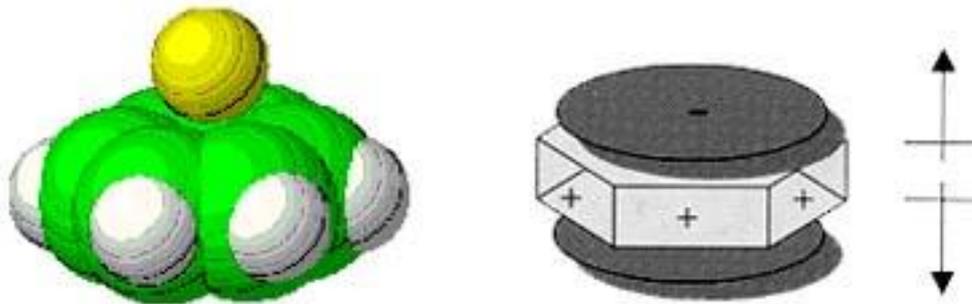
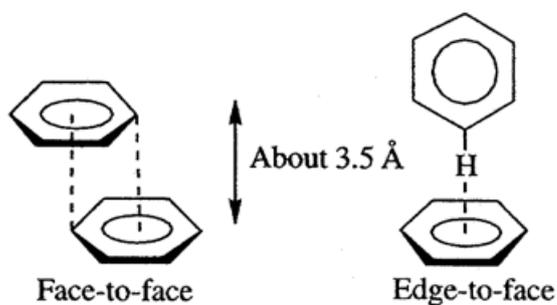


FIGURA N.7 – INTERAZIONE CATIONE - π

- Interazioni π - π (0-50KJ/mol)

Sono deboli interazioni elettrostatiche tra due o più anelli aromatici, in particolare nelle condizioni in cui uno si presenti elettrone-ricco ed un altro elettrone-povero. Pertanto esistono principalmente due tipi d'interazione π - π : "face-to-face" o "edge-to-edge" (FIGURA N.8). Un esempio sono le interazioni di stacking "face-to-face" che avvengono nella grafite, la quale la rendono scivolosa al tatto e lubrificante. Un altro esempio è dovuto alle interazioni tra le coppie di nucleotidi adiacenti che contribuiscono alla stabilizzazione della doppia elica del DNA.



Diversi modi di π - π stacking.

FIGURA N.8 – INTERAZIONI π - π

- Effetti Idrofobici

Gli effetti idrofobici⁸ si realizzano in presenza di esclusione di molecole apolari o debolmente solvate da parte dell'H₂O. Un esempio è costituito dalle ciclodestrine, formate a loro volta da monomeri di glucosio disposti ad anello, dove esistono delle interazioni idrofile nella parte esterna delle loro strutture, mentre nella parte interna sono presenti interazioni idrofobiche, tali da poter determinare un'inclusione di molecole idrofobiche ospiti (quali aromatici, acidi grassi, esteri...). Tali interazioni possono essere modificate nelle loro funzionalità negli atomi d'idrogeno e nelle funzionalità ossidriliche per aumentare per esempio la loro idrosolubilità (FIGURA N.9) e favorire le applicazioni in campo farmaceutico come vettore di un principio attivo, applicazioni in ambito alimentare, ambientale o igienico-sanitario.

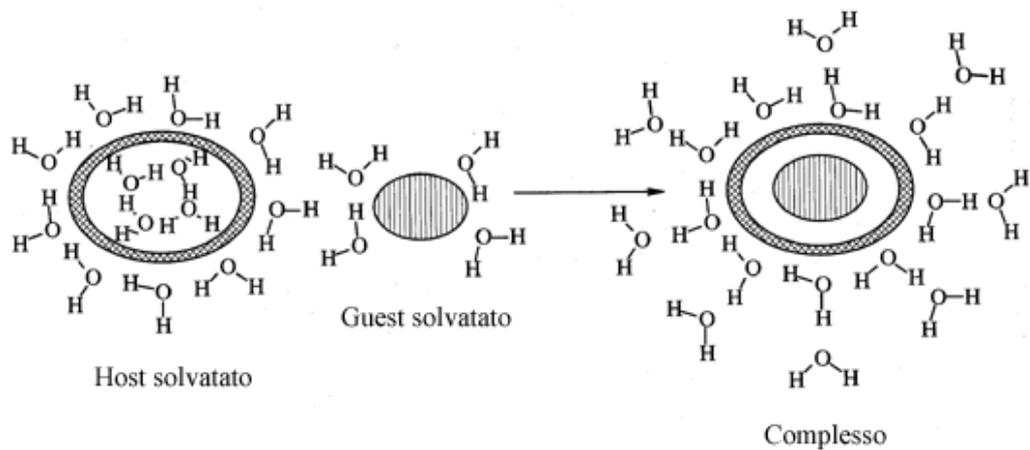


FIGURA N.9 – INTERAZIONI IDROFOBICHE

1.1.2 PRE-ORGANIZZAZIONE, SELF-ASSEMBLY E COMPLEMENTARIETA'

L'auto-assemblaggio o "self-assembly"⁹ è considerato uno degli aspetti più importanti della chimica supramolecolare in quanto l'unione di più componenti diversi tra di loro, genera un sistema superiore con proprietà diverse dai suoi costituenti iniziali e quindi anche applicazioni e funzioni diverse.

La natura mostra come nei sistemi viventi, in particolar modo da un punto di vista microscopico, esistano degli esempi affascinanti come il riconoscimento tra due filamenti complementari di DNA, la costruzione delle membrane cellulari, dei ribosomi. Una peculiarità di estrema importanza che interessa il "self-assembly", consiste nella realizzazione di un processo dinamico e reversibile: questo garantisce sia un equilibrio dinamico tra le supramolecole e i suoi costituenti, ma anche la possibilità, tramite opportuni interventi, in funzione delle applicazioni richieste al sistema supramolecolare, di modificare e quindi migliorare le performance a livello applicativo e/o industriale.

Questo rende percorribile un percorso nel quale quotidianamente, ricercatori, tecnici ed ingegneri, siano in grado di realizzare e sviluppare dispositivi come chemosensori in grado di soddisfare le richieste di mercato non solo in termini prestazionali, ma anche in termini design e di durata, al fine di soddisfare i bisogni di una società in continua evoluzione in termini di sviluppo tecnologico ed industriale.

Qui di seguito vengono illustrati degli esempi di sistemi macromolecolari di impiego quotidiano (FIGURA N.10).

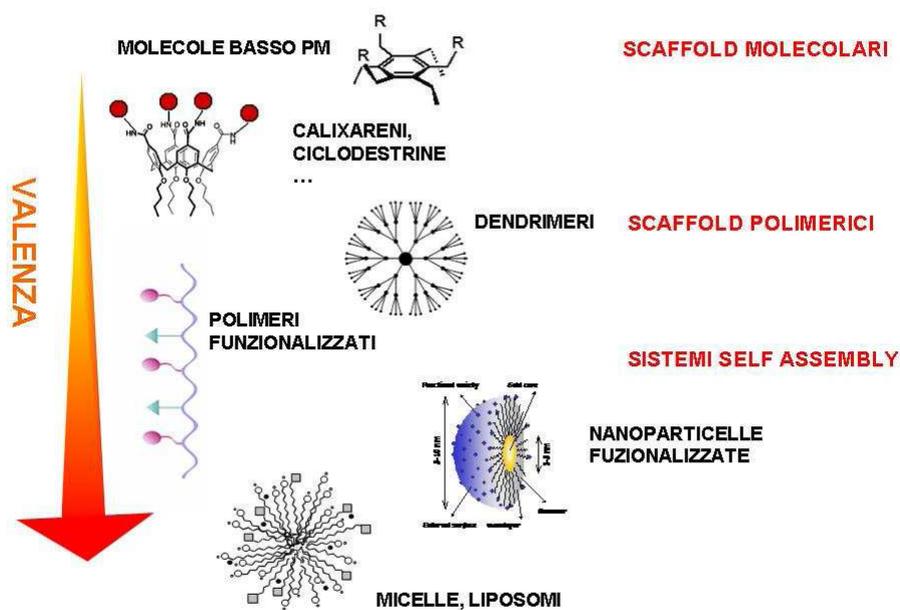


FIGURA 10 - ESEMPI DI AGGREGATI SUPRAMOLECOLARI

1.1.3 CHIMICA “HOST-GUEST”

I sistemi di tipo “host-guest” prevedono interazioni di tipo non covalente (forze di Van derWalls, interazioni idrofobiche, forze di London, interazioni elettrostatiche, interazioni legame a idrogeno...), come già esplicitato in precedenza, che si instaurano tra la molecola ospitante “host” e la molecola o ione ospite “guest”; spesso la formazione dell’addotto provoca una modifica delle proprietà chimico-fisiche del sistema che può essere rilevata ed in seguito misurata. Un esempio può essere la variazione di proprietà ottiche di assorbimento e di fluorescenza che può essere trasmessa mediante un linker o uno spaziatore “spacer” ad un’unità fotoattiva o

segnalatrice, responsabile della risposta ottica del complesso o del sistema che si realizza.

Di seguito vengono presentate due tra le possibili interazioni di tipo “host-guest” nelle quali il guest può interagire direttamente con il recettore e trasferimento dell’informazione all’unità fluorofora mediante accensione del sistema (FIGURA N.11-TIPO A) oppure seguito dell’interazione del guest con l’unità recettiva, si ha distacco del recettore e conseguente accensione dell’unità fluorofora (FIGURA N.12-TIPO B).

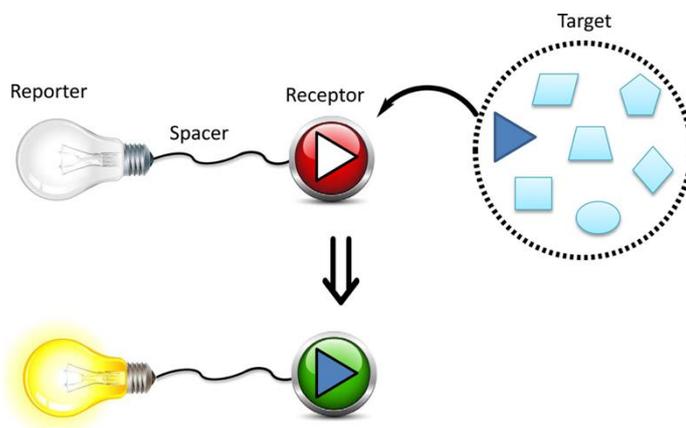


FIGURA 11 -INTERAZIONE “HOST-GUEST” TIPO A

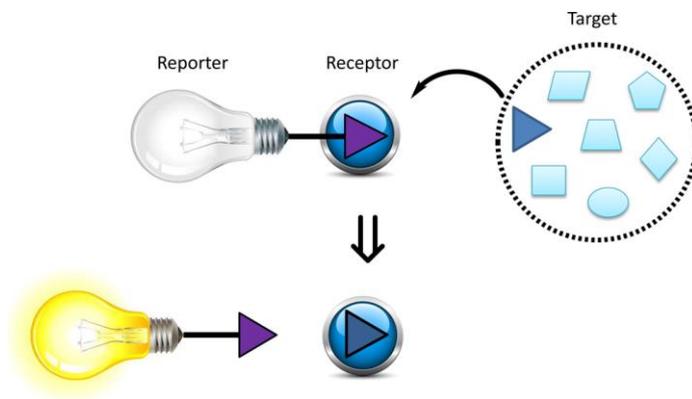


FIGURA 12 – INTERAZIONE “HOST-GUEST” TIPO B

Una caratteristica che precede ed è co-responsabile dell'interazione con il substrato da parte dell'unità recettiva, è la presenza di siti di legame convergenti quali atomi elettron-donatori (basi di Lewis), donatori e accettori di legame a idrogeno, ecc.; mentre il guest risulta caratterizzato da siti di legame divergenti (accettore di elettroni in quanto acido di Lewis se presente come catione metallico, o nel caso di un anione alogeno o alogenuro, accettore di legami a idrogeno).

Le interazioni che si realizzano pur nella loro semplicità, risultano dare un contributo di stabilità al sistema supramolecolare o complesso, in virtù della loro additività.

Tali interazioni se sommate tra di loro determinano un effetto stabilizzante del complesso risultabile da un aumento dell'energia di legame e quindi un complesso più stabile.

I complessi che si vengono a generare in chimica supramolecolare, possono essere stabilizzati mediante fattori entalpici ed entropici, dove nel primo caso effetti coordinanti generano una maggiore stabilizzazione del complesso in funzione della coordinazione dello ione ospitante nei confronti della molecola recettiva. Inoltre un aumento delle interazioni tra "host" e "guest", generano una stabilizzazione termodinamica del complesso tra i siti di legame della specie "host" e della specie "guest".

1.1.4 EFFETTO CHELATO, MACROCICLO E CRIPTATO

Effetti di tipo chelante o macrociclico riscontrabili in chimica di coordinazione e maggiormente in complessi di tipo metallico, per esempio possono essere costituiti da leganti bidentati (come 1,2-diamminoetano) che vanno a coordinare il catione Ni^{2+} più stabili dei leganti monodentati (come NH_3). Nella moderna chimica 'host-guest' è utile suddividere i composti host in due classi principali a seconda della relazione topologica relativa tra guest e host.

I cavitandi possono essere descritti come specie host che possiedono cavità intramolecolari. Ciò significa che la cavità disponibile è una proprietà molecolare intrinseca dell'host, ed esiste sia in soluzione che allo stato solido.

Diversamente i clatranti sono specie host con cavità extramolecolari (la cavità è essenzialmente uno spazio tra due o più molecole host) ed esiste solo allo stato solido cristallino.

Il complesso host-guest formato da un cavitando è detto cavitato mentre i clatranti formano clatrati. L'aumento dell'organizzazione del "host" e quindi la stabilizzazione del complesso che si realizza viene ad incrementare passando da effetti di tipo chelato, a chelato insieme ad effetto macrociclo fino ad effetto chelato e macrociclo insieme (FIGURA N.13).

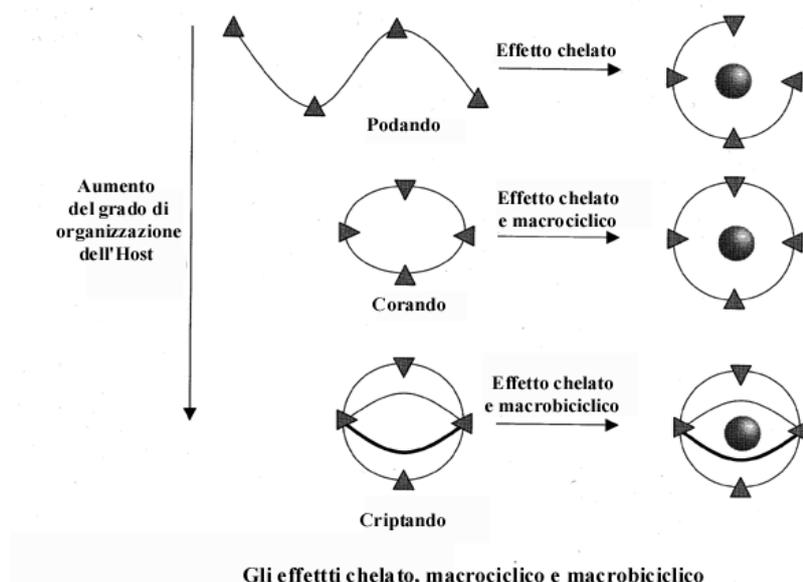


FIGURA 13 - EFFETTI STABILIZZAZIONE COMPLESSO "HOST-GUEST"

Nella reazione di sostituzione dell'ammoniaca con l'1,2-diamminoetano, il valore della costante di equilibrio ($\log K = 8.76$) risulta 10^8 volte più stabile rispetto a quello del legante non chelato.

L'aspetto cinetico evidenzia come a seguito di chelazione o coordinazione di uno ione metallico, possano esserci un maggior numero di molecole in libertà, quindi si genera un contributo entropico favorevole ($\Delta S^\circ > 0$) all'energia libera (ΔG°) della reazione data la formula: $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$.

Una caratteristica importante dei modelli supramolecolari, risiede nella capacità di pre-organizzarsi, ossia la molecola ospitante può essere in grado di adattarsi mediante libera rotazione nello spazio o interazione elettroniche al fine di accogliere al meglio, lo ione o molecola neutra ospite, andando così a "modellarsi", per raggiungere la migliore stabilità in termini energetici del complesso che si viene a costituire.

Questo aspetto è suggestivo, in quanto può essere un fattore discriminante per il riconoscimento ad esempio di specie ioniche, dove intervengono sia fattori strutturali e

di dimensioni del “guest”, sia la possibilità di generare interazioni più o meno convergenti tra “host” e “guest”.

Oltre all’aspetto della pre-organizzazione risulta importante anche la complementarietà che sussiste tra la molecola “host” aventi determinate proprietà steriche (dimensioni e struttura adeguate per ricevere il “guest”) e siti di legame aventi proprietà elettroniche favorevoli (polarità molecola, capacità di interazioni intermolecolari a H^+ , caratteristiche “hard” o “soft” dell’unità recettiva) così da poter realizzare un’interazione stabile, efficace e reversibile di tipo “host-guest”.

Un parametro che esplicita al meglio la misura con la quale un complesso risulta stabile e valorizza pertanto la complementarietà di tipo “host-guest”, è il valore della costante di formazione del complesso (K) o esplicitata anche dal suo logaritmo ($\log K$).

Si possono suddividere diverse strutture di tipo “Host-Guest” sulla base della topologia molecolare tra i due protagonisti del sistema o addotto generato:

- Cavitandi: host con cavità intramolecolari;
- Clatranti: host con cavità extramolecolari.

Mentre il cavitando esiste sia in soluzione che allo stato solido, mentre il clatrando esiste allo stato solido cristallino (FIGURA N.14).

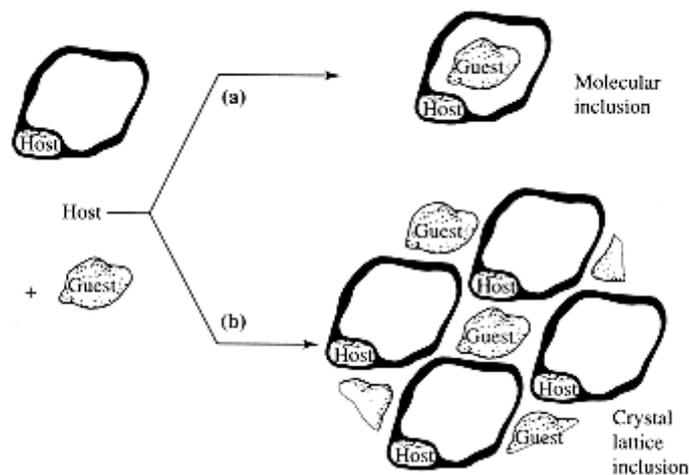


FIGURA N.14 – DIFFERENZA SCHEMATICA TRA UN CAVITANDO (a) ED UN CLATRATO (b).

E' possibile classificare in termini di forze che intervengono nella formazione del complesso "host-guest", se di tipo elettrostatico (ione-dipolo, dipolo-dipolo, legame a idrogeno) si parla di complesso, mentre nel caso di forze di minor entità, interazioni non direzionali, di carattere idrofobico, di Van derWalls, effetti di impaccamento cristallino, si usano i termini cavitato e clatrato.

1.1.5 TEORIA "HARD-SOFT"

Nel 1963 Pearson provò a unificare i concetti di reazione chimica, selettività e stabilità dei composti cercando di razionalizzarli prontamente. Le specie chimiche, possono essere costituiti da atomi, ioni, radicali liberi e possono essere classificate secondo "Hard" e "Soft"¹⁰⁻¹¹ acidi e basi di Lewis.

Le specie "Hard" sono più in generale costituite da raggi atomici piccoli, hanno elevata carica nucleare e bassa polarizzabilità; mentre le specie "Soft" possiedono caratteristiche opposte. Dalla teoria classica si conosce come la reazione tra un acido

forte e una base forte porti alla formazione di un complesso stabile mentre la reazione tra un acido e una base deboli, porti alla realizzazione un complesso più debole. A fronte di questi concetti, è bene considerare come la forza di un acido e di una base secondo Lewis, sia maggiore all'aumentare della carica ed al diminuire del raggio di cationi ed anioni. I fattori che governano le proprietà “**Hard-Soft**” di un composto dipendono dalle sue dimensioni, dalla sua carica o stato d'ossidazione, dalla struttura elettronica e dalla presenza di gruppi legati. Infatti la presenza di un atomo centrale poco elettronegativo, rende una base più soft, come esplicitato dalla serie seguente: **R₃Sb > R₃As > R₃P > R₃N>CH₃⁻> NH₂⁻> OH⁻> F⁻> I⁻> Cl⁻ > S²⁻> SO₃²⁻**Questo concetto può essere confrontato con l'elettronegatività di questi atomi donatori. Le basi organiche con atomi con atomi legati al carbonio vengono considerate soft. Di seguito vengono illustrate di acidi hard / soft in TABELLA N.1 e di basi hard / soft in TABELLA N.2

Classification of Lewis Acids

Class (a)/Hard	Class (b)/Soft
H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Tl ⁺ , Hg ⁺ , Cs ⁺
Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Sn ²⁺	Pd ²⁺ , Cd ²⁺ , Pt ²⁺ , Hg ²⁺
Al ³⁺ , Se ³⁺ , Ga ³⁺ , In ³⁺ , La ³⁺	CH ₃ Hg ⁺
Cr ³⁺ , Co ³⁺ , Fe ³⁺ , As ³⁺ , Ir ³⁺	Tl ³⁺ , Tl(CH ₃) ₃ , RH ₃
Si ⁴⁺ , Ti ⁴⁺ , Zr ⁴⁺ , Th ⁴⁺ , Pu ⁴⁺ , VO ²⁺	RS ⁺ , RSe ⁺ , RTe ⁺
UO ₂ ²⁺ , (CH ₃) ₂ Sn ²⁺	I ⁺ , Br ⁺ , HO ⁺ , RO ⁺
BeMe ₂ , BF ₃ , BCl ₃ , B(OR) ₃	I ₂ , Br ₂ , INC, etc.
Al(CH ₃) ₃ , Ga(CH ₃) ₃ , In(CH ₃) ₃	Trinitrobenzene, etc.
RPO ₂ ⁺ , ROPO ₂ ⁺	Chloranil, quinones, etc.
RSO ₂ ⁺ , ROSO ₂ ⁺ , SO ₃	Tetracyanoethylene, etc.
I ⁷⁺ , I ⁵⁺ , Cl ⁷⁺	O, Cl, Br, I, R ₃ C
R ₃ C ⁺ , RCO ⁺ , CO ₂ , NC ⁺	M ⁰ (metal atoms)
	Bulk metals
<i>HX (hydrogen-bonding molecules)</i>	
<i>Borderline</i>	
Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺	
B(CH ₃) ₃ , SO ₂ , NO ⁺	

TABELLA N.1 – LISTA DI ACIDI HARD E SOFT

Classification of Bases

Hard	Soft
H ₂ O, OH ⁻ , F ⁻	R ₂ S, RSH, RS ⁻
CH ₃ CO ₂ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻	I ⁻ , SCN ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻
Cl ⁻ , CO ₃ ²⁻ , ClO ₄ ⁻ , NO ₃ ⁻	R ₃ P, R ₃ As, (RO) ₃ P
ROH, RO ⁻ , R ₂ O	CN ⁻ , RNC, CO
NH ₃ , RNH ₂ , N ₂ H ₄	C ₂ H ₄ , C ₆ H ₆
	H ⁻ , R ⁻
<i>Borderline</i>	
C ₆ H ₅ NH ₂ , C ₅ H ₅ N, N ₃ ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₃ ²⁻ , N ₂	

TABELLA N.2 – LISTA DI BASI HARD E SOFT

Il concetto di “hard” e “soft” introdotto da Pearson¹²⁻¹³ permette di classificare gli acidi (in questo contesto ioni metallici) e le basi secondo le caratteristiche elettroniche degli atomi donatori e accettori.

Sono identificati empiricamente dall'ordine opposto della forza del legame di formazione di complessi con le basi alogenuro (come misura della costante di formazione K_f del complesso acido-base).

Classe a: $I^- < Br^- < Cl^- < F^-$ (hard)

Classe b: $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$ (soft)

Ioni metallici di tipo **a** (acidi) sono piccoli, non sono facilmente polarizzabili ed essi preferiscono leganti (basi) che sono piccoli e poco polarizzabili. Essi sono stati chiamati acidi e basi “**hard**” (duro).

Ioni metallici di tipo **b** (acidi) sono grandi, facilmente polarizzabili ed essi preferiscono leganti (basi) che sono grandi e facilmente polarizzabili. Essi sono stati chiamati acidi e basi “**soft**” (molle).

I cationi hard formano complessi in cui il carattere ionico è dominante e dove il contributo maggiore all'energia libera è dato dal termine entropico positivo; mentre i cationi di tipo soft formano complessi in cui è dominante il legame covalente e dove il termine più significativo è quello entalpico.

Gli ioni metallici di **tipoa** sono principalmente:

- ioni dei metalli alcalini e alcalino-terrosi;
- ioni metallici leggeri e con elevata carica: Ti^{4+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Al^{3+} ;

Ioni metallici di **tipo b** sono principalmente:

- ioni pesanti di metalli di transizione: Hg_2^{2+} , Hg^{2+} , Pt^{2+} , Pt^{4+} , Ag^+ , Cu^+ ;
- ioni di metalli in bassi stati di ossidazione, ad es. nei metallo carbonili

Alcuni ioni (Fe^{2+} ; Co^{2+} ; Ni^{2+} ; Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; Pb^{2+}) formano complessi le cui stabilità non possono essere pronosticate sulla base della classificazione hard/soft: essi formano la classe border-line.

La costante di stabilità dei complessi di questi ioni con un dato legante segue l'ordine, notocome **serie di Irving-Williams**:



1.2 CENNI SULLA FLUORESCENZA

La fluorescenza assieme alla fosforescenza sono due tipi diversi di emissione radioattiva che costituiscono la luminescenza. Più in generale la luminescenza consiste nell'emissione di fotoni a seguito di rilassamento da uno stato elettronico eccitato ad uno con energia inferiore in una sostanza, la quale viene definita **fluoroforo**. Tipicamente si tratta di fotoni con lunghezza d'onda nell'intervallo dell'UV-VIS e vicino IR (200 – 2000 nm), perché è proprio in questo intervallo che riguarda la differenza di energia tra gli stati elettronici LUMO ed HOMO nelle molecole (FIGURA N.16).

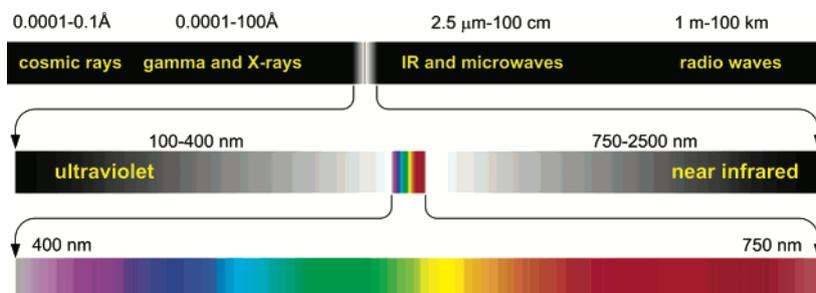


FIGURA N.16 – CAMPO SPETTRALE UV-VIS-IR

Pertanto come già accennato in precedenza esistono due tipi di luminescenza: la **fluorescenza** e la **fosforescenza**. La differenza tra i due fenomeni risiede nel meccanismo quantomeccanico che porta all'emissione di fotoni. Nella fluorescenza il rilassamento avviene da uno stato elettronico eccitato di singoletto sino ad uno stato elettronico iniziale e si tratta di un processo molto veloce, dell'ordine di 10 ns a seguito dell'eccitazione. Nella fosforescenza il rilassamento avviene da uno stato elettronico eccitato di tripletto sino allo stato di singoletto iniziale e si tratta di un processo che avviene in tempi dell'ordine di 1 ms – 1 s a seguito dell'eccitazione. Pertanto, dal punto di vista fenomenologico, la differenza principale risiede nel tempo che intercorre tra l'eccitazione e la diseccitazione della molecola con emissione di fotoni.

La tecnica impiegata per quantificare l'emissione in fluorescenza è la spettroscopia in fluorescenza. Inizialmente una radiazione luminosa ad opportuna lunghezza d'onda¹⁴(λ eccitamento) colpisce il campione generando un assorbimento di fotoni da parte di elettroni i quali passano da uno livello energetico iniziale S_0 , ad uno stato eccitato S_1 . In una fase successiva si ha rilassamento elettronico nella quale gli elettroni passano da uno stato di energia maggiore ad uno stato di energia minore, rilasciando energia che può essere emessa sotto forma di radiazione elettromagnetica di tipo radioattivo. Lo strumento che misura l'assorbimento o emissione di energia da parte del campione è uno spettrofotometro UV-visibile (FIGURA N.17).

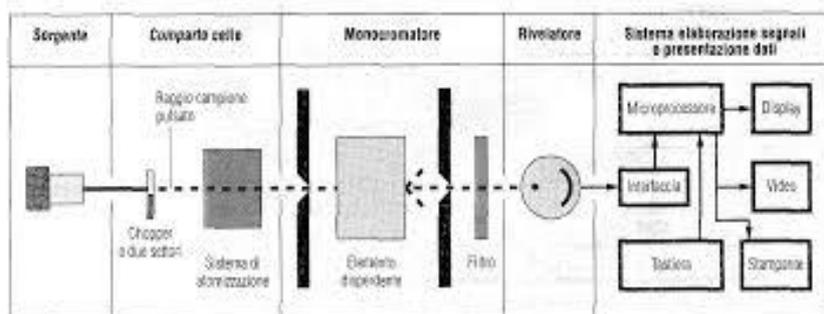


FIGURA N.17 – SCHEMA TIPICO SPETTROFOTOMETRO UV-VIS

L'emissione di radiazione da un livello eccitato S_1 ad uno stato iniziale S_0 , prende il nome di fluorescenza dove la lunghezza d'onda ed intensità della radiazione emessa, dipendono da una serie di leggi chimico-fisiche e di livelli energetici consentiti.

Infatti non tutte le transizioni elettroniche tra stati di energia diversa sono possibili. Esistono infatti delle regole di selezione dove solo alcune di esse risultano permesse.

La regola generale che vale sempre è che sono permesse le transizioni per cui la differenza dei numeri quantici di spin totale dei due stati è zero ($\Delta S = 0$).

Nella maggior parte delle molecole l'assorbimento di un quanto di luce porta alla transizione da uno stato di singoletto non eccitato ad uno stato di singoletto eccitato in un tempo dell'ordine di 10^{-15} s.

Lo stato di singoletto iniziale è uno stato elettronico caratterizzato dal numero quantico di spin $S = 0$. Al numero quantico di spin totale contribuiscono solo gli elettroni di valenza, cioè quelli dello strato più esterno. I valori del numero quantico di spin di un elettrone (S) possono assumere solo due valori: $\pm \frac{1}{2}$.

Un elettrone promosso ad uno stato eccitato, può avere lo spin parallelo o antiparallelo a quello dell'elettrone lasciato indietro. Durante la fase di "rilassamento" si può passare ad uno stato di tripletto avente energia un po' più bassa mediante intersystem-crossing (ISC) come mostrato in Figura n.18.

