



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO “Carlo Bo”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE PURE E APPLICATE

Corso di Dottorato di Ricerca in

SCIENZE DI BASE E APPLICAZIONI

Curriculum

SCIENZE CHIMICHE E SCIENZE FARMACEUTICHE

XXX CICLO

NUOVI FLUOROFORI E CHEMOSENSORI PER ANIONI E CATIONI
METALLICI E CARRIER PER ANIONI;

SINTESI E STUDI DI SENSING E DI TRASPORTO

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/03

RELATORE

Chiar.mo Prof. Vieri Fusi

DOTTORANDA

Dott.ssa Angela Ricci

Anno Accademico 2016/2017

Capitolo 1. INTRODUZIONE

LA CHIMICA SUPRAMOLECOLARE	3
1.1 CHIMICA SUPRAMOLECOLARE IN BIOLOGIA	5
1.2 LEGANTI MACROCICLICI DI SINTESI	7
1.2.1 ETERI CORONA	10
1.2.2 CRIPTANDI	11
1.2.3 CICLOFANI	12
1.2.4 CALIXARENI	12
1.3 POLIAZACICLOALCANI	13
1.4 RICONOSCIMENTO MOLECOLARE	16
1.4.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA FORMAZIONE E LA STABILITÀ DEI COMPLESSI	17
1.4.2 TERMODINAMICA	19
1.4.3 INTERAZIONI SUPRAMOLECOLARI	21
1.5 CHEMOSENSORI	23
1.5.1 CHEMOSENSORI DI FLUORESCENZA	25
1.5.2 MODULAZIONE DELLA FLUORESCENZA	26
1.6 COORDINAZIONE CATIONICA E ANIONICA	33
1.7 CENNI SUL TRASPORTO CELLULARE	36
1.7.1 TRASPORTATORI IONICI DI ORIGINE NATURALE	38
1.7.2 TRASPORTATORI IONICI DI SINTESI	40
1.8 METODI DI VALUTAZIONE DEL TRASPORTO ANIONICO	43

Capitolo 2. OBIETTIVI

SCOPO DELLA RICERCA	47
2.1 UNITÀ LEGANTE	51
2.2 UNITÀ FOTOATTIVA	52
2.2.1 CHEMOSENSORI BASATI SU UNITÀ OSSADIAZOLICHE	52
2.2.2 CHEMOSENSORI BASATI SULL'UNITÀ HNBO	55
2.3 TRASPORTATORI PER ANIONE CLORURO	56

Capitolo 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 SINTESI E STUDIO DI L1	59
3.1.1 SINTESI DEL LEGANTE L1	59
3.1.2 STUDIO DELLE PROPRIETÀ IN SOLUZIONE DI L1	61
3.1.2.1 Comportamento acido-base	61
3.1.2.2 Assorbimento UV-Vis in funzione del pH	62
3.1.3 STUDIO DELLE PROPRIETÀ COORDINATIVE DI L1	64
3.1.3.1 Studio delle strutture cristalline dei complessi mononucleari $[ZnL1]^{2+}$ $[CuL1]^{2+}$	64
3.1.3.2 Coordinazione del catione Zn^{2+}	66
3.1.3.3 Studio spettrofotometrico di L1 in presenza del catione Zn^{2+}	69
3.1.3.4 Studio del complesso $[ZnL1]^{2+}$ come metallo-recettore per anioni	74
3.1.3.5 Analisi NMR del complesso $[ZnL1]^{2+}$ e del complesso in presenza di Cl^-	78
3.1.4 CONCLUSIONI	81

3.2 SVILUPPO DI LEGANTI BASATI SULL'UNITÀ FOTOATTIVA PyPyD	83
3.3 SINTESI E STUDIO DI L2	83
3.3.1 SINTESI DEL FLUOROFORO PyPyD	83
3.3.2 SINTESI DI L2	85
3.3.3 STUDIO SPETTROFOTOMETRICO DI L2	86
3.3.4 CONCLUSIONI	86
3.4 SINTESI E STUDIO DI L3	88
3.3.1 SINTESI DI L3	88
3.3.2 STUDIO SPETTROFOTOMETRICO DI L3	89
3.3.3 CONCLUSIONI	90
3.5 SVILUPPO DI LEGANTI BASATI SUL FLUOROFORO HNBO	92
3.6 SINTESI E STUDIO DI L4	92
3.6.1 SINTESI DI L4	92
3.6.2 STUDI SPETTROFOTOMETRICI DI L4 IN FUNZIONE DEL pH	94
3.6.3 STUDIO DELLE PROPRIETÀ COORDINATIVE DI L4	98
3.6.3 CONCLUSIONI	104
3.7 STUDIO DI L5	105
3.7.1 SINTESI DI L5	105
3.7.2 STUDIO DELLE PROPRIETÀ COORDINATIVE DI L5	105
3.7.3 CONCLUSIONI	108
3.8 SVILUPPO DI TRASPORTATORI PER IONE CLORURO	109
3.8.1 SINTESI DEI TRASPORTATORI T1, T2, T3 E T4	109
3.8.2 STUDI DI TRASPORTO: METODO GENERALE DEL SAGGIO HPTS NMDG-Cl	113
3.8.2.1 Risultati e Discussione del Saggio di Trasporto HPTS NMDG-Cl	114
3.8.3 CONCLUSIONI	121

Capitolo 4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 SPETTROSCOPIE	122
4.2 POTENZIOMETRIA	124
4.2.1 METODO DI CALCOLO	126
4.3 HILL PLOT: SAGGIO HPTS NMGD-Cl	128
4.4 METODI GENERALI DI SINTESI	130
4.5 SINTESI DEL LEGANTE L1	131
4.6 FORMAZIONE DEI COMPLESSI DI L1	133
4.7 SINTESI DEL LEGANTE L2	136
4.8 SINTESI DEL LEGANTE L3	140
4.9 SINTESI DEL LEGANTE L4	141
4.10 SINTESI DEL LEGANTE L5	145
4.11 SINTESI DEI TRASPORTATORI T1, T2, T3 E T4	146

<i>Ringraziamenti</i>	153
-----------------------	-----

<i>Riferimenti Bibliografici</i>	154
----------------------------------	-----

Capitolo 1. INTRODUZIONE

LA CHIMICA SUPRAMOLECOLARE

La chimica è la scienza che studia la composizione della materia e le sue trasformazioni, all'interno di essa si estende la chimica supramolecolare, quella branca della chimica che si occupa di entità organizzate di elevata complessità, in cui due o più specie chimiche sono tenute assieme da forze intermolecolari non covalenti e selettive.¹ In natura, la chimica supramolecolare è alla base dei principali sistemi biologici che regolano numerose funzioni vitali e altamente specifiche, come fenomeni di riconoscimento, trasmissione di segnali, trasporto, reazioni enzimatiche o recettoriali per citarne alcune.

Questa scienza nasce pertanto traendo ispirazione dai sistemi complessi di origine naturali, in cui una specie di dimensioni maggiori detta recettore, oppure *host*, coordina selettivamente e reversibilmente un specifico substrato di dimensioni inferiori, detto *guest*, per dare origine a un addotto dotato di un elevato grado di organizzazione strutturale e dotato di funzioni e proprietà ben determinate (Figura 1).

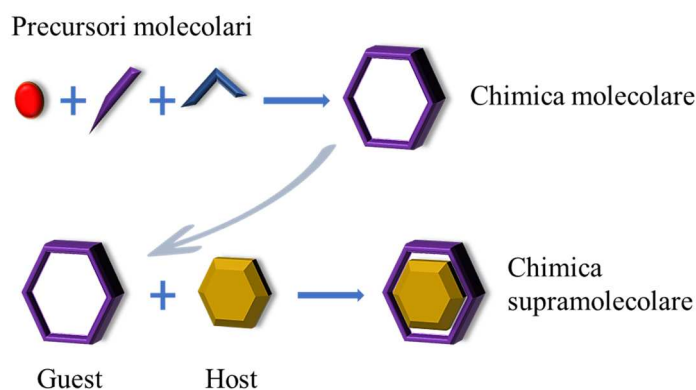


Figura 1 Rappresentazione schematica della chimica molecolare e della chimica supramolecolare.

Le basi della chimica supramolecolare sono state poste alla fine del XIX secolo, quando il chimico tedesco Hermann Emil Fisher formula il principio di “chiave-serratura”, tutt’oggi utilizzato per descrivere l’assemblaggio di aggregati molecolari, come ad esempio il complesso enzima-substrato.² L’identificazione e lo studio dettagliato delle interazioni di non legame, tra cui il legame a idrogeno, hanno permesso di comprendere la struttura delle proteine e dei più importanti aggregati biologici come il DNA. Ciò ha condotto alla progettazione e la sintesi di strutture basate su queste interazioni, in particolare agli inizi degli anni ’60 sono stati sviluppati i primi leganti macrociclici per cationi metallici, quali ciflofani, sferandi e carcerandi per citarne alcuni. La chimica supramolecolare fu definita dal chimico francese Jean-Marie Lehn, come la «chimica degli aggregati molecolari di più alta complessità risultanti dall’associazione di due o più specie chimiche legate assieme da forze intermolecolari» e ancora come “chimica oltre la molecola”.³ Nel 1987, Jean-Marie Lehn vinse il premio Nobel per la chimica grazie alla scoperta di una nuova classe di molecole, dette criptofani, in grado di coordinare selettivamente i cationi. Lo scorso dicembre 2016, la chimica supramolecolare è stata nuovamente la protagonista del premio Nobel assegnato ad uno dei più grandi scienziati dell’ultimo ventennio, Fraser Stoddart. Il chimico britannico ha ideato e progettato le prime macchine molecolari, o nanomacchine, cioè sistemi molecolari interconnessi che grazie all’utilizzo della chimica dinamica covalente producono movimenti simil-meccanici e svolgono un lavoro utile in grado di spostare processi meccanici o chimici.⁴ I principali progetti avanzati sono stati i rotaxani e l’anello di Borromeo molecolare, riportati in [Figura 2](#). Brevemente, il rotaxano è una molecola costituita da un anello macrociclico attraversato da parte a parte da un frammento lineare in cui l’unico modo per rompere la molecola è spezzare un legame covalente; mentre gli anelli di Borromeo molecolari consistono in tre macrocicli meccanicamente interconnessi tra loro, legati in modo che la rottura di un anello permette la dissociazione degli altri cicli. Attualmente, la ricerca scientifica è in forte espansione e la chimica supramolecolare è alla base delle più innovative nanotecnologie.

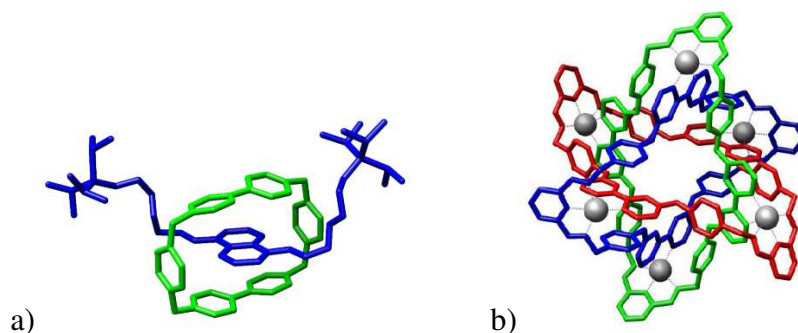


Figura 2 a) Rotaxano; b) anelli di Borromeo molecolari.

Come accennato, la chimica supramolecolare è una scienza multidisciplinare che coinvolge numerosi settori, che includono sia la chimica organica che la chimica inorganica, ma anche la cristallografia, la nanochimica per arrivare fino alla biologia e alla medicina moderna. Basti pensare a quanti sono i processi biochimici basati sull'aggregazione di più subunità molecolari, nei quali i complessi formati possono svolgere nuove e specifiche funzioni e presentare caratteristiche completamente differenti rispetto alle singole unità che li compongono. Il riconoscimento e il trasporto molecolare sono sicuramente due dei principali settori in cui gli addotti supramolecolari giocano un ruolo chiave e verso il quale abbiamo focalizzato la nostra attenzione per lo sviluppo di nuovi leganti, approfonditi in dettaglio successivamente.

1.1 CHIMICA SUPRAMOLECOLARE IN BIOLOGIA

In natura i sistemi supramolecolari sono essenziali per la sopravvivenza di ogni organismo, sono alla base dei complessi processi biologici, della struttura e della funzionalità di moltissimi enzimi, del riconoscimento antigene-anticorpo, della trasmissione neuronale, della trascrizione e traduzione del DNA e del trasporto attivo attraverso le membrane lipofile. Tra gli innumerevoli esempi che si possono citare a riguardo, uno sicuramente degno di nota è il gruppo eme, riportato in [Figura 3](#), un

classico modello di complesso metallico costituito da uno scheletro porfirinico che coordina selettivamente uno ione ferro o magnesio. La porfirina è un macrociclo formato da quattro anelli pirrolici uniti da ponti metilenici, la chelazione dello ione avviene per mezzo dei quattro atomi di azoto eterociclici che costituiscono la cavità al centro del legante. L'eme è il gruppo prostetico essenziale per la funzione di diverse proteine, tra cui l'emoglobina in cui lo ione coordinato è il catione di Fe(II), l'ossigeno molecolare viene legato reversibilmente dal ferro, indispensabile dunque per il trasporto nel sangue.

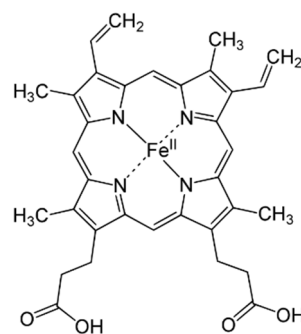


Figura 3 Il gruppo eme (Fe-porfirina).

La clorofilla, invece, è un pigmento presente nelle cellule vegetali ed è composta dal gruppo eme coordinante uno ione Mg(II), è responsabile del passaggio di elettroni attraverso reazioni di ossidoriduzione che stanno alla base della fotosintesi clorofilliana.

In natura esistono anche complessi molecolari che possono indurre delle vere e proprie trasformazioni del substrato, si parla quindi di catalisi a livello supramolecolare. Il sistema recettoriale è in grado di legare selettivamente il substrato mediante siti di interazioni non covalenti, ma possiede anche gruppi funzionali appropriati per reagire con esso e rilasciare poi i prodotti, rigenerando il "reagente" per un nuovo ciclo. La reattività e la catalisi a livello supramolecolare coinvolgono due passaggi fondamentali: formazione del legame e trasformazione del substrato in prodotti. Un esempio può essere quello dell'idrolisi dell'ATP che avviene per mezzo di poliammine protonate policicliche. In particolare, l'ATPasi (Na⁺/K⁺ ATPasi) lega fortemente l'ATP e la scinde in ADP e fosfato inorganico,

come mostrato in [Figura 4](#). La reazione di defosforilazione avviene grazie di una molecola di acqua coordinata dall'enzima per mezzo da uno ione $Mg(II)$, la presenza del metallo complessato è perciò di fondamentale importanza e funge da catalizzatore per la reazione. Inoltre, l'ATPasi è una proteina di transmembrana che coordina e trasporta selettivamente i cationi sodio e potassio da una parte all'altra della membrana lipidica, l'energia necessaria per il trasporto viene fornita dall'idrolisi di una molecola di ATP.

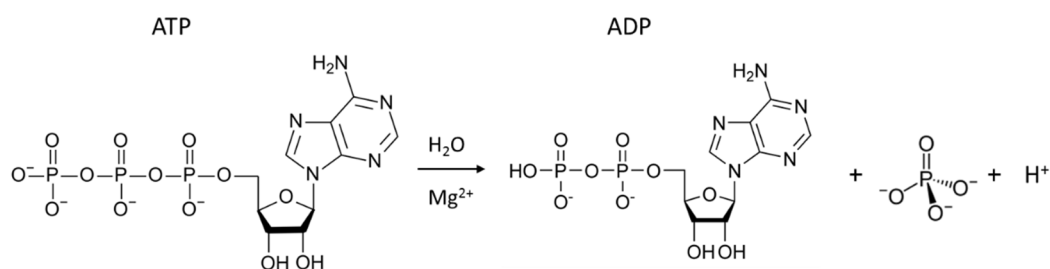


Figura 4 Defosforilazione di una molecola di ATP da parte dell'enzima Na^+/K^+ ATPasi.

1.2 LEGANTI MACROCICLICI DI SINTESI

La straordinaria importanza dei composti supramolecolari in campo biologico, ha fortemente alimentato la ricerca di nuovi leganti di sintesi in grado di coordinare molecole target. Nel corso degli anni infatti, traendo ispirazione dai complessi di origine naturale, sono stati sviluppati e studiati moltissimi recettori di sintesi, che hanno riscosso interesse sia in campo medico che in molti altri ambiti. Molti recettori hanno una struttura macrociclica composta da gruppi coordinativamente attivi disposti all'interno di una struttura ciclica abbastanza ampia da poter ospitare il substrato, in grado di interagire e/o legare attraverso legami a idrogeno, interazioni dipolo-dipolo, ione-dipolo, ione-ione o π - π stacking una molecola *guest*. In questo modo i composti supramolecolari che si formano sono più stabili e il legante risulta essere più selettivo. Tra i vari processi di sintesi per la produzione di complessi supramolecolari, un passaggio chiave è quello della formazione dei legami covalenti tra i

diversi precursori che dovranno interagire secondo uno schema ben definito e organizzato per ottenere il legante o il macrociclo, nel caso sia ciclico, desiderato. Esistono tre modelli principali da seguire che saranno di seguito brevemente descritti.

Template effect. Consiste nella sintesi del legante mediante l'ausilio di uno ione metallico, che può legarsi temporaneamente o permanentemente al legante formato. Il meccanismo viene anche definito assemblaggio metallo-assistito, in cui lo ione ha il compito di imporre ai reagenti la corretta conformazione per ottenere la molecola finale desiderata.⁵ I primi leganti ad essere stati sintetizzati mediante questo metodo furono gli eteri corona. In particolare la sintesi prevede l'utilizzo dello ione potassio come templante. In linea generale, il *template effect* è un processo cinetico⁶ e solitamente il metallo impiegato è un catione di metalli alcalini, alcalino terrosi, metalli di transizione o lantanidi. Lo ione viene coordinato dagli atomi donatori dei reagenti, generando un templato ciclico stabile attorno al metallo che conduce alla formazione di un anello macrociclico come prodotto risultante. Lo ione influenza il processo strutturalmente, controllando l'orientazione spaziale e geometrica dei componenti, la cavità del macrociclo sarà fortemente influenzata dalle dimensioni dello ione, ma aiuta anche a stabilizzare l'intermedio di reazione favorendo la ciclizzazione. In [Figura 5](#) è stata riportata la sintesi di Pedersen per il DB-18-corona-6, che utilizza lo ione sodio come templante.

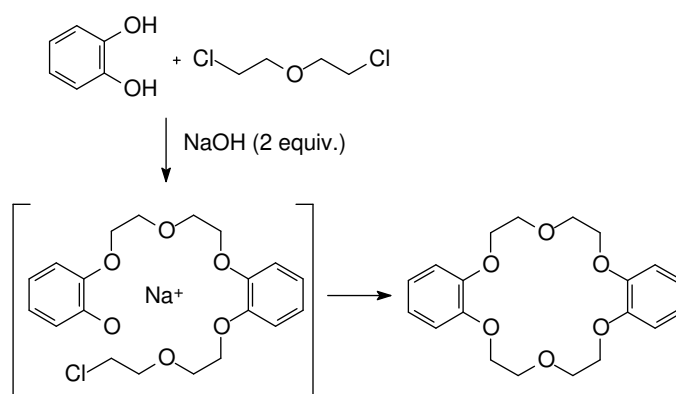


Figura 5 Sintesi di Pedersen per il DB-18-corona-6.