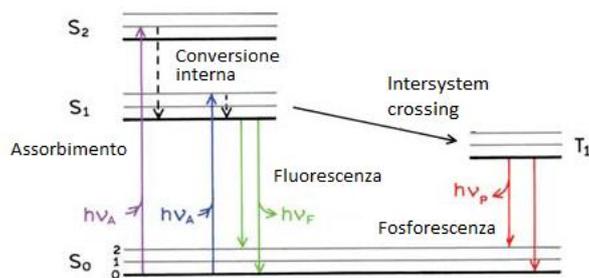


FIGURA N.18 – DIAGRAMMA DI JABLONSKY

Quando il fotone viene assorbito la transizione permessa è quella tra lo stato fondamentale di singoletto, S₀, e lo stato eccitato di singoletto, S₁ ($\Delta S = 0$). Immediatamente dopo il primo salto quantico, avviene una serie estremamente rapida di eventi prima che qualsiasi reazione fotochimica o emissione di radiazione accada. Prima di tutto c'è una "conversione interna": non ha importanza quale livello vibrazionale dello stato di singoletto eccitato è stato raggiunto, vi è sempre un rapido ritorno al più basso livello vibrazionale dello stato di singoletto eccitato, senza emissione di radiazioni. Questo processo avviene in tempi dell'ordine di 10^{-12} s. Vi è inoltre la possibilità di un passaggio allo stato di tripletto (T₁). Questo passaggio, che si chiama conversione di sistema o "intersystem-crossing", è una inversione dello spin dell'elettrone determinata dagli urti con altre molecole o da processi intramolecolari. Così l'energia di radiazione assorbita è ripartita tra il più basso stato eccitato di singoletto e gli stati di tripletto della molecola.

Se la molecola emette un fotone ritornando dallo stato di singoletto eccitato a quello di singoletto fondamentale si ha fluorescenza¹⁵⁻¹⁸. Questo processo avviene nei tempi dell'ordine di 10^{-9} - 10^{-8} s. La transizione da uno stato di tripletto ad uno stato di singoletto è lenta in quanto proibita dalle regole di selezione di spin, quindi è difficilmente osservabile in soluzione perché lo stato eccitato viene disattivato non

fotochimicamente con meccanismi collisionali di Stern-Volmer. Gli stati però non sono mai puri e gli stati di singoletto hanno qualche carattere degli stati di tripletto e viceversa. Questo fatto permette la transizione altrimenti proibita. La luce emessa da questa transizione è la tipica fosforescenza. Poiché la transizione tripletto-singoletto è proibita, il tempo di vita media dello stato di tripletto può essere abbastanza lungo, da 10^{-3} a 10^3 secondi, e quindi la fosforescenza può continuare per un tempo apprezzabile dopo che la radiazione eccitante è stata spenta (FIGURA N.19).

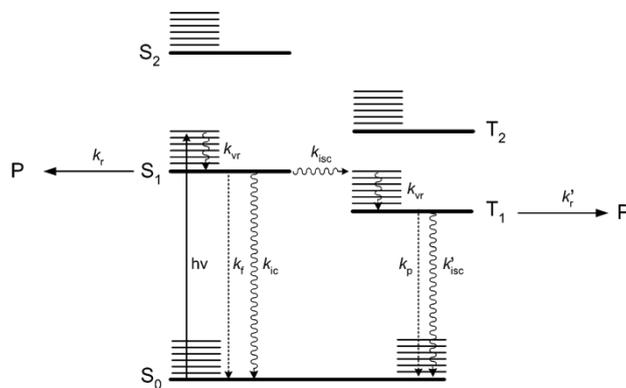


FIGURA N.19 – DECADIMENTO RADIATIVO IN FLUORESCENZA E IN FOSFORESCENZA

Oltre l'emissione di luce (fluorescenza e fosforescenza) altri processi secondari possono accadere come conseguenza all'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche.

È possibile vedere la radiazione emissiva di fluorofori in una camera buia a seguito d'impatto con una radiazione UV come mostrato nelle FIGURE N.20 e N.21.

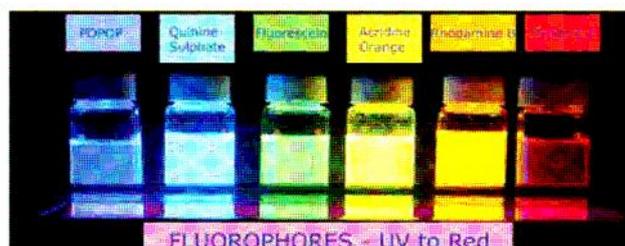


FIGURA N.20 – EMISSIONE DI DIVERSI FLUOROFORI SOTTO RADIAZIONE UV.



FIGURA N.21 – EMISSIONE DI ALCUNI CAMPIONI SOTTO RADIAZIONE UV.

1.2.1 SPETTROSCOPIA IN FLUORESCENZA

La molecola in grado di emettere radiazione a seguito di eccitamento viene definita fluoroforo. La molecola eccitata può urtare altre molecole e trasferire a loro parte o tutta l'energia. Quest'energia in molti casi è degradata a calore in altri casi induce reazioni chimiche per cui la molecola eccitata reagisce con altre molecole o si decompone spontaneamente (predissociazione).

Anche quando viene emessa fluorescenza alcune molecole perdono per collisione l'energia acquistata prima che possano emettere un fotone. Per questa ragione il numero di fotoni emessi è sempre minore del numero di fotoni assorbiti. Il rapporto tra numero di fotoni emessi e numero di fotoni assorbiti è il rendimento quantico del processo di fluorescenza.

$$\Phi = \frac{\text{fotoni emessi}}{\text{fotoni assorbiti}} ; \quad \Phi = \Phi_{st} * \frac{F}{F_{st}} * \frac{A_{st}}{A} * \left(\frac{n}{nst}\right)^2$$

Le caratteristiche di uno spettro in fluorescenza sono:

1) Una sostanza fluorescente in un solvente omogeneo ha un solo spettro di fluorescenza indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione. Questo è dovuto al fatto che un fluoroforo ha soltanto un livello che emette radiazioni.

2) Lo spettro di fluorescenza è sempre a lunghezze d'onda maggiori dello spettro di assorbimento, eccetto per la transizione 0-0 per cui le transizioni hanno la stessa energia.

3) L'interazione con il solvente può impedire questa sovrapposizione degli spettri.

La forma e la posizione dei massimi sono sensibili alle proprietà molecolari del solvente (o in generale del mezzo). Questo è dovuto alla perturbazione di livelli energetici del fluoroforo dovuti ad interazioni dipolo-dipolo o a interazioni tra cariche nel caso vi siano presenti cariche spaziali. Queste interazioni sono maggiori in solventi polari e spostano i picchi di assorbimento e di emissione verso lunghezze d'onda maggiori.

1.2.2 QUENCHING DELLA FLUORESCENZA

L'intensità della fluorescenza (o resa quantica di fluorescenza Φ) può diminuire per diversi fattori. Generalmente avviene per la presenza di una seconda specie definita quencher. Di solito esistono diversi processi tra cui reazioni che avvengono quando il fluoroforo è nello stato eccitato, formazione di complessi tra il fluoroforo e l'analita in soluzione, trasferimento energetico e collisioni. Nel trasferimento di energia si può avere riassorbimento energetico da parte del fluoroforo ma anche riassorbiti da un'altra specie (ad esempio l'analita). Il quenching collisionale avviene quando il fluoroforo passa da uno stato eccitato a quello fondamentale dove a seguito di collisione o urto con il quencher, l'energia in eccesso non venga poi emessa sotto forma di un fotone.

L'ossigeno molecolare, così come le ammine, lo iodio, l'acrilamide, lo Xe, l'H₂O₂ e gli ossidi di azoto risultano essere dei quencher collisionali. I meccanismi di quenching dipendono dalla coppia quencher-fluoroforo. Per esempio le ammine alifatiche o aromatiche sono quencher selettivi per fluorofori aromatici tramite un trasferimento di carica durante la collisione; gli alogeni ed in particolare lo iodio, sono quencher collisionali che promuovono l'intersystem-crossing verso uno stato di tripletto del fluoroforo per accoppiamento di spin-orbita del fluoroforo con l'alogeno. Esistono processi di quenching dinamici dovuti all'urto tra il fluoroforo ed un'altra specie chimica e dipendono dalla velocità diffusionale del quencher verso il fluoroforo; ne esistono di statici dovuti alla formazione di complessi e sono indipendenti dai processi diffusivi.

Il quenching collisionale è descritto dall'equazione di Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [C_q] = 1 + K_D [C_q]$$

dove F_0 ed F sono l'intensità di fluorescenza in assenza e presenza del quencher, k_q è la costante di quenching bimolecolare, τ_0 è il tempo di vita del fluoroforo in assenza del quencher, $[C_q]$ è la concentrazione del quencher e $K_D = k_q \tau_0$ è la costante di quenching di Stern-Volmer. L'intensità della fluorescenza F è proporzionale al numero di fotoni emessi dai fluorofori e risulta proporzionale all'area dello spettro d'emissione.

Secondo l'equazione di Stern-Volmer, il rapporto F_0/F dipende linearmente dalla concentrazione di quencher $[C_q]$ con pendenza pari alla costante di quenching K_D .

1.2.3 FENOMENI CHIMICO-FISICI/ELETTRONICI

La molecola fluoroforasintetizzata 2-(2'-idrossi-3'-naftil)benzossazolo(3), appartiene ad una classe di molecole che generano trasferimento del protone intramolecolare con stato eccitato; caratteristica presente in diversi materiali luminescenti, aventi diverse applicazioni come memorie ottiche e switches, filtri UV, dispositivi laser, scintillatori per il detection della radiazione, OLED a luce bianca e probes fluorescenti¹⁹.

Tale fenomeno di trasferimento protonico, definito ESIPT²⁰⁻²² può avvenire molto velocemente con tautomerizzazione per dare la forma cheto a seguito di foto-eccitazione. Si può avere pertanto trasferimento del H⁺ da un gruppo proton-donatore quale l'ossidrilico naftolico (-OH) ad un gruppo proton-accettore quale l'N del gruppo benzossazolico stabilizzato da anelli a 5 o 6 termini.

Simili composti si è visto che possono dare anche foto-tautomerizzazione. Nella forma "cheto" si genera una specie eccitata K* che dà una buona emissione con un largo Stokes shifts (generalmente compreso tra 6000-12000 cm⁻¹) nei confronti dell'analita.

La fluorescenza che avviene durante la coordinazione dei vari leganti costituiti da HNBO, avviene anche per la soppressione di un fenomeno quale PeT (trasferimento elettronico fotoindotto).

Un altro fenomeno importante che si verifica durante il trasferimento intramolecolare tra l'idrogeno naftolico (ma può essere anche fenolico) e l'azoto del benzossazolo (ma anche imidazolico, tiazolico) genera una tautomeria cheto dello stato eccitato K* con un abbassamento del livello energetico K* rispetto alla forma enolica eccitata E.

Tale abbassamento determina un rilascio di fotoni ($E = h\nu$) più basso rispetto a quelli assorbiti, generando quindi un'emissione in termini energetici minori rispetto al semplice decadimento dalla forma enolica allo stato iniziale, con conseguente aumento della lunghezza d'onda λ .

Più in generale le molecole che mostrano il fenomeno del trasferimento protonico dello stato eccitato intramolecolare (ESIPT) hanno particolare interesse per lo sviluppo di sensori fluorescenti, dispositivi laser e foto-stabilizzatori. La reazione di foto-tautomerizzazione dalla forma enolica (E) alla forma chetonica (K*), genera foto irradiazione come mostrato nella FIGURA N.22.

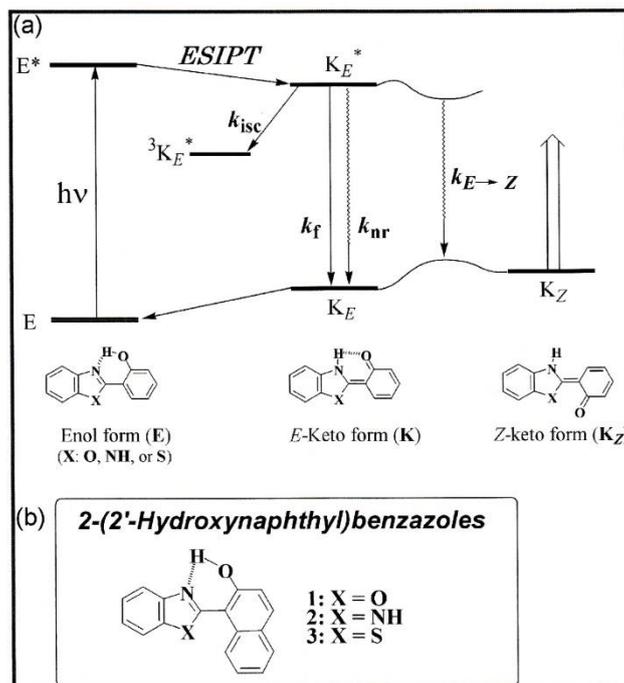
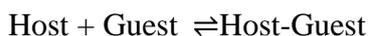


FIGURA N.22 – (a) DIAGRAMMA ENERGETICO DEL 2-(2'-IDROSSIFENIL)BENZOSSAZOLO
(b) STRUTTURE CHIMICHE DEL 2-(2'-IDROSSINAFTIL)BENZOSSAZOLO E DERIVATI 1-3

Un aspetto importante di un legante consiste nella selettività nei confronti di un guest o di una famiglia di guest. È possibile stimare l'affinità di un "host" nei confronti della specie ospitante, in funzione della costante di formazione che si viene a generare nella formazione del complesso. La selettività avviene in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della specie recettiva, della sua disposizione spaziale e capacità di pre-organizzarsi che determinano poi la complementarità secondo il modello "chiave-serratura" di Fischer con la molecola o ione ospitante nella formazione del complesso.



$$K = \frac{[\text{Host-Guest}]}{[\text{Host}][\text{Guest}]}$$

Secondo la termodinamica viene espressa la selettività come il rapporto tra l' "host" e due guest antagonisti in competizione:

$$\text{Selettività} = \frac{K_{\text{Guest1}}}{K_{\text{Guest2}}}$$

Da un punto di vista termodinamico è importante la costante di formazione del complesso, mentre da un punto di vista cinetico, si valuta l'aspetto della velocità di reazione nella formazione del complesso. Questo aspetto permette di fare una considerazione importante che sta base del concetto di selettività.

In termini pratici si evidenzia come sia più selettivo il processo nel quale il guest si lega più velocemente al recettore e quindi, se un complesso host-guest₁ avrà una costante di formazione maggiore rispetto al complesso host-guest₂, significherà che il complesso host-guest₁ si formerà più rapidamente.

Fenomeni chimico-fisici che stanno alla base di questi risultati, dipendono prevalentemente dalla struttura elettronica del sistema supramolecolare oltre che dalle disposizioni strutturali e conformazioni che si realizzano: più in dettaglio sistemi π - π e fenomeni di delocalizzazione elettronica sugli atomi della specie "host", contribuiscono a fornire una risposta fotochimica ben definita. Come già detto precedentemente, a seguito di eccitamento di uno stato di singoletto iniziale (S_0), si ha trasferimento elettronico in livelli energetici più elevati (S_1) per poi avere un decadimento di tipo

radioattivo rilevabile da uno spettrofotometro UV-VIS in fluorescenza ($\tau = 10^{-6}$ - 10^{-9} s) o in fosforescenza ($\tau = 10^3$ - 10^3 s), caratteristico di ciascun fluoroforo.

Questa peculiarità ha permesso di avere una serie di indicatori di riferimento o “markers” per applicazioni in chimica analitica o in biochimica per il riconoscimento di specie chimiche (FIGURA N.23).

Emission range (nm)	Compound	Solvent	Φ^{ab}
270–320	Benzene	Hexane	0.05
280–330	Phenol	H ₂ O	0.14
		Cyclohexane	0.08
300–400	Naphthalene	Cyclohexane	0.23; 0.036 ^c
		EtOH	0.21
310–400	Terphenyl	Cyclohexane	0.93; 0.82 ^c
315–480	2-Aminopyridine	H ₂ SO ₄ 0.05 M	0.60 ^d
		H ₂ SO ₄ 0.05-0.5 M	0.66 ^e
360–480	Anthracene	EtOH	0.27
			0.21 ^f
390–500	9,10-Diphenyl anthracene	Cyclohexane	0.90; 0.95
		Benzene	0.84
		EtOH	0.88
380–580	Quinine sulfate ^{gh}	H ₂ SO ₄ 0.5 M	0.55
		H ₂ SO ₄ 0.05 M	0.53
400–600	β -Carboline ⁱ	H ₂ SO ₄ 0.5 M	0.60
430–560	Perylene	EtOH	0.92
		Benzene	0.89; 0.99
480–650	Fluorescein ^{kd}	NaOH 0.1 M	0.87; 0.92; 0.95
550–700	Rhodamine 101	EtOH	1.00
550–700	Rhodamine 6G	EtOH	0.94 ^g
550–700	[Ru(bpy) ₃] ^{2+k}	H ₂ O	0.042, 0.028 ^l
		MeCN	0.06 ^m
580–780	Cresyl violet	MeOH	0.54 ^j
600–850	[Os(bpy) ₃] ^{2+k}	MeCN	0.005
600–900	[Os(phen) ₃] ^{2+k}	MeCN	0.021

FIGURA N.23 – COMPOSTI DI RIFERIMENTO IN CONDIZIONI STANDARD CON VALORI DI EMISSION RANGE E RESA QUANTICA.

1.3 DESIGN RECETTORI SINTETICI

(Coordinazione Poliedri Metallorganici)

La realizzazione di recettori sintetici²³ al fine di ottimizzare le interazioni host-guest, prevede lo studio tra le deboli forze d'interazione (comprese quelle tra soluto e solvente), la topologia e struttura molecolare dell'host per valutare i cationi, gli anioni e le molecole neutre a cui si deve legare.

In aggiunta a tale considerazioni, è bene tenere presente effetti di coordinazione o di chelazione, così come i concetti di complementarità e pre-organizzazione che interessano il rapporto tra recettore e substrato.

All'interno di sistemi biologici, il riconoscimento molecolare risulta di fondamentale importanza, in quanto è possibile codificare numerose informazioni che riguardano per esempio l'adesione cellulare, l'interazione cellula-batterio e cellula-virus, oltre che alla modulazione del sistema immunitario. Tali informazioni possono essere codificate da specifici saccaridi. I meccanismi d'interazione di tali molecole possono essere modificate per via sintetica, mediante una fase di progettazione e sintesi di saccaridi specifici nella realizzazione di un'efficace interazione con il carboidrato.

In ambito ambientale può essere interessante il riconoscimento di ioni metallici, in quanto è possibile individuarli e sequestrarli nella rimozione di inquinanti in una matrice ambientale. Esiste la possibilità di intrappolare ioni metallici in "gabbie" e più precisamente vengono intrappolati all'interno di cavità intramolecolari.

Pertanto il design dei recettori risulta essere di notevole importanza, perché tiene presente di quelle forze non covalenti e dimensioni molecolari, responsabili delle interazioni host-guest.

Queste interazioni possono essere modulate dalla presenza di gruppi elettron-donatori, elettron-attrattori, sistemi π , pendagli lipofili o idrofili.

Tra le caratteristiche principali delle strutture macrocicliche o policicliche, si trova la presenza di cavità ed aperture di specifiche dimensioni, di ramificazioni, di ponti e di connessioni, utili per la stabilizzazione dei complessi all'interno di una struttura ben specifica con caratteristiche dinamiche, dove l'autoassemblaggio delle molecole consente di sviluppare processi di riconoscimento molecolare, di trovare impiego nella catalisi enzimatica o industriale e nel trasporto di principi attivi o di nutrienti.

La pre-organizzazione del recettore, in aggiunta a leganti contenenti funzionalità ossidriliche, è la chiave per stabilizzare specie di cationi metallici hard, principalmente in acqua, dove la competizione delle specie idrossi-, spesso insolubili, è presente.

Recentemente è stata sintetizzata una classe molecolare basata sull'unità 3-idrossi-2-metil-4-pirrone avente attività antitumorale in vitro.

Ricerche bibliografiche mostrano studi d'interazione di leganti nei confronti di ioni metallici. Un esempio è costituito dal legante 4,10-bis[(3-idrossi-4-pirron-2-il)-1,7-dimetil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano, realizzato a sua volta da due unità di Maltolo²⁴ (3-idrossi-2-metil-4-pirrone) connesse ad un'unità 1,7 -dimetil- 1,4,7,10 - tetraazadodecano.

La coordinazione guidata dall'autoassemblaggio, consente un design razionale sia in 2D che in 3D della sfera di coordinazione e la capacità direzionale del legante.

Tale strategia è una valida alternativa al "bottom-up" per realizzare le molecole da alcuni migliaia di Å sino a migliaia di nanometri.

Una larga scala di sistemi²⁵ 2D è costituita da: romboidi, squares, rettangoli, triangoli ecc. mentre i sistemi 3D da: piramidi trigonali, prismi trigonali, cubi, cubi ottaedrici, doppio square, adamantanoidi, dodecaedri e altre gabbie.

Già dai pionieri della chimica supramolecolare, Lehn²⁶, Sauvage²⁷, era importante ed utile la coordinazione guidata dal “self assembly” nella formazione di complessi o di diversi sistemi supramolecolari tra cui rotoxani, anelli e catenani.

Altri gruppi importanti costituiti da Stang²⁸, Raymond²⁹, Fujita³⁰, Mirkin³¹ e Cotton³² hanno sviluppato nuovi paradigmi per la realizzazione di metallo-cicli e metallo-gabbie con forma e dimensioni ben definite.

Nell’ultima decade grazie anche a Fujita³³, Raymond³⁴ e Bergman, per quel che concerne in particolare, le gabbie-metalliche indicate come “molecularflasks”, sono capaci d’incapsulare i guest metallici consentendo l’osservazione di reazioni o fenomeni d’interazione unici e atipici, che non possono essere classificati nei convenzionali stati della materia solido, liquido e gassoso.

Sono stati realizzate varie architetture³⁵ 3D funzionali ed esteticamente eleganti che ricordano i solidi platonici, tra le quali triangoli equilateri, strutture planari e pentagoni. Così, architetture molecolari 3D possono essere progettate riducendo questi poliedri di componenti molecolari. Ad esempio, una piramide può essere progettata cucendo insieme quattro pannelli triangolari, mentre un ottaedro può essere preparato riunendo otto pannelli triangolari. Allo stesso modo l’unione di quadrati può portare alla formazione di cubetti e prismi.

Questi pannelli generano strutture tridimensionali tenendo presente gli angoli che vengono ad instaurarsi e le successive tensioni angolari.

Un aspetto importante rivestono i complessi cis- protetti in posizione planare con angoli contenenti centri metallici quali Pt (II) o Pd (II). Tale approccio è in contrasto con i centri di ioni metallici liberi dove tutta la sfera di coordinazione può andare ad

interagire con il centro convergente metallico. Pannelli molecolari triangolari, in presenza dell'unità angolo cis-bloccata, generano varie architetture supramolecolari tra le quali: la gabbia tetraedrica M_6L_4 tronca, il M_6L_4 cono piramidale quadrata, M_8L_4 tetraedri e coni e $M_{18}L_6$ esaedri. Strutture planari e pannelli rettangolari possono essere impiegati per la realizzazione di cubi, parallelepipedi e prismi di varia forma quali: trigonali, quadrati, pentagonali, esagonali, ecc.

La posizione dell'atomo o gruppo donatore, è fondamentale per la realizzazione della struttura finale della geometria finale del sistema supramolecolare. Un'importante caratteristica di questi sistemi supramolecolari, consiste nella labilità dei centri metallici che impartiscono una certa flessibilità al sistema supramolecolare, in maniera tale da potersi adattare, a differenza di sistemi dove il prodotto finale risulta rigido. Di seguito vengono illustrate alcune strutture geometriche tridimensionali in funzione della coordinazione di diversi ioni metallici (FIGURA N.23 e N.24).

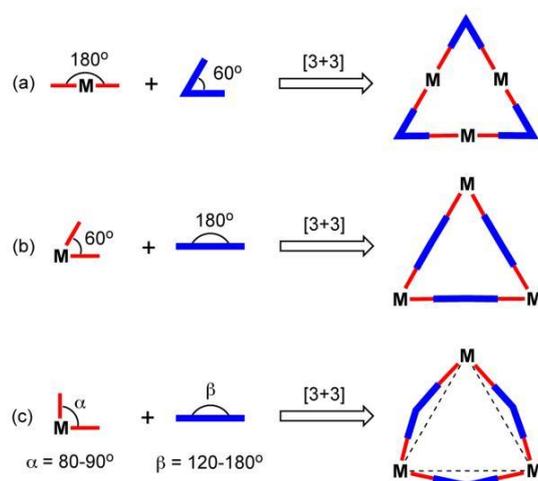


FIGURA N.23– STRATEGIA GENERALE DI DESIGN PER LA REALIZZAZIONE DI SISTEMI MOLECOLARI A TRIANGOLO COMPOSTI DA “M” ED “L”.

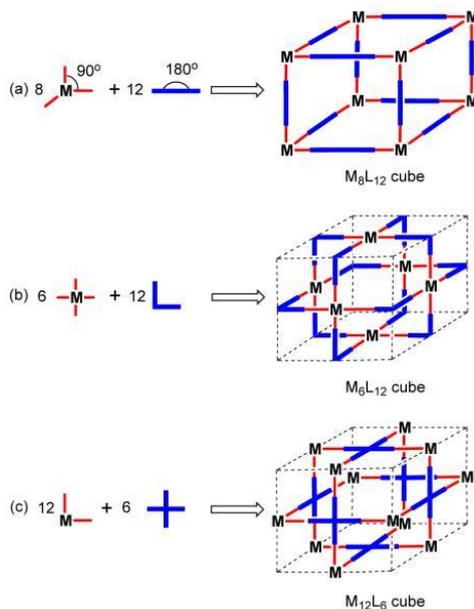


FIGURA N.24 –STRATEGIE DI DESIGN GENERALE PER LA SINTESI DI: A) M_8L_{12} ; B) M_6L_{12} ; C) M_{12}L_6 IN CUBI MOLECOLARI.

Il vantaggio di un tale approccio consente inoltre di avere diverse cavità con lo scopo di poter includere guest, poter avere riconoscimento molecolare e catalisi guidate da processi d'inclusione molecolare.

In complessi supramolecolari metallo-cicli, la reattività e la geometria di coordinazione dell'atomo centrale metallico riveste un ruolo importante nella topologia dell'architettura finale.

Tali sistemi sono stati realizzati utilizzando metalli di transizione come unità principali valutando le loro preferenze di coordinazione.

Nel dettaglio, ioni planari divalenti Pd(II) e Pt(II) elettron-poveri vengono complessati in leganti contenenti atomi elettron ricchi quale N in un processo di self-assembly.

Queste considerazioni non sono sempre così trasferibili anche ad altri gruppi di ioni metallici, in quanto esistono delle preferenze di coordinazione a seconda della tipologia del legante e della classe di ioni metallici considerati.

I complessi realizzati tra cationi metallici ossidati e atomi di N- elettroni ricchi, generano sistemi host-guest dove ci sono interazioni elettrostatiche responsabili della solubilità dei complessi in solventi acquosi.

Esistono anche “host” usati come traccianti o agenti di contrasto in spettroscopia di risonanza magnetica (NMR) per scopi medici o per sviluppare modelli enzimatici. Un classico esempio consiste in chemosensori aventi come agente di contrasto il Gd^{3+} .

1.4 EFFETTI DEL SOLVENTE SU ASSORBIMENTO ED EMISSIONE SPETTRALE

Il solvente gioca un ruolo importante non solo per quello che riguarda la solubilità di complessi o la loro precipitazione, ma anche per le interazioni che si vengono a creare tra il “guest” o il sistema supramolecolare più in generale.

È possibile notare come solventi protici aumentino la solvatazione di ioni, in particolare i cationi metallici vengono solvatati e circondati per esempio da molecole d’acqua. Tale effetto genera un quenching, ossia uno spegnimento del segnale in emissione (fluorescenza) del campione da analizzare. Al contrario ambienti idrofobici, rendono il segnale più ampio e intenso in emissione, pertanto un solvente come l’esano, genera elevate bande in fluorescenza.

Alla base delle interazioni che si svolgono tra il solvente e il complesso, esistono sempre anche altre interazioni non covalenti quali ad esempio: il legame a idrogeno tra i diversi componenti del sistema ed il solvente, le migrazioni di elettroni all'interno della molecola, le interazioni dipolo-dipolo o i momenti di dipolo tra il soluto ed il solvente. La polarità del solvente a sua volta coinvolge la permittività dielettrica ϵ e l'indice di rifrazione medio n della radiazione luminosa.

Esistono diverse interpretazioni anche a livello di funzioni matematiche che esplicitano gli effetti non specifici del solvente (dipolarità/polarizzabilità) e quelli specifici (legame a H) degli spettri elettronici d'assorbimento.

La magnitudo degli shift spettrali dipende dalla forza del legame ad H intermolecolare tra i gruppi sostituenti quali $-\text{OH}$ ed $-\text{NH}$ e il solvente e qualsiasi altra forza intermolecolare.

Dove non siano presenti legami ad H intermolecolari, lo shift spettrale risulta sensibile alla polarità del solvente dove le bande ($\pi-\pi^*$) $n-\pi^*$ sono spostate batocromicamente, quando la polarità del solvente aumenta. Esistono dei casi in cui l'effetto batocromico diminuisce passando ad un solvente meno polare.

Tale effetto batocromico dovuto alla presenza di gruppi cromofori nel legante, genera una variazione dell'energia di stabilizzazione tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato del cromoforo. Una variazione della polarità del solvente, così come le già citate interazioni a H, interazioni $\pi-\pi^*$, forze di Van der Waals generano cambiamenti spettrali mediante effetti ipsocromi (diminuzione della lunghezza d'onda d'assorbimento) o batocromi (aumento della lunghezza d'onda d'assorbimento).

L'effetto solvatocromico³⁶⁻³⁹ può essere usato per determinare l'entità delle interazioni tra il complesso o sistema host-guest ed il solvente secondo parametri quali la polarizzabilità/dipolarità, le interazioni π - π^* , l'effetto del solvente, dando informazioni utili sulle proprietà di legame a idrogeno donatore α e/o accettore β del solvente.

Per favorire l'accensione dei vari leganti studiati, è opportuno portare le molecole studio a pH alcalini per favorire la deprotonazione dell'ossidrilico naftolico, con conseguente formazione della specie "chetonica" e conseguente risposta fotochimica attiva nel segnale in emissione. All'interno del lavoro svolto, sono state effettuate anche titolazioni a pH neutro e più precisamente in soluzione acquosa con HEPES a pH=7.4, affinché si possano eseguire test biologici per studi in vitro ed in vivo in condizioni fisiologiche.

Più precisamente sono state svolte misure principalmente in acetonitrile ed acqua (90:10), solo acetonitrile ed in qualche caso particolare in cui il legante non era solubile nel solvente, a causa della parte ingombrante lipofila, si è utilizzato 1,4-diossano.

Una delle caratteristiche più importanti dei chemosensori sintetizzati, costituiti da unità fotosensibile benzossazolica derivata, di poter dare un largo Stoke shift in emissione ($\lambda = 560$ nm) che avviene in solventi polari protici come la miscela di acetonitrile ed in minima parte, d'acqua.

1.5 CHEMOSENSING

Le componenti essenziali di un chemosensore fluorescente, sono le interazioni selettive di un'unità segnalatrice nei confronti di un analita, grazie alla presenza di un cromoforo o un fluoroforo, responsabile della risposta fotochimica del sistema. Il fluoroforo o unità fotoattiva può essere connesso più o meno direttamente all'unità recettiva, mediante un "linker" o uno spaziatore ("spacer") e sono strutturalmente integrate per consentire la massima comunicazione tra le due unità.

Le interazioni "host-guest" che si realizzano, così come i cambiamenti delle geometrie di un sistema supramolecolare vanno a modificare le risposte fotochimiche che si ottengono in luminescenza. Generalmente sistemi elettron-ricchi ed etero metalli, mostrano un elevato quenching in sistemi planari nei confronti dei composti nitro-aromatici come ad esempio l'acido picrico; mentre non sono stati osservati significativi cambiamenti per esempio in presenza di benzene, xylene e 2,4,6-TMP.

L'elevata selettività nello spegnimento è dovuta alle interazioni $\pi-\pi^*$ tra il sistema π dell'atomo donatore della molecola planare e l'analita monitorato.

I chemosensori trovano applicazione anche in biochimica dove si parla di biosensori quando si usano molecole biochimiche per il riconoscimento e la trasduzione del segnale per registrare una specifica interazione biomolecolare e/o la quantità di analita monitorato.

I requisiti generali per un buon biosensore⁴⁰ così come quelli di un chemosensore più in generale, sono un'elevata sensibilità, una buona selettività, una stabilità a lungo termine ed una risposta rapida. Le scelte preferite dei metodi di trasduzione sono stati metodi

ottici e elettrochimici per la captazione selettiva e sensibile di molte biomolecole ed il riconoscimento biomolecolare come un acido desossiribonucleico (DNA) ibridato e le interazioni di un antigene-anticorpo (Ab).

Considerando che questi approcci richiedono una sensibilità adeguata, gli strumenti risultano costosi e presentano criticità nel tempo di derivatizzazione lungo, elevati costi e rumore di fondo. Con il rapido sviluppo delle nanotecnologie, una vasta gamma di biosensori sono stati sviluppati per il miglioramento delle prestazioni del biosensore. Nella fattispecie il progresso è rivolto sia nella progettazione che nello sviluppo di piattaforme di biosensori in termini di nano materiali.

Nonostante l'intenso sforzo, le prestazioni e l'efficienza dei biosensori sono ancora bassi; pertanto con la sempre crescente domanda di bioanalisi avanzate, numerose studi hanno cercato di sviluppare nuove tecniche bioanalitici che sono compatibili con i futuri requisiti di domanda energetica. Proprio a partire da queste considerazioni, si stanno sviluppando sempre più sistemi e dispositivi auto-alimentati a base di energie rinnovabili al fine di sviluppare una strategia promettente per soddisfare i requisiti delle analisi biologiche. Dalla scoperta pionieristica dell'effetto fotoelettrico di Becquerel⁴¹⁻⁴² nel 1839, la foto-elettrochimica ha avuto un sostanziale sviluppo nella ricerca in diversi campi, tra cui il fotovoltaico, la fotocatalisi e di rilevamento. Il processo foto-elettrochimico⁴³⁻⁴⁴(PEC) riguarda la conversione del fotone ad elettricità risultante dalla separazione di carica e il successivo trasferimento di carica dopo l'assorbimento di fotoni durante illuminazione. Il favorevole meccanismo di trasferimento di carica delle PEC offre una nuova piattaforma per analisi biologiche. Il processo foto-elettrochimico (PEC), è uno strumento promettente che coinvolge reazioni con trasferimento di carica tra un materiale foto elettrochimico, un analita e un elettrodo sotto irradiazione della

luce. Nel rilevamento del processo foto elettrochimico (PEC), la luce è usata come sorgente d'eccitazione mentre viene misurato il segnale di corrente in uscita. Tale meccanismo è l'opposto del processo dell'elettrochemiluminescenza⁴⁵⁻⁴⁸(ECL).

La possibilità di accoppiare il processo fotoelettrochimico con rivelazione elettrochimica rende i PEC sensori con un unico vantaggio di essere entrambi i sensori ottici ed elettrochimici. Inoltre, la separazione tra le fonti di eccitazione (luce) e rilevamento (sensori) nel processo PEC offre alta sensibilità con basso segnale di fondo. Allo stesso tempo, rispetto alle tecniche ottiche di rilevamento come la fluorescenza, chemiluminescenza (CL) ed elettrochemiluminescenza(ECL), che richiedono molto tempo e richiedono dispositivi di imaging ottici costosi, complessi e software di riconoscimento dell'immagine sofisticata; il rilevamento fotoelettrochimico rende il PEC semplice e poco costoso.

La capacità di rilevamento dei PEC sensori se paragonata con segnali analitici identici, mostra rispetto alle controparti elettrochimiche, dei bassi costi.

L'approccio del biosensing nei PEC sensori, mostra negli ultimi decenni notevole sviluppo sia nella realizzazione di materiali fotocatalisi, sia nelle strategie di amplificazione del segnale. Nei PEC sensori, una sequenza di trasferimento di cariche tra l'analita, il materiale fotocatalico e l'elettrodo in modo che la corrente in uscita sia sfruttata in modo efficiente. Il design dei sistemi fotocatalitici e la manipolazione sulla cattura e trasporto di fotoelettrodi sono importanti per definire i PEC sensori. Pertanto è importante capire pienamente sia le proprietà dei fotocatalitici e le caratteristiche di trasferimento di carica per sviluppare PEC sensori con alta sensibilità, bassi costi ed

ecocompatibili con caratteristiche di robustezza e di riutilizzo. Fujishima e Honda nel 1972 fecero delle prove sull'ossidazione dell'acqua con PEC mediante utilizzo del TiO_2 .

1.6 METALLI PESANTI

(Inquinamento ambientale ed impatto sulla salute umana)

I sistemi studiati durante l'attività svolta nel periodo del dottorando, saranno circoscritti alla spettrometria in assorbimento UV-Visibile ed in fluorescenza, per il riconoscimento principalmente di ioni metallici di elementi di transizione e di metalli pesanti.

I metalli pesanti⁸ in prima approssimazione vengono definiti dall'EPA (Environmental Protection Agency U.S.A.) come elementi dall'alto peso atomico (per esempio mercurio, cromo, cadmio, arsenico e piombo); i quali possono danneggiare a basse concentrazioni gli esseri viventi e tendono ad accumularsi nella catena alimentare.

Generalmente i metalli pesanti presentano le seguenti caratteristiche:

- Densità superiore ai 5.0 g/cm^3
- Si comportano in genere come cationi
- Bassa solubilità dei loro idrati
- Spiccata attitudine a formare complessi
- Affinità verso i solfuri

In letteratura si considerano normalmente metalli pesanti i seguenti elementi: alluminio, ferro, argento, bario, berillio, cadmio, cobalto, cromo, manganese, mercurio, molibdeno, nichel, piombo, rame, stagno, titanio, tallio, vanadio, zinco, ed alcuni metalloidi con

proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali l'arsenico, il bismuto ed il selenio. Tra i metalli pesanti si distinguono alcuni indispensabili per gli organismi viventi, con anche potenziale tossicità ad elevate concentrazioni come: ferro, cobalto, cromo, rame, manganese, molibdeno, selenio, zinco. Ne esistono altri ritenuti prevalentemente tossici già a basse concentrazioni come: alluminio, arsenico, berillio, cadmio, mercurio, nichel e piombo. Tra i maggiori responsabili dei danni ambientali e di quelli sulla salute umana e del regno animale, di sicuro si possono annoverare: il mercurio, il cadmio, il cromo e il piombo. Una stima dell'impatto dei metalli pesanti sull'ambiente viene di seguito esposta nel diagramma mostrato in FIGURA N.25.

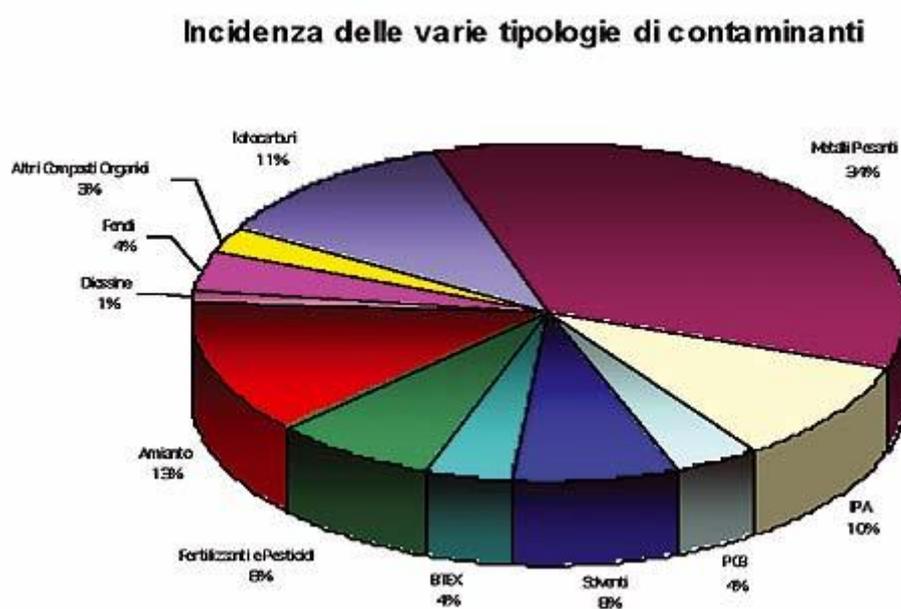


FIGURA N.25 – DIAGRAMMA SUI VARI CONTAMINANTI AMBIENTALI

Con un valore pari al 34%, l'impatto sull'ambiente da parte dei metalli pesanti, risulta notevole, considerando anche l'accumulo persistente e il difficile smaltimento di essi; pertanto un monitoraggio di tali contaminanti, risulta pressoché indispensabile, nelle varie forme in cui si costituiscono.

Infatti i metalli pesanti sono componenti naturali della crosta terrestre che non sono degradati dall'attività biologica e fotochimica, pertanto non possono essere smaltiti. Quando vengono rilasciati in una matrice ambientale, possono accumularsi per centinaia di anni. Fenomeni naturali come le eruzioni vulcaniche, gli incendi boschivi e le maree contribuiscono alla ciclizzazione naturale dei metalli, purtroppo però anche l'uomo con le sue attività agricole ed industriali, gioca un ruolo altrettanto importante e a volte esercita un ruolo maggiore rispetto alla natura stessa. Andando a modificare la frequenza di rilascio e di trasporto dei metalli pesanti nell'ambiente, l'uomo è riuscito ad aumentarne di alcuni ordini di grandezza le emissioni. I metalli pesanti possono entrare nel nostro corpo attraverso l'acqua, l'aria ed il cibo, anche se in tracce, alcuni di questi elementi sono importanti per la vita dell'uomo nelle giuste concentrazioni come: rame, selenio, zinco.

Generalmente gli esseri umani possono essere esposti ai metalli pesanti a seguito d'ingestione (mangiando o bevendo) o per inalazione (respirando).

Un altro aspetto che interessa l'esposizione umana alla contaminazione da parte dei metalli pesanti, ritrovabile anche nella dieta dell'uomo, è la possibilità di vivere vicino a siti industriali dove possono essere impiegati metalli e i loro composti, ma anche a seguito di attività metallurgiche che interessano direttamente l'uomo, il quale si trova davanti ad un'esposizione costante e continuativa ai metalli pesanti, con conseguenti impatti negativi sia sulla salute che sull'ecosistema più in generale, anche in presenza di attività quali caccia e pesca.

ARSENICO

L'arsenico⁴⁹ può essere rilasciato in grandi quantità attraverso attività vulcaniche, erosione di rocce, incendi boschivi ed attività umane. È possibile trovare la presenza di arsenico in pitture, tinture, metalli, farmaci, saponi e semi-conduttori.

Le operazioni di nutrimento agli animali ed alcuni fertilizzanti e pesticidi, possono rilasciare alte quantità di arsenico all'ambiente così come le attività industriali di fusione del rame o del piombo, attività mineraria e combustione del carbonio.

L'arsenico si presenta inodore ed insapore, è conosciuto come cancerogeno e può causare cancro della pelle, dei polmoni, del fegato e della vescica. Bassi livelli d'esposizione possono provocare nausea e vomito, ridurre la produzione di globuli rossi e bianchi, aritmia cardiaca, danneggiamento dei vasi sanguigni ed una sensazione di "formicolio" di mani e piedi. Ingestione ad alte concentrazioni può risultare letale.

Bassa esposizione a lungo termine può causare un oscuramento della pelle e formazione di vesciche o verruche sui palmi delle mani, nelle piante dei piedi e sul busto umano.

Alcuni valori limiti d'accettazione nel sistema statunitense dell'arsenico nell'acqua potabile è di 0,01 ppm mentre negli ambienti di lavoro è 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ per 8 ore di turno lavorativo e 40 ore di lavoro settimanale.

BARIO

Il bario è un elemento molto abbondante, naturalmente si presenta come un metallo ed è usato per una varietà di applicazioni industriali. I composti di bario come le leghe di

bario/nickel sono usate come elettrodi e tubi vacuum come agenti di asciutto e di rimozione d'ossigeno, il solfuro di bario è usato nelle lampade a fluorescenza, il solfato di bario è usato in medicina diagnostica, il bario nitrato e clorato dà una fiamma verde.

Composti di bario, sono anche usati nei fanghi di perforazione, nelle pitture, nei mattoni, nelle ceramiche, nel vetro e nella gomma.

Non ci sono documenti ufficiali che attribuiscono al bario la causa della formazione del cancro. Brevi tempi d'esposizione possono causare vomito, crampi addominali, diarrea, difficoltà respiratorie, aumento o diminuzione della pressione sanguigna, addormentamento intorno alla faccia e debolezza muscolare.

Elevate quantità di bario ingerite, possono causare vomito, ipertensione, cambiamenti del ritmo cardiaco o paralisi e possibile morte. I valori limite secondo l'EPA per l'acqua potabile sono di 2 ppm, mentre per gli ambienti di lavoro sono $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nei posti di lavoro per 8 ore lavorative e 40 ore a settimana.

CADMIO

Il cadmio è un metallo molto tossico, contenuto in terreni e rocce, incluso carbone e fertilizzanti naturali. Il cadmio ha molti usi tra cui le batterie, pigmenti, rivestimenti metallici e plastiche. È utilizzato nelle elettro-placche.

Il cadmio e i suoi composti sono conosciuti per essere cancerogeni per la salute dell'uomo. I fumatori sono esposti a livelli più elevati di cadmio rispetto ai non fumatori. Seri danni possono essere causati ai polmoni attraverso la respirazione di alti livelli di cadmio che irrita lo stomaco provocando vomito e diarrea. L'esposizione a

lungo termine a bassi livelli, conduce all'accumulo nel fegato con conseguenti possibili malattie al fegato, danni ai polmoni e fragilità ossea.

I valori limite nelle acque potabili sono 5 ppb secondo l'EPA, così come tale valore non dovrebbe essere superato nelle acque in bottiglia secondo l'FDA.

Negli ambienti di lavoro la presenza di cadmio non dovrebbe superare i 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ nell'aria per i turni da 8 ore lavorative e 40 ore settimanali.

CROMO

Il cromo si trova nelle rocce, negli animali, nelle piante e nel terreno e può essere un liquido, solido o gas. I composti di cromo si legano al terreno e non migrano facilmente, rimanendo nei sedimenti acquosi. Il cromo è usato nelle leghe metalliche come l'acciaio inossidabile, rivestimento protettivo sul metallo (elettro-placche), nastri magnetici e pigmenti per pitture, cemento, carta, gomma, copertura dei rivestimenti del pavimento ed altri materiali. Le sue forme solubili sono impiegate per preservare il legno. I composti di cromo (VI) sono tossici e riconosciuti come cancerogeni per la salute umana, laddove il cromo (III) risulta essere un nutriente essenziale.

Elevati livelli possono causare irritazione allo strato interno del naso, ulcere nasali e problemi respiratori come asma, tosse, respiro corto o ansimante. Il contatto con la pelle può causare ulcere. Reazioni allergiche consistono in duri rossori e gonfiori della pelle.

L'esposizione a lungo termine può provocare danneggiamento del fegato, dei reni e dei tessuti, così come irritazione della pelle.

Secondo l'EPA, il valore limite ammesso nell'acqua potabile è di 0.1 ppm, mentre secondo l'FDA non può superare il mg/L nelle acque in bottiglia.

Per quel che concerne gli ambienti di lavoro, il valore di concentrazione nell'aria è compreso tra 0.0005 e 1 mg/m³ in turni da 8 ore, in 40 ore settimanali a seconda del composto chimico presente.

PIOMBO

Il piombo può essere presente in diverse parti dell'ambiente, inteso aria, suolo ed acqua, sia come risultato di attività umane, di combustione di combustibili fossili, attività manifatturiere e miniere.

È usato per produrre batterie, munizioni, prodotti metallici come saldatura e tubi e dispositivi a raggi X. Il piombo è un metallo altamente tossico e come risultato relativo alla salute, il suo uso in diversi prodotti come gasolio, pitture e tubi di saldatura sono stati drasticamente ridotti in questi anni. La maggior parte della parte contaminazione odierna, è dovuta a vecchie condutture d'acqua, suolo contaminato, polvere domestica, acqua da bere, in alcuni cosmetici, giocattoli e ceramiche vetro-piombo.

L'EPA ha determinato che il piombo è responsabile probabilmente di carcinoma nell'uomo. Lunghi tempi d'esposizione per gli adulti, possono fare diminuire le funzioni del sistema nervoso, portare a debolezza nelle dita, nei polsi o fianchi, a piccoli incrementi della pressione sanguigna ed anemia. Esposizioni ad alti livelli di piombo può portare al danneggiamento del cervello, del fegato e infine può causare la morte. Nel donne in gravidanza, alti livelli di piombo, possono causare aborto spontaneo.

Elevati livelli d'esposizione nell'uomo possono causare danni all'uomo nella produzione di liquido spermatico.

Secondo l'EPA nelle acque potabili sono ammessi 15 ppb mentre in ambienti lavorativi 0,15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ d'aria.

MERCURIO

Il mercurio si miscela con altri elementi per generare composti organici ed inorganici del mercurio. Il mercurio metallico è usato per produrre cloro gassoso e soda caustica, è anche utilizzato nei termometri, come materiale riempitivo dentale, dispositivi, lampadine e batterie. Le centrali elettriche a carbone sono la più grande causa d'emissioni di mercurio in aria negli U.S.A. Il mercurio presente nel terreno ed in acqua, è convertito a metil-mercurio, una tossina che si bio-accumula.

L'EPA ha determinato che il cloruro di mercurio e il metil-mercurio sono possibili cancerogeni per la salute umana. Il sistema nervoso è sensibile a tutte le forme di mercurio.

L'esposizione ad elevati livelli di mercurio, può danneggiare il cervello, i reni e lo sviluppo dei feti. Gli effetti sulle funzioni del cervello, possono risultare irritabilità, timidezza, tremori, cambiamenti nella visione o nell'udito e problemi di memoria.

Esposizione a breve termine a vapori di mercurio metallico può generare danni ai polmoni, nausea, vomito, diarrea, incremento della pressione sanguigna o frequenza cardiaca, prurito ed irritazione agli occhi.

Secondo l'EPA i valori limite sono 2 ppb nelle acque potabili, mentre di 1 ppm di metil-mercurio nelle acque di mare. Secondo l'OSHA, sono ammessi 0.1 mg/m^3 di mercurio

organico e 0.05 mg/m^3 di vapori di mercurio metallico per turni di 8 ore lavorative e 40 ore settimanali.

SELENIO

Il selenio è un minerale in tracce largamente distribuito nella gran parte delle rocce e terreni. Il selenio lavorato è usato nell'industria elettronica, come integratore nutrizionale, nell'industria del vetro, nelle plastiche, pitture, smalti, inchiostri e gomme, nella preparazione di prodotti farmaceutici come pollami e bestiami, nella formulazione di pesticidi, nella produzione di gomma, come ingrediente negli shampoo e come costituente dei fungicidi. Il selenio radioattivo è usato nella medicina diagnostica.

Il selenio è tossico in grandi quantità, ma è necessario per la gran parte delle funzioni cellulari se non in tutti gli animali. Il selenio, è un nutriente essenziale per gli esseri umani ove presente in tracce. Per esempio riveste un ruolo importante nel funzionamento della ghiandola tiroidea. La quantità tollerata è di $400 \mu\text{g}$ di selenio al giorno. Il consumo sopra a quel livello, può condurre nel caso di brevi esposizioni ad alte concentrazioni a provocare nausea, vomito e diarrea, mentre nel caso di esposizioni croniche orali ad alte concentrazioni può provocare seleniosi.

I maggiori segni di seleniosi sono la perdita dei capelli, unghie fragili e anormalità neurologiche. L'esposizione a vapori ad alti livelli può provocare irritazione del tratto respiratorio, bronchiti, difficoltà di respiro e dolori di stomaco. L'esposizione per lungo tempo può generare irritazione respiratoria, spasmi dei bronchi e tosse.

I valori limite secondo l'EPA sono di 50 ppb nell'acqua potabile, mentre secondo l'OSHA di $0,2 \text{ mg/m}^3$ nei turni di 8 ore lavorative.

ARGENTO

L'argento di solito si mescola con altri elementi con solfuri, cloruri e nitrati. L'argento è usato in gioielleria, argenteria, dispositivi elettronici e riempimenti dentali. L'argento metallico è anche impiegato in contatti elettrici e conduttori, saldature di leghe e negli specchi. I composti d'argento sono impiegati in film fotografici. Soluzioni diluite di nitrato d'argento e di altri composti sono usati come disinfettanti ed agenti antibatterici.

Secondo l'EPA, l'argento non è classificabile come un cancerogeno per l'uomo.

L'esposizione ad alti livelli per un lungo periodo può risultare in una condizione chiamata argiria, una colorazione blu-grigiastra della pelle e altri tessuti del corpo. Tale argiria sembra un problema cosmetico che può non essere un problema per la salute.

L'esposizione ad alti livelli di argento nell'aria è risultata nei problemi respiratori, nei polmoni e nell'irritazione della gola e dolori di stomaco.

Il contatto con la pelle può causare reazioni allergiche come eruzione cutanea, rigonfiamento ed infiammazione in alcune persone.

I valori limite nell'acqua da bere non superano gli 0.10 ppb secondo l'EPA, mentre negli ambienti di lavoro i valori limite sono 0.01 mg/m³ per 8 ore lavorative in turni da 40 ore settimanali. Inoltre non è classificato come cancerogeno per la salute umana.

1.6.1 BIOACCUMULO

Il bioaccumulo è l'accumulo di sostanze chimiche nell'organismo. Ci sono un piccolo numero di piante che facilmente assorbono alti livelli di metalli dal terreno sottostante.

Queste piante vengono definite iper-accumulatori e se raccolte per il consumo umano, risultano pericolose per la salute dell'uomo a causa dell'elevato livello di metalli pesanti contenute in esse. Normalmente queste piante accumulano elevate concentrazioni di metalli dal sottosuolo. L'assorbimento dei metalli dalle piante, dipende dall'acidità del terreno (pH). A valori di acidità maggiore, i metalli risultano più solubili e mobili e più facilmente assorbiti ed accumulati alle piante. Gli esseri umani sono generalmente più esposti dalla contaminazione del terreno che dalle piante contaminate dal bioaccumulo.

Colture contenenti radici (quali patate e carote), verdure a foglia (come spinaci e lattuga), e parti di frutti che crescono nei pressi del suolo (come le fragole) sono un rischio più elevato di esposizione alla contaminazione metallica che le porzioni superiori di piante, come frutti in generale o bacche.

Quando si osservano cambiamenti nel colore o nella crescita delle piante, può essere un indicatore di stress di crescita ambientale (come la siccità) combinata ad alte concentrazioni di metalli nel terreno. Questo tipo di condizioni favoriscono il bioaccumulo di metalli pesanti dalle piante come assorbimento o bioaccumulo. Carenze nelle piante (come bassi livelli di zinco) possono anche influenzare le piante all'accumulo di metalli. Gli animali possono accumulare metalli anche dall'alimentazione di piante, pesci o acque contaminate da elevate concentrazioni di metalli. Questi metalli pesanti non vengono espulsi dal corpo, ma piuttosto accumulati negli organi come la pelle, i capelli e le ossa. L'accumulo dei metalli pesanti dall'acqua dove vivono, proviene dagli

organismi di cui si nutrono. Gli organismi più piccoli e semplici, sono i più suscettibili all'accumulo di metalli pesanti. Le alghe accumulano metalli dall'acqua circostante così come i sedimenti si accumulano. In aggiunta ci sono metalli accumulati attraverso la dieta ed un numero di esposizioni alle contaminazioni di metalli attraverso le piante.

Altre situazioni che generano un bioaccumulo da parte di metalli pesanti sono:

- inalazione dei contaminanti dal fumo delle piante (come tabacco);
- volatilizzazione dei contaminanti nei materiali delle piante in un'area chiusa (come in capannoni o aree di lavoro);
- Ingestione, inalazione o contatto con la pelle per lavori d'artigianato;
- Utilizzo giornaliero di tonici come ginseng o salvia per promuovere effetti benefici sulla salute.

1.7 SCOPO DELLA TESI

Il lavoro svolto ha lo scopo di sviluppare nuovi chemosensori di fluorescenza da poter essere utilizzati da soli o inseriti in sistemi più complessi quali membrane e nanoparticelle per il rilevamento e quantificazione di ioni metallici nel loro ambiente naturale. Il lavoro di tesi si è incentrato sullo sviluppo di una nuova unità fluorofora, basata sul 1,3-benzossazolo, e sua opportuna funzionalizzazione per il facile attacco ad unità recettive poliamminiche di varia natura. Per aumentare le proprietà emissive dell'unità benzossazolica, spostare la lunghezza d'onda nel range della luce visibile e farsi che la nuova unità sia direttamente coinvolta nell'interazione con uno ione metallico, essa è stata derivatizzata inserendoin posizione 2 del 5-metil-1,3-benzossazolo una unità naftolica (2-naftolo). L'unità fluorofora così ottenuta, chiamata 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo⁵⁰ (**3**), è stata funzionalizzata sul gruppo metile per consentirne la connessione a varie unità amminiche lineari, unità aromatiche od etero aromatiche, aventi proprietà coordinative nei confronti di ioni cationi metallici di tipo *hard*, quali ioni di metalli⁵¹⁻⁵⁴ alcalini, alcalino terrosi e metalli della prima serie di transizione Fe(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II).

Le unità poliamminiche sono state scelte perché pertanto costituiscono degli scaffolds versatili e di facile funzionalizzazione ed ovviamente per le loro proprietà coordinative nei riguardi degli ioni metallici.

Le funzionalità aromatiche in questo caso quella naftolica connessa a quella benzossazolica, oltre ad influenzare la topologia molecolare del legante realizzato, possono essere capaci di segnalare per via spettrofotometrica l'avvenuta complessazione del metallo, oltre che partecipare attivamente alla coordinazione dello

ione metallico, aumentando la stabilità del complesso insieme all'intervento di unità poliamminiche.

Il naftolo coordina lo ione metallico nella sua forma deprotonata, in cui l'O interagisce grazie ai suoi doppietti con possibili disposizioni a ponte, per formare complessi dinucleari con centri metallici ravvicinati tra di loro.

In tutti i leganti che sono stati sintetizzati, è presente un legame amminico N-CH₂ che può contribuire insieme agli altri atomi donatori alla stabilizzazione del centro metallico.

La sintesi dell'unità naftolica connessa all'unità benzossazolica, è stata scelta in quanto sono presenti in letteratura soltanto pochi studi in fluorescenza su questa unità ad eccezione di un caso, in cui tale unità era connessa alla N,N'-dipicolilammina. Lo scopo di questo lavoro, è stato quello di provare ad ottimizzare il processo di sintesi dell'unità fotoattiva 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**3**) e di funzionalizzare con differenti unità recettive amminiche e poliamminiche cicliche ed eteroatomiche, per studiare i comportamenti nei confronti di diversi ioni metallici alcalini, alcalino terrosi e ioni di metalli pesanti e elementi di transizione. Le misure sperimentali sono state eseguite in acetonitrile o miscele di esso con acqua in soluzioni a pH controllato.

Alcuni leganti sono stati studiati sia pH= 7.4 fisiologico, mediante soluzione di HEPESed altri a pH = 8 e pH = 9 in presenza di TAPS per favorire la deprotonazione dell'OH naftolico (pKa = 9,5). L'O dell'unità naftolica, risulta essere molto coordinante nei confronti di cationi hard. I leganti sintetizzati esibiscono un'emissione fotochimica nei confronti degli ioni Zn²⁺ e Cd²⁺, il cui primo catione citato, ha una notevole importanza in ambito cellulare.

Carenze di zinco all'interno del corpo umano, possono generare patologie come la malattia di Alzheimer o quella di Parkinson, pertanto è importante riuscire a stimare e a diagnosticare il valore di Zn^{2+} nei fluidi biologici. La possibilità di realizzare chemosensori "on-off" aventi elevata fluorescenza, selettività e di poter essere applicabili in situ, costituisce un obiettivo da perseguire non solo per il monitoraggio dello ione Zn^{2+} ma si può estendere anche ad altri ioni d'interesse farmacologico, ambientale e biologico.

Il fenomeno PET (Photoinduced Electron Transfer), è uno dei principi fondamentali che sta alla base della fluorescenza "on-off" dei sensori per lo Zn^{2+} .

I chemosensori sintetizzati N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (**L2**) e N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletilendiammina (**L3**), risultano essere fotoattivi nei confronti dello ione Mg^{2+} , ione essenziale per la salute dell'uomo e del suo sostentamento. Il Mg^{2+} è il secondo catione intracellulare più abbondante nel corpo umano dopo il potassio ed è coinvolto in più di 600 reazioni enzimatiche inclusi il metabolismo energetico e la sintesi proteica. Il Mg^{2+} riveste un ruolo particolarmente importante nel cervello, nel cuore e nei muscoli scheletrici. Soprattutto vengono utilizzati integratori a base di Mg^{2+} nel trattamento dell'emicrania, della depressione, delle malattie coronarie e nell'asma.

Il fine di sintetizzare leganti con un'elevata disponibilità di carica negativa per stabilizzare ioni di metalli hard in soluzione acquosa, è importante in quanto si vuole evitare la comparsa di idrosso-composti, una coordinazione con un numero elevato di atomi (maggiore di sei) e la mancanza di selettività all'interno di una serie a causa della stessa carica posseduta. La coordinazione di questi cationi metallici, di solito avviene in

presenza di ossigeni deprotonati, quali policarbossilati o polifenolati, che riducono la carica dei complessi ed evitano la formazione di idrosso-specie.

All'interno di questo progetto, è importante come le unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**3**) si pongano in una disposizione "face to face" nei confronti delle unità amminiche o poliamminiche recettive, per il discorso di pre-organizzazione e quindi di stabilizzazione dei complessi.

La funzionalità ossidrilica deprotonata, insieme al N benzossazolico generano un'area elettrone-ricca importante per la coordinazione di cationi metallici quali alcalini, alcalino terrosi e terre rare. In tutto questo la pre-organizzazione, gioca un ruolo fondamentale in quanto consente in termini di stabilità termodinamica, di stabilizzare il complesso che si forma.

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

2.1 SINTESI

2.1.1 Sintesi unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3)

La sintesi dei vari leganti studiati passa dalla sintesi dell'unità principale fluorofora 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3). Essa è stata sintetizzata seguendo lo schema di sintesi riportato in FIGURA N.26.

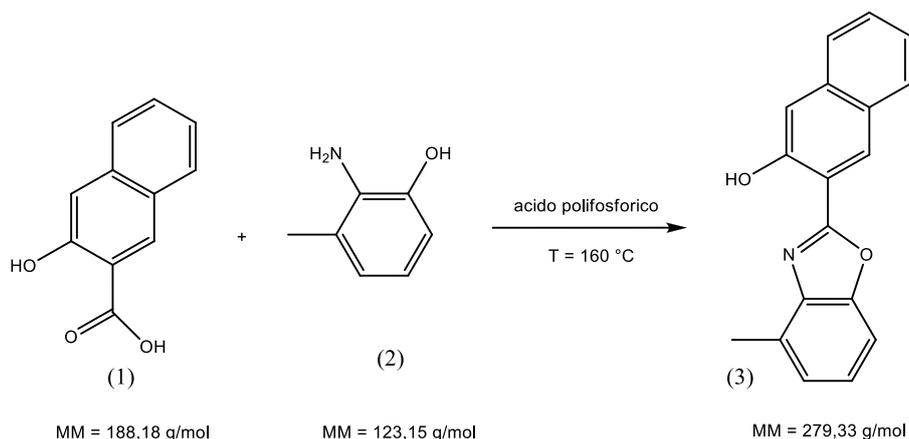


FIGURA N.26 – SINTESI 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3)

Il primo step della sintesi consiste in una reazione di condensazione tra il 2-ammino-m-cresolo e l'acido 3-idrossi-2-naftoico, reazione che avviene mediante rilascio di una molecola di acqua; tale reazione viene condotta in atmosfera inerte di N₂. La procedura sperimentale consiste nell'inserire in un pallone a 3 colli prima l'acido 3-idrossi-2-naftoico (solido di colore giallo) e successivamente il 2-ammino-m-cresolo (solido di colore marrone) in presenza di acido polifosforico che per le sue caratteristiche

liquescenti e per facilitarne il trasferimento nel pallone, viene scaldato mediante pistola termica. L'acido polifosforico ha la duplice funzione di essere utilizzato come solvente ad alta temperatura che da iniziatore acido per la reazione di formazione dell'anello ossazolico. Il sistema così realizzato viene scaldato fino a 160°C in un bagno a sabbia, in quanto il tradizionale bagno ad olio, non consente di giungere a temperature così elevate senza avere una degradazione dell'olio e quindi perdita del controllo della temperatura del sistema. Al termine della reazione monitorata con cromatografia su strato sottile TLC, il sistema, raffreddato, viene addizionata di acquasotto forte agitazione e successivamente, con molta attenzione, di Na_2CO_3 solido per permettere la neutralizzazione acido-base dell'ambiente di reazione. Pertanto si procede mediante debole agitazione per rendere il campione omogeneo prestando attenzione ad evitare rigonfiamenti della miscela che potrebbero portare a fuoriuscita e perdita del campione dovuti allo sviluppo di CO_2 . Il prodotto ottenuto di colore verde viene filtrato sottovuoto. Si sono svolte delle prove di solubilità del prodotto, dove risulta poco solubile a freddo in acetato di etile e bene a caldo, mentre si scioglie bene in cloroformio a temperatura ambiente.