Self-Assembly. Processo a più step di reazione. Si può distinguere in molecolare o supramolecolare, se per la formazione del prodotto le specie di partenza vengono legate, rispettivamente, attraverso legami covalenti oppure vi è solamente un riconoscimento molecolare attraverso interazioni non covalenti e reversibili. Il processo di *self-assembly* è un processo spontaneo che regola l'organizzazione strutturale e spaziale del complesso, influenzandone anche la struttura tridimensionale. La reversibilità dei legami permette al sistema di equilibrare i diversi componenti e le diverse interazioni possibili, formando così la struttura termodinamicamente più stabile. Secondo Lindsey⁷ esistono diverse classificazioni di *self-assembly*:

- *Strict Self-Assembly*: il prodotto finale si forma spontaneamente, quando i componenti sono mescolati secondo il rapporto di combinazione. La struttura del prodotto è il risultato diretto dell'assemblaggio dei suoi componenti, è inoltre reversibile e si trova in equilibrio termodinamico con i reagenti.
- *Self-Assembly Irreversibile*: la sintesi del prodotto avviene per formazione di legami irreversibili tra i componenti di partenza, non sono ammessi margini d'errore e tutti i legami devono essere formati correttamente fin da subito. Il processo conduce quindi alla formazione del prodotto cinetico di reazione.
- *Modificazione Del Precursore E Successivo Self-Assembly*: questo processo prevede ulteriori passaggi per la preparazione di un precursore, da utilizzare poi per il *self-assembly*. Un esempio può essere quello della preparazione del GTP per la formazione della tubulina, studi hanno dimostrato che le proteine adibite all'assemblaggio dei microtubuli necessitano una concentrazione minima di ioni Mg^{2+} per la corretta esposizione dei siti di legame tra le subunità tubulina-GDP.⁸
- *Self-Assembly Con Post-Modificazioni*: il prodotto assemblato richiede ulteriori modificazioni prima di poter essere utilizzato, solitamente per mezzo di un agente esterno.

- *Self-Assembly Assistito*: vengono adoperati fattori esterni per ottenere la formazione del complesso desiderato, come catalizzatori o proteine di supporto.
- *Self-Assembly Diretto*: il processo avviene mediante una struttura, che funge solamente da agente di supporto per permettere la formazione del legante, ma non fa parte della composizione del composto finale. La struttura esterna può giocare un ruolo fondamentale per stabilizzare termodinamicamente l'intermedio oppure per promuovere la cinetica di reazione.
- *Self-Assembly Con Processi Intermedi*: sono tipici in campo biologico. Prevede l'impiego di tutti gli elementi dei *self-assembly* descritti fino ad ora, quali legami reversibili, irreversibili, modificazioni e utilizzo di agenti esterni di supporto o catalizzatori. Gli esempi che meglio esplicano questo meccanismo sono l'assemblaggio del batteriofago e la biogenesi dei ribosomi.

Self-Organization. I composti formati per *self-assembly* interagiscono tra loro mediante interazioni di non legame. Ne derivano molecole complesse con caratteristiche derivanti dai vari costituenti.

Negli ultimi 20 anni ha preso piede, all'interno della chimica supramolecolare, il concetto di progettazione di macrocicli sintetici, interessanti per la stabilità cinetica e termodinamica dei loro addotti supramolecolari. In letteratura sono stati riportati innumerevoli esempi di molecole cicliche di sintesi capaci di complessare ioni o piccoli substrati, attraverso atomi o gruppi donatori presenti nel sito di legame in grado di formare interazioni stabili e reversibili. I macrocicli possono avere caratteristiche strutturali molto differenti e dunque anche le relative proprietà coordinative e funzionali saranno tra le più disparate.

1.2.1 ETERI CORONA

Questi macrocicli sono polieterei ciclici, furono scoperti per caso come prodotto secondario di una reazione di polimerizzazione. Sono formati da 3 a 20 atomi donatori, generalmente sono atomi di ossigeno, ma si possono trovare anche atomi di azoto o zolfo, in grado di chelare uno ione metallico.

Come già affermato, per la sintesi di tali composti si utilizza uno ione metallico, che agisce da template, che viene coordinato dagli atomi donatori dei reagenti e i quali si riorganizzano stabilmente attorno ad esso, tanto da permettere la formazione di un intermedio ciclico che conduce rapidamente al macrociclo finale.⁹ Alcuni dei più noti esempi di eteri corona (krown ethers) sono riportati in [Figura 6](#).

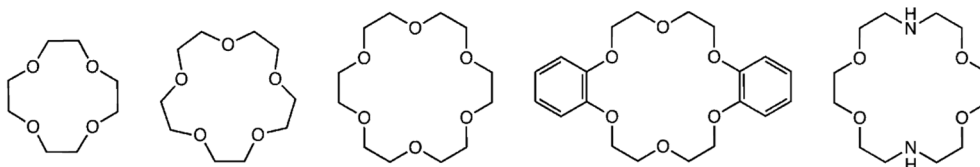
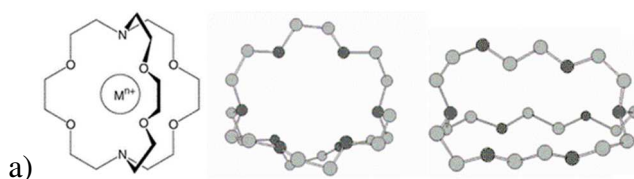


Figura 6 Esempi di crown ether; da sinistra verso destra: 12-corona-4, 15-corona-5, 18-corona-6, dibenzo-18-corona-6, e diaza-18-corona-6.

1.2.2 CRIPTANDI

Sono macrocicli costituiti da più strutture condensate, sono simili agli eteri corona ma sono caratterizzati dalla presenza di una vera e propria cavità tridimensionale in grado di ospitare un substrato (detto criptato) dando luogo alla formazione di un complesso d'inclusione cineticamente molto stabili, il recettore sarà chiamato criptando.¹⁰ La cavità del macrociclo è rivestita di siti di legame per la molecola bersaglio, le dimensioni, la tridimensionalità e la rigidità saranno tutti parametri che possono essere modulati sinteticamente. La struttura della tasca conferisce al recettore un alto grado di selettività verso ioni metallici, cationi o anioni, e molecole di natura biologica. Nel caso di criptandi poliamminici la forma protonata permette la coordinazione di anioni inorganici attraverso interazioni di tipo elettrostatico ([Figura 7](#)).



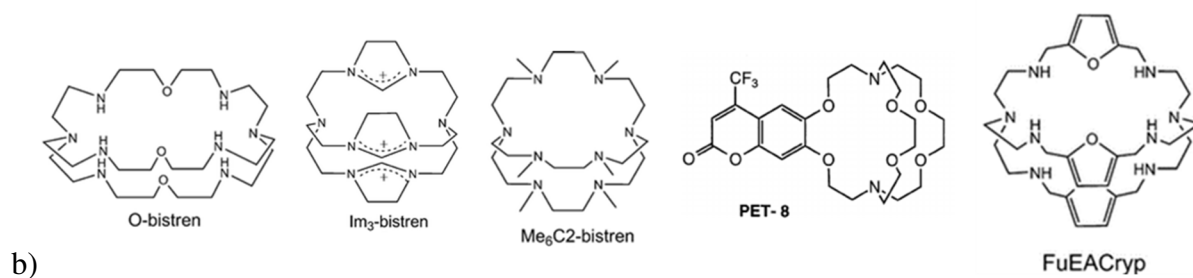


Figura 7 a) Illustrazione di un generico criptano e rappresentazione della struttura cristallina tridimensionale; b) alcuni esempi di criptani presenti in letteratura.

1.2.3 CICLOFANI

Sono macrocicli formati da uno scheletro di anelli aromatici collegati da catene alifatiche e che presentano una cavità idrofobica. I ciclofani hanno la capacità di coordinare molecole neutre in soluzione acquosa, per mezzo di interazioni idrofobiche e di stacking, incapsulandole all'interno della tasca. Esistono numerosi esempi di molecole riportate in letteratura, un esempio è riportato in Figura 8.¹¹

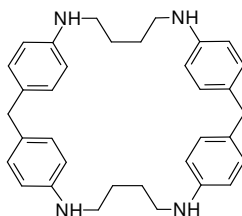


Figura 8 1,6,22,27-Tetraammino[6.1.6.1]paraciclofano.

1.2.4 CALIXARENI

Sono leganti ditopici, composti da una zona idrofila in cui sono presenti numerosi atomi di ossigeno in grado di coordinare ioni metallici hard, e da una cavità idrofoba capace di coordinare specie organiche neutre.¹² La cavità ricorda la forma di un calice ed è realizzato per condensazione di aldeidi

con fenoli, la struttura generica è mostrata in [Figura 9](#). Il numero di unità aromatiche possono variare da 4 a 8, conferendo alla struttura proprietà differenti.

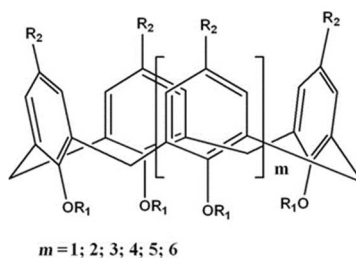


Figura 9 Struttura generica di un calixarene.

1.3 POLIAZACICLOALCANI

Una delle categorie più studiate di leganti macrociclici è quella dei poliazacicloalcani, che sono poliammine cicliche derivanti dai crown ether, con gruppi amminici al posto degli atomi di ossigeno. Gli atomi di azoto amminico fungono da donatori in grado di coordinare cationi di metalli di transizione, metalli alcalini e alcalino-terrosi, rendendo questa classe di leganti estremamente versatile. In molti casi la chelazione da parte dei poliazacicloalcani dipende dal pH della soluzione, questo è dovuto alla presenza delle poliammine nel macrociclo, che possono dar luogo a equilibri di protonazione in competizione con gli equilibri di formazione dei complessi metallici. Per questo motivo il metodo pH-metrico è ampiamente utilizzato nello studio di questi leganti. Alcuni poliazacicloalcani possono fungere anche da recettori per anioni, grazie alla formazione di specie poliprotonate, in questo caso il legante è in grado di coordinare l'analita per mezzo di interazioni ione-ione e legami a idrogeno.

In letteratura esistono svariati processi utilizzabili per la sintesi di questi macrocicli. Si possono brevemente individuare due linee generali: sintesi dirette del legante oppure sintesi metallo-assistita.

Sintesi dirette. Sono procedure condotte secondo le reazioni convenzionali di sintesi organica e prevedono una condensazione in rapporto equimolare tra i frammenti opportunamente funzionalizzati.¹³ La reazione prevede un primo step di condensazione “testa-corda” tra le due specie molecolari, a cui segue una seconda condensazione intramolecolare che potrebbe portare allo sviluppo di prodotti indesiderati oligomerici o polimerici dovuti a condensazioni intermolecolari. Per ovviare a questo inconveniente, è utile operare in condizioni di alta diluizione. Un metodo classico è quello di aggiungere i due reagenti, in soluzioni diluite, lentamente e contemporaneamente al solvente di reazione, questo consente di mantenere basse le concentrazioni e diminuire quindi la probabilità di reazioni intermolecolari indesiderate.¹⁴

Sintesi metallo-assistite. Il metallo gioca un ruolo fondamentale nella reazione che può espletarsi attraverso due meccanismi di ciclizzazione del templato. Il primo caso prevede che il metallo si leghi saldamente al reagente, spostando l’equilibrio a favore della struttura ciclica. Questo meccanismo è chiamato *effetto templato termodinamico*.¹⁵ In un secondo meccanismo, il metallo si lega al reagente catalizzando la formazione del composto ciclico e favorendo l’organizzazione sterica dei reagenti, predisponendo i gruppi funzionali reattivi alla conformazione ottimale reazione di ciclizzazione. Un inconveniente che si può verificare è quello che non è sempre possibile rimuovere il metallo da complesso finale formato.

Inoltre, la struttura del macrociclo può essere ulteriormente funzionalizzata con gruppi in grado di fornire legami di coordinazione, al fine di permettere l’interazione specifica e selettiva per un substrato target. I sostituenti da aggiungere dipendono dal tipo di interazioni *host-guest* che si vogliono generare, ad esempio si possono aggiungere sostituenti aromatici direttamente sul macrociclo o come pendagli se la specie bersaglio presenta sistemi aromatici al fine di aumentare le interazioni di stacking π - π .

Uno studio è stato rivolto al calcolo delle dimensioni ottimali per la cavità macrociclica dei poliazacicloalcani, in particolare su una serie di tetraazacicloalcani aventi quattro atomi d’azoto come

atomi donatori coplanari ed in conformazione idonea per la coordinazione. La serie prevede un incremento regolare del raggio della cavità di 0,10-0,15 Å per ogni atomo di azoto aggiunto nel macrociclico.¹⁶ Tale studio è stato condotto su una serie di composti analoghi che presenta la massima omogeneità tra le distanze degli atomi donatori e consente la formazione di complessi aventi anelli chelati a 5 o 6 termini, notoriamente più stabili (Figura 10).

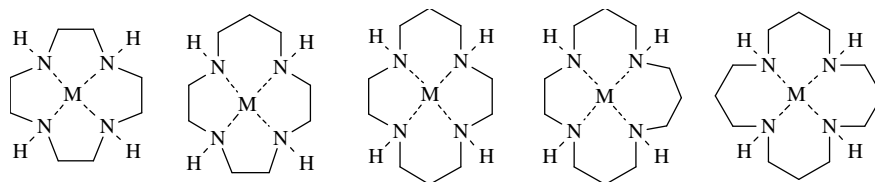


Figura 10 Tetraazamacrocicli chelati di dimensioni crescenti, la chelazione porta alla formazione di anelli di 5 o 6 termini (M=metallo).

Una seconda analisi è stata effettuata su una serie di macrocicli in cui l'incremento del numero di atomi di carbonio avviene in maniera non omogenea, ciò ha portato alla formazione di grandi chelati che mostrano un'elevata tensione angolare interna, come mostrato in Figura 11.

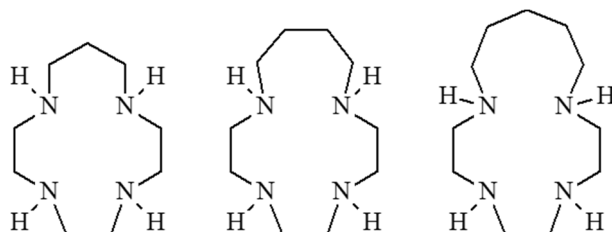


Figura 11 Tetraazamacrocicli di dimensioni crescente, nei quali l'incremento di dimensioni è dovuto solamente all'accrescimento di una delle catene alifatiche che collega gli atomi d'azoto.

Un fattore di notevole importanza da tenere in considerazione per lo sviluppo di poliazacicloalcani è la tensione angolare interna e repulsione sterica interna che si potrebbe formare nella cavità macrociclica tanto da rendere instabile il complesso di coordinazione. Un minor tensione interna è stata mostrata in anelli di 5 termini rispetto a quelli a 6, contribuendo sulla stabilità termodinamica del complesso. Una regolare alternanza di anelli a 5 e 6 termini, inoltre, riduce la tensione del legante

conferendo maggior stabilità alla coordinazione. Come ad esempio cyclam e iso-cyclam riportati in Figura 12.

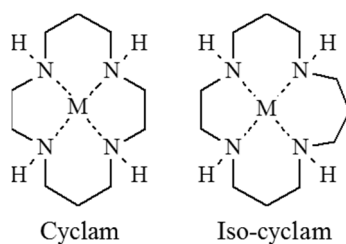


Figura 12 Cyclam e iso-cyclam, mostrano come la chelazione conduce all'alternanza di anelli chelati nei complessi (M =metallo).

1.4 RICONOSCIMENTO MOLECOLARE

La chiave della formazione dei complessi consiste nell'interazione selettiva da parte di una molecola recettore (*host*) con uno specifico substrato (*guest*), al fine di ottenere addotti stabili è necessario che le due specie siano complementari dal punto di vista strutturale e che avvenga un processo di riconoscimento specifico da parte del recettore verso la specie da legare. Il riconoscimento di ioni metallici resta il campo maggiormente indagato nella chimica supramolecolare, la complementarità deriva dalle caratteristiche hard e soft tra atomi donatori e cationi metallici e la stabilità del complesso metallico dipenderà anche dalle caratteristiche strutturali della cavità macrociclica disposte ad accogliere lo ione. Pertanto, di fondamentale importanza è l'organizzazione della tasca di legame costruito sulla base delle interazioni di non legame da instaurare con il target e le caratteristiche strutturali della cavità macrociclica quali dimensioni e rigidità, al fine di ottenere una complessazione stabile e selettiva.

1.4.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA FORMAZIONE E LA STABILITÀ DEI COMPLESSI

➤ **Complementarità strutturale**, si intendono tutte quelle caratteristiche strutturali che contraddistinguono il sito di interazione, come dimensioni, forma, disposizione e tipo dei siti di legame. È utile che la specie *host* sia in grado di interagire in modo complementare con il target, in termini di caratteristiche elettroniche quali polarità, accettore o donatore di legame idrogeno, o caratteristiche hard-soft. Per lo sviluppo di un buon recettore in termini di efficienza è conveniente avere un'ampia superficie di interazione tra il recettore e il substrato, ciò si verifica quando gli addotti possiedono un elevato numero di gruppi donatori e creano molteplici interazioni non covalenti al fine di massimizzare la stabilità del complesso formato. Questo avviene quando il grado di complementarità strutturale tra le due specie è elevato, si parlerà quindi di *shape complementarity*, generalmente quando possono essere precedentemente preorganizzati oppure l'interazione conduce ad una modifica della struttura tale da rendere attivo il complesso e svolgere la funzione designata.

In linea generale, dopo la desolvatazione dei componenti, la formazione del complesso legante-substrato avviene in due fasi. In primo luogo avviene un riarrangiamento conformazionale della cavità recettoriale sia per minimizzare le interazioni sfavorevoli tra i siti di legame, che per posizionare correttamente in maniera complementare le interazioni di legame rispetto al substrato. Questa fase è energeticamente sfavorevole e la conformazione deve essere mantenuta per tutto il tempo di formazione del complesso. Di seguito, avviene l'interazione tra *host* e *guest* che è energeticamente favorevole per la stabilizzazione entalpica dovuta alla complementarità strutturale. L'energia libera totale di formazione del complesso non sarà altro che la risultante in termini di entalpia ed entropia.

➤ **Preorganizzazione strutturale**, organizzata disposizione spaziale del legante, per la quale le interazioni con un substrato non comportano un significativo cambiamento conformazionale o riarrangiamento della struttura. Il legante ben organizzato si trova già nella conformazione finale che avrebbe nel complesso, necessitando perciò di minor energia per la formazione dell'addotto recettore-

substrato, l'energia libera totale risultante sarà diminuita influenzando favorevolmente la stabilità del complesso e la termodinamica di reazione. La rigidità e la preorganizzazione del legante sono caratteristiche fondamentali per determinare la selettività e la stabilità del complesso formato. In particolare, la rigidità è strettamente correlata alla preorganizzazione del recettore, una struttura ben organizzata con siti di chelazione multipli determinerà un'elevata specificità per la coordinazione di un determinato ione metallico.¹⁷

➤ **Interazioni non covalenti** tra *host* e *guest*, maggiore è il numero di legami e più elevata sarà la stabilità del complesso formato. La coordinazione di uno ione metallico nella cavità macrociclica di un legante potrebbe portare ad uno spostamento degli atomi donatori presenti nel sito di legame, avvicinandoli o allontanandoli, provocando perciò un aumento dell'energia conformazionale. I diversi tipi di interazioni di non legame verranno discussi in seguito.

➤ **Solvatazione** è un parametro che può influenzare la formazione del complesso contribuendo all'entropia e all'entalpia del processo.¹⁸ Allo stato solido il solvente si può comportare come un substrato ed essere intrappolato nel reticolo cristallino del legante, favorendo la nucleazione e contribuendo alla deposizione dei composti in forma cristallina dalla soluzione. Generalmente tutti i fenomeni di complessazione sono in competizione con le interazioni tra i reagenti e il solvente e dipendono fortemente dal loro grado di affinità. È necessario citare un fenomeno detto effetto idrofobico, spesso scambiato per una forza di legame, per il quale un solvente polare tende ad allontanare molecole poco solvate che a loro volta tendono ad aggregarsi e a dar vita ad agglomerati, per esempio oli o molecole organiche in acqua. L'effetto idrofobico è un fenomeno di grande importanza in natura, basti pensare alla membrana fosfolipidica e alla formazione e al mantenimento delle strutture conformazionali proteiche. Affinché abbia luogo la formazione del complesso, è necessario che le molecole di acqua siano rimosse dalla cavità recettoriale del legante per permettere il riconoscimento del target. Le cavità macrocicliche sono spesso apolari e non interagiscono fortemente con l'acqua, per cui il rilascio delle molecole di solvente verso l'esterno permette l'insorgere di interazioni con altre molecole d'acqua favorendo entalpicamente il sistema, inoltre la

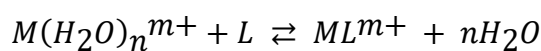
desolvatazione e l'aggregazione delle due specie apolari *host* e *guest* produrrà un guadagno entropico, favorendo ulteriormente la complessazione. Solventi polari come l'acqua competono con i siti di legame funzionalizzati attraverso atomi accettori/donatori di legami idrogeno. Per questo motivo per confrontare costanti di legame o affinità di diversi leganti verso un substrato o di diversi substrati verso un legante è indispensabile utilizzare lo stesso solvente. In alcuni casi, la desolvatazione del legante e dello ione metallico sono accompagnate dalla formazione del composto di coordinazione, per cui un legante caratterizzato da un basso grado di solvatazione, necessiterà di un basso apporto energetico per la desolvatazione e l'entalpia di complessazione risulterà più negativa. D'altra parte però, tanto minore è il numero di molecole di solvente liberate e tanto minore sarà il contributo entropico della reazione, sfavorendo per tanto la complessazione. La solvatazione, inoltre, interessa anche il complesso recettore-substrato, in particolare quando la formazione del complesso comporta un significativo cambiamento conformazionale. In altre parole, tanto più i due contributi si compenseranno, tanto meno la solvatazione sarà influente sull'energia libera della reazione di complessazione e sul suo decorso termodinamico.

L'ordine di solvatazione delle ammine nei più comuni solventi polari è ammoniacca > ammine primarie > ammine secondarie > ammine terziarie, l'ordine è inverso per quanto riguarda solventi apolari. Al fine di ridurre gli effetti dovuti alla solvatazione, quando si vogliono effettuare misure di comparazione tra una serie di diversi leganti, sarà opportuno scegliere recettori in cui gli atomi donatori presentano lo stesso grado di sostituzione. Lo stesso principio vale anche per tutti i leganti costituiti da atomi diversi dall'atomo d'azoto.

1.4.2 TERMODINAMICA

La stabilità termodinamica di un complesso è valutata per mezzo di opportune costanti di equilibrio relative alla sua formazione, strettamente dipendenti dalla temperatura e dal solvente.¹⁹ Esistono diversi parametri che possono essere valutati al fine di calcolare costante di formazione K_f , costante

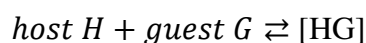
di associazione K_a , costante di stabilità K_s e costante di dissociazione K_d del complesso. Lo studio della costante di formazione K è di fondamentale importanza nell'ambito della chimica supramolecolare al fine di valutare la stabilità dei complessi formati in soluzione.



$$K = \frac{[ML^{m+}]}{[M(H_2O)_n^{m+}][L]}$$

Le costanti di formazione sono parametri termodinamici riferiti all'energia libera di reazione in accordo con l'equazione di Gibbs. L'affinità tra *host* e *guest* può, infatti, essere espressa come costante di formazione K o $-\Delta G^\circ$.

Il riconoscimento molecolare è un processo che coinvolge il legame e la selezione di substrati da parte di una molecola recettore. L'affinità di un substrato nei confronti di una specie recettoriale viene pertanto stimata attraverso la determinazione della costante di formazione:



$$K_{\text{formazione}} = \frac{[HG]}{[H] * [G]}$$

La selettività in termini di termodinamica, si può definire come il rapporto tra le costanti di formazione dei complessi tra il recettore e due differenti *guest*:

$$\text{Selettività} = \frac{K_{\text{Guest 1}}}{K_{\text{Guest 2}}}$$

La selettività può essere modulata intervenendo sul modello chiave-serratura, aumentando la specificità del sito di legame nei confronti del target desiderato, sulla preorganizzazione del legante oppure sulla complementarità tra le due specie. Un altro fattore che può entrare in gioco nella modulazione della selettività, è la diversa velocità di trasformazione dei substrati nei prodotti di reazione. Infatti, le specie *guest* che hanno costanti di velocità di formazione superiori risultano più

selettive, rispetto a quelle in cui i substrati si legano in maniera più forte ma reagiscono più lentamente. Elevate costanti di formazione tendono ad inibire i processi cinetici.

1.4.3 INTERAZIONI SUPRAMOLECOLARI

Le molteplici interazioni non covalenti coinvolte nella formazione degli addotti supramolecolari sono un elemento cruciale da tenere in considerazione per la progettazione di un legante, principalmente se si vuole condurre una complessazione selettiva. In particolare, le interazioni attrattive o repulsive che si possono generare tra la specie *guest* e il sito di legame dell'*host* determinano il decorso della complessazione in termini di stabilità strutturale e specificità.²⁰ Pertanto saranno brevemente descritte di seguito.

Interazioni ione-ione ($100\text{-}500\text{ kJ mol}^{-1}$) è di forza comparabile a quella del legame covalente. Queste interazioni sono fondamentali nei sistemi supramolecolari basati sull'interazione di uno ione, catione metallico o anione, con leganti polifunzionali cationici o anionici.

Interazioni ione-dipolo ($50\text{-}200\text{ kJ mol}^{-1}$) si possono osservare sia allo stato solido che in soluzione. In campo supramolecolare sono spesso utilizzati per la creazione di aggregati molecolari in cui un catione metallico viene coordinato per mezzo di doppietti solitari degli atomi donatori del legante neutro. Le interazioni ione-dipolo sono di tipo elettrostatico nel caso di cationi metallici poco polarizzabili con basi di tipo hard. Si osserva nella struttura degli eteri corona tra i cationi metallici e i doppietti degli atomi di ossigeno presenti.

Interazione dipolo-dipolo ($5\text{-}50\text{ kJ mol}^{-1}$) generato dall'allineamento di un dipolo con un altro. Sono interazioni di natura attrattiva, un esempio sono le molecole contenenti gruppi carbonilici.

Legame a idrogeno ($4\text{-}120\text{ kJ mol}^{-1}$) è alla base della formazione di aggregati supramolecolari e sicuramente una delle interazioni più importanti in natura. Può essere considerato un tipo particolare di interazione dipolo-dipolo, si instaura quando un atomo di idrogeno legato ad un atomo fortemente

elettronegativo (o un gruppo elettron-attrattore) viene attratto da un secondo atomo elettronegativo adiacente, appartenente ad un altro gruppo funzionale della stessa molecola o ad un'altra molecola.²¹ Questo legame è fortemente direzionale e dipende dalla distanza; la sua forza aumenta esponenzialmente quando aumenta il numero di legami a idrogeno presenti nella molecola. In natura è responsabile della struttura delle proteine, di molti enzimi e della struttura a doppia elica del DNA.

Interazione ione- π (5-80 kJ mol⁻¹) si possono dividere in legami catione- π e legami anione- π . I cationi dei metalli di transizione formano complessi stabili con sistemi aromatici, es. Fe²⁺ con le olefine, il legame è forte perché sono coinvolti gli orbitali d dei metalli, quasi paragonabile ad un legame covalente.²² Al contrario, le interazioni che si formano tra i cationi alcalini e alcalino terrosi e legami π sono più deboli ed a minor carattere covalente. Le interazioni anione- π , invece, sono di natura elettrostatica e l'interazione di un anione con un sistema aromatico elettronico/ π è di tipo repulsivo.²³ È stato dimostrato che gli anioni possono formare complessi stabili con un gran numero di composti aromatici elettron-deficienti. Questo tipo di interazione è stata riscontrata in complessi derivati da calixareni con organometalli, in cui l'anello aromatico porta una carica positiva.

Interazione π - π stacking (0-50 kJ mol⁻¹) sono interazioni deboli di natura elettrostatica che si creano tra due o più anelli aromatici quando uno è relativamente più elettron-ricco e l'altro elettron-povero.²⁴ Si possono riconoscere due tipi di interazioni "face to face" o "edge to face". Nella prima, "face to face", i due anelli si trovano parallelamente l'uno sull'altro sovrapposti, sono le forze che si generano nella stabilizzazione del DNA e sono responsabili della struttura della grafite per esempio. Nel caso "edge to face" un anello è perpendicolare al secondo aromatico, può essere considerato una forma debole di legame idrogeno, tra gli atomi di idrogeno di un anello e la nuvola elettronica dell'altro.

Forze di London (<5 kJ mol⁻¹, variabile) sono interazioni elettrostatiche deboli, determinate dalla polarizzazione di una nube elettronica da parte di un atomo adiacente. Le interazioni di Van der Waals non essendo direzionali, non giocano quindi un ruolo rilevante nella progettazione di un

legante verso uno specifico substrato per una complessazione selettiva. Generalmente, determinano forze attrattive tra molecole polarizzabili, dette soft.

Impacchettamento compatto allo stato solido viene presa in considerazione quando si parla di molecole allo stato solido, per esempio nei reticoli cristallini. In questo caso si devono considerare le interazioni che si generano tra i diversi elementi che costituiscono la struttura, è una massima manifestazione delle interazioni costruttive di London.²⁵ Man mano che le molecole si impacchettano viene favorita la formazione di complessi, ciò significa che le molecole si incastrano nelle cavità vicine in modo da generare il massimo numero di contatti intermolecolari possibili.

1.5 CHEMOSENSORI

Nell'ambito della chimica supramolecolare la formazione di complessi tra specie *host* e *guest* può essere utilizzato come strumento di valutazione per il target bersaglio sfruttando le caratteristiche chimico-fisiche del recettore e del complesso formato. Un *chemosensore* è una molecola capace di segnalare la presenza o determinare concentrazione in soluzione di un particolare substrato bersaglio, interagendo con esso.²⁶ Per essere utilizzata come metodo di valutazione, l'interazione recettore-substrato deve essere selettiva, reversibile e non distruttiva, deve inoltre generare un'apprezzabile variazione di una o più caratteristiche del legante, ad esempio le proprietà ottiche, tale da valutarne la risposta sperimentalmente. Un chemosensore può essere così schematizzato (Figura 13):

- Unità recettrice: è responsabile della coordinazione con il substrato, deve essere in grado di interagire con esso in maniera specifica e reversibile;
- Unità sensibile: è responsabile delle variazioni chimico-fisiche che avvengono in seguito all'interazione con il substrato e che ne permettono la rivelazione;

- Catena spaziatrice: può esserci o meno, ha solamente una funzione strutturale per il collegamento delle due parti attive.

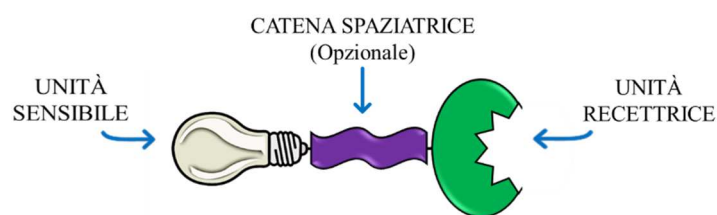


Figura 13 Schematizzazione di un generico chemosensore.

Per ottenere un'interazione selettiva tra diversi possibili substrati in soluzione, è necessario che tra l'unità recettrice e la specie bersaglio avvenga uno specifico riconoscimento molecolare, detto chiave-serratura o "lock and key".² Tale riconoscimento racchiude tutti i fattori che sono stati precedentemente citati, in particolare è caratterizzato da un'elevata affinità di legame, da una geometria ben definita e da numerose forze di legame tra le due specie, che rendono esclusiva l'interazione (figura 14).

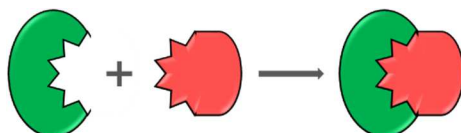


Figura 14 Interazione host-guest secondo il modello chiave-serratura.

Le variazioni più frequentemente utilizzate sono variazioni elettrochimiche (potenziale elettrochimico), valutate come potenziale di riduzione, oppure variazioni fotochimiche, come colore, assorbimento UV-Vis o emissione di fluorescenza. Gli anioni possono essere determinati mediante variazione delle proprietà ottiche, per esempio lo ione può essere legato per coordinazione da parte di un cromoforo, questo provocherà un cambiamento della colorazione del sistema, oppure un recettore può subire un riarrangiamento strutturale in seguito al legame con l'anione bersaglio che determinerà risposte misurabili attraverso la luminescenza. Quest'ultima classe di recettori viene

definita come *chemosensori di fluorescenza*, illustrati in Figura 15, in cui l'unità sensibile del legante è fotoattiva e viene chiamata **fluoroforo**.

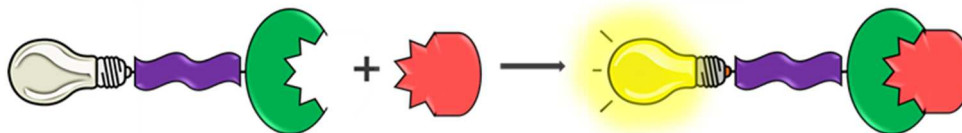


Figura 15 Schema di un chemosensore di fluorescenza, in cui l'interazione con la specie bersaglio provoca un aumento dell'intensità di emissione da parte del fluoroforo.

1.5.1 CHEMOSENSORI DI FLUORESCENZA

Negli ultimi anni, è stato riscontrato un grande interesse per il riconoscimento delle specie ioniche da parte di recettori fluorescenti in soluzione e sono stati pubblicati molti libri e articoli scientifici a riguardo.²⁷ Molti degli esempi riportati volgono l'interesse verso molecole di sintesi formate da una parte organica fluorescente, in grado di rispondere con un cambiamento luminescente significativo e rilevabile in seguito all'interazione con un target. Tra i numerosi vantaggi dell'utilizzo dei chemosensori fluorescenti, la rapidità della risposta è sicuramente uno tra i più importanti, la variazione di emissione di fluorescenza infatti è la diretta conseguenza della formazione del complesso di coordinazione. La fluorescenza inoltre è un metodo di analisi reversibile e non distruttivo, particolarmente utile quando l'analita è di interesse biologico. L'interazione con il substrato bersaglio può condurre a tre principali risposte da parte del fluoroforo.²⁸ Il primo caso prevede la formazione di un legame reversibile tra il substrato e il legante, l'effetto risultante può essere un *quenching* della fluorescenza, ossia uno spegnimento del fluoroforo (CHEQ), oppure un incremento o accensione di esso (CHEF). Entrambi possono essere accompagnati ad uno spostamento della banda di emissione a lunghezze d'onda maggiori o minori. Un secondo caso avviene quando tra le due specie non vi è alcuna interazione, ma il *quenching* della fluorescenza è una conseguenza della

collisione con il bersaglio (quenching dinamico). Infine, i fluorofori possono far parte di un complesso sistema supramolecolare, in cui sono direttamente legati all'unità recettrice oppure collegati attraverso ad una catena spaziatrice ad essa. La risposta ottenuta dal fluoroforo è frutto di modificazioni elettroniche o steriche dovute all'interazione del recettore con il target.

1.5.2 MODULAZIONE DELLA FLUORESCENZA

Come accennato in precedenza, la coordinazione di un substrato conduce alla variazione nell'emissione di fluorescenza dell'unità fluorofora di un legante, incrementandola o diminuendola. Tali fenomeni sono stati ampiamente studiati e vengono determinati da una serie di effetti meccanicistici prodotti dall'interazione *host-guest*:²⁹

- **Trasferimento Elettrico Fotoindotto (PET)** Questo effetto è un processo disattivante derivante da un trasferimento elettronico che può essere ossidativo o riduttivo, la reazione avviene tra lo stato eccitato di un complesso e un substrato *quencher* in grado di donare o accettare elettroni. Generalmente, il fluoroforo libero viene irradiato e passa dallo stato fondamentale A allo stato eccitato A*, in cui un elettrone è stato promosso dal più alto orbitale molecolare occupato HOMO al più basso orbitale molecolare non occupato LUMO. L'effetto PET si ha quando un atomo donatore "elettron-ricco", ad esempio N, O, S o P, adiacente al fluoroforo trasferisce un elettrone dal suo orbitale HOMO a quello HOMO del fluoroforo, la lacuna elettronica viene perciò colmata producendo un decremento dell'intensità della fluorescenza emessa, detto anche *quenching* (vedi [Figura 16](#)). La maggior parte dei fluorofori è legato ad un gruppo poliamminico legato, gli atomi d'azoto di questo frammento fungono da atomi donatori di elettroni che sono in grado di coordinare ioni o specie bersaglio e, in determinate condizioni, possono anche generare un effetto PET sul fluoroforo. Nello specifico, quando doppietti di non legame degli atomi d'azoto non sono impegnati nella complessazione di un substrato, si otterrà un *quenching* della fluorescenza. Al contrario, nel caso in cui il legante sia protonato o complessato, i doppietti amminici dell'unità recettrice sono

fortemente impegnati nelle interazioni con gli H^+ o con i cationi metallici, comportando l'inibizione l'effetto PET, che si traduce in un significativo aumento dell'emissione di fluorescenza. In linea generale, queste interazioni inducono a loro volta ad un abbassamento dell'energia potenziale di ossidoriduzione dell'orbitale HOMO dell'azoto, inferiore all'HOMO del fluoroforo. Il trasferimento elettronico non è così permesso, traducendosi in un apprezzabile aumento dell'intensità di fluorescenza emessa.

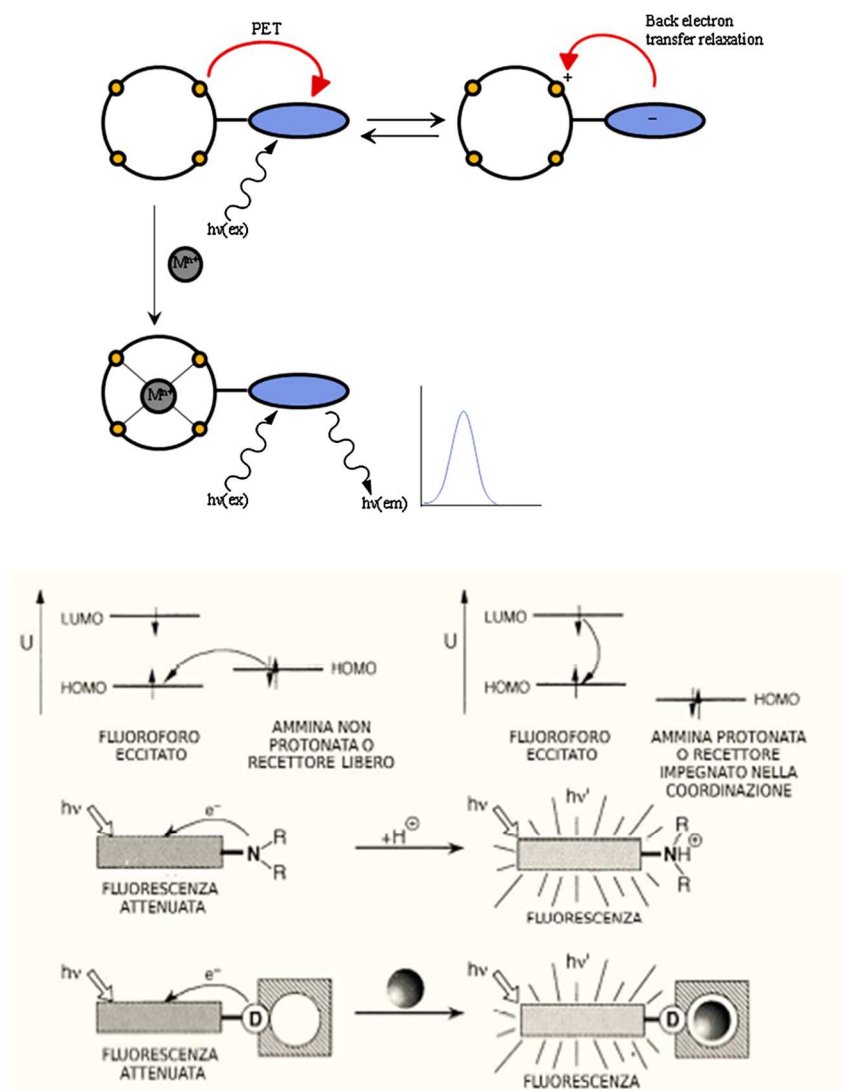


Figura 16 Schematizzazione dell'effetto PET in un sensore di fluorescenza.