A questo punto sono state svolte due procedure alternative per il work-up della reazione.

La prima prevede di isolare il prodotto mediante cromatografia su supporto solido con una colonna impaccata con n-esano su gel di silice. Si scioglie il prodotto in acetato di etile e si aggiunge una miscela eluente di acetato di etile/n-esano (1:50 in volume). Si raccolgono le aliquote d'interesse così da riuscire a separare ed isolare il prodotto desiderato ($R_f = 0,4$).

La seconda procedura, prevede l'impiego di un estrattore Soxhlet utilizzando n-esano come solvente estrattivo; questa procedura, nonostante preveda tempi lunghi di

estrazione dovuti alla scarsa solubilità di (3) in n-esano permette di ottenere direttamente il prodotto desiderato che cristallizza a freddo nel pallone di raccolta. Il prodotto desiderato (3) si presenta in entrambi i casi di colore rosso mattone.

2.1.2 Sintesi di 2-(2-metossimetilossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (4)

(4)

Lo step successivo ha riguardato la protezione selettiva della funzionalità ossidrilica, in quanto nelle fasi successive della sintesi, l'OH naftolico potrebbe andare ad interferire nelle successive reazioni di tipo S_N2 (FIGURA N.27).

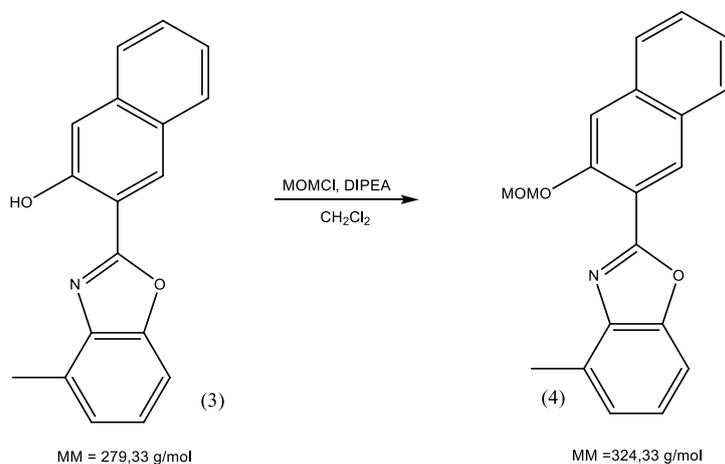


FIGURA N.27 – SINTESI 2-(2-metossimetilossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (4)

L'atomo di ossigeno naftolico è stato protetto con la funzione metossimetilica utilizzando il metossimetil-cloruro come agente protettivo in presenza di una base quale N,N'-diisopropiletilammina in diclorometano. Dopo aver terminato la reazione, è stata

aggiunto acqua per distruggere il metossimetil-cloruro in eccesso e per eliminare i sali di ammonio formati come prodotti dalla reazione. La fase organica ottenuta è raccolta mediante imbuto separatore e la fase acquosa estratta più volte con CH₂Cl₂; le fasi organiche sono riunite ed anidificate su Na₂SO₄ e il solvente evaporato a pressione ridotta ottenendo il prodotto desiderato solido di colore arancione.

2.1.3 Sintesi di 4-bromometil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo

(5)

Dopo aver protetto la funzionalità ossidrilica, si è passati alla funzionalizzazione del metile benzossazolo mediante bromurazione radicalica utilizzando NBS (N-bromosuccinimide) in presenza dell'iniziatore radicalico AIBN (2,2'-Azobis(2-metilpropionitrile)) come mostrato in FIGURA N.28.

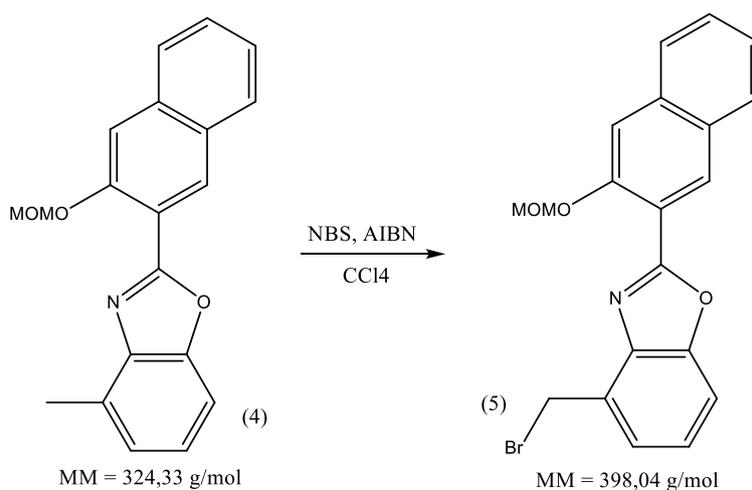


FIGURA N.28 – SINTESI 4-bromometil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo(5)

La reazione è stata effettuata mettendo il **(4)** insieme al reagente NBS in tetracloruro di carbonio utilizzato come solvente e scaldando il sistema a riflusso. Quando il sistema ha raggiunto lo stato di riflusso del solvente, si aggiunge con una spatola direttamente l'iniziatore AIBN. Nel monitoraggio della reazione si osserva la formazione oltre che del prodotto desiderato **(5)** mono-bromurato anche del di-bromurato (derivante da successiva bromurazione del mono-bromurato) questo quando ancora vi è la presenza del reagente **(4)**. La resa della reazione quindi si abbassa arrivando ad una resa del 48%) Utilizzando questa metodica è stata provata la sostituzione dell'iniziatore radicalico AIBN con un altro iniziatore, il benzoilperossido, senza avere dei riscontri positivi nella resa di reazione.

2.1.4 Sintesi di 2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)metilbenzossalo (6)

Nell'esplorazione di ottenere una miglior resa per l'attivazione del fluoroforo ad un successivo attacco ad una poliammina si è sondato la sostituzione del gruppo protettivo all'ossigeno naftolico utilizzando un derivato sililato. In questo caso, l'unità segnalatrice **(3)** è stata fatta reagire con l'agente protettivo TBDMSCl (tert-butildimetilsilil-cloruro) in presenza di una base quale l'imidazolo in DMF (N,N-dimetil-formammide) come solvente (FIGURA N.29).

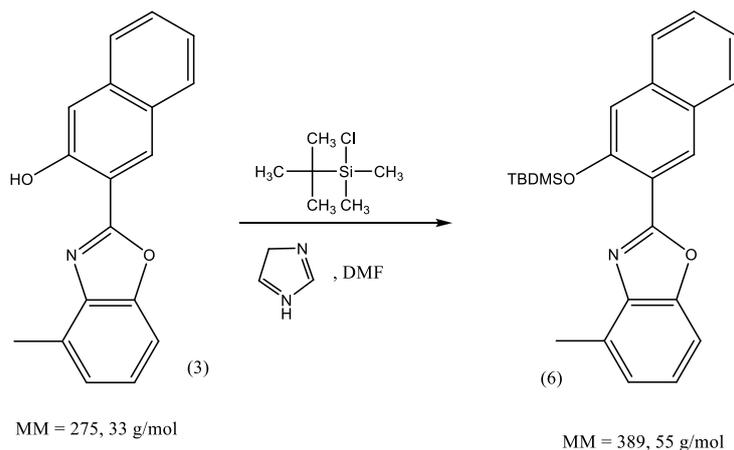


FIGURA N.29 – SINTESI 2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)metilbenzossazolo(6)

La procedura consiste nello sgocciolamento, tramite opportuno imbuto gocciolatore, della base imidazolo in DMF in un pallone a tre colli in atmosfera inerte di N_2 contenente il reagente HNBO e il TBDMSCl disciolti in DMF. La reazione è lasciata 12 h a $80\text{ }^\circ\text{C}$ sotto agitazione. Passato tale periodo, la reazione è andata a completamento e all'ambiente di reazione portato a temperatura ambiente e è aggiunta una soluzione acquosa al 5% di NaHCO_3 per eliminare il TBDMSCl in eccesso e neutralizzare l'ambiente di reazione. Si è osservato un cambiamento del colore della miscela da arancione limpido ad arancione con un precipitato biancastro. Si è estratto successivamente con n-esano formando una miscela bifasica con la fase sottostante acquosa di colore giallina limpida e la fase superiore organica di colore arancione. All'interfaccia delle due fasi si è formato un precipitato marrone monitorato con TLC dove risultavano esserci delle impurezze che sono state allontanate. La fase organica è stata raccolta e messa ad anidrificare su Na_2SO_4 anidro per rimuovere tracce di acqua. Il sistema filtrato e il solvente organico tirato a secco ottenendo il prodotto desiderato come solido di colore arancione (6).

2.1.5 Sintesi di 4-bromometil-2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)benzossazolo

(7)

Dopo aver protetto la funzionalità ossidrilica, si è passati alla funzionalizzazione del metile benzossazolo mediante bromurazione radicalica utilizzando NBS (N-bromosuccinimide) in presenza dell'iniziatore radicalico AIBN (2,2'-Azobis(2-metilpropionitrile)) come mostrato in FIGURA N.30.

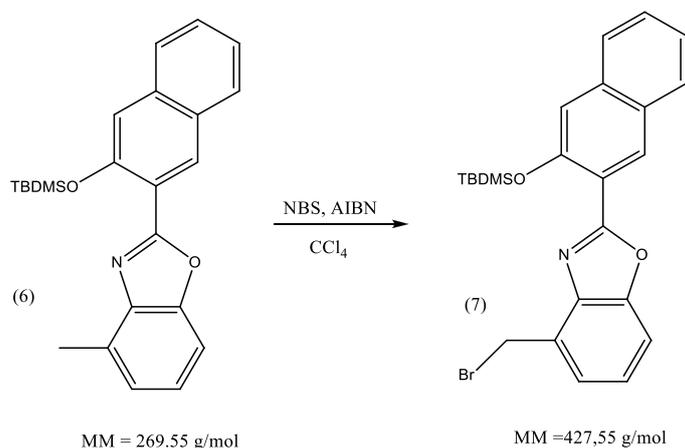


FIGURA N.30 – SINTESI 4-bromometil-2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)benzossazolo

(7)

La reazione è stata effettuata mettendo il (6) insieme al reagente NBS in tetracloruro di carbonio utilizzato come solvente e scaldando il sistema a riflusso. Quando il sistema ha raggiunto lo stato di riflusso del solvente, si aggiunge con una spatola direttamente l'iniziatore AIBN.

La reazione viene condotta a riflusso per 21 ore, poi si spegne la reazione e si lascia raffreddare a temperatura ambiente per poi mettere il pallone in bagno a ghiaccio. Si

osserva il formarsi di un precipitato, la succinimide (giallino), che viene rimossa mediante filtrazione.

Il grezzo di reazione viene tirato a secco al rotavapor ed aggiunto qualche millilitro di n-esano e si lascia precipitare in frigorifero.

Il prodotto può risultare ancora non puro, pertanto viene ripetuta più volte l'operazione di triturazione del solido con metanolo.

Il prodotto 4-bromometil-2-(2-tertbutil-dimetilsilil-3-naftil)benzossazolo si presenta di colore marroncino.

2.1.6 Sintesi unità 2,8-ditia-5-aza-[9] (2,6) piridinofano

(8)

La reazione di sintesi del macrociclo 2,8-ditia-5-aza-[9] (2,6) piridinofano⁵⁵(8), avviene mediante reazione di ciclizzazione tra una soluzione di N-(t-butossicarbonil)bis-(2-cloroetilammina) con la 2,6-ditiometil-piridina in presenza di Cs₂CO₃ in DMF anidra. (FIGURA N.31).

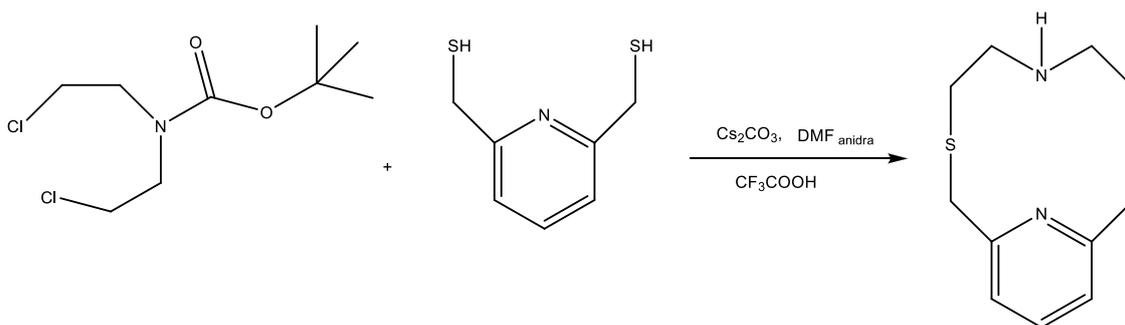


FIGURA N.31 – SINTESI 2,8-ditia-5-aza-[9] (2,6) piridinofano (8)

Al termine della reazione, che viene condotta a 50°C, si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si filtra. Il filtrato viene tirato a secco e recuperato con CH₂Cl₂ e lavato con acqua. Si estrae per rimuovere il sale CsCl. Il prodotto ottenuto viene successivamente deproteggato con acido trifluoroacetico ed in seguito il pH della soluzione viene portato a valori fortemente alcalini per evitare che l'ammina secondaria rimanga protonata.

2.2 Sintesi dei Leganti L₁, L₂, L₃, L₄ contenenti l'unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3)

I leganti sintetizzati sono stati tutti realizzati utilizzando l'unità fluorofora 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3) opportunamente protetta e attivata per l'accoppiamento con il bromo derivato precedentemente descritto (7). Tale unità è stata fatta reagire con diverse unità amminiche o poliamminiche ottenendo i vari sistemi chemosensori mostrati in FIGURA N.32.

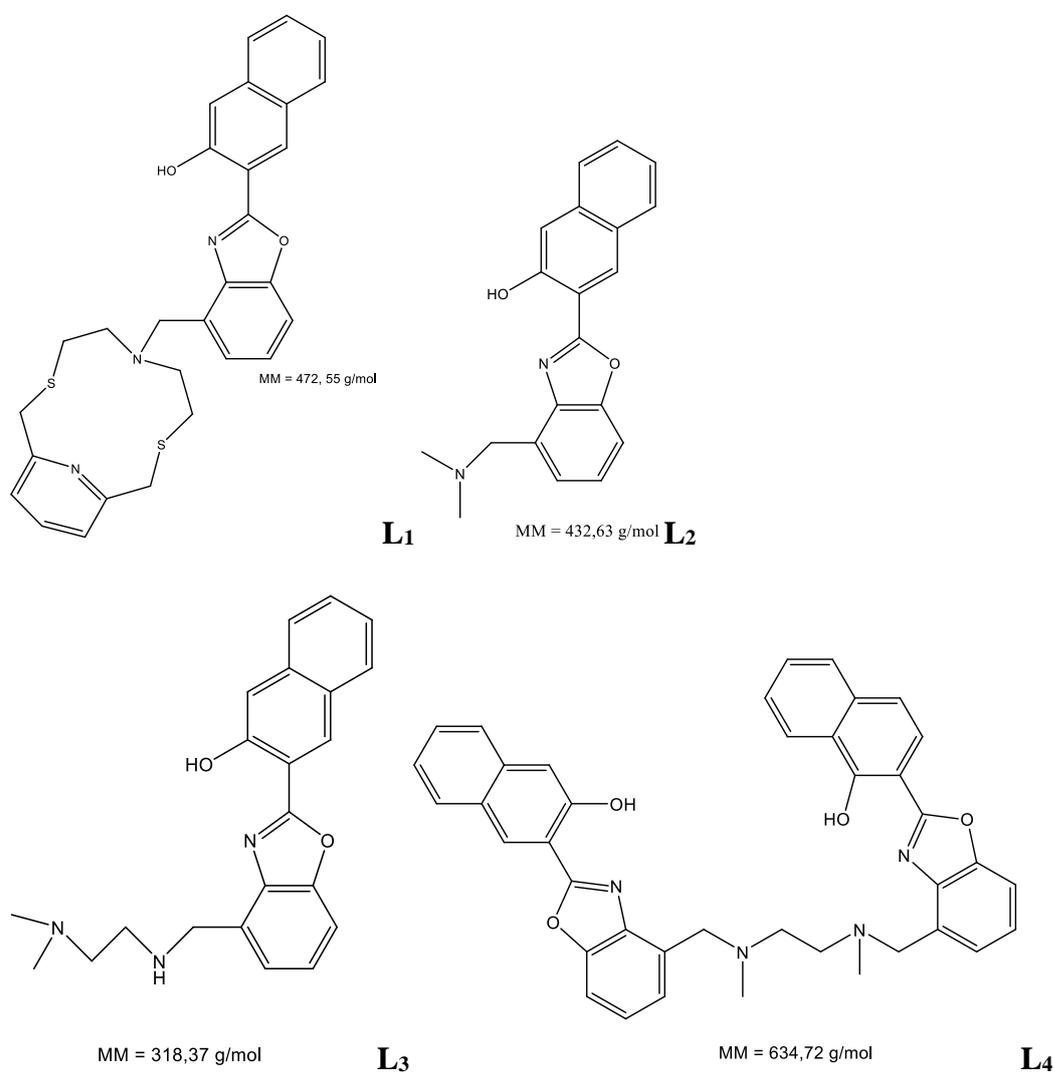


FIGURA N.32 – LEGANTI L₁, L₂, L₃ ed L₄ sintetizzati

Il legante 5-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza-[9](2,6)-piridinofano (**L1**), è stato realizzato secondo lo schema sottostante facendo reagire il composto (**7**) in presenza dell'unità recettiva (**8**) in presenza di acetonitrile utilizzando una base quale carbonato di potassio (K_2CO_3); l'accoppiamento è stato condotto alla temperatura di 50°C in quanto a temperatura ambiente la reazione non avveniva mentre a temperatura superiore si ottiene una minor resa di reazione dovuta alla labilità del bromo-derivato (FIGURA N.33).

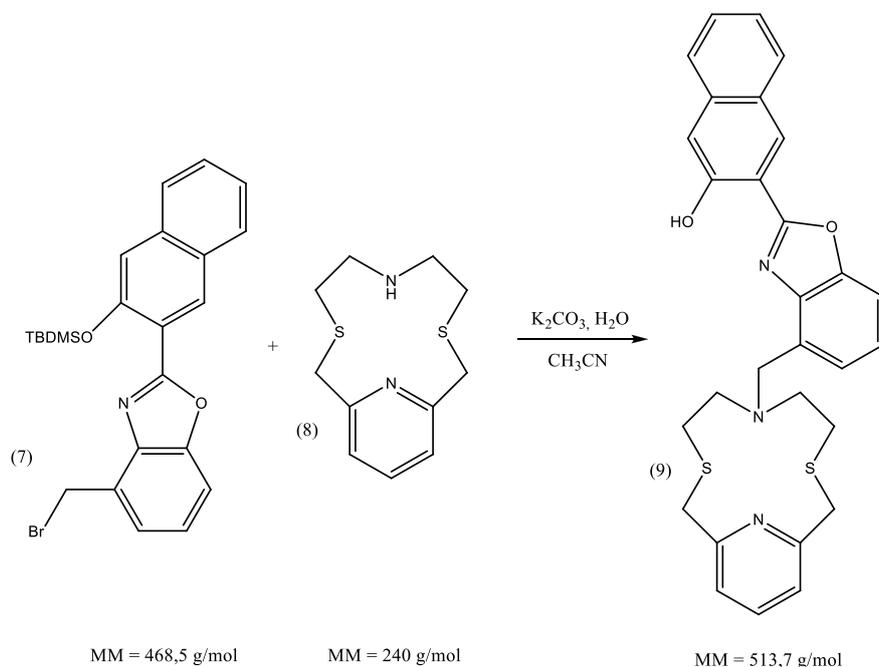


FIGURA N.33 Schema sintesi 5-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza-[9] (2,6)-piridinofano (**L1**)

La sintesi del legante N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (**L2**), avviene a partire dalla reazione S_N2 tra il composto bromurato (**7**), la N,N'-dimetilammina in acetonitrile a temperatura ambiente, secondo quanto riportato nel seguente schema in FIGURA N.34.

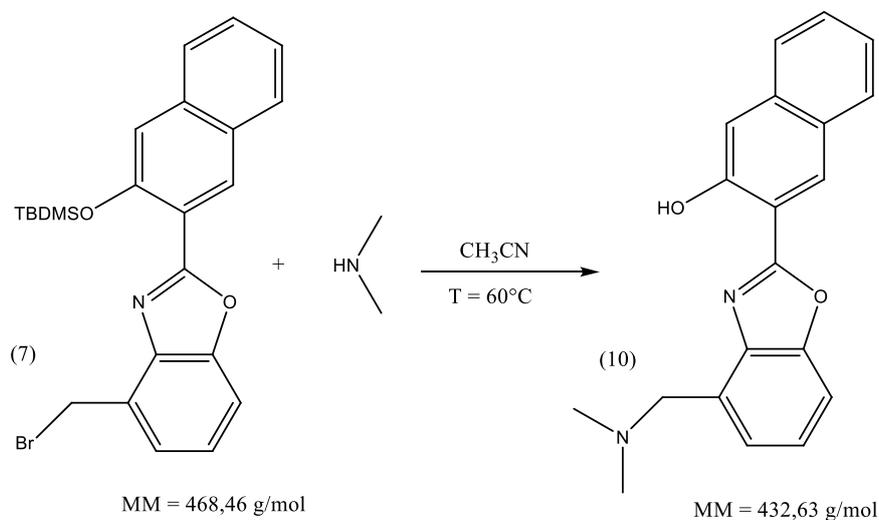


FIGURA N.34 Schema sintesi N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (L₂)

Questa reazione è stata condotta anche facendo reagire del composto bromurato protetto. Il composto bromurato, disciolto in acetonitrile, è stato fatto sgocciolare all'interno di un pallone contenente l'ammina a temperatura ambiente in atmosfera inerte. La reazione di sostituzione nucleofila S_N2 si è svolta in breve tempo, dopo 1 ora e mezza era giunta a completamento. Il prodotto ottenuto risulta ancora protetto, pertanto si è scaldato il sistema a 60°C per fare avvenire completamente la deprotezione del naftolo.

La miscela ottenuta si presenta arancione scura e tirando a secco all'evaporatore rotante, si ottiene un solido di colore arancione. Il solido viene disciolto in CH₂Cl₂ ed estratto in una soluzione satura di Na₂CO₃. In ambiente basico si riforma il sale inorganico (CH₃)₂NHBr che si desidera rimuovere dal sistema.

Nell'imbuto separatore si ritrova la fase organica nella parte inferiore avente colore arancione, mentre in quella superiore risulta essere presente quella acquosa d'aspetto biancastro con delle tonalità arancioni. La fase organica così ottenuta, viene raccolta, si

lava con etere dietilico e si tira a secco all'evaporatore rotante, ottenendo il prodotto desiderato.

La sintesi del legante N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletilendiammina(L₃), si realizza mediante reazione di sostituzione nucleofila S_N2 tra il (7) e la N,N',N''-trietiletilendiammina (TMEA) in presenza di CH₃CN e CH₂Cl₂ (FIGURA N.35).

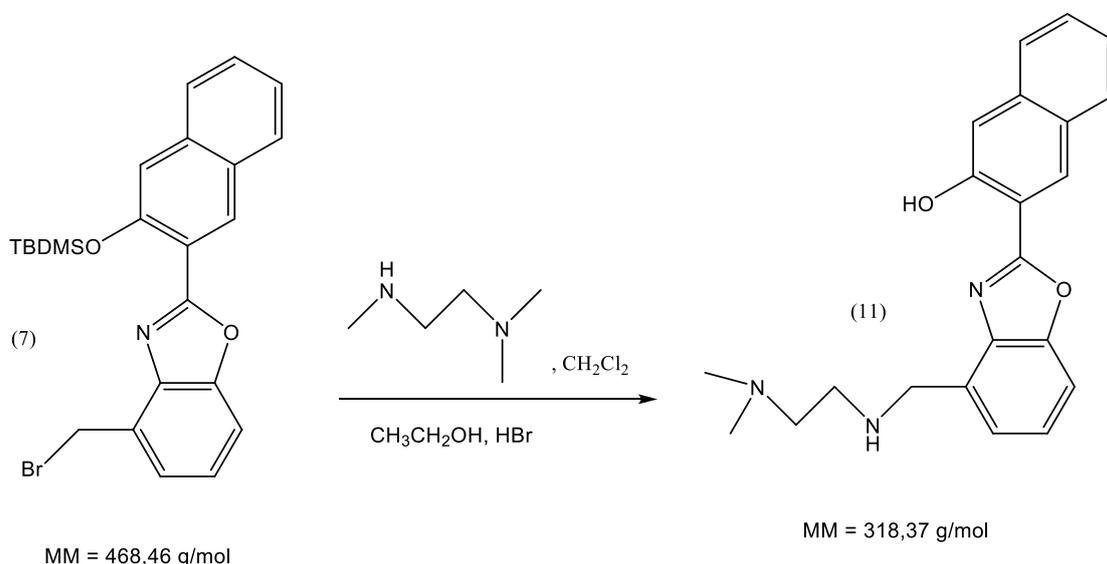


FIGURA N.35 Schema sintesi N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletilendiammina (L₃)

In un pallone a 3 colli si introducono N,N',N''-trietiletilendiamminain presenza di acetonitrile in atomesfera inerte in presenza di N₂.Il reagente bromurato (7)si solubilizza in una miscela di acetonitrile/diclorometano (10:2 v/v) e si introduce in imbuto gocciolatore.Si sgocciola la miscela contenente (7) all'interno del pallone di reazione. Si ottiene una miscela di reazione dal colore arancione. La reazione di

formazione del legante **L3** è stata condotta a temperatura ambiente. La miscela si presenta di colore arancione scuro, si rimuove la miscela di solventi mediante evaporatore rotante. Si aggiunge etanolo in presenza di HBr, per ottenere il legante come sale bromidrato.

Si forma un precipitato rosso (**L3**), che viene isolato dalla miscela mediante filtrazione e si rimuovono le tracce di solvente mediante essiccatore.

La sintesi del legante N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N'-dietilendiammina (**L4**) è stata effettuata come riportato nello schema successivo facendo reagire il composto (**7**) in eccesso (2:1) molare rispetto all'ammina N,N'-di-etilendiammina in presenza di carbonato di potassio scaldando il sistema a 50°C per tutta la notte (FIGURA N.36).

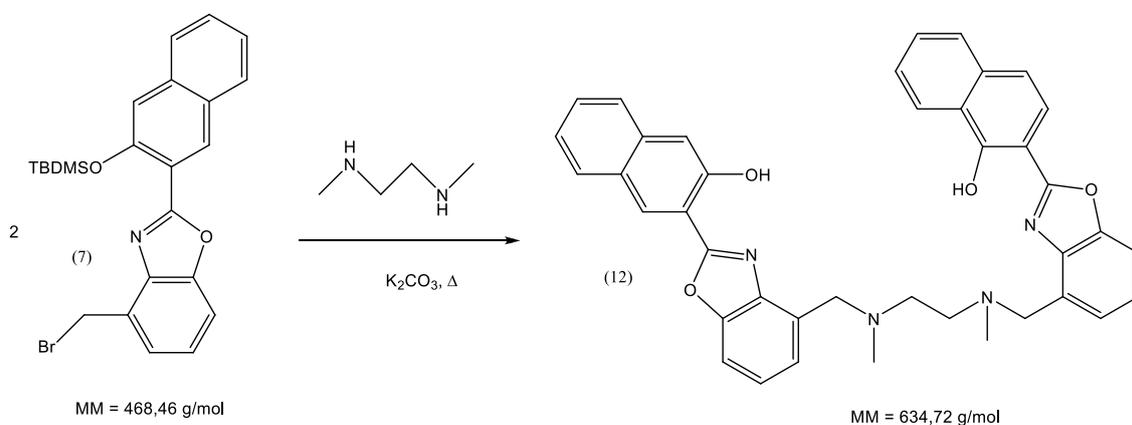


FIGURA N.36 Schema sintesi di N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N'-di-etilendiammina (**L4**)

Il composto (**7**) si scioglie in acetonitrile, scaldando leggermente per non degradare il composto bromurato. La soluzione che si realizza, si presenta di colore arancione e si

introduce dentro l'imbuto gocciolatore. Il pallone di reazione contenente l'ammina, il K_2CO_3 e acetonitrile si presenta torbida con il carbonato che rimane in sospensione.

La miscela di reazione si scalda a $50^\circ C$ per poi sgocciolare lentamente il composto bromurato (7) precedentemente disciolto. Al termine dello sgocciolamento, la miscela si presenta di colore rosa-arancione, col carbonato di potassio che rimane in sospensione.

Si filtra la miscela per rimuovere il carbonato e sali bromurati dell'ammina mediante filtrazione e si rimuove il solvente all'evaporatore rotante. Il prodotto ottenuto (L4) si presenta gommoso a causa di impurità presenti, pertanto si è prova a rimuoverle mediante cristallizzazione del prodotto con n-esano. Durante il processo di evaporazione del solvente, è possibile ottenere la precipitazione del prodotto. Una considerazione fatta al termine della procedura di sintesi del legante, è quella di considerare la presenza di prodotto anche sul filtro dove era presente il carbonato di potassio, in quanto parte del prodotto risultava insolubile in acetonitrile.

2.3 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3) ai cationi metallici

E' stato condotto uno studio preliminare del comportamento fotoattivo dell'unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3) in soluzione in presenza di vari ioni metallici per valutare la possibile interazione diretta dell'unità fotosensibile.

Gli studi seguenti, hanno mostrato come non avvengano cambiamenti negli spettri in assorbimento ed emissione UV-Visibile con la presenza in soluzione di uno ione metallico di quelli testati. Ad esempio, come mostrato in FIGURA N.37, durante la titolazione con lo ione Zn^{2+} non si osserva alcuna variazione dello spettro di

assorbimento che suggerisce quindi che tale ione metallico non vada a perturbare l'intorno chimico della funzionalità ossidrilica del naftoloe quindi non sia coordinato da essa in queste condizioni.

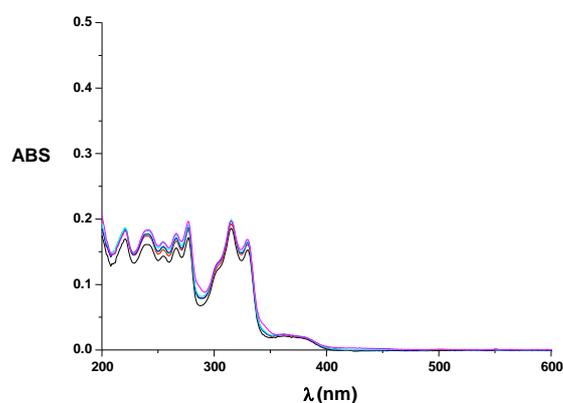


FIGURA N.37 – Titolazione UV-Vis di (3) con $Zn(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 6,15 * 10^{-6} M; Zn(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Anche lo spettro in emissione mostra simili risultati e quindi assenza della variazione di emissione con l'aggiunta di 10 equivalenti di ione zinco; in questo caso comunque, l'aggiunta di un largo eccesso di ione metallico (> 100 equivalenti) produce unincremento, seppur modesto, dell'emissione denotando un'interazione almeno in queste condizioni (FIGURA N.38).