- **Trasferimento Energetico Elettronico (EET):** molto simile al PET, ma in questo caso il sistema necessita di due livelli elettronici di energia compresa tra l'orbitale HOMO e l'orbitale

LUMO del fluoroforo. In seguito all'irraggiamento, il fluoroforo eccitato promuove un elettrone dall'orbitale HOMO al LUMO, di seguito avvengono due decadimenti consecutivi in cui l'elettrone nell'orbitale LUMO passa all'orbitale LUMO non occupato dell'atomo adiacente al fluoroforo e un elettrone nell'HOMO dell'atomo donatore si sposta verso l'orbitale HOMO del fluoroforo ripristinando così lo stato fondamentale. Anche in questo caso ne risulta un *quenching* della fluorescenza.

- **Trasferimento di Carica Fotoindotto (PCT):** Alcuni fluorofori possono essere formati da un gruppo elettrone-donatore, solitamente un sistema poliamminico, legato ad un gruppo accettore, l'irraggiamento luminoso genera il trasferimento di carica intramolecolare tra i due sistemi coniugati. (Figura 17) La perturbazione del momento dipolare e la coordinazione di uno ione metallico inducono ad una variazione dei livelli energetici elettronici, provocando un'apprezzabile alterazione dell'emissione e dell'assorbimento del complesso. Le bande degli spettri UV-Vis e fluorescenza possono subire uno spostamento verso lunghezze d'onda ad energia maggiore, detto anche "blue shift", o verso campi ad energia minore, detto "red shift", in funzione alla perturbazione e all'intorno chimico del fluoroforo. Quando avviene la complessazione di uno catione metallico, il gruppo elettrone-donatore interagisce con esso, ne risulta una riduzione della coniugazione allo stato eccitato e una destabilizzazione di questo rispetto allo stato fondamentale, ciò si traduce in un "blue shift" delle bande e una diminuzione del coefficiente molare di assorbimento. Al contrario, l'interazione di uno ione con il gruppo accettore risulta stabilizzare lo stato eccitato rispetto a quello fondamentale, dovuto all'aumento del carattere elettrone-attrattore del sistema, la lunghezza d'onda subirà un "red shift" e il coefficiente di assorbimento risulterà aumentato.

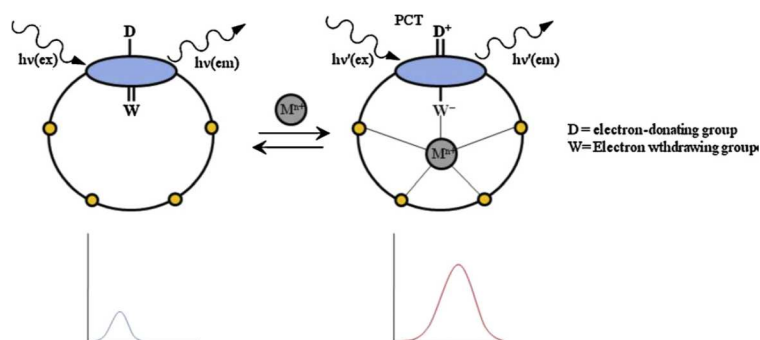


Figura 17 Effetto di trasferimento di carica fotoindotto (PCT) in seguito alla complessazione.

- Spegnimento Paramagnetico di Fluorescenza** La presenza di atomi paramagnetici in prossimità del fluoroforo aumentano la velocità di un processo detto “intersystem crossing” (isc), per il quale avviene la conversione di un elettrone dallo stato eccitato S_1 al livello elettronico T_1 ad energia inferiore che provoca un forte decremento della fluorescenza emessa. I complessi metallici che subiscono per eccitazione un intersystem crossing sono quello contenenti ioni di Cu(II), Fe(III), Cr(III) e Co(II). In particolare, l’effetto paramagnetico ed è una delle principali cause di *quenching* della fluorescenza da parte dello ione d^9 Cu(II), come mostrato in Figura 18. Le sonde per la determinazione di metalli sono un classico esempio dell’applicazione di questo effetto.

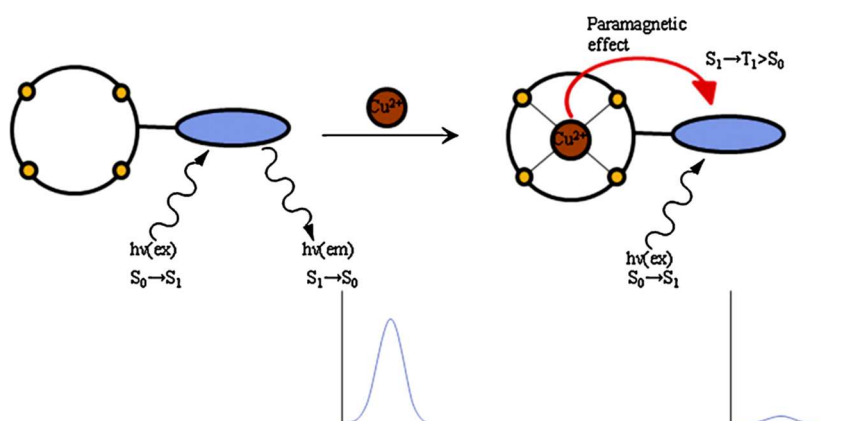


Figura 18 Effetto paramagnetico in seguito alla complessazione di Cu(II).

- Trasferimento Protonico Fotoindotto (PPT):** In seguito all’irraggiamento luminoso, la densità elettronica tra lo stato eccitato e quello fondamentale del fluoroforo può subire delle

variazioni, ciò che ne risulta è una differenza nelle proprietà acido tra i due stati, ad esempio tra la pKa di un gruppo acido e la sua pKa* allo stato eccitato. Gli indicatori di pH fluorimetrici si basano appunto su queste alterazioni.

- **Trasferimento di Energia per Risonanza:** Sono interazioni dipendenti dalla distanza tra due gruppi fluorofori appartenenti alla stessa molecola, il trasferimento di energia avviene per mezzo di elettroni allo stato eccitato di un gruppo donatore ad un gruppo accettore, senza emissione di fotoni, **Figura 19**. In altre parole, se avviene l'effetto FRET, eccitando un fluoroforo si può determinare l'emissione di fluorescenza di un altro gruppo fluoroforo della molecola. Questo effetto richiede particolari condizioni: il gruppo accettore e quello donatore devono trovarsi a stretta distanza l'uno con l'altro, che varia tra 10-100 Å, inoltre lo spettro di assorbimento dell'accettore deve sovrapporsi con quello di emissione del donatore (almeno parzialmente) e l'orientamento dei dipoli delle due specie devono essere approssimativamente paralleli. La presenza di uno ione metallico può indurre riarrangiamenti strutturali alla molecola che provocano un avvicinamento o allontanamento dei due fluorofori presenti, attivando o impedendo l'effetto FRET.

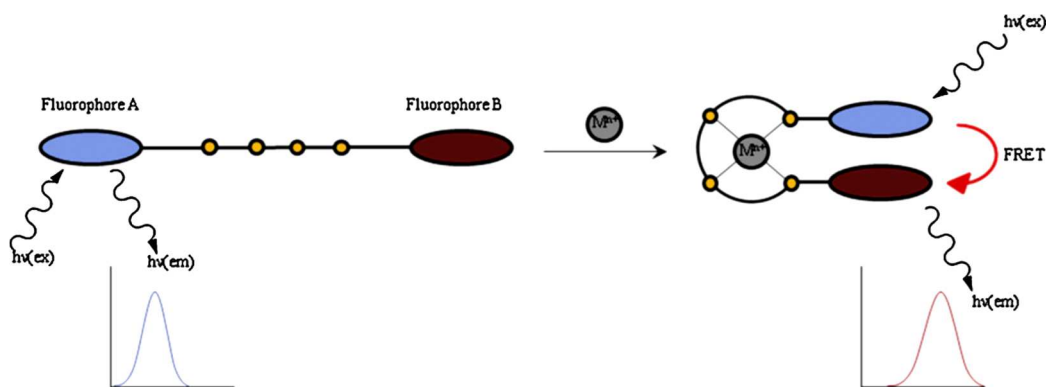


Figura 19 Effetto FRET di un fluoroforo A su un fluoroforo B.

- **Formazione di Eccimeri o Ecciplessi:** Sono complessi formati dall'interazione di molecole nello stato eccitato, che generalmente non interagiscono quando si trovano nello stato fondamentale, normalmente rispettano la stechiometria 1:1, **Figura 20**. Gli eccimeri sono complessi formati da una molecola nello stato eccitato con un'altra molecola dello stesso tipo ma allo stato fondamentale, gli

ecciplessi invece sono complessi formatosi da due molecole differenti entrambe nello stato eccitato. Questi particolari complessi presentano delle bande di assorbimento ed emissione specifiche. I fluoroionofori sono, invece, dei leganti composti da due unità fluorofore che, se poste ad un'opportuna distanza, possono formare degli eccimeri. La coordinazione di cationi può causare un riarrangiamento della struttura e perciò modificare la distanza dei due fluorofori, la banda di emissione specifica dell'eccimero del legante libero ne risulterà alterata, fungendo così da sensore cationico.

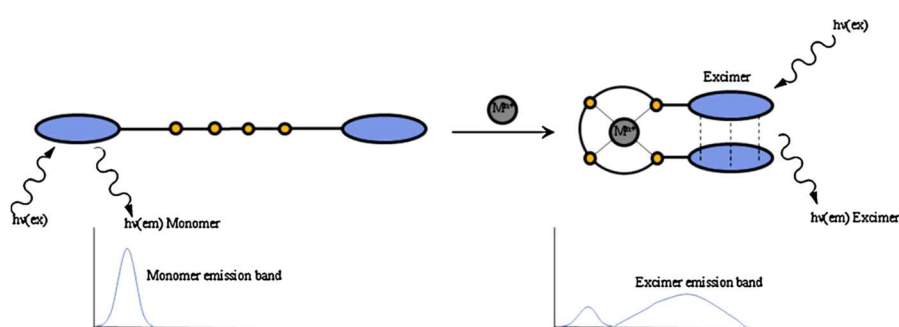


Figura 20 Emissione di fluorescenza in seguito alla formazione di ecciplessi.

Un gran numero di molecole sono, inoltre, dei metallo-recettori, cioè sistemi coordinanti un metallo acido di Lewis che ha la funzione di riconoscimento del substrato attraverso il meccanismo host-guest. Quando il legante complessato risponde con un'alterazione della luminescenza alla presenza dell'anione, per spiazzamento del cromoforo dalla posizione iniziale del chelato, senza però rimuovere il cromoforo dalla struttura del complesso è chiamato indicatore intramolecolare metallo assistita MIIDA. La fluorescenza può essere ripristinata eliminando il legame con l'anione, per esempio aggiungendo ioni un controione in soluzione. Un meccanismo simile si ottiene anche senza l'impiego di un acido di Lewis (saggio detto IIDA) ed è stato utilizzato per il riconoscimento dell'anione glifosato.³⁰ Questi metodi di analisi sono ampiamente utilizzati nell'ambito della biotecnologia, per esempio sono impiegati per valutare l'intercalazione del DNA per lo spiazzamento dell'etidio bromuro.

La risposta di un chemosensore alla presenza di un target in soluzione viene comunemente valutata mediante titolazioni spettrofotometriche:

Titolazione spettrofotometriche UV-Vis: prevede il monitoraggio delle bande di assorbimento alla lunghezza d'onda caratteristica del legante o della specie bersaglio liberi oppure del complesso in formazione. Le variazioni che si possono notare sono un'alterazione dell'intensità della banda caratteristica e in alcuni casi anche ad un suo spostamento verso campi energetici maggiori o minori. Lo spettro riporterà l'intensità di assorbimento in funzione della concentrazione della specie bersaglio aggiunta ad una soluzione contenente il legante a concentrazione nota. Le titolazioni spettroscopiche sono più sensibili rispetto alla tecnica NMR e permettono di lavorare con soluzioni più diluite. Dallo spettro di assorbimento, inoltre, si può individuare il punto isosbastico caratteristico di una titolazione, ossia il punto in cui l'intensità di assorbimento rimane costante ed è rappresentativo della formazione del complesso.

Titolazione in Fluorescenza: quando si lavora con un chemosensore di fluorescenza è possibile analizzare l'andamento dell'emissione per aggiunte di una specie target in soluzione. Si possono monitorare le specie in formazione in soluzione mettendo in relazione l'intensità di emissione di fluorescenza con la concentrazione delle specie in soluzione, oppure mantenendo costante la concentrazione totale della soluzione ma variando la concentrazione delle singole specie, metodo chiamato Job Plot o della variazione continua. Il Job plot in fluorescenza è molto utile per identificare il rapporto stechiometrico del complesso che ha la capacità di emettere fluorescenza.

Titolazione NMR: un ulteriore metodo di analisi della formazione di un complesso in soluzione. Non valuta le proprietà spettrofotometriche del chemosensore, ma dall'analisi dei chemical shift degli spettri ottenuti è possibile identificare quali gruppi molecolari sono coinvolti nella complessazione. Durante la titolazione NMR, piccole aliquote di substrato vengono aggiunte ad una soluzione a concentrazione nota di legante in un solvente deuterato. Quando siamo in presenza di

complessi caratterizzati da lenti equilibri di formazione, non è possibile una rapida valutazione dei chemical shift, ma si integreranno i segnali NMR delle specie legate con quelle non legate. Graficando i $\Delta\delta$ rispetto alla concentrazione di *guest* aggiunto, si ottiene l'isoterma relativa alla concentrazione, con cui è possibile calcolare il valore della costante di associazione del complesso.

1.6 COORDINAZIONE CATIONICA E ANIONICA

Dagli esempi riportati fino ad ora, è evidente come il ruolo di cationi metallici ed anioni sia di cruciale importanza a livello ambientale e biologico. Lo sviluppo di chemosensori in grado di segnalare, riconoscere e coordinare selettivamente è attualmente un'area in continua espansione, che mira a incrementare l'efficienza dei composti già noti per le loro proprietà o alla sintesi di nuove molecole. Specie recettoriali capaci di coordinare metalli in soluzione riscuotono un elevato particolare interesse per tutte quelle tecniche che prevedono processi di estrazione liquido-liquido come metodi rapidi ed efficienti per separare o recuperare cationi metallici. I chemosensori complessano selettivamente gli ioni, trasportandoli dalla fase acquosa in quella organica e ne permettendo così l'isolamento. La coordinazione di cationi assume un ruolo decisamente importante negli organismi biologici, partecipando attivamente a numerosissimi processi cellulari ed alla regolazione degli ioni all'interno delle cellule. D'altro canto, la chimica di coordinazione degli anioni è un'area altrettanto vasta e suscita particolare interesse nel campo della chimica supramolecolare, trovando applicazione in molti settori, tra cui quello biologico.³¹ È ormai ben noto come molte proteine catalizzano reazioni, legano e trasportano materiale biologico mediante la formazione di complessi.

Per quanto riguarda la chelazione di cationi metallici, chemosensori costituiti da un macrociclo come unità recettrice, si sono rivelati più funzionali, versatili e selettivi. In particolare, leganti poliamminici sono stati ampiamente utilizzati per la coordinazione di metalli della prima serie di transizione, mentre

recettori contenenti atomi di zolfo o ammine aromatiche possiedono maggior affinità per metalli pesanti, dato il miglior assortimento delle proprietà hard-soft degli atomi. Le subunità aromatiche, inoltre, conferiscono rigidità alla struttura poliamminica, impedendo in alcuni casi la partecipazione di tutti gli atomi di azoto nella coordinazione del catione e permettendo, al sistema metallo-legante, di comportarsi come recettore per specie esogene.^{32a-d} Di particolare interesse sono i sistemi in grado di formare complessi mono- e poli nucleari di Zn(II), è stato infatti dimostrato che queste specie possono essere utilizzati come recettori selettivi per nucleosidi. L'esempio più famoso è quello del cyclen, in cui la coordinazione dell'unità imidica delle basi, CO-NH-CO, avviene per mezzo del catione chelato e stabilizzato dai legami idrogeno instaurati tra le funzioni amminiche del poliazamacrociclo e i gruppi CO delle basi azotate.³³ La presenza di sistemi aromatici può conferire al chemosensore anche proprietà idrofobe, di particolare interesse per solubilizzare specie ioniche in solventi non acquosi e trasportarli attraverso membrane di carattere lipofilo. L'unità recettrice opportunamente funzionalizzata sarà legata covalentemente all'unità fotoattiva, in taluni casi è possibile inserire anelli eteroaromatico direttamente nel macrociclico, la struttura presenterà proprietà fotochimiche profondamente influenzate dalla coordinazione del metallo, il chemosensore risultante sarà perciò in grado di rilevare la presenza dello ione anche in concentrazioni estremamente basse.

Sono stati riportati in [Figura 21](#) alcuni esempi di chemosensori per cationi metallici sviluppati all'interno del nostro laboratorio: i composti a) e b) sono basati sulla stessa unità fotoattiva 2,5-difenil[1,3,4]ossadiazolo, ma diverse unità leganti, il composto a) è legato a due catene poliammine acicliche identiche e ad una singola catena poliamminica alifatica che, attraverso una reazione di ciclizzazione intramolecolare, forma un poliazamacrociclo contenente il fluoroforo, i chemosensori hanno dimostrato proprietà coordinative specifiche nei confronti di vari metalli di transizione, con particolare interesse verso il catione Zn(II).⁸⁹ Il legante OXD, riportato in [Figura 21 c\)](#), ha dimostrato possedere interessanti proprietà in forma protonata nei confronti dell'anione cloruro³⁴; mentre, il composto d) (maltonis), è in grado di coordinare cationi metallici, ma nella forma $[H_2L]^{2+}$ ha mostrato

interessanti proprietà intercalanti del DNA, in cui le ammine giocano un ruolo chiave per la formazione di legami idrogeno, rilevandosi un promettente agente intercalante.³⁵

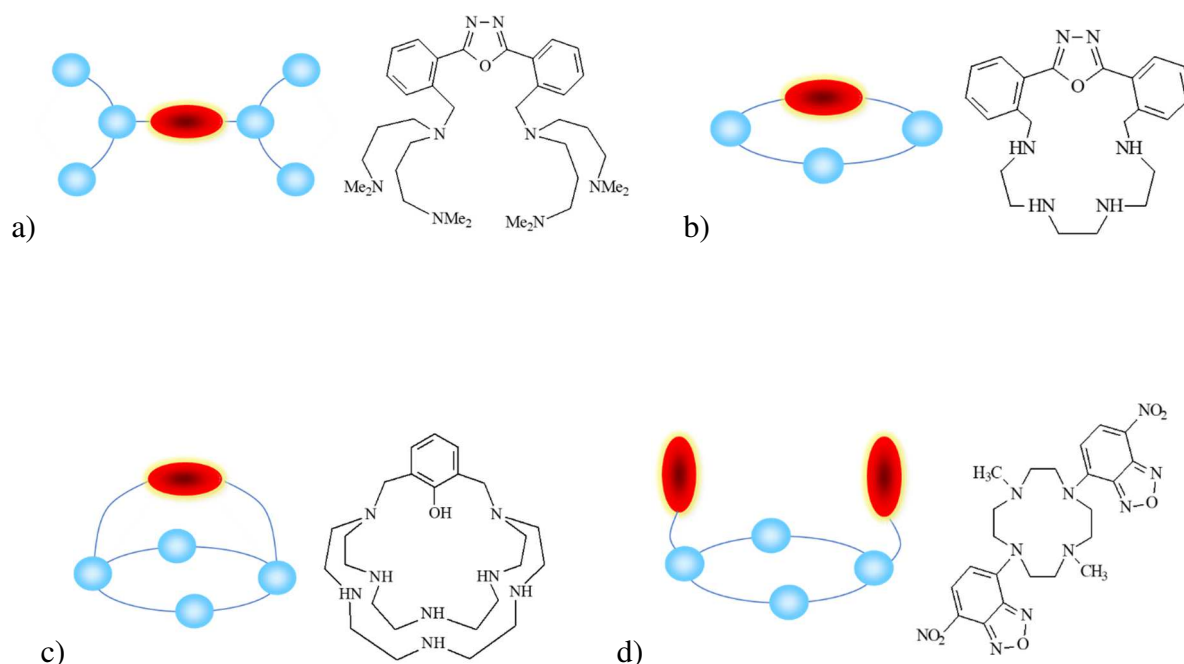


Figura 21 a) 3,3'-Bis[N,N-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-29-oxatetracyclo[24.2.1.0^{2,7}.0^{20,25}]enneicosa-2,4,6,20,22,24,26,281-octaene⁷⁴; b) 9,12,15,18,27,28-hexaaza-29-oxatetracyclo[24.2.1.0^{2,7}.0^{20,25}]enneicosa-2,4,6,20,22,24,26,281-octaene⁸⁹; c) 32-hydroxy-1,4,7,10,13,16,19,22-octaazatricyclo[11.11.7.1(26,30)]diatricosca-26,28,29(32)-triene³⁴; d) 4,10-bis[(3-hydroxy-4-pyron-2-yl)methyl]-1,7-dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (maltonis).³⁵

Per quanto riguarda la coordinazione di anioni, sono riportati in letteratura due approcci di chelazione: mediante sistemi non-metallici oppure basati su sistemi a centro metallico, chiamati metalli-recettori. L'uso di quest'ultimi prevede la presenza di un centro metallico con una sfera di coordinazione non completa per legare specie anioniche mediante un classico legame coordinativo; al contrario la chelazione per mezzo di sistemi non-metallici prevede l'utilizzo di sistemi carichi positivamente, ad esempio delle unità poliamminiche, che interagiscono con gli anioni principalmente attraverso legami ionici. Chemosensori anionici possono essere anche in forma neutra, in questo caso la coordinazione avverrà tramite interazioni deboli, come legami idrogeno, interazioni idrofobiche o di stacking. I recettori per anioni vedono la loro applicazione come sensori in soluzioni acquose o organiche, ma soprattutto come trasportatori in campo biologico.³⁶

1.7 CENNI SUL TRASPORTO CELLULARE

Lo scambio di materiale tra una cellula e il suo ambiente circostante è un processo fondamentale per la sua sopravvivenza. Molte funzioni biologiche, quali segnalazione cellulare, regolazione del pH e mantenimento dell'omeostasi osmotica, infatti implicano il trasporto di ioni e altre sostanze attraverso la membrana cellulare, che funge da barriera per il passaggio di soluti.³⁷ La membrana è costituita da un doppio strato fosfolipidico che la rende semipermeabile a moltissimi soluti e ioni, solamente piccole molecole neutre o gassose sono in grado di diffondervi. Per la grande maggioranza di molecole il passaggio da una parte all'altra della membrana è assistito da proteine dette trasportatori, che funzionano come vettori o come canali.

Tra i molteplici soluti presenti all'interno della cellula, gli anioni sono essenziali per molti processi metabolici, aiutano nella regolazione dell'omeostasi cellulare e della segnalazione nervosa e muscolare.³⁸ I più abbondanti a livello cellulare sono cloruro, idrogenocarbonato e fosfato, essi sono presenti con un gradiente di concentrazione tra ambiente intra- ed extracellulare, pertanto il loro trasporto attraverso la membrana riveste un ruolo cruciale per la cellula. Un mal funzionamento delle proteine di trasporto è stato correlato a gravi malattie, come fibrosi cistica (CF), problemi al cuore o cervello e sindrome di Bartter, comunemente chiamate "canalopatie".³⁹ In natura, il flusso di anioni è prevalentemente mediato da proteine trasportatrici che agiscono come canali o come vettori, che a loro volta possono essere suddivisi in carrier mobili oppure trasportatori di transmembrana.

I canali sono proteine ancorate alla membrana che formano un poro idrofilo nel doppio strato lipidico attraverso il quale gli anioni diffondono selettivamente;⁴⁰ i carrier mobili invece legano il substrato formando dei veri e propri complessi, la proteina deve essere abbastanza lipofila tanto da poter attraversare lo strato lipofilo della membrana e veicolare così l'anione.⁴¹ Il terzo tipo di trasportatori

è costituito da proteine ancorate alla membrana, che legano il target da un lato e lo traslocano all'altro. Quest'ultimo tipo di trasportatori richiede caratteristiche strutturali ben precise, le proteine devono infatti possedere una parte idrofila esterna al doppio strato per il riconoscimento del target e una idrofoba di transmembrana capace di veicolarlo.⁴² (vedi Figura 22)

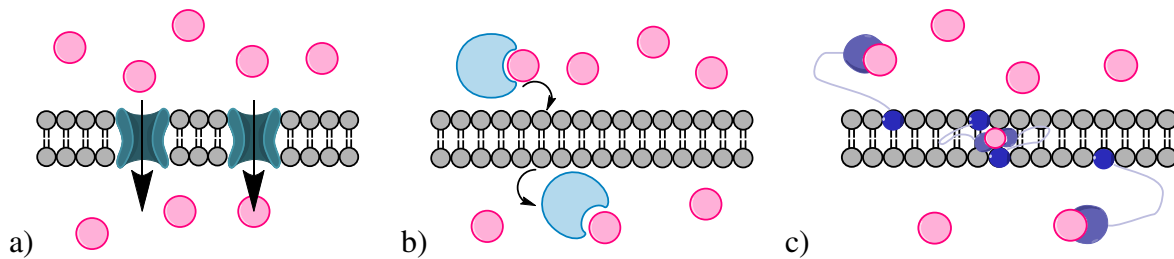


Figura 22 Tipi di trasportatori di membrana: a) proteine canale; b) carrier mobile; c) trasportatori di transmembrana.

Il trasporto transmembrana di anioni può essere un processo attivo o passivo. Le proteine di transmembrana possono operare per diffusione semplice, cioè il trasporto dell'anione segue il suo gradiente di concentrazione e il trasporto è detto passivo, perché non richiede un dispendio energetico; mentre il trasporto attivo prevede che gli anioni siano veicolati contro gradiente di concentrazione, per permetterne il funzionamento è richiesto un apporto energetico, di solito fornito dall'idrolisi di ATP.

I trasportatori canale possono essere ulteriormente classificati secondo la stechiometria e direzione del trasporto: uniporto, simporto o antiporto. Nel primo caso, la proteina trasporta selettivamente un singolo ione seguendo il suo gradiente di concentrazione, il movimento è facilitato dalla differenza di carica che si genera all'interno del canale; nel secondo caso, simporto, lo ione viene co-trasportato insieme a un secondo ione, solitamente di carica opposta, i due soluti si spostano nella stessa direzione e il movimento risultante non apporta un cambiamento di potenziale di carica. Il co-trasporto per antiporto, invece, coinvolge due ioni di carica uguale che si muovono in direzione opposta, la carica netta trasportata risulta quindi nulla. Solitamente il primo ione veicolato segue il proprio gradiente di

concentrazione, mentre il secondo per diffondere dall'altro lato della membrana segue la differenza di potenziale elettrostatico che si genera.

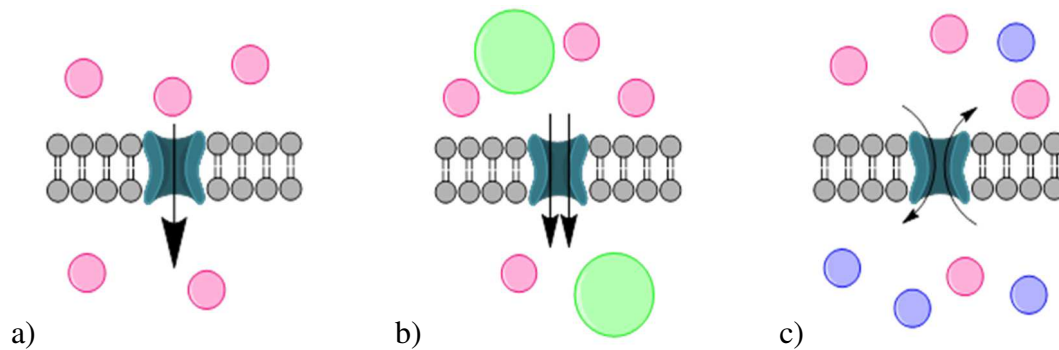


Figura 23 Tipi di trasporto passive: a) uniporto, b) simporto, c) antiporto.

Negli ultimi anni, molte ricerche hanno rivolto l'attenzione verso la progettazione di trasportatori anionici, ispirati al meccanismo dei trasportatori di membrana. Le nuove molecole sviluppate sono sia di origine naturale che molecole di sintesi in grado di legare anioni e veicarli attraverso il doppio strato lipidico. Per lo sviluppo di carrier bisogna tener presente le caratteristiche chimico-fisiche della molecola da sintetizzare, per essere in grado di attraversare la membrana cellulare, infatti, il composto deve essere di piccole dimensioni, rispettare la regola del 5 di Lipinski ed essere in grado di formare un complesso con il substrato abbastanza lipofilo tanto da diffondere nel doppio strato lipidico, ma altrettanto idrofilo da migrare nel fluido cellulare per permetterne il rilascio.⁴³

1.7.1 TRASPORTATORI IONICI DI ORIGINE NATURALE

Esistono molti esempi di trasportatori di origine naturale in grado di veicolare ioni attraverso la membrana cellulare fungendo da canali o da carrier mobili, alcuni di essi sono già presenti sul mercato con applicazioni in campo biologico o medico. Una delle molecole più ampiamente studiata è la

valinomicina, [Figura 24](#), un polipeptide di origine naturale attualmente in commercio come antibiotico ionoforo. La valinomicina è in grado di legare selettivamente lo ione potassio da una parte della membrana, il complesso cationico diffonde all'interno del doppio strato lipidico, rilascia poi lo ione dall'altro lato della membrana e torna indietro come molecola non complessata per completare il ciclo, fungendo così da trasportatore selettivo per il potassio.⁴⁴

L'azione di ionofori come la valinomicina, porta ad un trasferimento di carica netta attraverso la membrana cellulare in grado di modificarne il potenziale elettrico, per questo vengono definiti trasportatori elettrogenici; i carrier vengono chiamati, invece, elettroneutri quando non provocano un movimento netto di carica e quindi non alternano il potenziale, solitamente lo ione trasportato è scambiato con un protone per antiporto. Un esempio di ionoforo elettroneutro è la monensina, in cui il carbossilato presente nella struttura funge da trasportatore di H^+ .⁴⁵

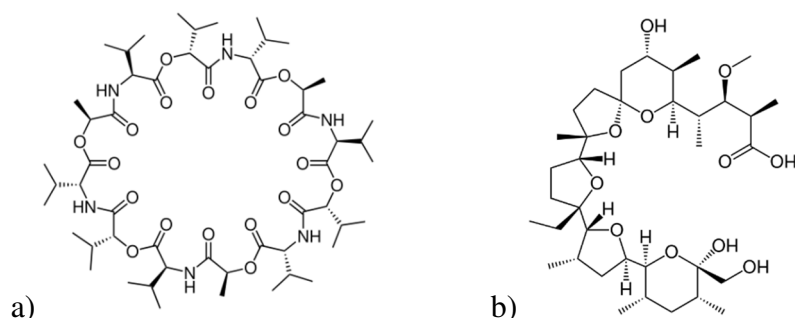


Figura 24 a) Valinomicina. b) Monensina.

Oltre ai trasportatori di cationi anche trasportatori di specie anioniche possono trovare una vasta applicazione in campo biomedico, sopperendo ad esempio a deficit di canali anionici che causano malattie genetiche oppure come antitumorali inducendo apoptosi cellulare per influsso di $NaCl$. Uno dei trasportatori anionici di origine naturale ad oggi più conosciuto è la prodigiosina, [Figura 25](#). Questa molecola è infatti in grado di facilitare il trasporto per simporto di H^+/Cl^- all'interno della cellula e per antiporto di Cl^-/NO_3^- . La prodigiosina attualmente è utilizzata per le sue proprietà antitumorali; causa infatti uno squilibrio elettrolitico, dei gradienti di concentrazione e del pH che portano all'apoptosi cellulare.⁴⁶

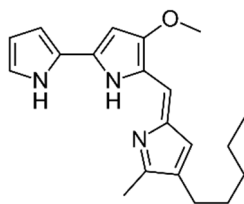


Figura 25 Prodigiosina.

Il gradiente di pH di transmembrana gioca un ruolo essenziale per molte funzioni cellulari, è quindi di grande importanza comprendere a fondo il meccanismo d'azione degli ionofori e se interagiscono con il trasporto di protoni o ioni idrossido. A questo proposito, la valinomicina veicola selettivamente lo ione K^+ senza alterare le concentrazioni di H^+/OH^- ; al contrario non sono ancora stati scoperti ionofori capaci di trasportare solamente Cl^- senza favorire il trasporto di H^+/OH^- . Infatti, la prodigiosina e altri carrier anionici di sintesi, cotrasportano H^+/Cl^- e scambiano Cl^-/OH^- alterando il pH intracellulare che causa la morte delle cellule trattate.⁴⁷ Anche la monensin ha dimostrato di perturbare il pH favorendo il trasporto di Na^+/H^+ nelle membrane degli organelli.

Recentemente, Gale e il suo gruppo hanno focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di trasportatori anionici naturali e di sintesi, ottenendo ottimi risultati per quanto riguarda studi sulla valinomicina e sintesi di suoi derivati, con possibile utilizzo per il trattamento di "canalopatie". In particolare una parte di questo lavoro di tesi rivolge l'attenzione verso piccole molecole di sintesi capaci di veicolare anioni, potenzialmente applicabile nella cura della fibrosi cistica.⁴⁸

1.7.2 TRASPORTATORI IONICI DI SINTESI

Prendendo ispirazione dalle molecole d'origine naturale, negli ultimi 20 anni sono stati sviluppati molti trasportatori sintetici di ioni.⁴⁹ A causa della natura supramolecolare di questa chimica, i trasportatori sono stati progettati secondo il modello *host-guest* per legare selettivamente l'anione

bersaglio e veicolarlo attraverso nelle membrane lipidiche presenti nelle cellule, rilasciandolo poi dall'altro lato della membrana. Le interazioni che si possono instaurare tra il recettore e il substrato sono interazioni deboli di tipo non covalenti, quali legami a idrogeno, legami ad alogeno, interazioni anione-dipolo e interazioni anione- π . L'interazione debole più comunemente utilizzata nella progettazione di trasportatori anionici è il legame a idrogeno. Questi legami sono reversibili e relativamente deboli (tipicamente 2-160 kJ mol⁻¹) comparati con i legami ionici o i legami covalenti. Il legame a idrogeno deve essere abbastanza forte da legare l'anione ma altrettanto debole da permetterne il rilascio una volta che il complesso ha oltrepassato il doppio strato lipidico. Nello sviluppo di piccoli recettori anionici, i legami a idrogeno coinvolti sono soprattutto quelli derivanti da gruppi funzionali come uree, ammidi, pirroli e indoli.⁵⁰ In linea generale, maggiore sarà la forza del legame a idrogeno tra il recettore e l'anione e più aumenterà la capacità di trasporto, ma bisogna tener conto anche di tanti altri fattori. La forza del legame a idrogeno è stata studiata attraverso il trasporto di cloruro da parte di una serie di molecole analoghe che differiscono per il gruppo legante l'anione: urea, tiourea o squaramide (Figura 26).⁵¹ Sono state eseguite titolazioni ¹H-NMR con ciascun trasportatore in soluzioni di DMSO-d₆ contenenti il 0,5% di acqua aggiungendo aliquote di tetrabuttilammonio cloruro.

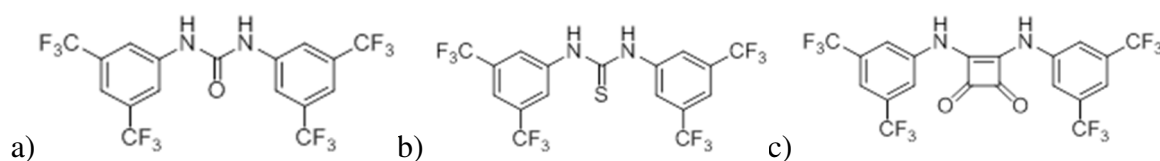


Figura 26 Analoghi a) urea, b) tiourea, c) squaramide.

Il complesso tra la molecola contenente il gruppo squaramide e il cloruro ha dato la costante di associazione maggiore, rispetto ai suoi analoghi, questo ha portato a pensare che la squaramide è il miglior gruppo legante l'anione e quindi con miglior efficienza di trasporto.⁵² Un altro metodo per aumentare la forza del legame a H è quello di aumentarne l'acidità del gruppo N-H, ciò può avvenire per esempio per fluorurazione della molecola. In letteratura, infatti, sono stati riportati numerosi

esempi nei quali recettori fluorurati, come le bis-urea riportate in [Figura 27](#), presentano una miglior affinità per il legame con Cl⁻ o altri anioni.

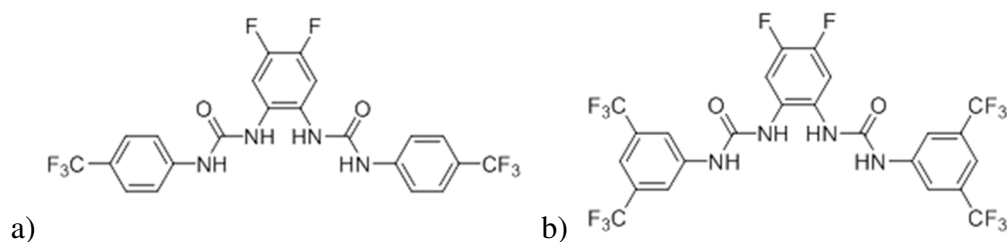


Figura 27 Due esempi di orto-fenilendiamine bis-urea diversamente fluorurate nell'anello benzilico.