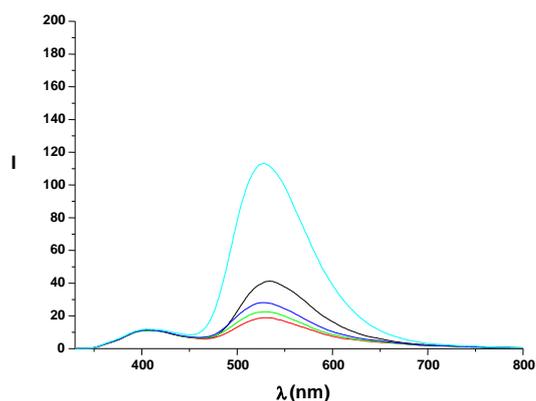


FIGURA N.38 –Titolazione in Fluorescenza di (3) con $Zn(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$[L] = 6,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $Zn(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$, infine forte eccesso di Zn^{2+} ($> 100 \text{ eq}$)

La titolazione dell'unità (3) con una base forte quale l'idrossido di tetrabuttilammonio (TBAOH), mostra come l'unità naftolica abbia proprietà acido-base e venga deprotonata dalla presenza di OH^- ; questo produce la comparsa di una nuova banda a 450 nm nello spettro di assorbimento UV-Vis (FIGURA N.39) mentre in emissione si osserva un grosso incremento dell'intensità e uno spostamento del massimo di emissione da 425 nm a 570 nm.

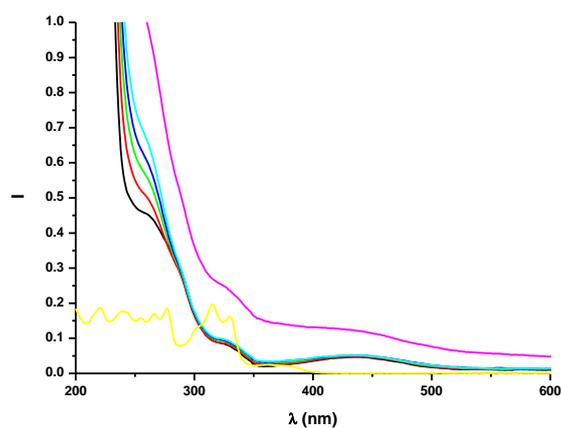


FIGURA N.39 – Titolazione UV-Vis di (3) in presenza di TBAOH con $Zn(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$[L] = 6,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $Zn(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$

Il fluoroforo deprotonato è stato poi titolato con aggiunte di $Zn(ClO_4)_2$ che ha determinato una piccola variazione dello spettro di assorbimento ma una diminuzione netta dell'intensità di emissione (FIGURA N.40). Questo significa che l'unità fluorofora da sola è in grado di coordinare lo ione $Zn(II)$ coinvolgendo l'atomo di ossigeno naftolico.

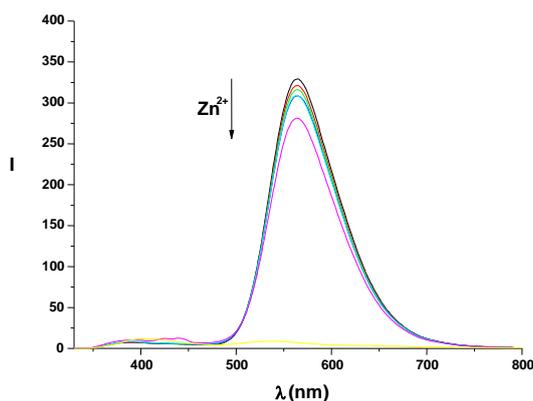


FIGURA N.40– Titolazione in Fluorescenza di (3) in presenza di TBAOH con $Zn(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;
 $[L] = 6,15 \cdot 10^{-6} M$; $Zn(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 eq.$

Al contrario l'unità (3) non è in grado di interagire con ioni metallici hard quale $Mg(II)$, infatti l'aggiunta di Mg^{2+} non determina cambiamenti nello spettro d'assorbimento (FIGURA n.41).

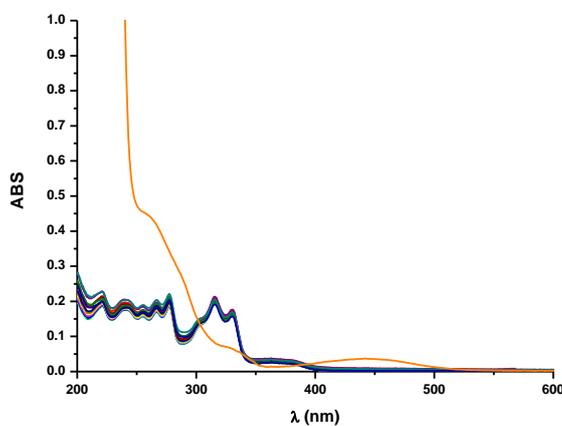


FIGURA N.41 – Titolazione UV-Vis di (3) con $Mg(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K ed eccesso finale di TBAOH;

$$[L] = 6,15 * 10^{-6} M; Mg(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Lo stesso ragionamento può essere applicato allo spettro d'emissione dove la titolazione dell'unità HNBO con Mg^{2+} , non modifica lo spettro in emissione. L'aggiunta di TBAOH, va a deprotonare l'unità naftolica del HNBO, generando un segnale in emissione. Anche questi dati sperimentali, vanno a dimostrare come l'unità HNBO da sola non possa interagire con ioni metallici, pertanto si richiede la presenza di unità recettive ad essa collegata, per la coordinazione di ioni metallici (FIGURA N.42).

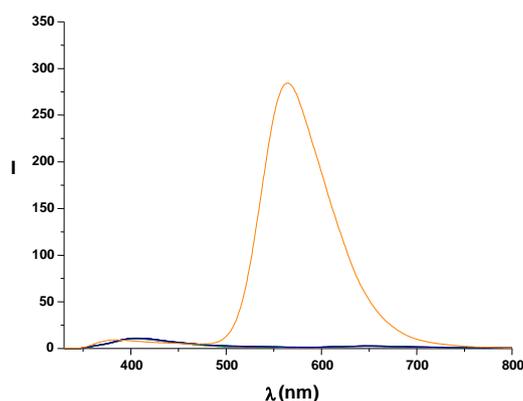


FIGURA N.42 – Titolazione in Fluorescenza di (3) con $Mg(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K ed eccesso finale di

$$TBAOH; [L] = 6,15 * 10^{-6} M; Mg(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Si è provato a titolare l'unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**3**) in presenza di TBAOH con Mg^{2+} . Dopo essersi formata la forma deprotonata, non ci sono cambiamenti spettrali interessanti per la coordinazione con il Mg^{2+} , ma solo una modifica delle bande a valori inferiori a $\lambda = 316 \text{ nm}$. (FIGURA N.43).

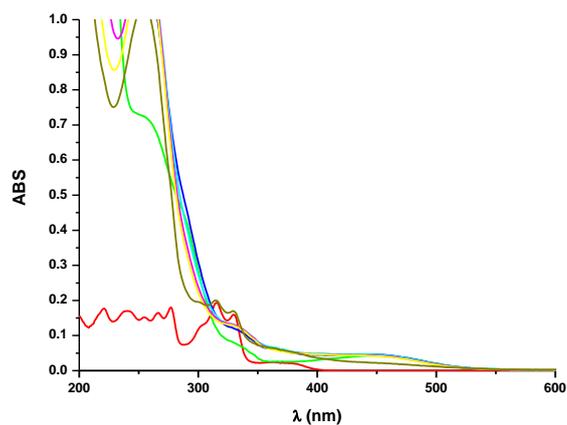


FIGURA N.43 – Titolazione UV-Vis di (3) in presenza di TBAOH con $Mg(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 6,15 * 10^{-6} \text{ M}; Mg(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Lo spettro in emissione dell'unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**3**) in presenza di TBAOH con aggiunte di Mg^{2+} , mostra come lo il segnale in emissione venga a spegnersi (FIGURA N.44).

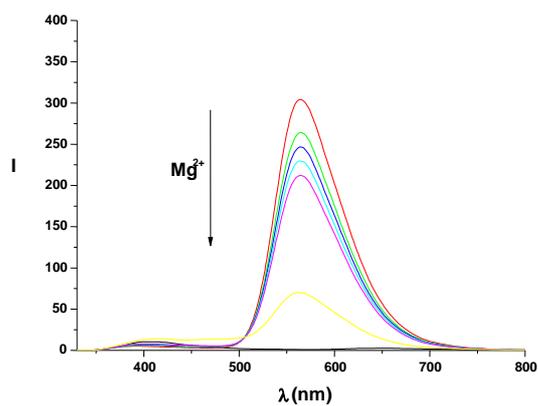


FIGURA N.44 – Titolazione in Fluorescenza di (3) in presenza di TBAOH con $Mg(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298

$$K; [L] = 6,15 * 10^{-6} \text{ M}; Mg(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Le considerazioni fatte per la curva di titolazione in assorbimento dell'unità HNBO in presenza di TBAOH per il Mg^{2+} , sono analoghe per lo Zn^{2+} , dove a seguito della deprotonazione in presenza della base, la curva d'assorbimento nel corso della titolazione con Zn^{2+} rimane costante.

2.4 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di 5-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza[9](2,6)-piridinofano (L_1) ai cationi metallici

Il legante L_1 è costituito da un'unità (**3**) collegata al macrociclo eteroatomico 2,8-ditia-5-aza-[9](2,6) piridinofano mediante un legame amminico $N-CH_2$. Tale macrociclo è capace di preorganizzarsi per poter legare cationi metallici soft e borderline grazie alle possibili interazioni degli atomi di N e di S. La presenza di un'unità recettiva costituisce un aspetto importante per i recettori sintetici, in quanto esistono in natura molti siti catalitici biologici, come ad esempio siti attivi metallo-enzima, costituite da coppie di ioni metallici vicine tra di loro. I fattori che regolano la coordinazione e l'interazione tra "host-guest" vanno a ricercarsi nella natura degli atomi donatori, nelle esigenze geometriche della sfera di coordinazione, quindi nel tipo di pre-organizzazione del legante che deve essere adatta a stabilizzare al massimo lo ione metallico. Di seguito vengono illustrati gli spettri in assorbimento UV-Vis (FIGURA N.45) ed in Fluorescenza (FIGURA N.46) con Cd^{2+} in acetonitrile.

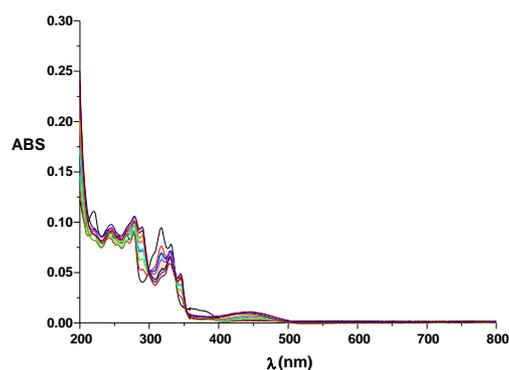


FIGURA N.45 - Titolazione UV-Vis di L_1 con $Cd(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 5,4 * 10^{-6} \text{ M}; Cd(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 1 \text{ eq.}$$

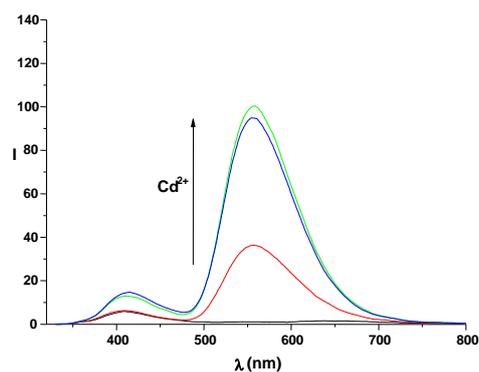


FIGURA N.46- Titolazione in Fluorescenza di L_1 con $Cd(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 5,4 * 10^{-6} \text{ M}; Cd(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 1 \text{ eq.}$$

Come ione soft modello è stato scelto il Cd(II), in quanto essendo a configurazione elettronica d^{10} ha un comportamento fotochimico facilmente interpretabile. Le interazioni del legante L_1 , mostrano come l'aggiunta di titolante di Cd^{2+} , aumenti la banda in assorbimento a 450 nm tipica della specie chetonica, mentre nello spettro in fluorescenza aumenta la banda in emissione a 560 nm. Un comportamento analogo è

comunque stato osservato anche per l'aggiunta di ione Zn^{2+} , quindi il legante non è selettivo verso questi due ioni metallici (FIGURE N.47 e N.48). L'aumento dell'intensità della banda di emissione a 560 nm è dovuta principalmente alla stabilizzazione della forma carbonilica del fluoroforo indotta dalla coordinazione dello ione metallico, evidenziata anche dalla crescita della banda di assorbimento a 450 nm, e dal coinvolgimento dei doppietti degli atomi donatori del macrociclo che minimizzano il quenching della fluorescenza dovuto a PET, come evidenziato dal fatto che la coordinazione non incrementa solo l'emissione della forma carbonilica a 560 nm ma anche quella della forma ossidrilica a 425 nm.

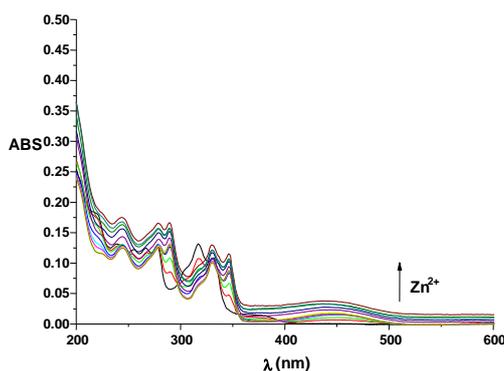


FIGURA N.47 - Titolazione UV-Vis di L₁ con Zn(ClO₄)₂ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 5,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}; \text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

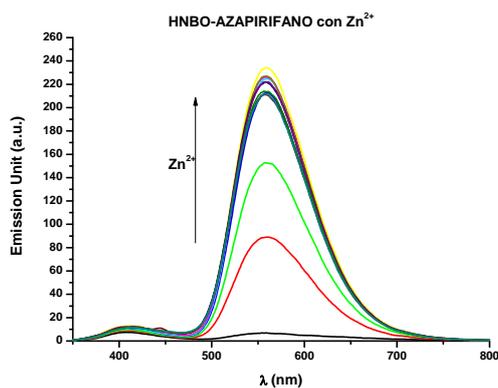


FIGURA N.48 - Titolazione in Fluorescenza di L₁ con Zn(ClO₄)₂ in acetonitrile a 298K;

$$[L] = 5,4 * 10^{-6} \text{ M}; \text{Zn(ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Sono state condotte titolazioni con altri cationi metallici di natura soft, come Pd(II), Pt(II), Pb(II) e Hg(II). Gli spettri di assorbimento relativi alla titolazione di L₁ con il Pd²⁺ sono riportati in (FIGURA N.49). Lo ione metallico interagisce con il legante favorendo la comparsa della banda carbonilica, ma in fluorescenza la risposta è uno spegnimento totale dell'emissione dovuta all'effetto del metallo pesante.

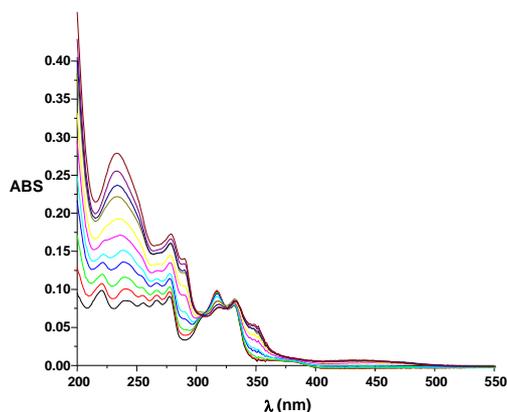


FIGURA N.49 - Titolazione UV-Vis di L₁ con K₂PdCl₄ in acetonitrile a 298K;

$$[L] = 5,4 * 10^{-6} \text{ M}; \text{K}_2\text{PdCl}_4 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Sono state condotte titolazioni in competizione tra lo Zn²⁺ e il Pd²⁺, per capire quale dei due ioni fosse più affine a L₁. In base alle misure spettrofotometriche svolte, come già affermato, lo ione Pd²⁺ interagisce con il chemosensore L₁, determinando uno

spegnimento della risposta emissiva in fluorescenza, mentre con lo Zn^{2+} si assiste ad un aumento dell'emissione. Pertanto, a seguito di una prima titolazione del legante L_1 con Zn^{2+} e conseguente aumento dell'emissione in fluorescenza si è proceduto a titolare con lo ione Pd^{2+} il complesso di Zn (II), altamente fluorescente a 560 nm.

I dati ottenuti dalla titolazione, mostrano come la fluorescenza diminuisca aggiungendo lo ione Pd^{2+} e il segnale in emissione caratterizzato si sposta da 560 a 550 nm. Questo significa che lo ione Pd(II) è in grado di spostare lo ione Zn(II) dal complesso, come ci si aspettava dal suo maggior carattere soft (FIGURE N. 50 e N.51).

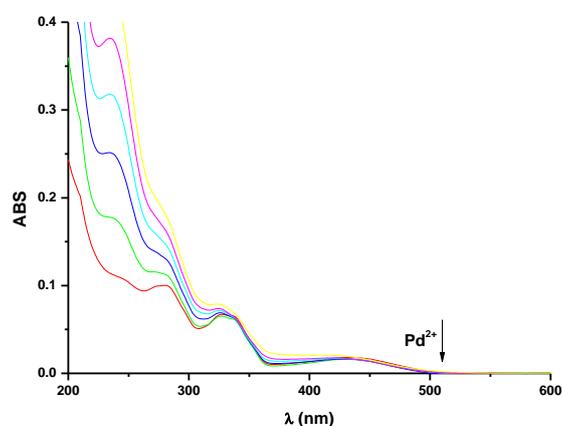


FIGURA N.50 - Titolazione UV-Vis di L_1 -Zn con K_2PdCl_4 in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 5,4 * 10^{-6} M; K_2PdCl_4 = 0 \rightarrow 1 \text{ eq.}$$

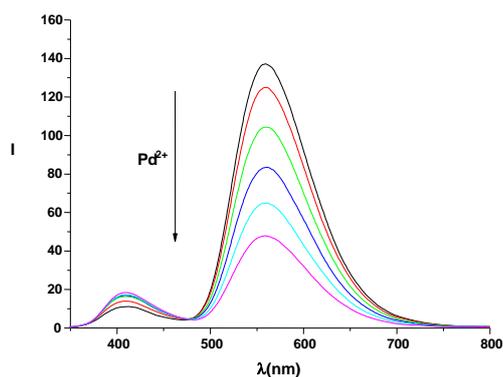


FIGURA N.51 - Titolazione in Fluorescenza di L_1 -Zn con K_2PdCl_4 in acetonitrile a 298 K;
 $[L] = 5,4 * 10^{-6}$ M; $K_2PdCl_4 = 0 \rightarrow 1$ eq.

Il legante L_1 , si presenta come un macrociclo etero-atomico, costituito dalla presenza di atomi di S, aventi un raggio ionico grande, dai quali ci si aspetta un comportamento “soft” dell’unità recettiva e dalla presenza degli atomi di N dalle caratteristiche “hard”. Nella coordinazione L_1 si mostra come risultano coordinati ioni metallici con caratteristiche “hard” e “border-line”, come del resto ci si aspettava.

Studi analoghi pregressi sull’unità recettiva 2,8-ditia-5-aza-2,6-piridinofano, mostrano come la fluorescenza di tale legante sia funzione dell’inibizione dei processi di PPT (Intramolecular Photoinduced Proton Transfer) e PET (Photoinduced Electron Transfer) ad esempio nella coordinazione con il Cd^{2+} in rapporti 1:1. In letteratura, bassi valori di fluorescenza attribuibili a leganti simili, sono dovuti a due diversi meccanismi chiamati PPT (Intramolecular Photoinduced Proton Transfer) tra l’idrogeno (quello degli azoti protonati, in caso di pH acidi) e l’azoto benzossazolico e PET (Photoinduced Electron Transfer) tra gli atomi di azoto del macrociclo e l’unità fluorofora (**3**). E’ importante notare come sia possibile strutturare l’unità segnalatrice in funzione dell’unità recettiva,

in quanto quest'ultima è deputata all'interazione principale e diretta con il substrato. Questa tipologia di legante si chiama chemosensore coniugato dove l'unità recettiva(8) è legata covalentemente all'unità segnalatrice attraverso uno spaziatore-N-CH₂. Esistono anche leganti costituiti da una singola unità che si comporta da segnalatrice ed interagisce direttamente con lo ione metallico guest e si chiamano chemosensori indotti.

Le prove eseguite hanno mostrato come il legante dia una risposta fotochimica di accensione "switch on" quando il legante **L₁** interagisce con gli ioni Zn²⁺ e Cd²⁺.

L'emissione del legante in funzione del pH evidenzia come il legante emetta a pH alcalini con un picco massimo a pH = 9.54. Questa considerazione è importante, perché proprio l'ambiente basico, favorisce il deprotonamento dell'ossidrile naftolico (pK_a = 9, 57) con conseguente prevalenza della forma chetonica nell'equilibrio "cheto-enolico" che si viene a realizzare. Altre considerazioni possono essere fatte sul solvente:utilizzando un solvente organico come ad esempio acetonitrile, si è ottenuta una risposta emissiva nel visibile maggiore rispetto al solvente acquoso;in quanto le molecole d'acqua, possono solvatare l'anione ossidrilico, impedendo la formazione della specie chetonica. Inoltre per le sue proprietà, l'acqua è conosciuto come agente di spegnimento della radiazione luminosa in fluorescenza.

Nella forma deprotonata si osserva come nello spettro ¹H-NMR, il segnale degli H a 3.8 ppm relativo agli H in posizione 4 del macrociclo piridinico, siano presenti come un singoletto. A seguito di coordinazione del legante **L₁** con lo ione Zn²⁺, si nota come il segnale subisca uno shift a δ = 4.4 ppm e a δ = 4.6 ppm con due doppietti. Questa informazione può confermare l'ipotesi che, a seguito d'interazione dello ione metallico col chemosensore, la parte macrociclica sia coinvolta direttamente nella coordinazione.

I segnali così ottenuti possono dimostrare come gli H siano disposti in posizioni simmetriche lungo un piano di simmetria.

E' stata effettuata una titolazione in spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ (FIGURA N.52) del legante L_1 con lo ione Zn^{2+} . Lo spettro ottenuto mostra come il segnale degli H in posizione 7, relativi al $-\text{CH}_2$ legato all'ammina terziaria del macrociclo, subisca uno spostamento dalla forma deprotonata ($\delta = 4$ ppm) a quella coordinata con lo Zn^{2+} ($\delta = 4,2$ ppm).

Il confronto tra lo spettro del legante complessato in presenza di base con il legante deprotonato, mostra come nella complessazione con lo Zn^{2+} la presenza della forma deprotonata sia analoga al legante presente da solo in presenza del TBAOH.

Pertanto il legante complessato si presenta analogamente nella forma libera deprotonata, con scomparsa del H naftolico e stabilizzazione del $-\text{CH}_2$ amminico legato alla funzionalità benzossazolonica.

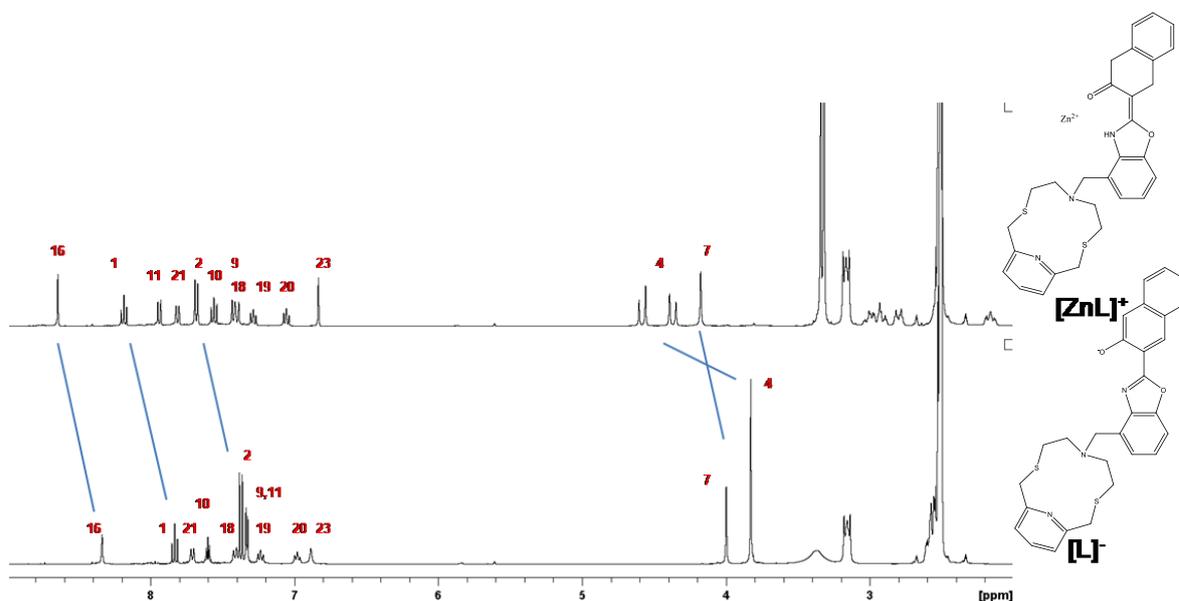


FIGURA N.52- SPETTRO $^1\text{H-NMR}$ RISPETTIVAMENTE DELLE FORME: $[\text{ZnL}_1]^+$ E $[\text{L}_1]^-$.

I segnali relativi allo spettro al ^{13}C mostrano come il C in posizione 5, subisca uno spostamento chemical shift da 25 ppm nella forma deprotonata L_1^- , a 33 ppm nella forma complessata con lo Zn^{2+} . Anche i C in posizione 6 e 7 subiscono spostamento verso campi più alti, a dimostrazione che il macrociclo interagisce con lo ione metallico come mostrato in FIGURA N.53.

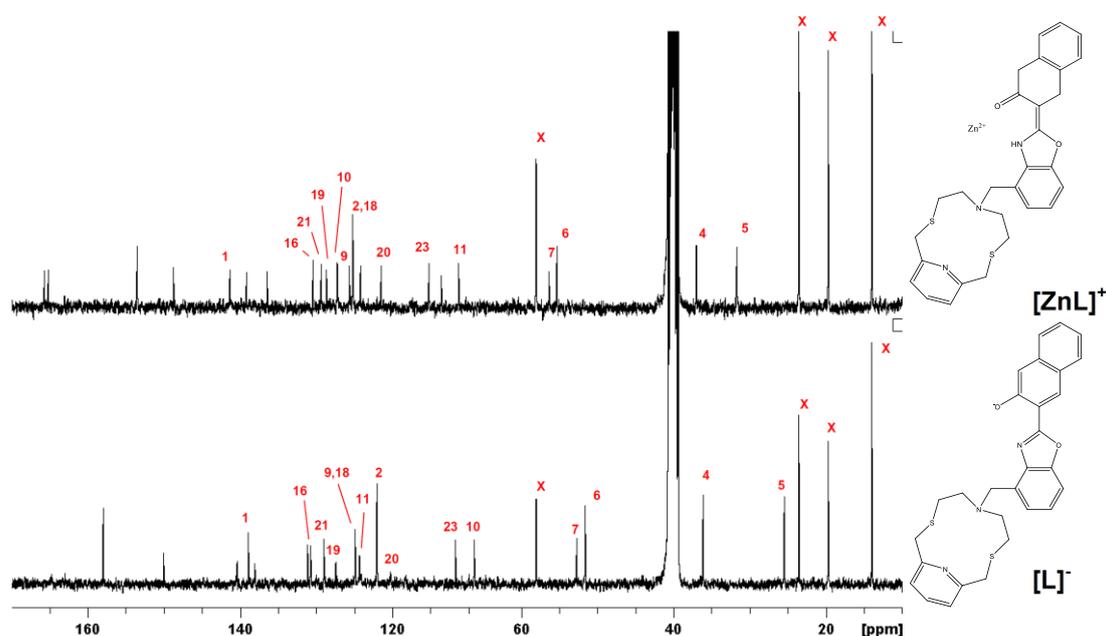


FIGURA N.53 – SPETTRI AL ^{13}C RISPETTIVAMENTE PER $[\text{ZnL}_1]^+$ E $[\text{L}_1]^-$.

I complessi che si realizzano dalla coordinazione con lo Zn^{2+} (FIGURA N.54) e con il Cd^{2+} (FIGURA N.55), mostrano la formazione di specie a diverso grado di protonazione (visibile nello spettro nella zona aromatica ed in quella alifatica), la cui forma deprotonata interagisce direttamente con l'analita d'interesse. In presenza di TBAOH, si viene a formare solamente la specie deprotonata.

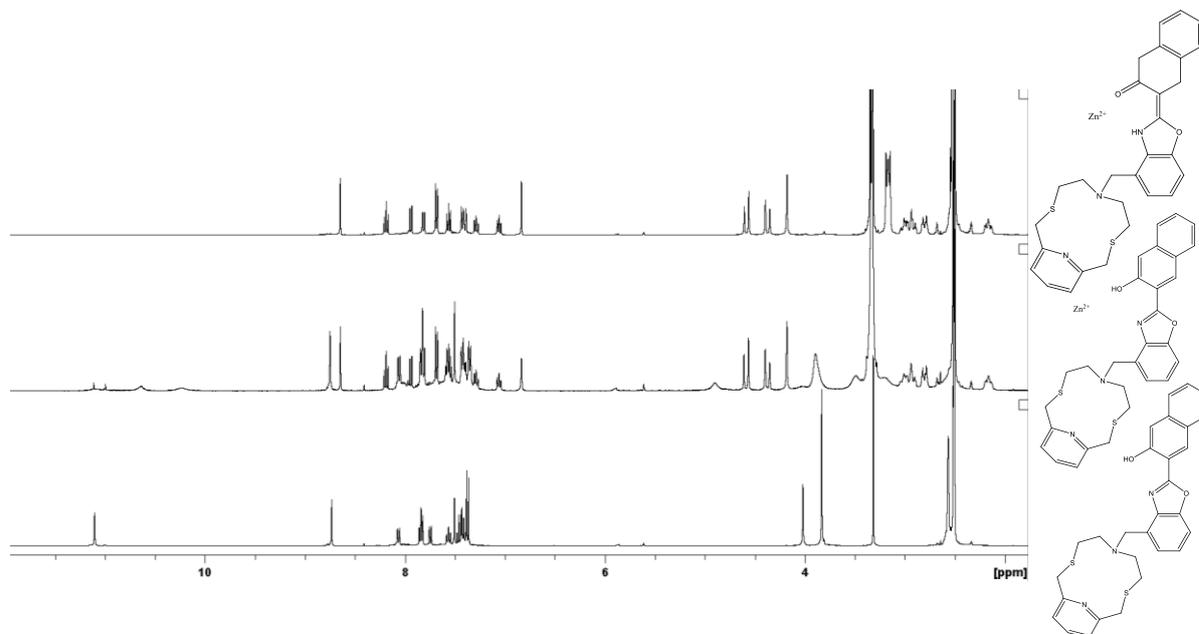


FIGURA N.54 – SPETTRI AL ^1H RISPETTIVAMENTE PER $[\text{ZnL}_1]^+$, $[\text{ZnHL}_1]^{2+}$ E $[\text{HL}_1]$.

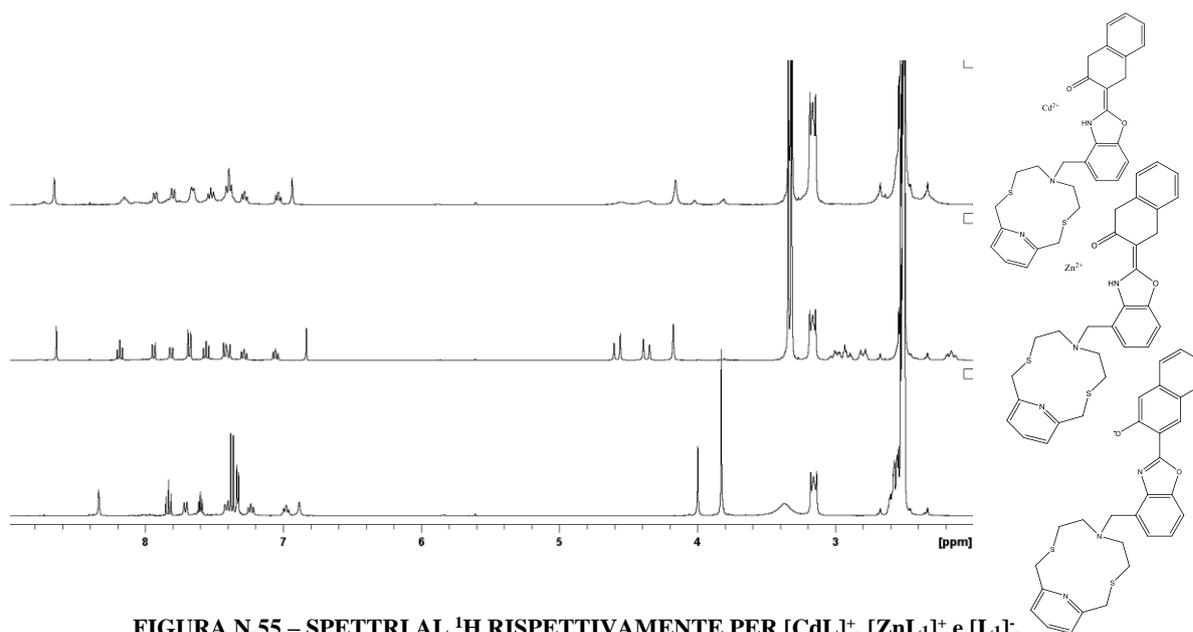


FIGURA N.55 – SPETTRI AL ^1H RISPETTIVAMENTE PER $[\text{CdL}]^+$, $[\text{ZnL}_1]^+$ e $[\text{L}_1]$.

Il chemosensore L_1 esibisce una diversa emissione luminosa nelle sue diverse forme di protonazione e coordinazione con lo Zn^{2+} , con una colorazione più spostata verso lunghezze d'onda maggiori per la specie deprotonata (FIGURA N.56).

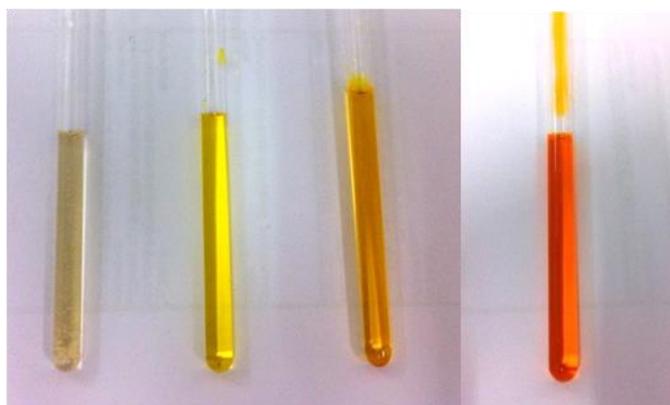


FIGURA N.56-FOTO LEGANTE IN DIVERSE FORME ALLA LUCE VISIBILE DA SINISTRA VERSO

DESTRA: $[HL_1]$, $[ZnHL_1]^{2+}$, $[ZnL_1]^+$, $[L_1]$.

L'immagine del legante L_1 in forma deprotonata si presenta di colore arancione, mentre le due forme complessate con Zn^{2+} e Cd^{2+} , si presentano giallo scuro (FIGURA N.57).



FIGURA N.57 - FOTO LEGANTE IN DIVERSE FORME ALLA LUCE VISIBILE DA SINISTRA VERSO

DESTRA: $[L]$, $[ZnL]^+$, $[CdL]^+$.

L'immagine sotto riportata, mostra come il legante in forma libera, in presenza di radiazione ultravioletta, presenti un'acolorazione azzurra, mentre in forma deprotonata cambia diventando di colore violacea. Le specie complessate con Zn^{2+} e Cd^{2+} , invece si presenta di colore giallo (FIGURA N.58).

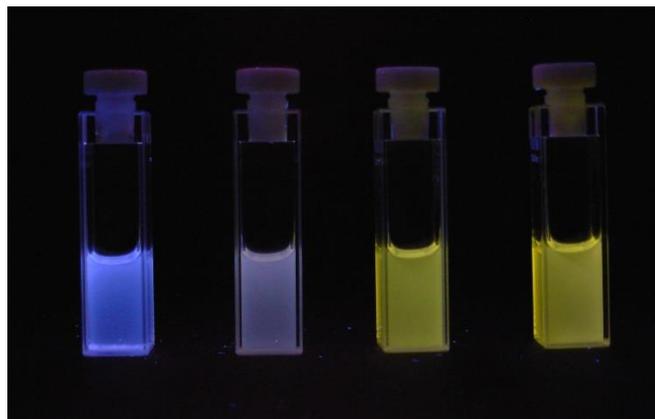


FIGURA N.58 - FOTO LEGANTE HNBO-AZAPIRIFANO IN CAMERA BUIA IN PRESENZA DI LAMPADA UV A PARTIRE DA SINISTRA, IN FORME: HL, L⁻, [ZnL]⁺ e [CdL]⁺.

Si può ipotizzare come nella coordinazione rispettivamente di Zn²⁺ e Cd²⁺, il legante L₁ tenda ad interagire in maniera analoga nei confronti dei due ioni metallici.

Nell'immagine sotto riportata invece sembra che la coordinazione dello Zn²⁺ sia analoga al legante in forma deprotetta, mentre il complesso di Cd²⁺, sembri d'intensità più forte. Il legante L₁ rimane più colorato nella forma complessata con il Cd²⁺ (FIGURA N.59).

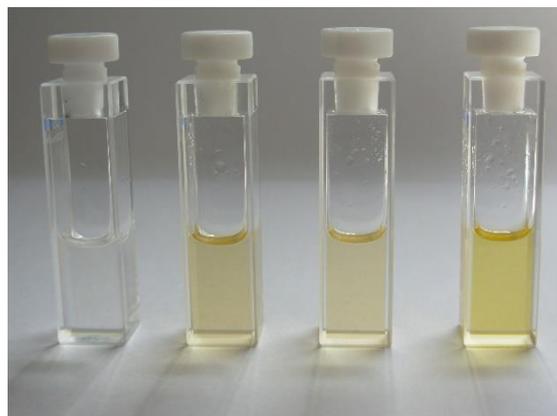


FIGURA N.59 - FOTO LEGANTE HNBO-AZAPIRIFANO ALLA LUCE VISIBILE A PARTIRE DA SINISTRA, IN FORME: HL₁, L₁⁻, [ZnL₁]⁺ e [CdL₁]⁺.

E' stata misurata la resa quantica del complesso **L**₁ con riferimento il bifenolo sciolto in acetonitrile. Il legante è stato disciolto in DMSO. Dopo aver realizzato due soluzioni che avessero uno assorbimento analogo, è stata scelta come lunghezza d'eccitazione $\lambda = 282$ nm e misurate rispettivamente l'emissioni del riferimento e del legante. Si integrano le aree d'emissione e mediante la formula, si calcola la resa quantica Φ . Il valore ottenuto per il complesso con lo Zn^{2+} è 0.18.

$$\Phi_L = \Phi_R \cdot \frac{A_L}{A_R} \cdot \frac{n_L^2}{n_R^2}$$

Legenda:

Φ_L = Resa quantica del Legante
Φ_R = Resa quantica del Riferimento
A_L = Area sottesa dello spettro d'emissione del Legante
A_R = Area sottesa dello spettro d'emissione del Riferimento
n_L = Indice di rifrazione del DMSO
n_R = Indice di rifrazione del l'acetoneitrile

2.5 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (**L**₂) ai cationi metallici

Il legante N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (**L**₂) è costituito da un'unità (**3**) collegata ad un'ammina secondaria N,N'-dimetilammina mediante un legame amminico N-CH₂. Il legante **L**₂ è stata caratterizzato mediante spettroscopia ¹H-NMR (FIGURA N.60).

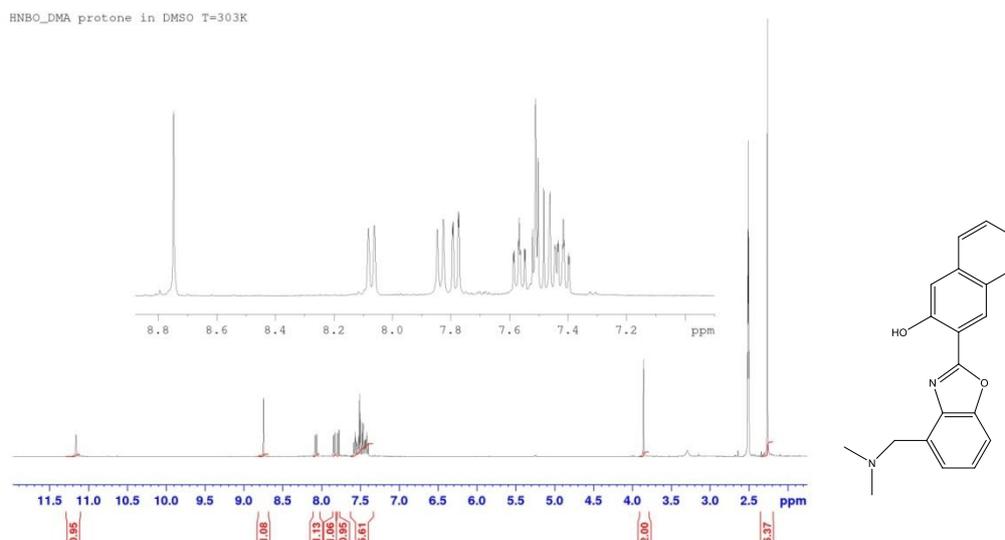


FIGURA N.60 – SPETTRO (L₂)IN DMSO-d₆ A 303 K

Dal confronto degli spettri ¹H-NMR del legante libero L₂ e del legante nella forma complessata con Zn²⁺, si può osservare l'esistenza di due forme durante la titolazione, una forma libera con l'-OH naftolico libero, in cui il segnale del -CH₂ legato all'ammina è un singoletto che risuona a 3.85 ppm, e una forma coordinata allo ione metallico in cui lo stesso -CH₂ risuona a 4.5 ppm. I metili legati all'ammina terziaria nella forma libera risuonano a δ=2.3 ppm, mentre nella forma complessata allo ione metallico si spostano a campi più bassi (2.8 ppm). Anche i segnali aromatici, che cadono tra 7 e 8.7 ppm, subiscono un cambiamento di chemical shift. Aggiungendo un eccesso di base TBAOH al legante, si nota come si formi solamente la specie deprotonata. Questo si può osservare dallo spettro in figura n.67, con i segnali a 4 ppm (-CH₂ amminico), a 2.3 ppm (metili amminici) ed assenza del segnale a 10.8 ppm (tipico dell'ossidrilico naftolico), caratterizzanti della specie deprotonata (FIGURA N.61, 62 e 63).

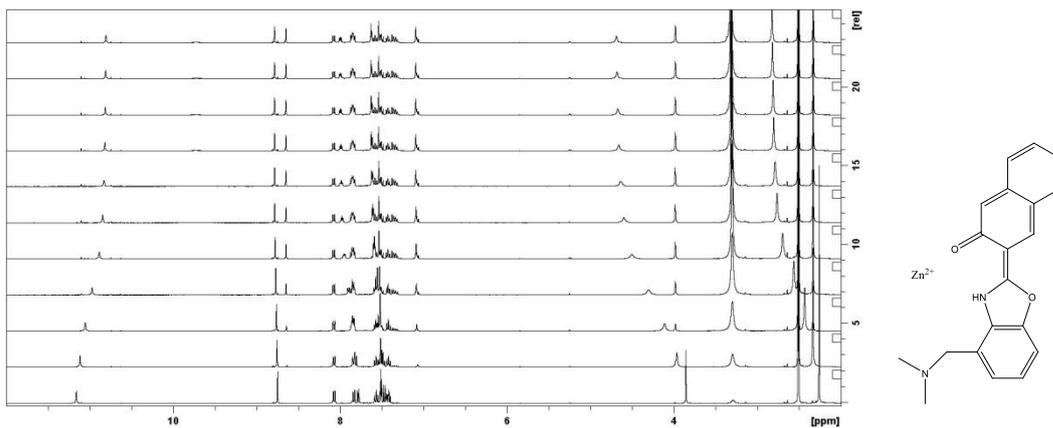


FIGURA N.61 – TITOLAZIONE DEL LEGANTE L₂ CON Zn²⁺

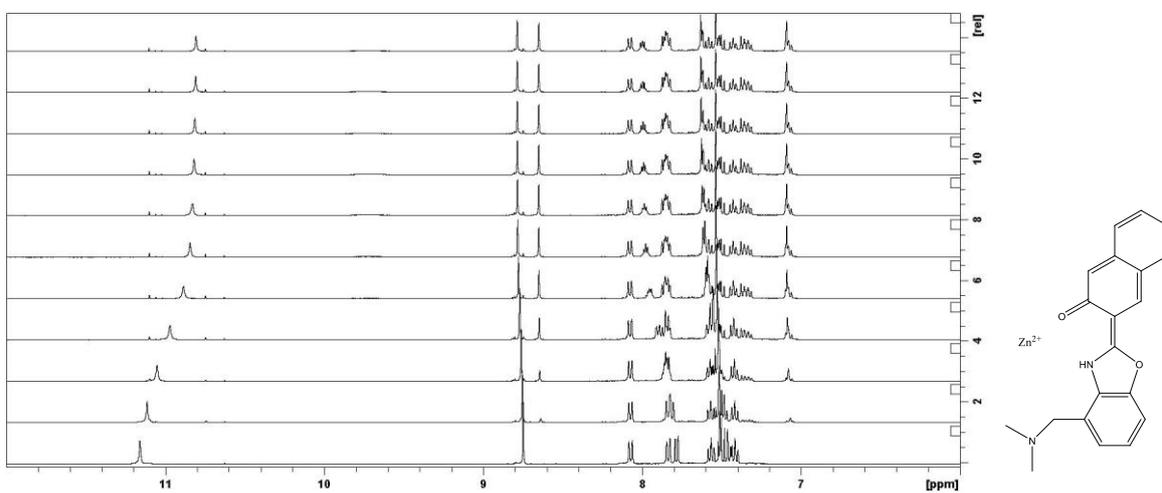


FIGURA N.62 – PARTE AROMATICA DELLA TITOLAZIONE DI L₂ CON Zn²⁺

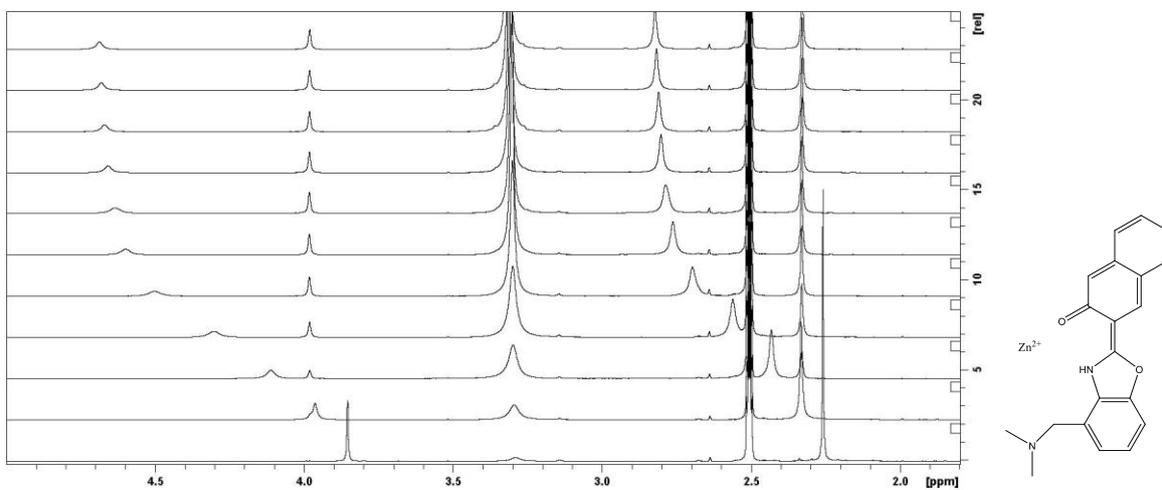


FIGURA N.63 – PARTE ALIFATICA DELLA TITOLAZIONE DI L₂ CON Zn²⁺

Il confronto tra gli spettri della titolazione di **L**₂ con Zn²⁺ in presenza o assenza di TBAOH, mostra come il segnale relativo intorno a 11 ppm relativo al H del gruppo naftolico, venga a scomparire e come i segnali aromatici siano più risolti in presenza di TBAOH (FIGURA N.64).

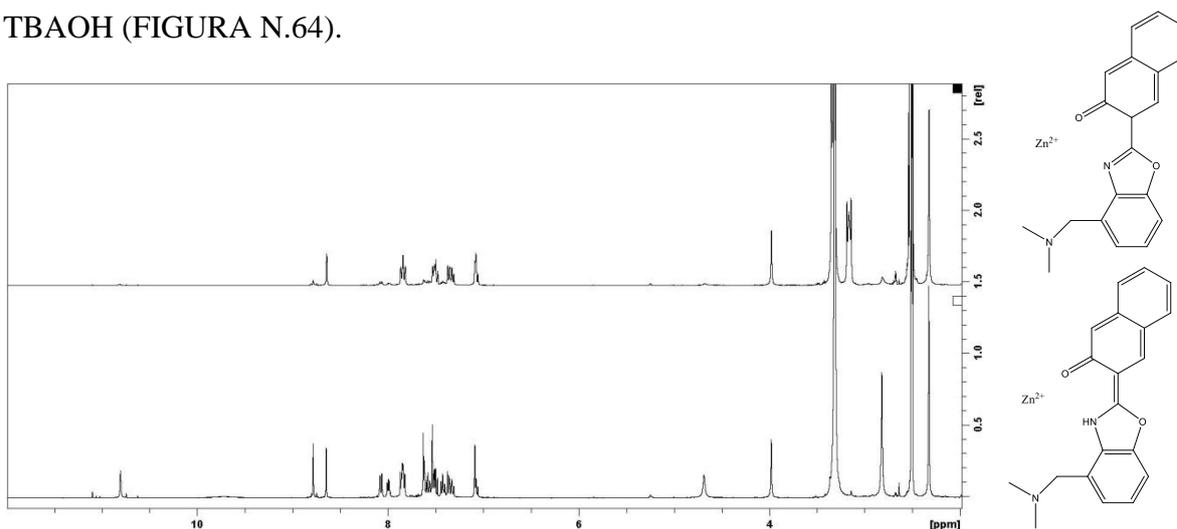


FIGURA N.64 – SPETTRO DELLA TITOLAZIONE DI L₂ CON Zn²⁺ (PARTE BASSA) E CON Zn²⁺ IN PRESENZA DI TBAOH (PARTE ALTA)

Entrambi i leganti **L**₁ ed **L**₂ mostrano nei confronti degli ioni Cd²⁺ e Zn²⁺, un aumento della banda in assorbimento a 450 nm tipica della forma chetonica derivante dalla parte naftolica. In emissione si ha un aumento della banda a 550 nm in presenza del Cd²⁺ e del Zn²⁺. Per il legante **L**₂ si ha un aumento dell'emissione anche in presenza di Mg²⁺.

Gli studi relativi a **L**₂ in spettrofluorimetria mostrano come il complesso che si forma con Cd²⁺ (FIGURE N.65 e N.66) emetta con una $\lambda_{\max} = 560$ nm. Gli studi sono stati eseguiti in soluzione HEPES a pH = 7.4 ed acetonitrile (10:90). La soluzione acquosa a pH tamponato a 7.4 consente eventualmente di poter realizzare studi cellulari a pH fisiologico. L'acetonitrile è stato scelto come solvente dopo aver eseguito delle prove di

solubilità, in quanto i leganti sintetizzati nelle prove di laboratorio, mostrano una bassa solubilità davanti alla maggior parte dei solventi.

Pertanto si è ricorso a sonicazione con dispositivo ad ultrasuoni per facilitare lo scioglimento del legante.

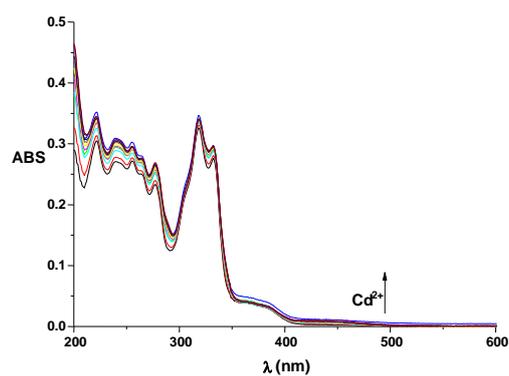


FIGURA N.65 - Titolazione UV-Vis di L₂ con Cd(ClO₄)₂ in H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; [L] = 1,95 * 10⁻⁵ M; Cd(ClO₄)₂ = 0 → 2,3 eq

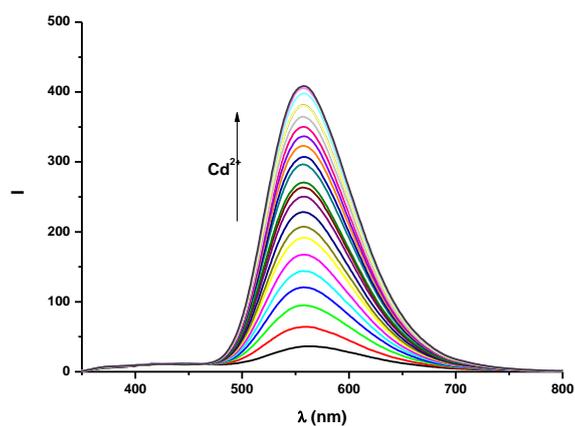


FIGURA N.66- Titolazione in Fluorescenza di L_2 con $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$ 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; $[\text{L}] = 1,95 * 10^{-5}$ M; $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 2,3$ eq

Analogamente a quanto accade nella titolazione del legante L_2 con lo ione Cd^{2+} , anche in questo caso l'aggiunta di Zn^{2+} determina un aumento della banda di assorbimento della forma chetonica (FIGURA N.67) e un aumento della banda di emissione in fluorescenza con un debole spostamento del verso il rosso (575 nm) (FIGURA N.68).

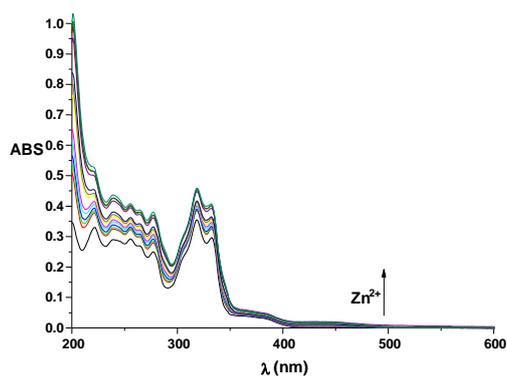


FIGURA N.67 - Titolazione UV-Vis di L_2 con $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$ 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; $[\text{L}] = 5,4 * 10^{-6}$ M; $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 2,1$ eq.

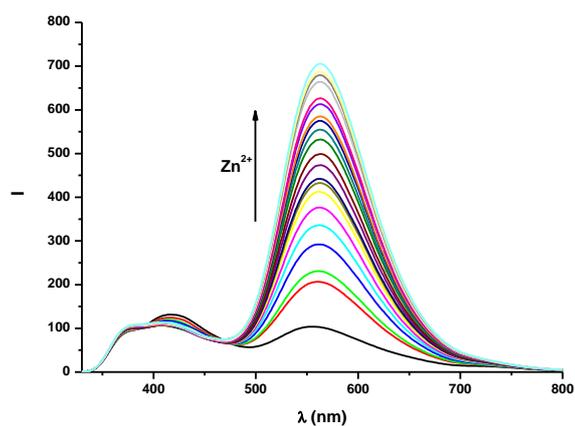


FIGURA N.68 – Titolazione in Fluorescenza ($\lambda_{ecc.} = 316$ nm) di L_2 con $Zn(ClO_4)_2$ in $H_2O/acetonitrile$ 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; $[L] = 1,95 \cdot 10^{-5}$ M; $Zn(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2,1$ eq.

Il legante L_2 è stato studiato con la titolazione di due ioni di metallo alcalino-terrosi quali Ca^{2+} e Mg^{2+} . È interessante come la titolazione di L_2 con Ca^{2+} non modifichi lo spettro in assorbimento (FIGURA N.69) e nemmeno quello in emissione, se non con un leggero spegnimento del segnale relativo al legante L_2 (FIGURA N.70).

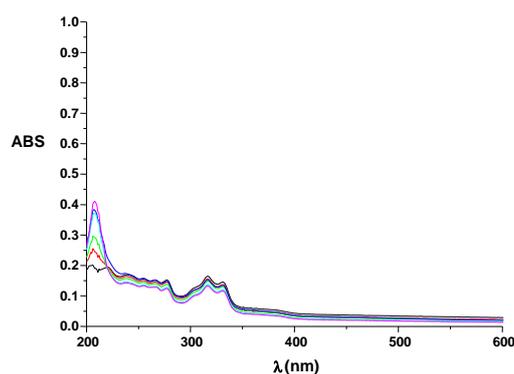


FIGURA N.69–Titolazione UV-Vis di L_2 con $Ca(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K; $[L] = 1,95 \cdot 10^{-6}$ M; $Ca(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 1$ eq.

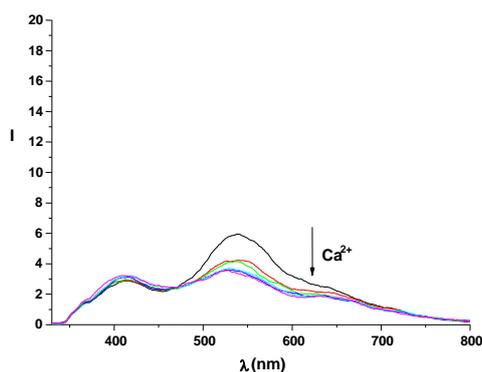


FIGURA N.70– Titolazione in Fluorescenza di L₂ con Ca(ClO₄)₂ in acetonitrile

a 298 K; [L] = 1,95 * 10⁻⁶ M; Ca(ClO₄)₂ = 0 → 1 eq.

Lo spettro in assorbimento del legante L₂ in presenza di Mg²⁺, a differenza del Ca²⁺, mostra un cambiamento nelle bande a lunghezza d'onda inferiore a 316 nm ed un aumento della banda a 450 nm (FIGURA N.71).

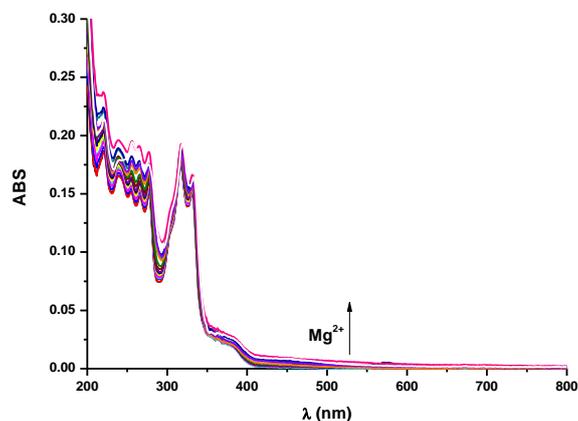


FIGURA N.71 - Titolazione in UV-Vis di L₂ con Mg(ClO₄)₂ in acetonitrile;

[L] = 2,95 * 10⁻⁶ M; Mg(ClO₄)₂ = 0 → 2 eq.

Lo spettro in emissione mostra come aumenti la fluorescenza, con uno spostamento della verso il blu da 560 a 530 nm (FIGURA N.72).

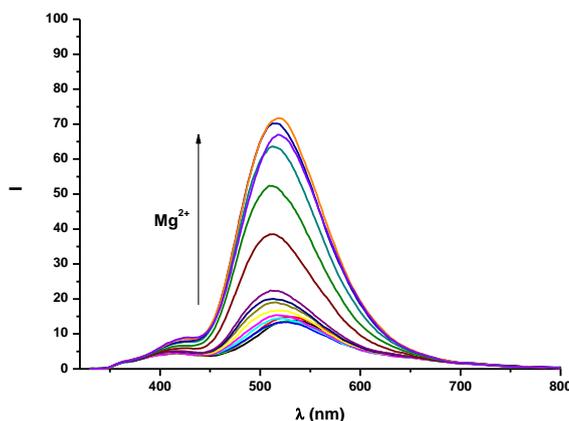


FIGURA N.72 - Titolazione in Fluorescenza di L₂ con Mg(ClO₄)₂ in acetonitrile;

$$[L] = 9 * 10^{-6} \text{ M}; \text{Mg}(\text{ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

La possibilità da parte del legante L₂ di avere un comportamento diverso per due ioni appartenenti allo stesso gruppo, quale Ca²⁺ e Mg²⁺, può essere un buon risultato per poter discriminare i due ioni ospiti.

Sono stati svolti studi in emissione anche per i seguenti ioni metallici: Pd²⁺, Pb²⁺, Pt²⁺, Al³⁺, Ag⁺, Gd³⁺. Da questi studi emerge come il Pb²⁺ ed il Gd³⁺, diano una debole emissione in fluorescenza a dispetto di altri ioni metallici, che non cambiano lo spettro in emissione o addirittura lo spengono.

Il legante L₂ pertanto interagisce con lo ione metallico grazie ai doppietti dell'ossigeno naftolico deproteetto, dell'azoto del gruppo benzossazolico e dell'azoto dell'ammina recettiva.

2.6 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletildiammina (**L**₃) ai cationi metallici

Il legante N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletildiammina (**L**₃) è costituito da un'unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**3**) collegata alla diammina lineare N,N',N'-trimetiletildiammina mediante un legame ammino N-CH₂.

Il legante **L**₃ si presenta come una macromolecola costituita da un'unità fluorofora (**3**) connessa da una poliammina lineare, nella quale l'interazione con gli ioni metallici avviene grazie al gruppo -OH dell'unità naftolica e i due N della N, N', N'-trimetiletildiammina. Da studi effettuati emerge come la coordinazione privilegiata per aver il massimo dell'emissione in fluorescenza, avvenga mediante l'interazione con gli ioni Cd²⁺, Zn²⁺ e Mg²⁺, che danno una maggiore risposta fotochimica.

A pH acido ci si aspetta una protonazione dell'unità amminica recettiva, mentre a pH alcalini, si ha deprotonazione dell'ossidrilico naftolico. Durante l'interazione anione-metallo che viene facilitata a pH basici intorno a 9, viene bloccata la libera rotazione dell'unità naftolica il che favorisce il decadimento radiativo dello stato eccitato rispetto al rilassamento termico, fenomeno che determina un aumento della resa quantica di emissione (ESIPT).

Le misure sperimentali sono state eseguite in una miscela solvente costituita da acetonitrile e una soluzione acquosa di HEPES a pH fisiologico 7,4 in rapporto 90:10 (v/v). Il legante **L**₃ è stato titolato con Cd²⁺ mostrando l'aumento della banda in assorbimento a 450 nm in funzione della coordinazione con lo ione metallico (FIGURA N.73).