A. P. Davis e i suoi collaboratori hanno sviluppato una serie di trasportatori basata su differenti scaffold lipidici a cui sono stati legati atomi donatori di legami a idrogeno, detto “cholapod” ([Figura 28](#)), con lo scopo di studiare la correlazione tra affinità strutturale e capacità di trasporto del cloruro.⁵³ I risultati ottenuti, hanno dimostrato che non esiste una correlazione diretta tra l'affinità dell'anione per il recettore e la capacità di trasporto da tenere in considerazione per aumentare la traslocazione, ma hanno proposto una varietà di altri fattori come differenze nell'anione legato, possibili aggregazioni formate all'interno del doppio strato lipidico oppure modificazioni del complesso all'interno della membrana. Dallo studio è emerso che trasportatori troppo fluorurati possiedono un'affinità di legame per il cloruro molto elevata, ma una scarsa efficienza di trasporto. Questo fa pensare che una costante di legame troppo alta porti poi ad una difficoltà di rilascio dell'anione. Queseda e collaboratori hanno analizzato il ruolo della lipofilia nel trasporto anionico di transmembrana, condotto su una serie di molecole sintetiche ispirate alla tambjamina ([Figura 28](#)) che differiscono per variazioni alla catena alchilica.⁵⁴ L'efficienza di trasporto di questi composti è stata correlata al relativo valore di logP, cioè il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua. I test hanno mostrato che i composti hanno la loro massima attività di trasporto quando il valore logP è compreso tra 4 e 5, al di fuori di questo intervallo l'attività è nettamente inferiore. Ulteriori studi sono stati eseguiti da P.A. Gale e A.P. Davis sulla lipofilia come fattore pregiudicante del trasporto, esaminando

il bilanciamento della lipofilia attorno al sito di coordinazione per l'anione; in particolare è stato scelto un recettore contenente una tiourea (Figura 28). I saggi sono stati svolti su una serie di composti tutti contenenti lo stesso numero di atomi di carbonio e la tiourea ma variandone la disposizione spaziale, quindi modificando la lipofilia attorno al sito di chelazione. Gli effetti ottenuti hanno dimostrato che la miglior affinità di legame per il cloruro è stata mostrata dal complesso con la tiourea al centro del recettore, quindi con una lipofilia distribuita uniformemente attorno all'anione, notevolmente maggiore rispetto a quelli con una distribuzione irregolare. Questo risultato suggerisce che un bilanciamento della lipofilia può aumentare la capacità il trasporto dell'anione, aiutando il complesso nella diffusione attraverso la membrana lipidica e riducendo la barriera energetica necessaria.⁵⁵

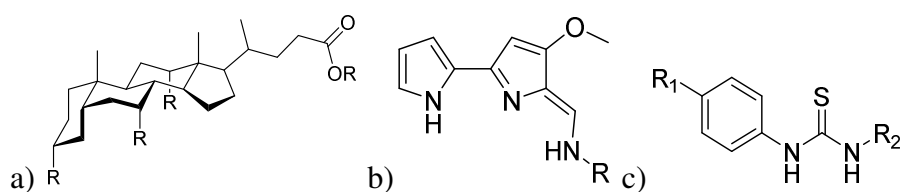


Figura 28 a) "cholapod"; b) tambjamina; c) recettore a base di tiourea utilizzato per gli studi di lipofilia.

Al fine di ottenere ulteriori approfondimenti sulla capacità di trasporto anionico di piccole molecole di sintesi, è stato utilizzato il modello standard farmacologico QSAR per la relazione struttura - attività.⁵⁶

La chimica recettoriale utilizza il modello di preorganizzazione del legame al fine di ottenere costanti di legame più elevate, questo metodo può essere utilizzato anche dalla chimica supramolecolare per lo sviluppo trasportatori anionici. La pre-organizzazione del sito di coordinazione elimina la necessità di un riarrangiamento per legare l'anione, riducendo così anche il dispendio entropico relativo al riarrangiamento, il che determina un'energia di interazione maggiore.⁵⁷ La struttura delle isotalamidi, riportate in Figura 29, ne sono un esempio: la molecola a) configurazione *sin-sin* presenta legami idrogeno intramolecolari, dovuti alla presenza di gruppi fenolici, che mantengono la struttura

bloccata nella conformazione ideale per il legame con l'anione cloruro.⁵⁸ Infine, nella progettazione di trasportatori anionici è quindi opportuno tener conto della disponibilità di rilascio dell'anione, molecole troppo lipofile non riescono a diffondere nella soluzione acquosa intracellulare, rimanendo intrappolate all'interno del doppio strato lipidico.

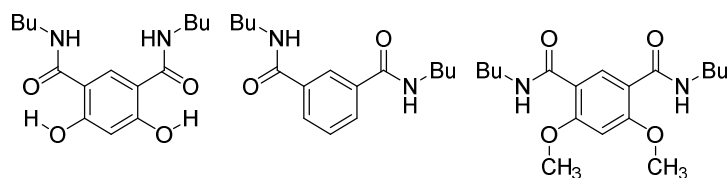


Figura 29 Isoftalamidi studiate.

Le proprietà chimico-fisiche rilevabili dei complessi recettore-substrato possono essere molteplici. Per un corretto riconoscimento è necessario che la coordinazione del substrato determini una variazione di proprietà fisiche facilmente rilevabili e valutabili. A tale scopo possono essere utilizzati diversi parametri, come pH, colore, emissione di fluorescenza o assorbimento di radiazioni Vis-UV, proprietà magnetiche o elettriche per citarne alcune. Questo progetto di tesi si è occupato soprattutto di recettori in grado di rispondere sensibilmente alla presenza di cationi metallici mediante variazione di alcune proprietà ottiche, quali assorbimento ed emissione di fluorescenza, inoltre sono state utilizzate altre tecniche come analisi NMR e potenziometriche. Una parte del progetto tesi ha riguardato l'interazione dello ione cloruro con di una serie di politiouree in soluzione acquosa.

1.7.3 METODI DI VALUTAZIONE DEL TRASPORTO ANIONICO

Vesciche Unilamellari: Non è semplice studiare l'attività di trasportatori sintetici nelle cellule in vivo, per questo motivo comunemente vengono utilizzate vescicole lipidiche, anche chiamate liposomi, come modello della membrana cellulare. Sono stati sviluppati e standardizzati vari test per studiare il trasporto di molecole di sintesi, molti dei quali utilizzano liposomi

unilamellari.^{59,60} Un grande vantaggio del loro impiego è sicuramente quello del controllo della soluzione interna ed esterna alla membrana, così come il controllo delle dimensioni delle vescicole, rendendoli adatti ad un'ampia varietà di condizioni sperimentali. I fosfolipidi che abbiamo scelto per i test di trasporto condotti sono stati 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), mostrati in [Figura 30](#).

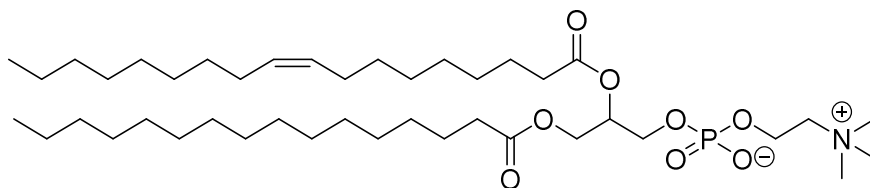


Figura 30 Struttura del fosfolipide 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC).

Saggio potenziometrico ISE: È un saggio potenziometrico con elettrodo ionoselettivo (ISE). Gli studi potenziometrici su liposomi possono essere eseguiti utilizzando un elettrodo a membrana sensibile alla variazione della concentrazione di cloruro in soluzione. Tipicamente, le analisi sono condotte caricando i lipidi con una soluzione acquosa di ione cloruro e sospendendoli in una soluzione esterna contenente un altro anione. Il trasportatore analizzato viene aggiunto alla sospensione ed il trasporto di anioni viene monitorato mediante l'elettrodo. L'efflusso di ione cloruro è misurato attraverso il potenziale dell'elettrodo, calibrato opportunamente con una soluzione di sodio cloruro al fine di convertire il cambiamento di potenziale con la concentrazione di cloro trasportata esternamente. Alla fine dell'esperimento le vescicole vengono lisate mediante l'aggiunta di un detergente alla soluzione, per ottenere il valore di efflusso di anione cloruro al 100%.

Saggio HPTS: Un altro metodo ampiamente utilizzato per lo studio del trasporto è quello per via fluorimetrica. La soluzione interna dei liposomi conterrà un indicatore di fluorescenza, per cui l'intensità di emissione di un indicatore fluorimetrico verrà monitorato nel tempo e fornirà informazioni sul pH o sul trasporto di anioni. Il composto più comunemente utilizzato è 8-idrossi-

1,3,6-pirentrisolfonato (HPTS), mostrato in [Figura 31](#); il quale presenta una forma acida e una basica che possiedono due differenti lunghezze d'onda di eccitazione, 403 nm e 460 nm rispettivamente. Il rapporto tra la forma acida e quella basica fornisce informazioni sul pH intra-vescicolare, rendendo questo metodo molto utile per investigare il trasporto X^-/OH^- o X^-/H^+ .⁶¹

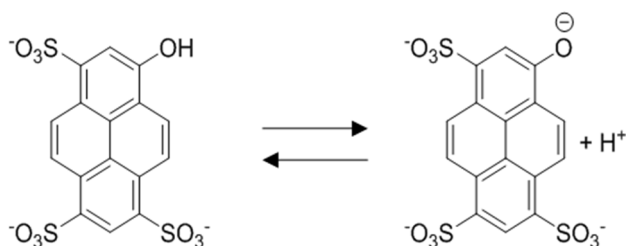


Figura 31 Struttura dell'HPTS nelle forme protonata e deprotonata.

Titolazioni 1H -NMR: Anche per quanto riguarda il monitoraggio per il trasporto cellulare, la risonanza magnetica può rilevarsi un utile strumento d'impiego, infatti le interazioni tra il trasportatore e gli anioni bersaglio possono essere investigate attraverso titolazioni 1H -NMR. Le titolazioni vengono eseguite mantenendo costante la concentrazione del recettore per ogni analisi e aumentando la concentrazione dell'anione. Negli spettri registrati si osserveranno degli spostamenti dei segnali relativi ai gruppi di donatori in grado di formare legami a idrogeno con l'anione bersaglio, i dati saranno quindi elaborati utilizzando un opportuno programma⁶² per calcolare le costanti di stabilità delle interazioni tra il recettore e l'anione.

Capitolo 2. OBIETTIVI

SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni numerose ricerche si sono incentrate nello sviluppo di sistemi molecolari capaci di riconoscere e/o monitorare specie target come ad esempio cationi o anioni coinvolti in processi biologici fondamentali. Ad esempio, sia lo ione zinco che lo ione potassio sono tra i cationi più abbondanti negli organismi viventi, la loro stabilizzazione attraverso processi coordinativi da parte di proteine ed enzimi gioca un ruolo cruciale per numerosi funzioni metaboliche, di catalizzazione e trasporto, inoltre, è stato studiato il coinvolgimento dello zinco nella regolazione dell'apoptosi cellulare.^{63,64,65} Un'alterazione dell'omeostasi di questi cationi metallici, o un loro deficit, è stato associato all'insorgenza di gravi patologie come morbo d'Alzheimer,⁶⁶ morbo di Parkinson⁶⁷ o epilessia,⁶⁸ delle molecole in grado di rilevare la loro concentrazione cellulare potrebbe essere di notevole interesse in campo medico. Nell'ambito della chimica supramolecolare, uno dei campi in cui ha trovato applicazione è stato nello sviluppo di sistemi che permettessero di riconoscere e segnalare la presenza del target attraverso variazione delle proprietà ottiche del sistema o dell'analita; questi sistemi, chiamati chemosensori hanno trovato negli ultimi anni una grossa espansione, sfruttando una chimica già ampiamente conosciuta e studiata come la chimica di coordinazione ed il riconoscimento molecolare. Negli ultimi anni, i chemosensori si sono così evoluti da trovare impiego in campo medico e biotecnologico come la diagnostica e/o la teranostica oppure nella costruzione di sensori macroscopici. In particolare, interessanti si sono dimostrati essere i chemosensori di fluorescenza, cioè la cui risposta fotochimica alla presenza della specie target avvenisse attraverso una variazione della emissione di fluorescenza. e, una sfida ancora di grande attualità, è quella di progettare chemosensori fluorescenti che rispondano selettivamente e rapidamente alla presenza dell'analita target, sia esso uno specifico ione metallico, un anione o una molecola. L'interazione

selettiva o il riconoscimento dell'analita da parte del chemosensore, come ampiamente discusso in precedenza, deve indurre una modificazione della emissione espressa come aumento o diminuzione dell'intensità di emissione o cambiamento di lunghezza d'onda dell'emissione stessa.

In questo ambito, le poliammine si sono dimostrate essere una ottima base polivalente per l'ottenimento di nuovi chemosensori; queste infatti sono una classe di molecole dotate di una grande versatilità sintetica e capaci di interagire attraverso legami coordinativi con un vastissimo numero di ioni. In particolare, la presenza di molteplici funzioni amminiche le rende degli ottimi leganti principalmente per i cationi metallici ma non solo e, potendo essere presenti in soluzione anche come specie poliprotonata, esse possono interagire anche con una specie anionica stabilizzandola al sistema. Da ricordare che è anche riconosciuto che le poliammine biogene sono coinvolte in svariate funzioni biologiche come il mantenimento del pH, l'interazione con acidi nucleici, trascrizione e processi di trasporto e quindi il loro impiego le rende attrattive anche sotto questo aspetto. Particolarmente attrattive sono le poliammine a struttura macrociclica che, attraverso la loro preorganizzazione favoriscono sia l'instaurarsi di legami idrogeno intramolecolari che possono contribuire alla selettività nella stabilizzazione della specie target, in particolare se anionica; al contrario, le ammine lineari semplici a causa della loro elevata flessibilità strutturale risultano molto meno selettive nella complessazione della specie target.

Una delle strategie che può essere utilizzata per la progettazione di chemosensori è quindi quella di prevedere l'utilizzo di una poliammine per sfruttare le sue proprietà recettrici, in grado di riconoscere e coordinare stabilmente specie bersaglio alla quale legare covalentemente una parte fotoattiva che abbia le capacità di segnalare l'avvenuta interazione con il target attraverso una risposta fotoattiva, come la variazione di emissione o di assorbimento.⁶⁹ In questo caso, si è posta particolare attenzione allo sviluppo di chemosensori in grado di coordinare o veicolare ioni come Zn^{2+} , Mg^{2+} o Cl^- , noti per il loro coinvolgimento in molti processi cellulari essenziali.

Un secondo impiego di strutture supramolecolari è lo sviluppo di trasportatori di sintesi o semisintesi, in grado di coordinare selettivamente piccoli substrati o ioni, per mezzo di interazioni di non legame e legami idrogeno, e veicarli da una parte all'altra del doppio strato lipidico delle membrane cellulari.

Questo progetto di tesi si è rivolto principalmente a questi due ambiti. In primo luogo, sono state progettate e sintetizzate due nuove unità fotoattive da poter inserire su scheletri molecolari poliamminici; esse si sono dimostrate essere capaci di emettere o assorbire radiazione luminosa nel campo dell'UV-Vis sia in soluzione acquosa che in solventi organici. Successivamente sono state sviluppate strutture macrocicliche e acicliche in cui sia le unità otticamente attive precedentemente sviluppate che alcune già note sono state collegate alla parte recettrice poliamminica al fine di creare chemosensori fotoattivi per cationi ed anioni. I chemosensori sintetizzati sono stati studiati preliminarmente per valutarne le proprietà acido-base e le proprietà coordinative, con un particolare interesse per la complessazione selettiva di ioni metallici in soluzioni acquose a pH fisiologico. Le proprietà chimico-fisiche rilevabili dei complessi recettore-substrato possono essere molteplici, da appunto un cambio delle proprietà fotofisiche, a cambi strutturali rilevabili attraverso indagini NMR in soluzione o allo stato solido attraverso studi strutturali di diffrattometria a raggi X ed altre ancora. Una situazione ottimale per avere un immediato riscontro dell'avvenuto riconoscimento, da qui l'inserimento dell'unità fotosensibile, è che l'alterazione della proprietà osservata sia facilmente rilevabile e valutabile e che in generale sia connessa al fatto che il legante si trovi in forma libera o associata al target. Esistono molti parametri utilizzati, per quanto riguarda questo progetto di tesi, i chemosensori saranno indagati per le loro proprietà spettrofotometriche, specificatamente nell'assorbimento e nell'emissione di fluorescenza. L'attenzione sarà rivolta anche allo studio dei complessi formati in soluzione attraverso l'analisi NMR al fine di determinare la struttura del legante e del complesso ed il coinvolgimento della struttura molecolare del legante nella stabilizzazione e riconoscimento delle specie target. Inoltre, traendo ispirazione dagli agenti terapeutici basati su centri metallici, alcuni leganti saranno testati a livello cellulare, al fine di

valutarne una possibile applicazione in campo biologico. Di seguito, nella [Figura 32](#) sono riportati i sistemi finali ottenuti e caratterizzati.

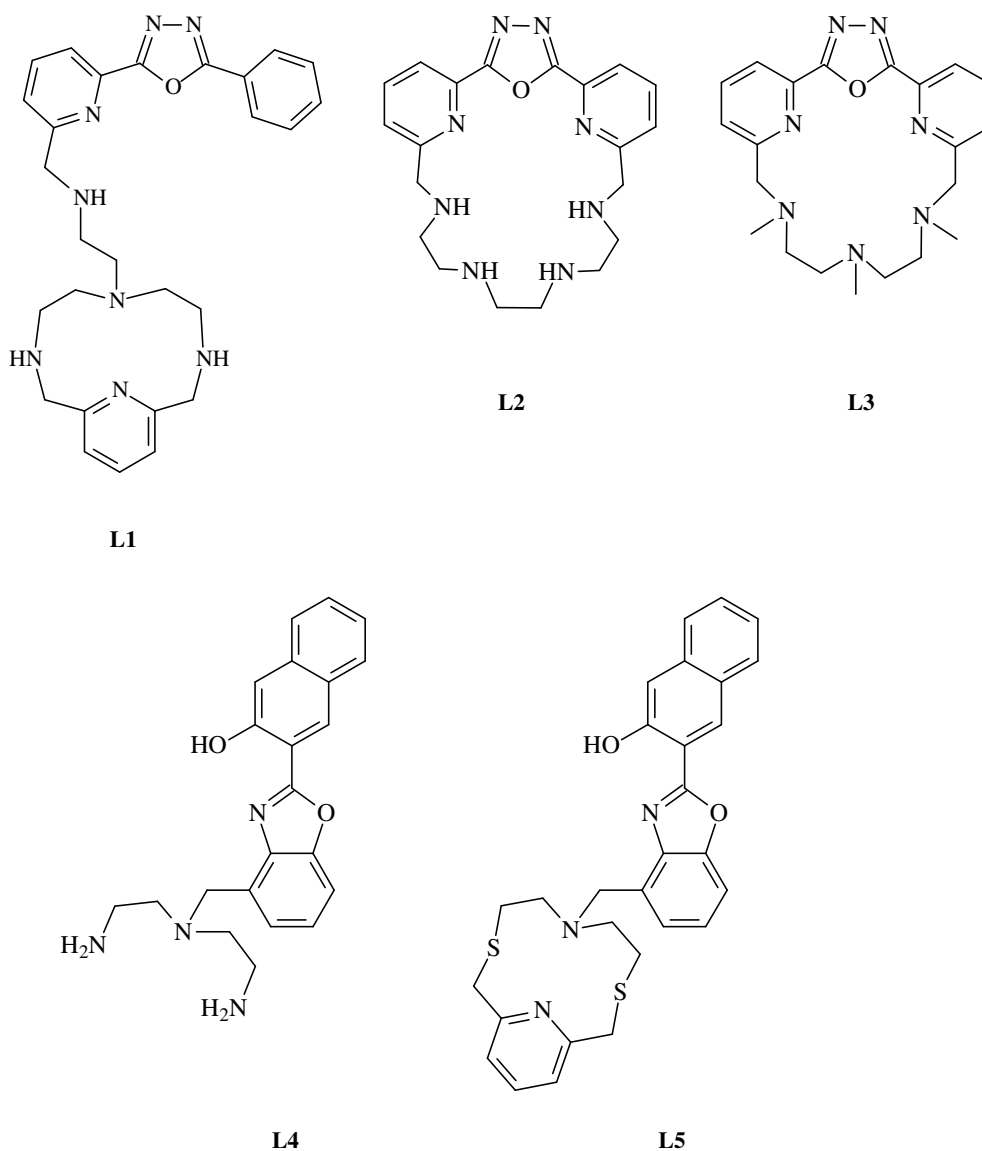


Figura 32 Chemosensori sintetizzati.