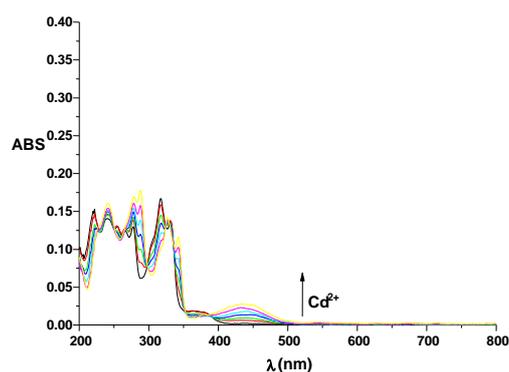


FIGURA N.73 - Titolazione UV-Vis di L₃ con Cd(ClO₄)₂ in H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; [L] = 6,175 * 10⁻⁶ M; Cd(ClO₄)₂ = 0 → 2 eq.

Lo spettro in emissione del legante **L₃** mostra un comportamento d'accensione in emissione con un red shift della banda. Tale fenomeno può essere motivato dalla presenza di gruppi auxocromi come le ammine presenti nell'unità recettiva di **L₃** che dispongono di doppietti di non legame che, oltre ad interagire con lo ione metallico, possono andare a perturbare il sistema π del derivato benzossazolico durante l'interazione con il metallo, andando a contribuire allo spostamento della lunghezza d'onda verso valori maggiori rispetto al legante **L₃** in forma libera (effetto batocromico) (FIGURA N.74). Inoltre il sistema coniugato viene stabilizzato a seguito di coordinazione con lo ione metallico.

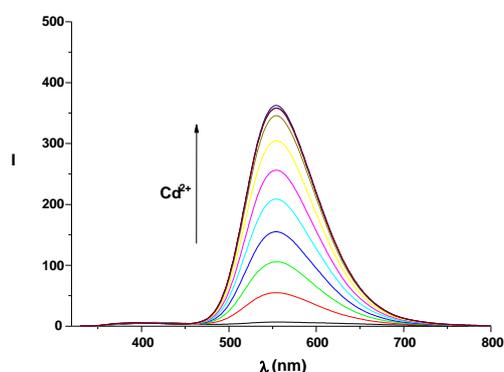


FIGURA N.74 - Titolazione in Fluorescenza di L₃ con Cd(ClO₄)₂ in H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; [L] = 6,175 * 10⁻⁶ M; Cd(ClO₄)₂ = 0 → 2 eq.

La titolazione con lo ione Zn²⁺ di L₃ esibisce un comportamento analogo alla titolazione con il Cd²⁺ sia in assorbimento UV-Visibile che in emissione. La natura dello ione Cd²⁺, secondo la teoria Hard-Soft, risulta essere “soft”, dove le interazioni covalenti prevalgono rispetto alle interazioni coulombiane, mentre lo ione Zn²⁺ risulta essere di tipo “border-line”. Dagli studi sperimentali, si evidenzia come gli spettri in assorbimento ed in fluorescenza siano analoghi, pertanto lo ione Zn²⁺, avendo uno strato di elettroni di valenza analogo al Cd²⁺, ma con un raggio ionico inferiore, risulta avere lo stesso comportamento in assorbimento (FIGURA N.75) ed in emissione (FIGURA N.76).

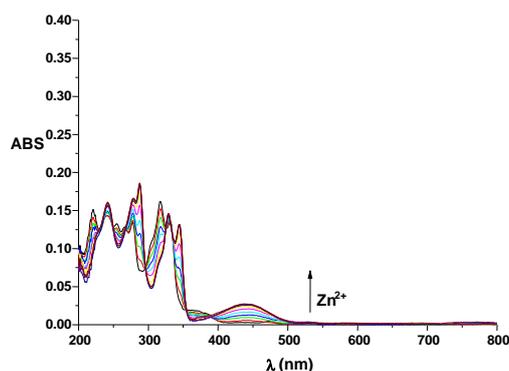


FIGURA N.75 – Titolazione UV-Vis di L₃ con Zn(ClO₄)₂ in H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; [L] = 6,175 * 10⁻⁶ M; Zn(ClO₄)₂ = 0 → 2 eq.

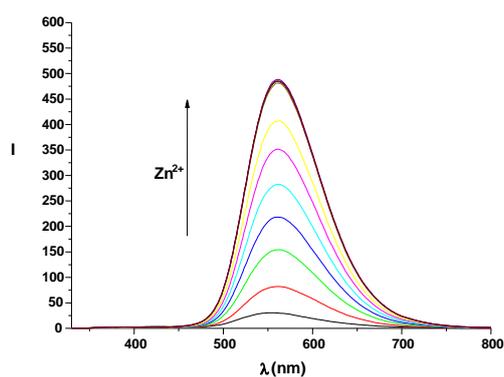


FIGURA N.76 – Titolazione in Fluorescenza di L_3 con $Zn(ClO_4)_2$ in H_2O /acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; $[L] = 6,175 \cdot 10^{-6} M$; $Zn(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2$ eq.

La titolazione del legante L_3 con Cu^{2+} ha comportato un lieve aumento dell'emissione da 0.2 eq sino a 0.6 eq rimanendo costante il segnale d'emissione. Aggiungendo un equivalente di titolante, il segnale ritorna allo stato iniziale nella forma di L_3 libero, per poi spegnersi completamente a 2 equivalenti, a causa dell'effetto paramagnetico dello ione metallico (FIGURA N.77).

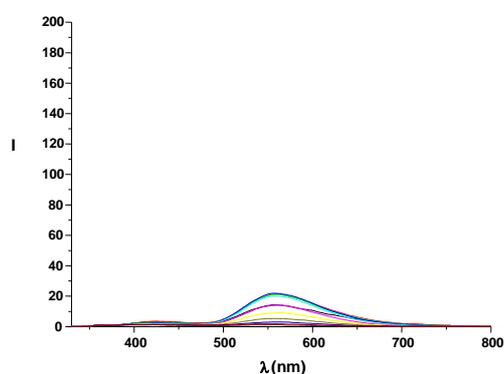


FIGURA N.77 – Titolazione in Fluorescenza di L_3 con $Cu(ClO_4)_2$ in H_2O /acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; $[L] = 6,175 \cdot 10^{-6} M$; $Cu(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2$ eq.

E' stata svolta una prova per confrontare la selettività del legante **L₃** nei confronti del Cu (II) e dello Zn (II). Siccome il complesso di rame è spento mentre quello di zinco è altamente fluorescente, si è deciso di provare a titolare il complesso con Zn²⁺ per osservare il comportamento del legante in presenza di entrambi gli ioni metallici. Si osserva come il legante preferisca rimanere coordinato al Cu²⁺, senza dare emissione fotochimica in presenza dei due ioni citati (FIGURA N. 78).

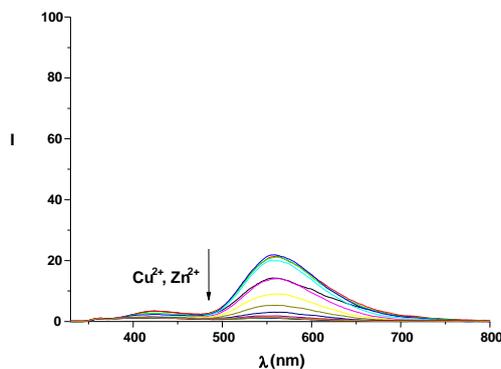


FIGURA N.78 - Titolazione UV-Vis di L₃-Cu con Zn(ClO₄)₂ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 6,175 * 10^{-6} \text{ M}; \text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}; \text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

Sono state svolte delle prove in presenza del legante **L₃** e di un forte eccesso di Mg²⁺ (5 equivalenti) in diverse condizioni sperimentali, variando la concentrazione di H₂O in un sistema dove era già presente H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) per valutare la variazione della risposta in fluorescenza. Con una concentrazione di acqua all'1% si osserva come la risposta emissiva sia molto elevata con la formazione della specie chetonica (FIGURA N.79).

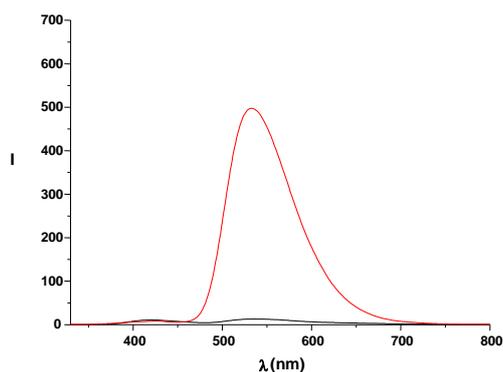


FIGURA N.79 – Titolazione in Fluorescenza di L_3 con $Mg(ClO_4)_2$ in H_2O /acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K + 1% H_2O ; $[L] = 5,24 * 10^{-6}$ M; $Mg(ClO_4)_2 = 5$ eq.

Passando ad una concentrazione del 2.5 % di H_2O , si nota come la risposta emissiva del legante L_3 , risulta più bassa, con formazione della specie enolica dovuta alla protonazione dell'ossidrile naftolico; pertanto si può presumere la presenza di entrambe le forme chetonica ed enolica del legante L_3 . (FIGURA N.80).

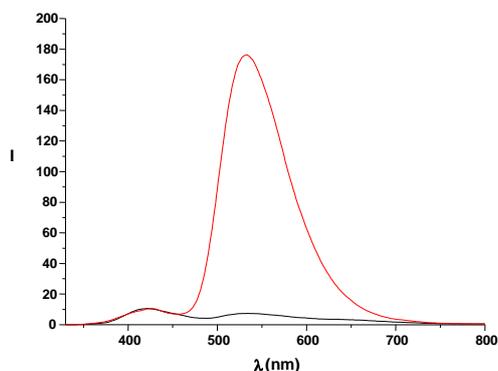


FIGURA N.80 – Titolazione in Fluorescenza di L_3 con $Mg(ClO_4)_2$ in H_2O /acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K + 2,5 % H_2O ; $[L] = 5,24 * 10^{-6}$ M; $Mg(ClO_4)_2 = 5$ eq.

L'aumento della concentrazione dell'acqua da 2.5 a 5 % non genera una significativa diminuzione nel segnale in emissione della titolazione di L_3 con Mg^{2+} , come se la

coordinazione con lo ione metallico avesse un ruolo più forte rispetto all'effetto di spegnimento del solvente acquoso (FIGURA N.81).

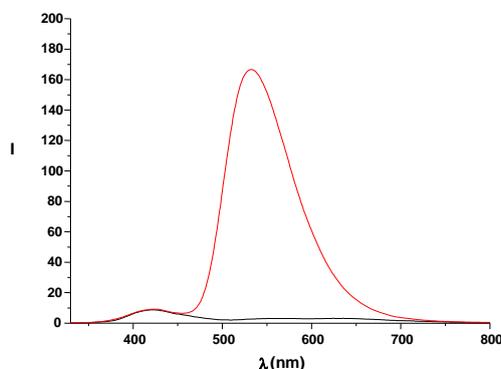


FIGURA N.81 – Titolazione in Fluorescenza di L₃ con Mg(ClO₄)₂ in H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K + 5 % H₂O; [L] = 5,24 * 10⁻⁶ M; Mg(ClO₄)₂ = 5 eq.

Un aumento della concentrazione fino a 7.5 % di H₂O, genera una sensibile riduzione del segnale in fluorescenza del legante ed un aumento della forma enolica dovuta alla presenza del mezzo acquoso e presumibilmente alla solvatazione dello ione metallico, che risulta essere meno accessibile e quindi disponibile nell'interazione col legante L₃. (FIGURA N.82).

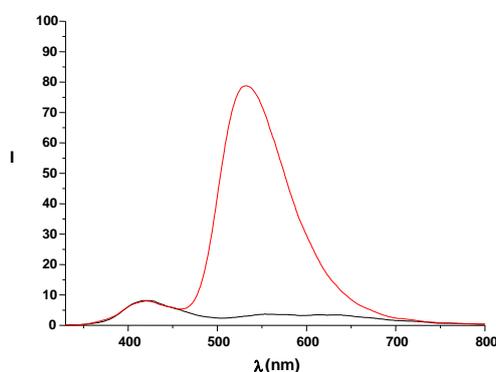


FIGURA N.82 – Titolazione in Fluorescenza di L₃ con Mg(ClO₄)₂ in H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K + 7,5 % H₂O; [L] = 5,24 * 10⁻⁶ M; Mg(ClO₄)₂ = 5 eq.

Un incremento sino al 10% del solvente acquoso, consente di proseguire lo stesso andamento indicato precedentemente con la formazione della specie enolica ed una riduzione notevole della risposta in fluorescenza del legante. (FIGURA N.83).

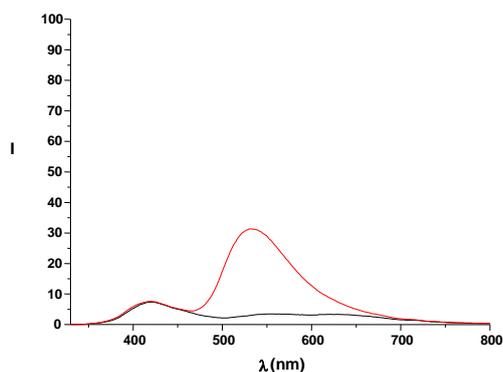


FIGURA N.83 – Titolazione in Fluorescenza di L₃ con Mg(ClO₄)₂ in H₂O/acetonitrile 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K + 10 % H₂O; [L] = 5,24 * 10⁻⁶ M; Mg(ClO₄)₂ = 5 eq.

Dalle misure effettuate in fluorescenza, si osserva come il segnale in emissione diminuisca all'aumentare della presenza di acqua. Tale effetto “quencher” da parte dell'acqua è dovuto sia alla solvatazione dello ione che rende meno stabile il complesso, sia a effetti dinamici di spegnimento dello stato eccitato. Dopo aver studiato il comportamento del legante L₃ in presenza di Mg²⁺ in un mezzo a pH fisiologico, si è provveduto a svolgere una titolazione sempre in presenza di Mg²⁺ nel solo solvente organico (acetonitrile). Lo spettro in assorbimento di L₃ con il Mg²⁺ in acetonitrile mostra la formazione della banda a 450 nm relativa alla specie chetonica, già vista per gli ioni Cd²⁺ e Zn²⁺ (FIGURA N.84).

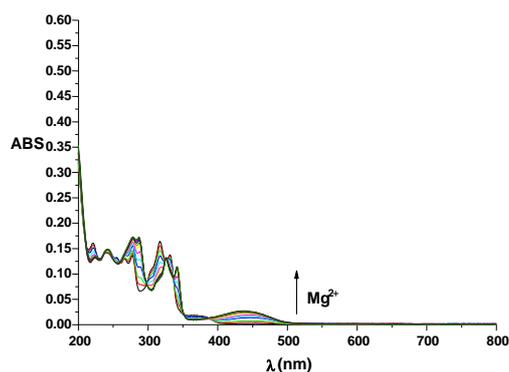


FIGURA N.84 – Titolazione UV-Vis di L_3 con $Mg(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 5,55 \cdot 10^{-6} \text{ M}; Zn(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2 \text{ eq.}$$

La risposta in emissione ci ha consentito di vedere come cambiasse in assenza del mezzo acquoso, quindi di poter eliminare l'effetto quencher ed osservare la variazione del segnale in emissione. Si noti come la titolazione determini uno spostamento verso il blu della radiazione luminosa con un valore massimo a 540 nm. (FIGURA N.85).

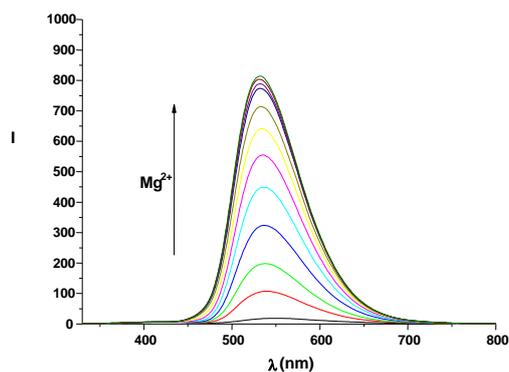


FIGURA N.85 – Titolazione in Fluorescenza di L_3 con $Mg(ClO_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$$[L] = 6,175 \cdot 10^{-6} \text{ M}; Mg(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2,2 \text{ eq.}$$

Lo spettro in emissione del legante **L₃** mostra che in presenza di Mg^{2+} , si assiste a un aumento della banda in emissione a 560 nm senza il red shift osservabile per gli ioni Cd^{2+} e Zn^{2+} . Questo può essere dovuto al fatto che mentre l'interazione con gli ioni $Zn(II)$ e $Cd(II)$ è soprattutto di natura covalente, quindi aumenta l'estensione del sistema coniugato del fluoroforo determinando uno spostamento della banda di emissione verso il rosso, quella con gli ioni $Mg(II)$ è essenzialmente ionica e probabilmente stabilizza lo stato fondamentale in misura maggiore rispetto allo stato eccitato determinando un leggero spostamento verso il blu (FIGURA N.86).

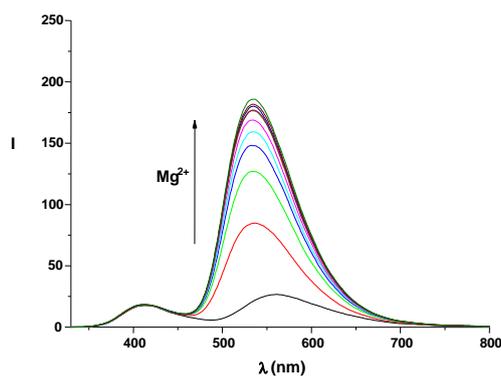


FIGURA N.86 –Titolazione in Fluorescenza di **L₃ con $Mg(ClO_4)_2$ in $H_2O/acetonitrile$ 1:9 (v/v) in HEPES a pH = 7,4 a 298 K; $[L] = 5,55 * 10^{-6}$ M; $Mg(ClO_4)_2 = 0 \rightarrow 2$ eq.**

Il chemosensore **L₃** mostra emissione per il Mg^{2+} , mentre non ci sono risposte emissive per il Ca^{2+} , anch'esso ione appartenente alla classe dei metalli alcalino-terrosi e pur essendo due ioni di metalli di tipo "hard". Dallo spettro in fluorescenza di **L₃** nei confronti della risposta allo ione Ca^{2+} , si può ipotizzare come il chemosensore non venga perturbato e non interagisca con il legante.

Infatti, nello spettro in fluorescenza di **L3** con il Ca^{2+} , rimane presente la forma enolica di **L3** segnalata dalla banda a 430 nm in equilibrio con la forma chetonica a 450 nm(FIGURA N.87).

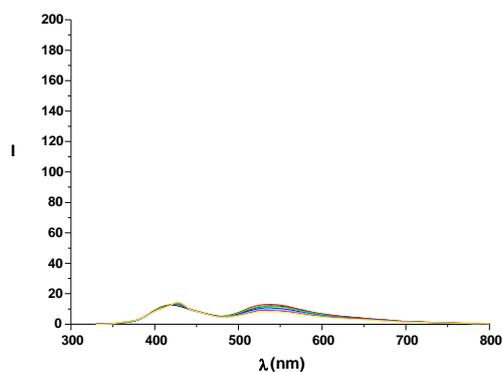


FIGURA N.87 –Titolazione in Fluorescenza di L3 con $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ in acetonitrile a 298 K;

$$[\text{L}] = 5,55 \cdot 10^{-6} \text{ M}; \text{Ca}(\text{ClO}_4)_2 = 0 \rightarrow 1 \text{ eq.}$$

È come se la tautomeria “cheto-enolica” non venisse alterata dalla presenza dello ione Ca^{2+} , consentendo la libera rotazione dell’unità naftolica nello spazio, con conseguente formazione del legame H intramolecolare tra l’azoto ma anche con l’ossigeno dell’unità benzossazolica, con la presenza contemporanea delle forme chetoniche e enoliche.

2.7 Proprietà spettroscopiche e risposta fotochimica di N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N'-dietilendiammina(L₄) ai cationi metallici

Il legante N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N'-dietilendiammina (L₄) è costituito da due unità 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3) collegata alla diammina lineare N,N'-diemetilendiammina mediante un legame ammino N-CH₂. Il legante (L₄) presenta due unità fluorofore (3) connessa da una poliammina lineare. I sei siti che dovrebbero convergere nella coordinazione con ioni metallici sono i due ossidrili naftolici presenti in forma chetonica durante la coordinazione o comunque a pH alcalini in soluzioni acquose con TAPS, l'azoto delle due unità benzossazoliche e i doppietti degli azoto dell'ammina lineare. Questo legante presenta due unità fotoattive e coordinative separate da uno spaziatore e potrebbe coordinare due ioni metallici. Il legante L₄ è stato disciolto in una miscela H₂O/diossano 1:9 (v/v) per solubilizzare il chemosensore, quanto in acetonitrile risultava poco solubile a temperatura ambiente. La titolazione di L₄ in presenza di Cd²⁺ mostra l'aumento della banda a 450 nm della forma chetonica come visto in precedenza per gli altri leganti L₁, L₂ ed L₃ con lo stesso ione metallico (FIGURA N.88).

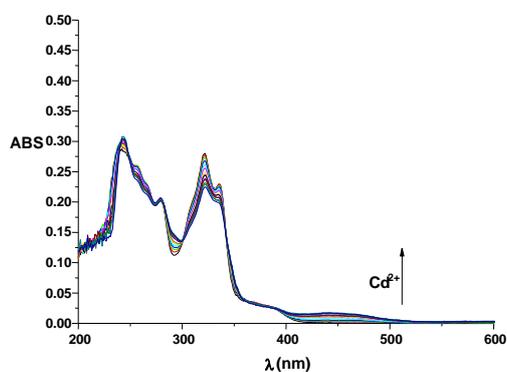


FIGURA N.88 –Titolazione UV-Vis di L₄ con Cd(ClO₄)₂ in H₂O/diossano 1:9 (v/v) in TAPS a pH = 9 a 298

K; $[L] = 5,2 * 10^{-6} M$; Cd(ClO₄)₂ = 0 → 2 eq.

La coordinazione con lo ione Cd²⁺ da parte di L₄ determina un aumento dell'emissione fotochimica e in presenza di TAPS, dia il massimo dell'emissione (FIGURA N.89).

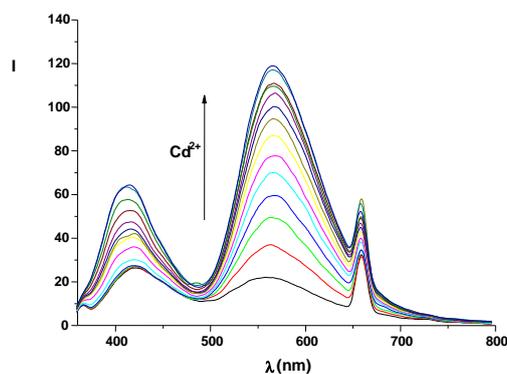


FIGURA N.89 – Titolazione in Fluorescenza di L₄ con Cd(ClO₄)₂ in H₂O/diossano 1:9 (v/v) in TAPS a pH = 9 a

298 K; $[L] = 5,2 * 10^{-6} M$; Cd(ClO₄)₂ = 0 → 2 eq.

La titolazione di L₄ in presenza di Zn²⁺ mostra un aumento della banda a 450 nm tipica della forma chetonica. Si ha inoltre un effetto ipercromico, in corrispondenza del punto isobestico λ = 316 nm, lunghezza d'onda d'eccitazione utilizzato per eccitare il legante in spettrofotometria in emissione (FIGURA N.90).

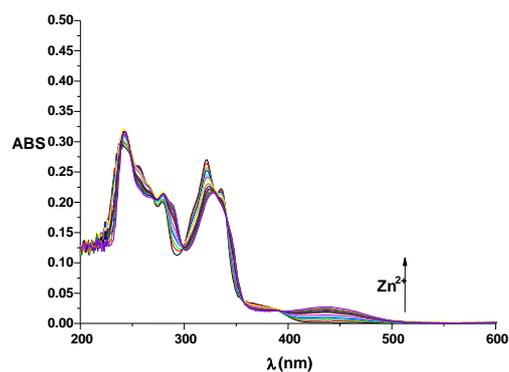


FIGURA N.90 –Titolazione UV-Vis di L₄ con Zn(ClO₄)₂ in H₂O/diossano 1:9 (v/v) in TAPS a pH = 9 a 298

K;[L] = 5,2 * 10⁻⁶ M; Zn(ClO₄)₂ = 0 → 1,5 eq.

Lo spettro in emissione del legante L₄ mostra come durante la titolazione, si abbia un aumento della forma chetonica con un red-shift a 580 nm. L'interazione host-guest che si realizza viene agevolata dalla presenza di un pH alcalino che favorisce la deprotonazione dei due ossidrili naftolici, consentendo una migliore interazione con lo ione Zn²⁺(FIGURA N.91).

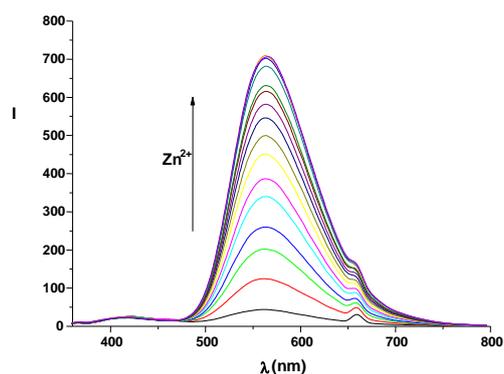


FIGURA N.91–Titolazione in Fluorescenza di L₄con Zn(ClO₄)₂ in H₂O/diossano 1:9 (v/v) in TAPS a pH = 9 a

298 K;[L] = 5,2 * 10⁻⁶ M; Zn(ClO₄)₂ = 0 → 1,5 eq.

È stata condotta una titolazione in fluorescenza di **L4** in H₂O / diossano 1:9 (v/v) a pH = 8 in presenza di TAPS, per valutare la variazione dell'emissione fotochimica in condizioni meno alcaline (FIGURA N.92).

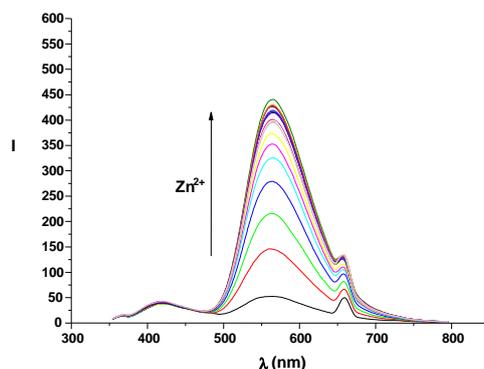


FIGURA N.92–Titolazione in Fluorescenza di L4 con Zn(ClO₄)₂ in H₂O/diossano 1:9 (v/v) in TAPS a pH = 8 a 298 K; [L] = 9,52 * 10⁻⁶ M; Zn(ClO₄)₂ = 0 → 2 eq.

Un aspetto interessante si nota nella titolazione con Zn²⁺ in presenza di TAPS a pH = 8 dove l'emissione aumenta fino a 2 equivalenti. Durante la titolazione la forma della banda enolica rimane pressoché costante, mentre aumenta la forma carbonilica intorno a 560 nm. Il massimo dell'emissione si ha a due equivalenti di titolante, ciò significa che il legante **L4**, può coordinare due ioni Zn²⁺.

È presumibile che la coordinazione dei due ioni metallici Zn²⁺ coinvolga i due N presenti nella poliammina lineare coordinante che vanno ad interagire con uno ione Zn²⁺ e l'ossigeno naftolico e l'N del gruppo benzossazolico a coordinare l'altro ione Zn²⁺. È interessante questa ipotesi, in quanto consentirebbe di sviluppare il concetto dove, la forma chetonica prevale rispetto alla forma enolica e l'N del gruppo benzossazolico anziché risultare protonato, per trasferimento di H⁺ intramolecolare, potrebbe andare ad

interagire con l'altro ione Zn^{2+} . Il confronto tra il comportamento fluorescente del legante **L4** a pH = 8 e a pH=9 è rappresentato in FIGURA N.93:

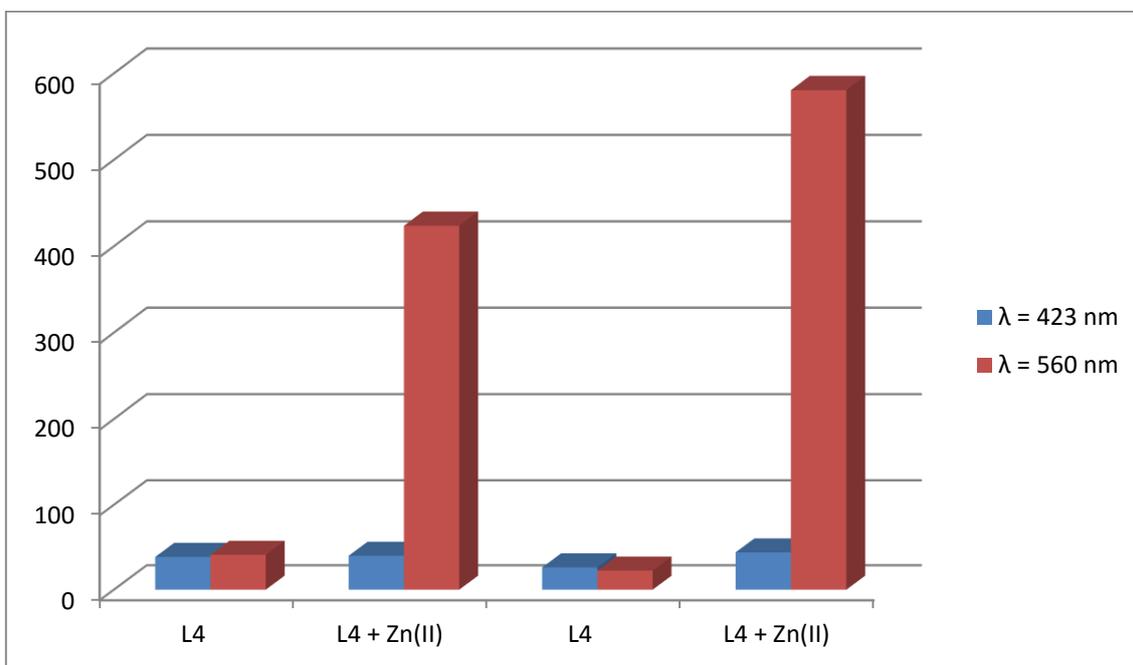


FIGURA N. 93- Grafico relativo alla titolazione in Fluorescenza di **L4** con Zn^{2+} a pH = 8 (parte sinistra) e a pH = 9 (parte destra)

Dal grafico si nota come passando da pH = 8 a pH = 9 l'emissione a seguito di titolazione con Zn^{2+} aumenta, così come il rapporto tra la forma del legante libero e quella complessata con un equivalente di titolante. Questo aspetto può essere attribuito alla deprotonazione dell'ossidrilico naftolico, favorita a pH maggiormente alcalini, in quanto la pKa dell'H naftolico si colloca attorno a 9-9,5.

E' stata condotta una titolazione del legante **L4** in presenza di uno ione paramagnetico quale Cu^{2+} , per valutarne il comportamento in fluorescenza e per verificare se l'andamento della titolazione fosse confrontabile con quello osservato con gli altri leganti. Anche in questo caso studio, per effetto paramagnetico, viene a spegnersi

l'emissione del legante durante la titolazione, con prevalenza della forma enolica rispetto alla forma chetonica del legante **L4**(FIGURA N.94).

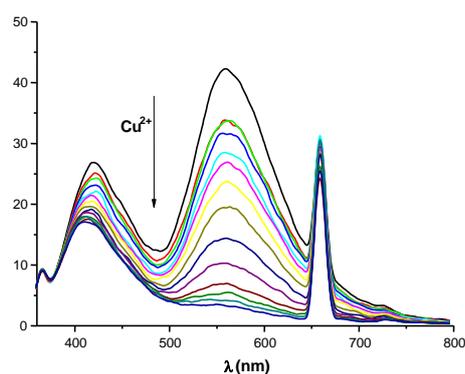


FIGURA N.94 –Titolazione in Fluorescenza di L₄ con Cu(ClO₄)₂ in H₂O/diossano 1:9 (v/v) in TAPS a pH = 9 a 298 K; [L] = 5,2 * 10⁻⁶ M; Cu(ClO₄)₂ = 0 → 1 eq.

In presenza di altri ioni metallici, quali ad esempio Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ga^{3+} , Gd^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Pd^{2+} e Pt^{2+} , l'emissione fotochimica è pressoché nulla. Di seguito viene riportato lo spettro in emissione in presenza di Ni^{2+} , che genera un lieve aumento dell'emissione (FIGURA N.95).

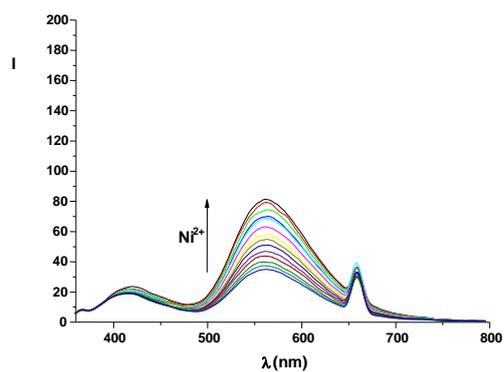


FIGURA N.95 –Titolazione in Fluorescenza di L₄ con Ni(ClO₄)₂ in H₂O/diossano 1:9 (v/v) in TAPS a pH = 9 a

298 K; [L] = 5,2 * 10⁻⁶ M; Ni(ClO₄)₂ = 0 → 1 eq

2.8 CONCLUSIONI

I quattro leganti **L**₁, **L**₂, **L**₃ e **L**₄ contengono l'unità fluorofora 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**3**) costituita da un gruppo 2-naftolico connesso dalla posizione 3 a un anello benzossazolico. La caratteristica peculiare di questo sistema è che la deprotonazione dell'ossidrilico naftolico, che avviene in soluzione acqua/acetonitrile in presenza di basi forti o a seguito della coordinazione di uno ione metallico, determina il riarrangiamento della molecola in forma chetonica con conseguente aumento della coniugazione tra i due sistemi aromatici. Questo è evidenziato sia dalla spettroscopia NMR che dalla spettrofotometria UV-Vis in assorbimento e in fluorescenza. Infatti nella forma ossidrilica i due anelli sono indipendenti e lo spettro di assorbimento mostra le bande tipiche del naftolo e del benzossazolo rispettivamente a 325 e 290 nm, mentre nella forma deprotonata i due anelli sono coniugati e compare una banda di assorbimento molto larga, ma di bassa estinzione molare probabilmente perchè proibita per simmetria, centrata a 450 nm. Le differenze nello spettro di emissione sono molto più evidenti, infatti mentre la forma protonata è caratterizzata da una fluorescenza a 425 nm di media intensità, la forma deprotonata ha una banda di emissione molto intensa a 560 nm nella zona visibile dello spettro. Queste caratteristiche rendono il fluoroforo molto interessante dal punto di vista della sintesi di sensori per ioni metallici, non solo perchè possiede caratteristiche fotochimiche ottimali in termini di assorbimento, emissione e Stokes-shift, ma anche perchè interagisce direttamente con gli ioni metallici e l'interazione determina un cambiamento radicale della sua struttura, inoltre è abbastanza idrofilo da poter essere utilizzato in miscele solventi che contengono fino al 50% di acqua (ad esempio acqua/acetonitrile o acqua/dimetilsolfossido) ed è stabile in un ampio intervallo di pH. Tre leganti studiati contengono il fluoroforo connesso a un

macrociclico N₂S₂ (**L**₁), alla dimetilammina (**L**₂), alla trimetiletilendiammina (**L**₃), il quarto legante (**L**₄) contiene due unità fluorofore connesse alla dimetiletilendiammina. Il comportamento dei leganti amminici è simile, infatti tutti interagiscono con ioni metallici d¹⁰, come Zn(II) e Cd(II) aumentando l'emissione a 560 nm e interagiscono con lo ione Cu(II) diminuendo l'emissione fino a spegnere completamente la banda chetonica. I leganti **L**₂ e, soprattutto, **L**₃ interagiscono anche con lo ione Mg(II) selettivamente rispetto al Ca(II). Infatti in soluzione di acetonitrile contenente al massimo il 10% di acqua tamponata a pH 7,4, **L**₃ risponde alla presenza del magnesio accendendo l'emissione a 560 nm in modo visibile anche a occhio nudo, mentre nelle stesse condizioni non coordina gli ioni Ca(II). Questo risultato è molto interessante e dovrà essere approfondito visto il grosso interesse verso la determinazione selettiva degli ioni dei metalli alcalino-terrosi in ambienti acquosi. Il legante **L**₁ contiene, nella parte recettiva, un macrociclo solforato quindi è adatto al sensing di ioni di metalli soft. Il legante interagisce con ioni di metalli pesanti quali Pd(II) e Pt(II) spegnendo l'emissione a 560 nm, mentre interagisce con Zn(II) e Cd(II) aumentando la resa quantica di emissione.

Questo studio ha voluto sondare il comportamento del fluoroforo 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo inserito in unità recettrici di diversa tipologia, e i risultati sono stati incoraggianti. In futuro sono necessari ulteriori studi per caratterizzare completamente il comportamento di questi sistemi nella coordinazione degli ioni metallici, inoltre si prevede di sintetizzare nuovi leganti connettendo l'unità fluorofora ad altre unità recettoriali specifiche per diversi substrati, soprattutto in soluzione acquosa, al fine di aumentare la selettività e rendere possibile l'applicazione delle nuove molecole in campo biologico.

3. PARTE SPERIMENTALE

Il lavoro svolto durante il percorso formativo e di ricerca del mio dottorato in “Scienze Chimiche e Farmaceutiche” ciclo XXVIII, è stato caratterizzato dalla realizzazione di nuovi leganti costituiti dalla presenza dell’unità fotoattiva 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**3**) legata a diverse unità binding amminiche lineari o cicliche, i cui studi hanno permesso di ottenere dei risultati in spettrofotometria in fluorescenza riguardo al singolo comportamento in presenza di cationi di metalli alcalino terrosi, pesanti e di elementi di transizione.

3.1 Reagenti/Solventi da Laboratorio

Le reazioni svolte in laboratorio sono state condotte in ambiente anidro ed in atmosfera inerte sotto azoto. I solventi anidri utilizzati sono forniti dalla ditta produttrice in contenitori a tenuta sure-seal. I solventi utilizzati vengono forniti da Fluka e Sigma-Aldrich. Le cromatografie su strato sottile (Thin Layer Chromatography) sono state realizzate sul gel di silice e su allumina con indicatori fluorescenti a 254 nm, di spessore 0,2 mm, pronte all'uso e fornite da Analytical Chromatography e dalla Fluka.

Le TLC sono state controllate mediante lampada UV MODEL UVG-11 Minerallight lamp operante alla lunghezza d'onda di 254 nm o sviluppate in soluzione basica di permanganato.

I prodotti, quando necessario sono stati purificati per flash cromatografia utilizzando gel di silice 60 (70-230 mesh ASTM) o alluminio ossido 90 attivo neutro (70-230 mesh ASTM) prodotti dalla Merck. I prodotti acquistati (starting materials e reattivi), ove non specificato diversamente, sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

3.2 SINTESI UNITÀ 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (3)

La sintesi dell'unità fotoattiva(3) presente in tutti i leganti sintetizzati, si ha mediante reazione di condensazione tra 1 g (5,3 mmol) 3-idrossi-2-acido naftoico (1) e 0,65 g (5,3 mmol) 2-ammino-m-cresolo (2) in presenza di acido polifosforico, in un bagno a sabbia a 160 °C per tutta la notte.

Dopo 15 ore, si lascia raffreddare la miscela e si aggiungono 300 mL di H₂O e si trasferiscono in un becher da 1L.

Si neutralizza la miscela di reazione con circa 5/6 g di Na₂CO₃, aggiungendo cautamente per evitare sviluppo forte di effervescenza sino a pH neutro.

Il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice eluendo con una miscela di acetato di etile-n-esano (1:50, % v/v).

Si recuperano 0,530 g (279,33 g/mol) di 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo(3).

Resa: 36 %

¹H-NMR (CDCl₃; 25 °C) δ (ppm) :2,68 (s, 3H); 7.20-7,55 (m, 6 H), 7,73-7,77 (d, 1H); 7,87-7,91 (d, 1H), 8,64 (s, 1H), 11,44 (s, 1H).

Sono state percorse due vie alternative per la protezione della funzionalità ossidrilica del gruppo naftolo sia con il gruppo protettivo MOMCl sia con TBDMSCl.

3.3 SINTESI 2-(2-metossimetilossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (4)

In un pallone da 100 mL in atmosfera inerte, si aggiungono: 0,500 g di (3), 2,35 mL (13,7 mmol) di N-etildiisopropiletilammina e CH₂Cl₂ sotto agitazione a 65°C in bagno ad olio.

Si lasciano sgocciolare lentamente 1,04 mL (13,7 mmol) di MOMCl in presenza di CH₂Cl₂ e si lascia reagire per 36 ore.

Si aggiungono 100 mL di H₂O e si trasferisce in un becher da 1 L.

Si estrae la fase organica con 3 aliquote da 100 mL di CH₂Cl₂ in un imbuto separatore da 500 mL. La fase organica si raccoglie, si anidrifica e si aggiunge del Na₂SO₄ anidro.

Si filtra, si tira la soluzione all'evaporatore rotante e si recuperano 0,520 g di prodotto **2-(2-metossimetilossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo(4)**.

Resa: 88%.

¹H-NMR (CDCl₃, 25°C) δ (ppm) : 2,73 (s, 3H); 3,62 (s, 3H); 5,45 (s, 2H); 7,17-7,58 (m, 6 H); 7,78-7,82 (d, 2H); 7,89-7,93 (d, 2H); 8,63 (s, 1H).

3.4 SINTESI 4-bromometil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo

(5)

In un pallone a tre colli da 250 mL in atmosfera inerte, si versano 1,12 g (3,46 mmol) di(4).

Si aggiungono nell'ordine 150 mL di CCl₄, poi 0,68 g (3,81 mmol) di N-bromosuccinimide e si mette il pallone nel bagno ad olio a 110°C. Quando si raggiunge una vigoroso riflusso, si aggiungono 0,03 g (0,18 mmol) di 2,2'-azobis-(2-metilpropionitrile) e si lascia reagire per 18 ore.

Al termine della reazione si nota una soluzione arancione scura.

Si lascia raffreddare il pallone a tre colli, poi lo si mette in un bagno a ghiaccio. In seguito a questa operazione si forma un precipitato bianco che viene rimosso mediante filtrazione.

La soluzione viene concentrata al rotavapor sino a circa 30 mL di soluzione.

Si aggiungono circa 70 mL di metanolo alla soluzione. Si forma un precipitato che viene filtrato sottovuoto, messo a tirare in essiccatore e si caratterizza mediante spettro ¹H-NMR. Si ottengono 0,63 g (1,58 mmol) di prodotto desiderato 4-bromometil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo(5).

Resa : 48%

¹H-NMR :3,62 (s, 3H); 5,45 (s,2H); 7,17-7,59 (m, 6H); 7,78-7,82 (d,1H); 7,89-7,93 (d, 1H); 8,64 (s,1H).

3.5 SINTESI 2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)benzossazolo (6)

Si pesano 2,5 g (9.08 mmol) di **(3)** in un pallone da 250 mL e vengono addizionati una quantità equimolare (2.05 g) di TBDMSCl e sgocciolato imidazolo 1.24 g in 20 mL di DMF in un bagno ad olio a 80°C in 130 mL di DMF.

Dopo 24 ore, si spegne la reazione, si lascia raffreddare e si aggiunge NaHCO₃ al 5 % m/m in bagno a ghiaccio. Si estrae la soluzione in CH₂Cl₂, si anidifica con Na₂SO₄ anidro e si rimuove la DMF con una soluzione BRINE. Si rimuovono i residui di solvente organico mediante evaporatore rotante. Si cristallizza il prodotto durante rimozione del solvente e si recuperano 2,7 g di 2-(2-tertbutildimetilsilossi-3-naftil)benzossazolo(**6**).

Resa: 82%.

¹H-NMR :0,30 (t, 6H); 1,073-1,10 (m, 9H); 2,75 (s, 3H); 7,18-7,73 (m, 6H); 7,77-7,90 (d, 1H); 7,94-7,95 (d, 1H); 8,70 (s, 1H).

3.6 SINTESI 4-bromometil-2-(2-tertbutildimetilsililossi-3-naftil)benzossazolo (7)

Si pesano 2.09 g (5.36 mmol) di **6**, un eccesso del 30% molare di N-bromosuccinimide e una quantità catalitica di AIBN in 100 mL di CCl₄ in un pallone da 250 mL a riflusso.

Dopo 23 ore, al termine della reazione, si spegne la reazione e si lascia raffreddare. Si pone il pallone in un bagno a ghiaccio e si rimuove la succinimide mediante filtrazione. Si concentra il pallone e si lascia precipitare il prodotto mediante n-esano in frigorifero. Si filtra il prodotto, triturandolo con n-esano. Si filtra e si rimuove il solvente mediante evaporatore rotante.

Si ottengono 1.35 g di prodotto desiderato 4-bromometil-2-(2-tertbutildimetilsililossi-3-naftil)benzossazolo (**7**).

Resa: 54 %

¹H-NMR :0,31 (t, 6H); 1,08-1,10 (m, 9H); 5,00 (s, 2H); 7,18-7,73 (m, 6H); 7,32-7,53 (m,6H); 7,72 (d, 1H); 7,90 (d, 1H); 8,71 (s,1H).

3.7 SINTESI unità 2,8-ditia-5-aza-[9] (2,6) piridinofano

(8)

Si aggiungono a 300 mL di DMF anidra, una soluzione di N-(t-butossicarbonil)bis-(2-cloroetilammina) (6,3 g, 25,8 mmol) e del Cs₂CO₃. Viene sgocciolato in 24 ore la 2,6-ditiometil-piridina (3g, 17.5 mmol) in 60 mL di DMF anidra in 24 ore a 55°C. La soluzione risultante viene miscelata a temperatura ambiente per 20 ore. Il Cs₂CO₃ viene rimosso mediante filtrazione. Il filtrato viene disciolto in CH₂Cl₂ (250 mL) e lavato con acqua (100 mL). La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e il solvente rimosso mediante evaporatore rotante, purificato mediante cromatografia flash (silice) utilizzando CH₂Cl₂ : CH₃OH (97.5 : 2.5 V/V) come eluente.

Il prodotto è stato deprotetto in presenza di acido trifluoroacetico (20 mL) in 20 mL di diclorometanomiscelati a temperatura ambiente per 1.5 ore. Il solvente è stato rimosso mediante evaporatore rotante e il residuo recuperato in acqua. Il pH della soluzione è stato portato a valori fortemente alcalini mediante una soluzione di NaOH 6M ed è stata effettuata un'estrazione con diclorometano mediante imbuto separatore. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ anidro e il solvente rimosso mediante evaporatore rotante.

Il prodotto ottenuto 2,8-ditia-5-aza-[9](2,6) piridinofano pesa 1,46 g.

Resa: 84 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.39 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.71 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.83 (s, 4H, ArCH_2S), 7.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.55 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 31.75 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 37.77 (ArCH_2S), 47.01 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 121.25, 137.21, 158.55 (C aromatici).

3.8 SINTESI 5-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza-[9](2,6)-piridinofano (L₁)

Si monta l'apparecchiatura di laboratorio nel seguente modo: si collegano ad un pallone da 250 mL posto sopra un bagno ad olio, una presa per N_2 , un refrigerante e un tappo di vetro. Si scalda la vetreria per rimuovere tracce d'umidità che possono interferire con la reazione.

Si pesano nell'ordine 150,7mg (0,628 mmol) di 2,8-ditia-5-aza [9] (2,6)-piridonofano (**8**) e discolti in 60 mL di CH_3CN anidro, in presenza di 260 mg K_2CO_3 in quantità equimolare e posti in un pallone da 250 mL a 3 colli. Si pesano 294,2 mg di 4-bromometil-2-(2-tertbutil-dimetilsilil-3-naftil)benzossazolo(**7**), che vengono disciolti in 70 mL di CH_3CN anidro e versati dentro ad un imbuto gocciolatore.

Si mette a scaldare il sistema a 50°C e si inizia a sgocciolare la soluzione di (**7**) dentro il pallone di reazione.

A reazione terminata, dopo 17 ore previo controllo su lastrina cromatografica, spengo la reazione e lascio raffreddare a temperatura ambiente la soluzione che si presenta di

colore giallo scuro. Si osserva il formarsi di un precipitato, costituito da sali inorganici che vengono rimossi mediante filtrazione.

Il grezzo di reazione viene tirato a secco al rotavapor ed aggiunto qualche millilitro di CH_2Cl_2 e cristallizzato mediante metanolo.

Il prodotto così ottenuto si presenta marroncino e si ottengono 240 mg di 5-2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza [9] (2,6)-piridinofano(**L1**) (resa 53%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 2.56 (s,8H), 3.83 (s,4H), 4.02 (s,2H), 7.36-7.46 (m,6H), 7.50-7.56 (t,1H, $J=8\text{Hz}$), 7.73 (d,1H, $J=8\text{Hz}$), 7.81 (t,1H, $J=8\text{Hz}$), 7.82-7.86 (t,2H, $J=8\text{Hz}$), 8.05 (d,1H, $J=8\text{Hz}$), 8.73(s,1H), 11.10 (S,1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 13.9, 19.6, 23.5, 25.4, 51.6, 52.7, 58.0, 109.3, 111.8, 122.1, 124.3, 124.9, 127.4, 129.0, 130.8, 131.1, 138.1, 138.9, 140.4, 150.0, 158.0.

3.9 SINTESI N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina

(L₂)

Si versano in un pallone a tre colli da 250 mL, 1,2 mL di soluzione di dimetilenammina al 40% con 20 mL di acetonitrile. In un imbuto gocciolatore da 100 mL si versano 500 mg (1,06 mmol) di (7) sciolti in 20 mL di acetonitrile e si lasciano sgocciolare per circa un'ora nel pallone di reazione.

Si lascia la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 1h30', poi si scalda il sistema a circa 60 °C. La miscela si presenta arancione scura.

Con una pipetta di Pasteur, si raccoglie la miscela di reazione e si introduce dentro un pallone da 50 mL per poi evaporare il solvente mediante evaporatore rotante. Si raccoglie il prodotto con una piccola quantità di CH₂Cl₂ e si esegue un'estrazione con una soluzione satura di carbonato di sodio, per rimuovere l'ammina libera in eccesso.

La fase organica si raccoglie e si anidrifca con Na₂SO₄ anidro. In seguito si tritura il campione con n-esano per rimuovere la presenza di silicio, lasciando sotto agitazione il prodotto a T ambiente. Si filtra e si mette in essiccatore il prodotto (L₂).

Si ottengono 228,3 mg di prodotto N,N-dimetil-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)ammina (L₂).

Resa: 61%

Si caratterizza il solido mediante spettro ¹H-NMR utilizzando come solvente DMSO-d₆ per la preparazione del campione.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 2.25 (s,6H), 3.85 (s,4H), 4.02 (s,2H), 7.39-7.58 (m,6H), 7.76-7.78 (d, 1H), 7.82-7.84 (d, 1H), 8.05-8.07 (d, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.73(s, 1H), 11.10 (s, 1H).

3.10 SINTESI N-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N',N'-trimetiletilendiammina (L₃)

Si pesano 488 mg (1,14 mmol) di **(7)** e si sciolgono in 50 mL di CH_3CN e 15 mL di CH_2Cl_2 per aumentarne la solubilità. La soluzione si introduce in un imbuto gocciolatore. All'interno di un pallone a 3 colli da 250 mL, si miscelano 0,148 mL(1,14 mmol) di N,N'-trimetiletilendiammina con 30 mL di CH_3CN . Il sistema si pone in atmosfera inerte (N_2) e si mette sotto agitazione a temperatura ambiente, lasciando sgocciolare il bromuro **(7)** lentamente. Si lascia il sistema sotto agitazione per 16 ore fino al termine della reazione, visibile su cromatografia su strato sottile in Al_2O_3 (Rf prodotto = 0,17). Si evapora la miscela di solventi mediante evaporatore rotante. Si ottiene un solido al quale si aggiunge a temperatura ambiente etanolo ed in seguito HBr per formare il sale bromidrato di L₃. Il precipitato rosso così ottenuto si filtra e si evaporano i residui di solvente in essiccatore.

Si caratterizza il sale del legante L₃ mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare $^1\text{H-NMR}$ in D_2O (Resa = 54%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 2.77 (s,6H), 3.46-3.52 (m,4H), 4.28 (s,2H), 6.93 (s, 1H), 7.12-7.34 (m, 5H), 7.55-7.57 (d, 2H), 8.13 (s, 1H).

3.11 SINTESI N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N'- dietilendiammina (L4)

In un pallone a 3 colli da 250 mL si miscelano 0,840 mL (0,78 mmol) di N,N'-dietilendiammina, in presenza di 648 mg di K₂CO₃ (forte eccesso), con 50 mL di CH₃CN. Si pesano 734 mg (1,56 mmol) di bromuro (7) e si disciolgono in 70 mL di CH₃CN e posti in imbuto gocciolatore collegato al pallone di reazione. Il sistema si pone in un bagno ad olio a 50°C in atmosfera inerte di N₂. Si sgocciola il bromuro (7) nel pallone di reazione e si lascia reagire per 17 ore fino al termine della reazione. Si spegne la reazione, che si presenta arancione con il K₂CO₃ presente in sospensione, si lascia raffreddare e si filtra per rimuovere i sali inorganici.

Il prodotto ottenuto N,N'-bis-(2-(2-idrossi-3-naftil)-4-benzossazol-5-ilmetil)-N,N'-dietilendiammina (L4) si lascia cristallizzare da n-esano.

Il prodotto (L4) si caratterizza mediante spettroscopia in risonanza magnetica nucleare (¹H-NMR).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 2.36 (s, 6H), 2.77 (s, 4H), 4.00 (s, 4H), 7.30-7.52 (m, 12H), 7.63-7.67 (d, 2H), 7.82-7.86 (d, 2H), 8.50 (s, 2H), 11.3 (s, 2H).

3.12 SPETTROSCOPIE

3.12.1 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

Spettri ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D H-H COSY e 2D C-H HSQC sono stati eseguiti utilizzando un apparecchio Bruker Avance 400 che opera ad una frequenza di 400 MHz per ^1H e per ^{13}C .

I chemical shift sono riportati in ppm utilizzando come riferimento il tetrametilsilano ($\delta = 0$) o, in soluzione acquosa, diossano ($\delta = 67,4$ ppm) per ^{13}C e HOD ($\delta = 4,75$ ppm) per ^1H .

3.12.2 Spettroscopia elettronica ultravioletto-visibile (UV-VIS)

Gli spettri elettronici VIS-UV sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro in assorbimento Varian mod. Cary 100 SCAN con portacelle termostattizzato a 25°C ed uno spettrofotometro in fluorescenza Varian mod. Eclipse.

3.12.3 Titolazioni spettrofotometriche

La procedura per la determinazione l'interazione tra i leganti e i vari guest metallici prevede l'impiego dei leganti ad una concentrazione di $\approx 10^{-6}$ M disciolti in opportuno solvente organico. Le prove per i leganti **L**₁, **L**₂, **L**₃ sono state realizzate nelle condizioni del 100 % di acetonitrile o in una miscela di solventi H_2O /acetonitrile (1:9 v/v) a pH

costante. Le misure effettuate sono state fatte a pH = 7,4 in soluzione HEPES, a pH = 8 e a pH = 9 in soluzione TAPS mediante l'impiego di un pH-metro precedentemente tarato. Le misure spettrofotometriche per il legante **L4** sono state effettuate utilizzando una miscela di H₂O / diossano (1:9 v/v) a pH=9 ed a pH=8 per consentire una migliore solubilità del legante nel mezzo e per favorire la deprotonazione dell'ossidrilico naftolico.

Le cuvette impiegate sono termostattizzate a 25 °C e quindi si è misurato lo spettro in assorbimento e successivamente in emissione. Si ottiene in questo modo la possibilità di ottenere diverse informazioni utili circa la risposta fotochimica dei complessi che si formano. Le misure in fluorescenza, sono state svolte ad una lunghezza d'onda d'eccitazione pari a 316 nm, punto isosbetico ricavato dallo spettro in assorbimento.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) PAC, 1999, 71, 1919 (*Glossary of terms used in theoretical organic chemistry*) on page 1964
- 2) Konrad Szaciłowski, Wojciech Macyk Chem. Rev. **2005**, 105, 2647-2694
- 3) Bonnett, R. Chem. Soc. Rev. 1995, 24, 19
- 4) Wojciech Macyk, Chem. Rev. 2005, 105, 2647-2694.
- 5) Pedersen, C. J. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1988, 27, 1021.
- 6) Lehn, J.-M. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1988, 27, 89.
- 7) Cram, D. J. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1988, 27, 1009.
- 8) Evan P, Roger C., Journal of the American Chemical Society 1977, 99 (8), 2564-71.
- 9) L.F. Lindoy, I.M. Atkinson, Self-Assembly in Supramolecular Systems, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000.
- 10) Pearson Ralph G., Journal of Chemical Education, Volume 45, Number 9, September 1968
- 11) Pearson Ralph G., Journal of Chemical Education Volume 45, Number 10, October 1968.

- 12) Pearson, *Chemical Reviews*, 1975, 1, 75.
- 13) Pearson, *J. Chem. Ed.* 1968, 45, 581-587.
- 14) Henary, M. M.; Fahrni, C. J. *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, 5210.
- 15) P. Atkins; *Physical Chemistry*; Oxford 2006.
- 16) Joseph R. Lakowicz; *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd Edition); Springer 2006
- 17) T. Cumberbatch, Q. S. Hanley; *J. Chem. Educ.* 2007 (8) 1319 – 1322
- 18) *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC press 2009
- 19) Ying Zhang, *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 4159
- 20) S.R. Vazquez, M.C.R. Rodriguez, M. Mosquera, F. Rodriguez-Prieto, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 1814.
- 21) H. Wang, H. Zhang, O.K. Abou-Zied, C. Yu, F.E. Romesberg, M. Glasbeek, *Chem. Phys. Lett.* 367 (2003) 599.
- 22) T. Arthen-Engeland, T. Bultmann, N.P. Ernsting, M.A. Rodriguez, W. Thiel, *Chem. Phys.* 163 (1992) 43.
- 23) Rajesh Chakrabarty, Partha Sarathi Mukherjee, *Chemical Reviews* 2011, 111 (11), 6810-6918.
- 24) Mauro Formica, Vieri Fusi, Luca Giorgi, Mauro Micheloni, Paola Paoli, *Dalton*

Trans., 2013, 42, 5848

25) Northrop, B. H.; Chercka, D.; Stang, P. J. *Tetrahedron* 2008, 64, 11495.

26) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*;

VCH: Weinheim, Germany, 1995.

27) Sauvage, J.-P.; Dietrich-Buchecker, C., Eds. *Molecular Catenanes, Rotaxanes, and Knots: A Journey Through the World of Molecular Topology*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999.

28) Reviews: Stang, P. J. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 2.

29) Reviews: Caulder, D. L.; Raymond, K. N. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1999, 1185.

30) Reviews:(a) Fujita, M.; Tominaga, M.; Hori, A.; Therrien, B. *Acc. Chem. Res.* 2005, 38, 371.

31) Reviews:(a) Oliveri, C. G.; Ulmann, P. A.; Wiester, M. J.; Mirkin, C. A. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 1618.

32) Reviews: Cotton, F. A.; Lin, C.; Murillo, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99, 4810.

33) Reviews: Yoshizawa, M.; Fujita, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2010, 83, 609.

34) Reviews: Pluth, M. D.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 1650.

- 35) Reviews: Fujita M, Umemoto K, Yoshizawa M, Fujita N, Kusukawa T, Biradha K. Chem. Commun. 2001, 509.
- 36) G. Bourhill, J.L. Brédas, L.T. Cheng, S.R. Marder, F. Meyers, J.W. Perry, and B.G. Tiemann, J. Am. Chem. Soc., 116, 1994, pp. 2619–2620.
- 37) M. Blanchard-Desce, V. Alain, P.V. Bedworth, Chem. Eur. J., 3, 1997, pp. 1091–1104.
- 38) A.V. Kulinich, N.A. Derevyanko, Russ. J. Gen. Chem. (Engl. Trans.), 76, 2006, pp. 1441–1457.
- 39) B.W. Domagalska, K.A. Wilk, and R. Zielinski, J. Photochem. Photobiol. A Chem. 184, 2006, pp. 193–203.
- 40) Jelinek, R.; Kolusheva, S. Chem. Rev. 2004, 104, 5987.
- 41) A.E. Becquerel, Recherches sur les effets de la radiation chimique de la lumiere solaire au moyen des courants electriques, Comptes Rendus de L'Academie des Sciences 9 (1839) 145–149. [22]
- 42) A.E. Becquerel, Memoire sur les effects d'electricques produits sous l'influence des rayons solaires, Annalen der Physick und Chemie 54 (1841) 35–42.
- 43) Anitha Devadoss, Pitchaimuthu Sudhagar, Reviews Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews 24 (2015) 43–63

44) L. Zhang, H.H. Mohamed, R. Dillert, D. Bahnemann, Kinetics and mechanisms of charge transfer processes in photocatalytic systems: a review, *J. Photochem. Photobiol. C* 13 (2012) 263–276.

45) R.J. Forster, P. Bertoncello, T.E. Keyes, Electrogenerated chemiluminescence, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2 (2009) 359–385.

46) A. Venkatanarayanan, B.S. O’Connell, A.D. Keyes, E. Tia, R.J. Forster, , *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 396–398.

47) A. Devadoss, C. Dickinson, T.E. Keyes, R.J. Forster, , *Anal. Chem.* 83 (2011) 2383–2387.

48) A. Devadoss, L. Dennany, C. Dickinson, T.E. Keyes, R.J. Forster, , *Electrochem. Commun.* 19 (2012) 43–45

49) Sabine Martin, Wendy Griswold, *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens*, Center for Hazardous Substance Research, Issue 15 March 2009

50) Ji Eon Kwon, Sumin Lee, *Inorg. Chem.* 2012, 51, 8760–8774

51) Aragoni, M. C.; Garau, A.; Lippolis, V.; Papke, U.; Shamsipur, M.; Tei, L.; Yari, A.; Verani, G. *Inorg. Chem.* 2002, 41, 6623.

52) (a) Caltagirone, C.; Bencini, A.; Garau, A.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Papke, U.; Tei, L.; Verani, G. *Dalton Trans.* 2003, 901.

(b) Tei, L.; Blake, A. J.; Cooke, P. A.; Caltagirone; Lippolis, V.; Morale, F.; J. Chem. Soc., Dalton Trans. 2002, 1662.

(c) Arca, M.; Blake, A. J.; Lippolis, V.; Montesu, D. R.; Eur. J. Inorg. Chem. 2003, 1232.

53) Aragoni, M. C.; Arca, M.; Bencini, A.; Blake, A. J.; Caltagirone, C.; Decortes, A.; Garau, A.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Prodi, L.; Zaccheroni, N. Dalton Trans. 2005, 2994.

54) (a) Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Lippolis, V.; Garau, A.; 2001, 55, 1047.

(b) Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Lippolis, V.; Garau, A.; Anal. Chim. Acta 2002, 462, 225.

(c) Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Ganjali, M. R.; Lippolis, V.; Garau, A. Electroanalysis 2002, 14, 1691.

(d) Shamsipur, M.; Poursaberi, T.; Rezapour, M.; Lippolis, V.; Montesu, D. R. Electroanalysis 2004, 16, 1336.

(e) Shamsipur, M.; Hosseini, M.; Alizadeh, K.; Caltagirone, C.; Lippolis, V. Anal. Chim. Acta 2005, 533, 17.

(f) Shamsipur, M.; Hosseini, M.; Mousavi, M. F.; Garau, A.; Lippolis, V.; Anal. Chem. 2005, 77, 276.

55) Blake, A. J.; Bencini, A.; Garau, Lippolis, V.; Mariani, P.; Prodi, L.; Dalton Trans. 2004,(72), 2771-2779.