In un secondo momento, con il gruppo di ricerca del Professor Philip Gale dell'Università di Southampton, è stata progettata e sviluppata una serie di trasportatori per anioni basati su un sistema amminico tripodale di tiouree opportunamente funzionalizzate, mostrate in [Figura 33](#), derivate dal composto precursore **T1** che aveva mostrato buone capacità di trasporto per il cloruro. Dei

trasportatori sintetizzati sono state testate le proprietà di trasporto in soluzione al fine di valutarne le proprietà come trasportatori selettivi di ione cloruro.⁷⁰ I nuovi composti di sintesi dovranno avere la capacità di complessare l'anione e veicolarlo attraverso un doppio strato fosfolipidico.

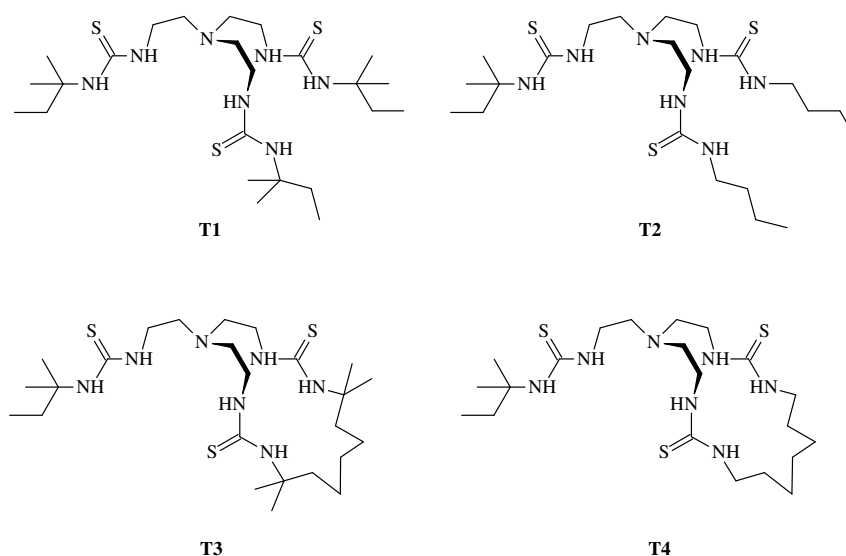


Figura 33 Trasportatori sintetizzati.

2.1 UNITÀ LEGANTE

Il numero, la disposizione e il tipo di atomi donatori contenuti nella parte recettrice del chemosensore sono fattori determinanti per le capacità coordinative esibite dal sistema, influenzandone oltre alla tipologia e alla selettività del substrato bersaglio anche la stechiometria del complesso. In particolare, nei leganti sviluppati, le unità coordinatrici sono costituite da poliammine alifatiche lineari o macrocicliche, o contenenti anelli piridinici. L'unità fotoattiva può presentarsi inserita nella struttura del legante come pendaglio del macrociclo, oppure può fare parte della struttura macrociclica stessa. Gli scaffolds impiegati sono riportati in [Figura 34](#). I composti **L^{II}**, **L^{III}** e **L^{IV}** erano stati sviluppati in

studi precedenti. Il macrociclo **L^I** è stato fornito dal gruppo del Professor Garcia-Espana dell'Università di Valencia⁷¹ e **L^V** dal Professor Vito Lippolis dell'Università di Cagliari.⁷²

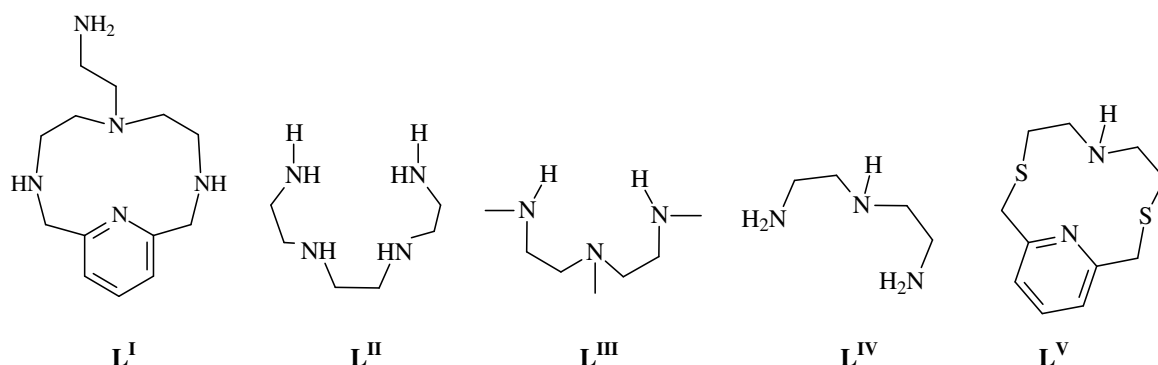


Figura 34 Unità poliamminiche leganti macrocicliche e lineari.

Data la loro natura chimica, tutti i leganti poliamminici progettati danno luogo a equilibri acido-base in soluzione acquosa, i quali risultano competitivi con gli equilibri di formazione dei complessi metallici. La formazione delle specie acido-base nonché dei complessi metallici possono determinare variazioni delle proprietà fotochimiche dell'unità fluorofora inserita, fornendo una risposta fotochimica. In quest'ottica diventa di fondamentale importanza studiare gli equilibri che si instaurano in soluzione, e le specie che si formano, attraverso misure potenziometriche, spettrofotometriche e di risonanza magnetica nucleare.

2.2 UNITÀ FOTOATTIVA

2.2.1 CHEMOSENSORI BASATI SU UNITÀ OSSADIAZOLICHE

Il gruppo di ricerca, presso il quale ho svolto questo lavoro, si occupa da anni della progettazione e dello studio di chemosensori di fluorescenza. Importanti risultati sono stati ottenuti dallo sviluppo dell'unità fluorofora [1,3,4]ossadiazolo, inserita in diversi frammenti fotochimicamente attivi come il 2,5-difenil[1,3,4]ossadiazolo (**PPD**), 2-fenil-5-piridil[1,3,4]ossadiazolo (**PyPD**), e 2,5-

dipiridil[1,3,4]ossadiazolo (**PyPyD**), riportati in [Figura 35](#). Queste strutture sono state utilizzate per la realizzazione di leganti macrociclici fotoattivi, in cui l'unità contenente l'anello ossadiazolico possiede la capacità di generare un'apprezzabile alterazione delle proprietà fotochimiche a seguito della presenza di uno ione metallico, coordinato all'unità recettrice.

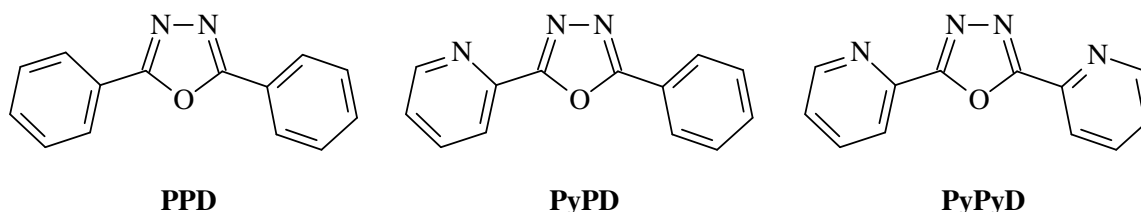


Figura 35 Fluorofori basati sull'unità [1,3,4]ossadiazolo.

L'unità fluorofora **PPD** è nota per possedere importanti proprietà fotochimiche in emissione di fluorescenza; questa unità è stata pertanto utilizzata per la sintesi di vari chemosensori poliamminici fluorescenti aventi elevate rese quantiche di emissione e adatte per determinare presenze di analiti in soluzioni molto diluite come richiesto in campo biologico. Recentemente, è stata studiata una famiglia di chemosensori basata sull'unità fotoattiva **PPD**, in cui il fluoroforo è stato accoppiato a una serie di strutture poliamminiche acicliche o macrocicliche; i risultati ottenuti hanno rivelato eccellenti risposte sia coordinative che fotochimiche dei sistemi sviluppati verso specifici metalli di transizione.⁷³ In particolare, il legante macrociclico **B** di Figura 21, si è dimostrato un ottimo chemosensore per lo ione Zn(II) in soluzione fisiologica. Promettenti risultati in campo biologico sono stati ottenuti utilizzando i complessi metallici di Zn(II) e Cu(II) con **B** i quali si sono rivelati capaci di intercalarsi nel DNA influenzando il ciclo cellulare di linee tumorali.^{74,75} Nei sistemi sintetizzati, l'unità fotoattiva non partecipa direttamente alla coordinazione del catione metallico che è invece stabilizzato dalla poliammina.

Alla luce dei risultati precedentemente ottenuti, uno degli obiettivi della ricerca è stato quello di realizzare un fluoroforo analogo al **PPD** in grado di partecipare direttamente alla coordinazione del

catione. La struttura del **PPD** è stata perciò modificata sostituendo un anello benzenico con un anello piridinico. In questo modo, il nuovo frammento ossadiazolico ottenuto, denominato **PyPD** (Figura 35), diventa in grado di essere coinvolto nella coordinazione di uno ione metallico attraverso l'atomo di azoto della piridina. Tale coinvolgimento può produrre una risposta fotochimica diretta e più sensibile alla presenza dello ione target nel sistema. A tale scopo, è stato progettato e sintetizzato il legante **L1**, formato dal poliazamacrociclo aromatico **L^I**, come unità recettrice, a cui è stato legato il fluoroforo **PyPD** come unità fotoattiva/coordinante. I due frammenti sono stati uniti attraverso un ponte metilenico a collegare il fluoroforo alla funzione amminica primaria. La cavità recettoriale del legante è stata concepita con lo scopo di ottenere un sistema in grado di coordinare selettivamente cationi metallici delle dimensioni di Zn(II) e di Cu(II).

Alla coordinazione possono contribuire le funzioni amminiche presenti sia nell'unità macrociclica che nel pendaglio quali l'ammina secondaria alifatica e l'ammina aromatica della piridina nel **PyPD**. Del legante **L1** sono state studiate le sue caratteristiche chimico-fisiche, di coordinazione verso ioni metallici in soluzione sia acquosa che organica.

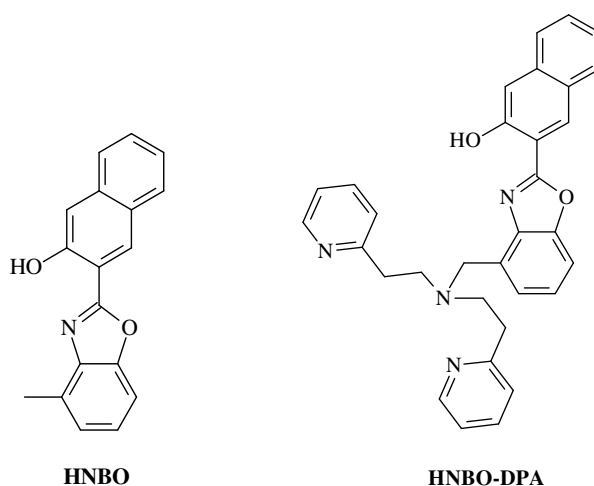
La formazione di un complesso metallico in cui il **PyPD** sia coinvolto in coordinazione, comporta che la specie possa essere utilizzata come metallo-recettore per specie esterne. Infatti, il legame coordinativo **PyPD**-metallo può essere rimosso da un legante secondario più affine al metallo dando luogo al distacco del fluoroforo dalla coordinazione con conseguente risposta fotochimica. Il complesso metallo-recettore si comporta come sensore nei confronti di specie coordinanti presenti in soluzione.

Con lo scopo di aumentare le proprietà coordinanti dell'unità fluorofora ed incrementare la risposta fotochimica nonché cercando di spostare l'assorbimento verso il campo del visibile, è stato sostituito l'anello benzenico del **PyPD** con un secondo anello piridinico, realizzando il nuovo fluoroforo **PyPyD**. La presenza di un secondo atomo d'azoto piridinico, potenzialmente i coordinante verso gli ioni metallici, dovrebbe aumentare la sensibilità e l'efficienza del fluoroforo alla complessazione.

Come primo approccio, l'unità fluorescente **PyPyD** è stata inserita in sistemi poliamminici macrociclici, ottenendo i leganti **L2** e **L3**, utilizzando le unità leganti **L^{II}** e **L^{III}**. Al momento, i due leganti appartenenti alla stessa famiglia, sono stati sintetizzati e caratterizzati; in seguito, saranno valutate le loro caratteristiche acido-base e fotochimiche in soluzione.

In tutti questi esempi, le variazioni delle proprietà fotochimiche potranno essere utilizzate non solo come segnale della presenza del target, ma anche come strumento per un'analisi quantitativa dei livelli di ione in soluzione.

2.2.2 CHEMOSENSORI BASATI SULL'UNITÀ HNBO



I chemosensori **L4** e **L5** sono stati progettati partendo da una differente unità fluorofora il 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo, **HNBO**, già nota in letteratura per le sue caratteristiche luminescenti e chelante di cationi di metalli di transizione. In particolare, il legante **HNBO-DPA**⁷⁶ costituito dal fluoroforo **HNBO** legato covalentemente ad una parte recettrice poliazaciclica aromatica, si è rivelato un ottimo chemosensore per il catione Zn(II), rispondendo con una drastica alterazione dell'emissione di fluorescenza alla presenza del metallo in soluzione. Abbiamo tratto spunto dai promettenti risultati per lo sviluppo di nuovi leganti, **L4** e **L5**. I nuovi composti sono

costituiti dal fluoroforo **HNBO** a cui sono state legate due differenti unità recettrici, rispettivamente una catena alifatica poliazaaciclica, **L^{IV}**, e un sistema macrociclico, **L^V**, contenente N e S come atomi donatori. I due chemosensori saranno studiati per le loro proprietà fotochimiche e di coordinazione, al fine di valutarne la selettività verso metalli alcalini e metalli di transizione. Inoltre, **L⁵** sarà ulteriormente funzionalizzato per testarne la capacità di trasportatore di anioni attraverso le membrane lipidiche in soluzione.

2.3 TRASPORTATORI PER ANIONE CLORURO

Il gruppo di ricerca di Philip Gale, presso il quale ho lavorato per un periodo del mio corso di dottorato, si occupa da anni dello studio del trasporto cellulare e ha progettato e sviluppato un gran numero di trasportatori di origine naturale e di sintesi. Recentemente, l'attenzione è stata focalizzata su un trasportatore naturale di ioni, la valinomicina, da cui sono state tratte ispirazione una serie di nuove molecole di sintesi per il trasporto selettivo di ioni cloruro attraverso le membrane fosfolipidiche.^{77,78} La ricerca scientifica ha dimostrato come il cloro è di fondamentale importanza per le funzioni biologiche e un suo squilibrio provoca gravi patologie, la fibrosi cistica ne è un esempio.⁷⁹ Il trasporto dell'anione si basa sul classico modello di coordinazione *host-guest* delle molecole supramolecolari, le interazioni ioniche devono essere reversibili per permettere il rilascio del target una volta attraversata la membrana cellulare. Sono state sviluppate una serie di molecole trasportatrici, in grado di legare l'anione e veicolarlo all'interno di vescicole, tuttavia nessun anionoforo è ad oggi in grado di trasportare selettivamente cloro, rispetto a molecole come H⁺ o OH⁻. Importanti informazioni sono state ottenute su uno studio condotto su svariati composti analizzati come trasportatori transmembrana, con lo scopo di ricercare strutture non elettrogeniche in grado di facilitare il trasporto selettivo per lo ione cloruro, individuando le caratteristiche strutturali più favorevoli per lo sviluppo di un trasportatore specifico.⁵⁰

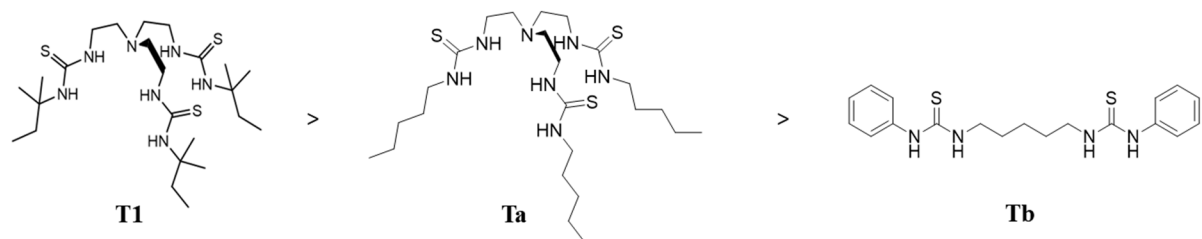


Figura 36 Confronto della selettività per il trasporto di ione cloruro tra strutture presentati tiouree.

Uno dei composti più promettenti è sicuramente il trasportatore **T1**, si basa su una struttura trietilamminica contenente tre tiouree funzionalizzate con catene *tert*-pentiliche. Lo ionoforo è stato analizzato per le sue caratteristiche in soluzione acquosa, dai risultati ottenuti si rivela capace di veicolare l'anione, ma provoca una perturbazione del pH intracellulare, ciò significa che facilita il trasporto anche di protoni e di ioni idrossilici. Probabilmente il trasporto di protoni è dovuto al carattere acido delle tiouree, mentre quello di ioni idrossilici è attribuito alla flessibilità della tasca recettoriale che influenza sia il legame con OH^- che l'interazione con i fosfolipidi di membrana. È stato studiato che i fosfolipidi quando si trovano nella forma deprotonata, con la testa polare verso la soluzione esterna, sfruttano il legame con le tiouree dei recettori per ruotare all'interno del doppio strato di membrana, secondo un meccanismo "flip-flop", per poi ritornare alla posizione di partenza e veicolando protoni da una parte all'altra del doppio strato.⁸⁰

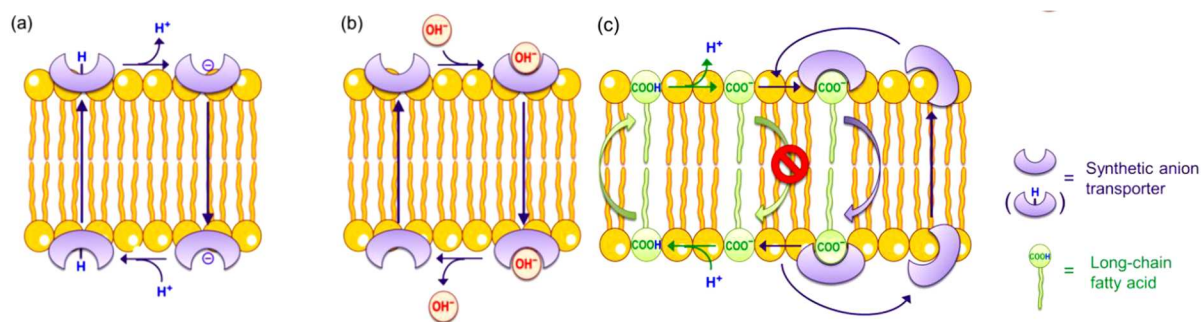


Figura 37 Schematizzazione del meccanismo del trasporto di (a) protoni, (b) ioni idrossido e (c) interazione con acidi grassi di membrana e relativo "flip-flop"; da parte dei carrier attraverso il doppio strato lipidico di membrana.

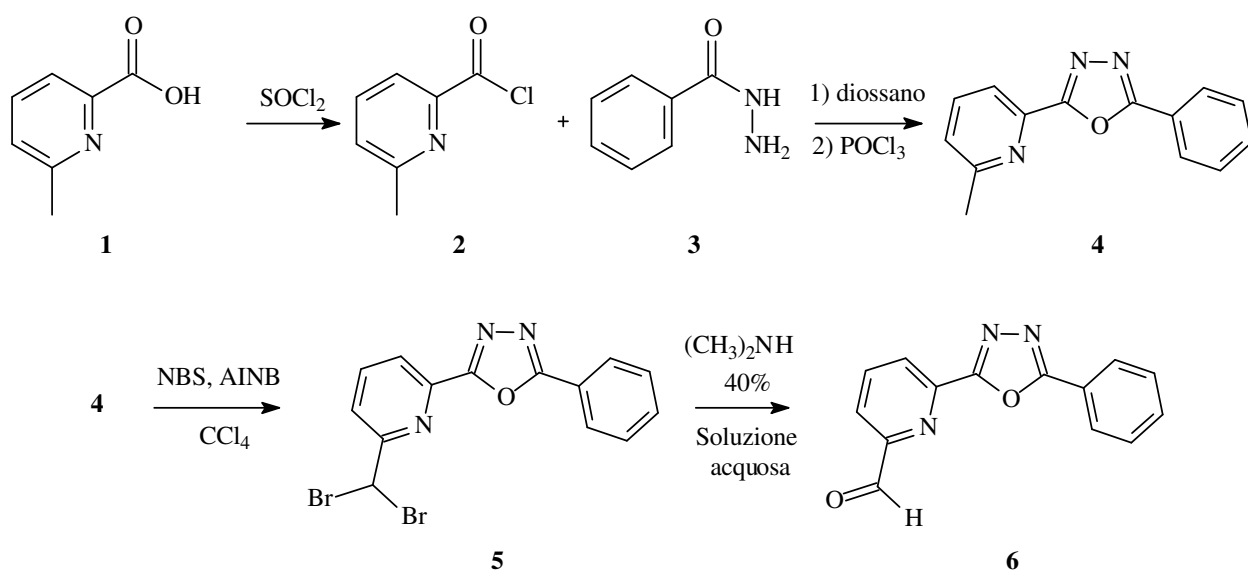
Abbiamo perciò progettato una serie di piccole molecole potenzialmente in grado di trasportare ione cloruro attraverso le membrane cellulari e migliorare la selettività rispetto a H^+ o OH^- . I nuovi trasportatori **T2**, **T3** e **T4**, sono basati sulla struttura del composto **T1** e sono molecole asimmetriche tripodali costituiti da uno scheletro di tris-tiouree. Le strutture di **T3** e **T4** sono state rese meno flessibili mediante la formazione di un macrociclo tra due delle tre tiouree, delle dimensioni tali da accogliere l'anione ed escludere lo ione idrossido. Inoltre, lo ione per essere incapsulato deve essere desolvato ad opera della parte del recettore non coinvolta nell'interazione. Pertanto, il trasporto di anioni con un'alta entalpia di legame di disidratazione saranno favorite termodinamicamente rispetto a quelle con entalpia di legame inferiore, sarà quindi favorito il trasporto di cloruro. Sebbene l'acidità delle tiouree sia meno favorevole per la coordinazione dell'anione cloruro rispetto alle uree, è vantaggiosa per ridurre il trasporto di H^+ . I nuovi composti verranno valutati mediante test di trasporto su liposomi, al fine di valutarne le capacità come trasportatori e la selettività verso l'anione Cl^- ; infine, le strutture macrocicliche e acicliche verranno comparate per valutare gli effetti della ciclizzazione sulla selettività.

Capitolo 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 SINTESI E STUDIO DI L1

3.1.1 SINTESI DEL LEGANTE L1

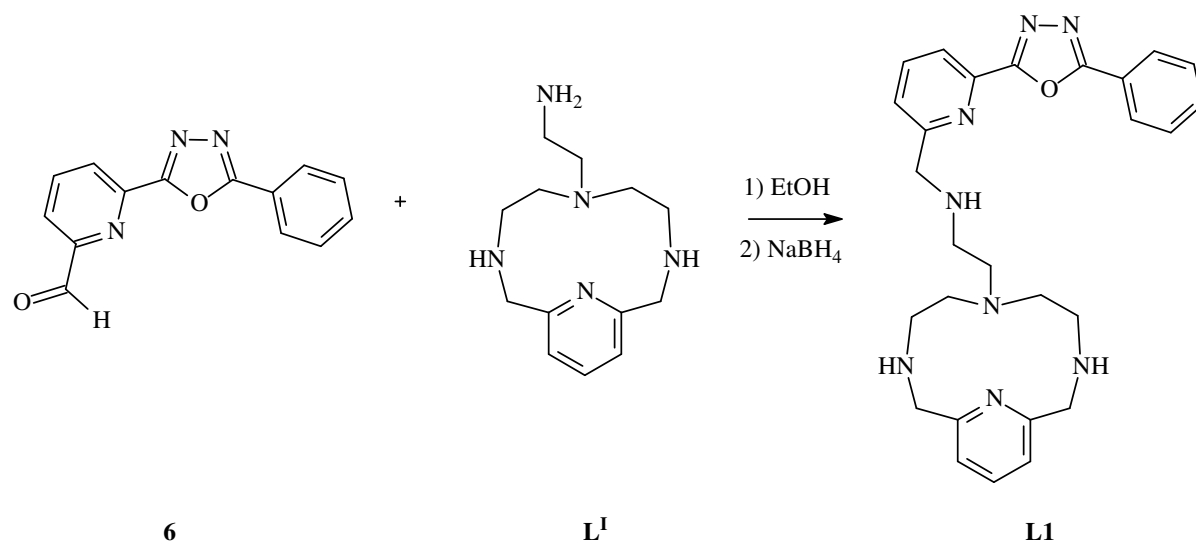
La sintesi del nuovo fluoroforo **PyPD**-derivato, il composto **6**, è riportata nello [Schema 1](#).



Schema 1 Sintesi del fluoroforo PyPD (6).

L'unità fotoattiva utilizzata per la sintesi del legante **L1**, è stato opportunamente funzionalizzata sull'anello piridinico, al fine di ottenere un gruppo aldeidico in grado di reagire selettivamente con l'ammina primaria del frammento macrociclico **L^I**. In primo luogo, è stato sintetizzato il cloruro acilico **2** derivato dell'acido 6-metil-2-piridincarbossilico **1** mediante clorurazione con cloruro di tionile. Il fluoroforo **4** è stato ottenuto in una reazione a due step, come primo passaggio sono stati accoppiati in diossano i precursori 6-metil-2-piridincarbonil cloruro **2** e benzidrazide **3**, successivamente è avvenuta la chiusura dell'anello ossadiazolico **4** per aggiunta di POCl_3 direttamente nella miscela di reazione. Il composto **6** è stata ottenuta mediante due reazioni

consecutive, la prima dibromurazione del metile sull'anello piridinico del composto **4** a cui segue la conversione del dibromo **5** in aldeide mediante l'utilizzo di dimetilammina al 40% in soluzione acquosa.



Schema 2. Sintesi del legante L1.

La sintesi del legante **L1** è stata portata a termine ad alte rese per accoppiamento del fluoroforo **6**, opportunamente funzionalizzato, con il macrociclo **L^I** secondo la reazione riportata nello [Schema 2](#). La reazione di coupling è stata eseguita aggiungendo un equivalente di composto **6** ad una soluzione di **L^I** in etanolo, l'immina così formata è stata ridotta ad ammina per aggiunta di NaBH₄. Il legante ottenuto è stato purificato per precipitazione in una miscela di etanolo/acido perclorico 4:1 (v/v) e successivamente cristallizzato come sale perclorato da una miscela di metanolo/etanolo.

Il legante desiderato **L1** è stato testato e analizzato per le sue proprietà acido-base, spettrofotometriche e coordinative come chemosensore di fluorescenza selettivo per il riconoscimento di ioni metallici. Ne è stato studiato il comportamento come complessante di ioni Zn(II) e Cu(II) in soluzione acquosa, a pH fisiologico, e in soluzione organica.

3.1.2 STUDIO DELLE PROPRIETÀ IN SOLUZIONE DI L1

3.1.2.1 Comportamento acido-base

In *Tabella 1* sono riportate le tutte costanti di protonazione del legante **L1** determinate per via potenziometrica a $298,1 \pm 0,1$ K, utilizzando una soluzione $0.15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ di NaClO_4 come elettrolita di supporto. In queste condizioni, **L1** si comporta come base triprotica, il legante mostra infatti tre equilibri di protonazione attribuibili alle tre ammine secondarie presenti nella struttura. Teoricamente anche gli atomi d'azoto presenti nel gruppo PyPD così come le ammine terziaria e l'azoto piridinico del macrociclo potrebbero subire una protonazione, ma queste nel range di pH studiato (2,5 – 11,0) alle condizioni utilizzate non danno luogo a nessun equilibrio di protonazione. Globalmente **L1** è meno basico del suo precursore, il composto **L^I**, ciò è dovuto probabilmente a maggior basicità dell'ammina primaria presente in **L^I**. I valori ottenuti sono, però, comparabili con le costanti di protonazione esibite dai composti precedentemente riportati analoghi di **L1**, derivanti dello stesso frammento macrociclico ma con differenti sistemi legati al braccio laterale.^{81,82}

Reazioni ^[a]	L^I	L1
$\text{L1} + \text{H} \rightleftharpoons \text{HL1}$	10.20(6) ^[c]	9.84(1) ^[d]
$\text{HL1} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L1}$	9.18(3)	8.61(2)
$\text{H}_2\text{L1} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L1}$	7.84(4)	6.73(2)
$\log\beta$ ^[b]	27.32(8)	25.18(2)

^[a]Le cariche sono state omesse. ^[b]Calcolato come $\log \beta = \sum_j \log K_j$.

^[c]I valori tra parentesi sono le deviazioni standard riferite all'ultima cifra significativa. ^[d]Preso da ref. 9.

Tabella 1 logaritmi delle costanti d'equilibrio di protonazione e costante di protonazione totale per **L** e per il legante **L1**, determinate in una soluzione 0.15 M di NaClO_4 a 298.1 ± 0.1 K.

La distribuzione delle specie del legante **L1** in funzione del pH, è stata riportata nel diagramma in *Figura 38(b)*. Le tre specie determinate appaiono tutte nel range di pH da 5 a 10. A pH acidi è presente solo la forma $[\text{H}_3\text{L1}]^{3+}$, mentre a pH fortemente alcalini oltre 10 unità si trova solo il legante in forma deprotonata. Inoltre, analizzando attentamente il grafico, si può notare che a pH fisiologico la specie predominante è $[\text{H}_2\text{L1}]^{2+}$.

3.1.2.2 Assorbimento UV-Vis in funzione del pH

Al fine di ottenere informazioni relative agli effetti della protonazione sull'assorbimento e sull'emissione di fluorescenza del nuovo legante **L1** sono stati acquisiti Gli spettri UV-Vis e di fluorescenza in soluzione acquosa a pH variabile. Analizzando lo spettro d'assorbimento UV-Vis si può osservare che a pH=12, condizione in cui **L1** è presente solo in forma neutra, sono presenti due bande principali con $\lambda_{\text{max}}=264 \text{ nm}$ ($\epsilon = 12200 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$) $\lambda_{\text{max}}=290 \text{ nm}$ ($\epsilon = 16100 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$) entrambe attribuibili al cromoforo PyPD. Il legante, inoltre, mostra solo minimi cambiamenti per quanto riguarda l'assorbimento UV-Vis nel range di pH studiato (2-12), suggerendo che la piridina presente nel macrociclo così come quella del sistema PyPD non è coinvolta né direttamente nella protonazione né indirettamente partecipando alla stabilizzazione delle specie protonate attraverso la formazione di legami a idrogeno. Al contrario, le proprietà di emissione di fluorescenza del legante **L1** sono profondamente pH-dipendenti. Lo spettro di fluorescenza è stato determinato in soluzione acquosa eccitando alle lunghezze d'onda di 264 nm o a 290 nm in un range di pH da 2 a 12. L'eccitazione diverse lunghezze d'onda non ha portato cambiamenti rilevanti sull'emissione di fluorescenza, confermando che entrambe le bande osservate nello spettro UV-Vis sono ascrivibili al sistema PyPD. Lo spettro riportato in *Figura 38* è stato acquisito eccitando a $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$. Mentre in *Figura 38(a)* è stato riportato l'andamento dell'intensità di emissione di fluorescenza in funzione del pH a $\lambda_{\text{em}} = 364 \text{ nm}$ insieme al diagramma della distribuzione delle specie nel range di pH studiato.

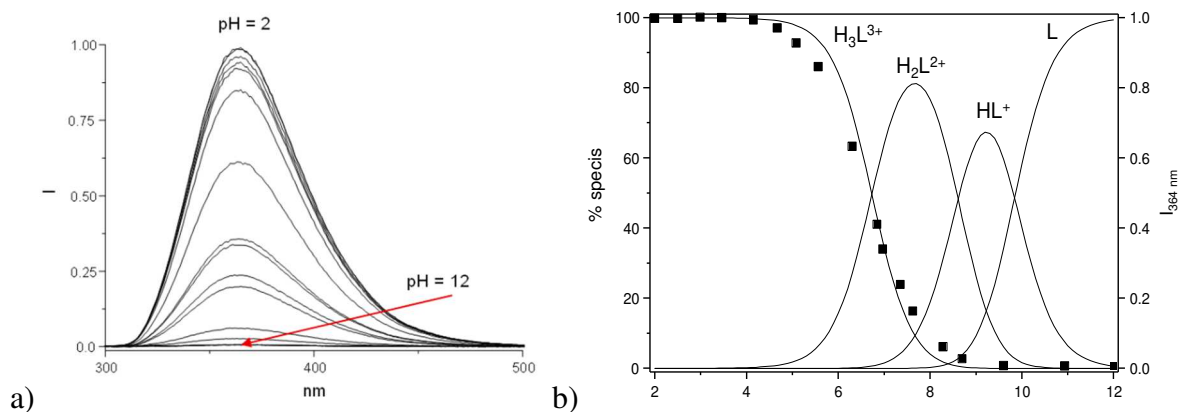


Figura 38 a) Emissione di fluorescenza in funzione del pH in un range da 2 a 12; b) distribuzione delle specie (-) in funzione del pH nel range da 2 a 12 e curva dell'emissione di fluorescenza (■) a $\lambda_{em}=364$ nm, soluzione 0.15 M di $NaClO_4$ a $T=298$ K.

Analizzando l'andamento dell'intensità di emissione in funzione del pH emerge che in presenza della specie non protonata in soluzione a pH = 12, **L1** non emette fluorescenza mentre passando da pH alcalini verso pH acidi il cromoforo si accende. In particolare, l'intensità di emissione inizia ad aumentare da pH = 8 ($\lambda_{em} = 364$ nm) conseguentemente alla formazione della specie protonata **H₃L³⁺**, raggiungendo il massimo d'intensità a pH = 4 dove l'unica specie presente in soluzione è il composto **H₃L³⁺**. Lo spettro UV-Vis non ha dato informazioni sul coinvolgimento del gruppo PyPD nella protonazione, questo comportamento può essere invece interpretato attraverso lo spettro di fluorescenza. Il quenching dello stato eccitato è dovuto all'effetto di trasferimento elettronico intramolecolare fotoindotto (PET) dall'orbitale HOMO dell'atomo di azoto benzilico non macrociclico allo stato eccitato del fluoroforo, che avviene quando l'ammina in posizione benzilica rispetto al PyPD presenta un doppietto di non legame.⁸³ Come mostrato nello spettro, a valori di pH acidi, inferiori a 4, l'ammina alifatica secondaria legata al cromoforo è protonata, di conseguenza il doppietto di non legame non è disponibile e l'effetto PET non è permesso, perciò il sistema PyPD emette il suo massimo di fluorescenza. Al contrario, a pH superiori di 4 la deprotonazione di questa funzione amminica determina l'effetto PET, portando ad una diminuzione dell'intensità di emissione fino ad un completo spegnimento a pH = 8, che corrisponde alla formazione della specie **H₂L²⁺**.

Questo ci suggerisce che la densità elettronica dell'ammina in posizione benzilica al PyPD aumenta durante la formazione di H_2L^{2+} rendendo l'effetto PET sempre più evidente, e che in questa specie la piridina del cromoforo non è protonata.

3.1.3 STUDIO DELLE PROPRIETÀ COORDINATIVE DI L1

3.1.3.1 Studio delle strutture cristalline dei complessi mononucleari $[ZnL1]^{2+}$ e $[CuL1]^{2+}$

Sono stati ottenuti cristalli adatti all'analisi diffrattometrica a raggi X su cristallo singolo dei complessi metallici di zinco $[ZnL1](ClO_4)_2$ e di rame $[CuL1](ClO_4)_2$. Questi sono stati ottenuti da soluzione acquosa a pH 7,4 utilizzando $Zn(ClO_4)_2$ $Cu(ClO_4)_2$. Le strutture cristalline dei complessi sono state riportate in [Figura 39](#) per il complesso con Zn(II) e in [Figura 40](#) con Cu(II).

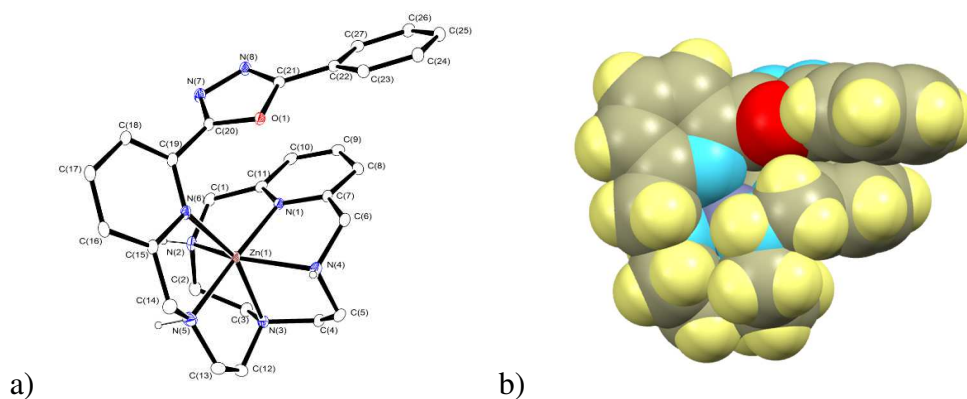


Figura 39 a) Rappresentazione della struttura solida cristallina del complesso $[L1Zn](ClO_4)_2$. Gli ellissoidi sono disegnati con il 15% di probabilità. Gli atomi di idrogeno sono stati emessi per rendere il disegno più chiaro. b) Rappresentazione space-filling del complesso cationico $[L1Zn]^{2+}$.

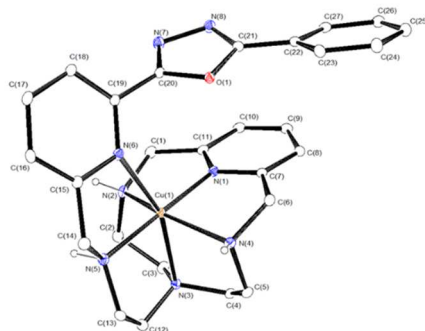


Figura 40 Rappresentazione della struttura cristallina del complesso [L1Cu](ClO₄)₂. Gli ellissoidi sono disegnati con il 15% di probabilità.

I due complessi metallici sono isoformi e isostrutturali. In entrambi i casi il sistema è asimmetrico ed è formato dal catione [ML1]²⁺ (M= Zn²⁺ o Cu²⁺), con stechiometria metallo/legante 1:1 e da due ioni perclorato. La geometria dei due complessi metallici è sostanzialmente identica. I cationi metallici risultano esa-coordinati dai sei atomi d'azoto donatori delle funzioni amminiche presenti: quattro alifatiche e due aromatiche. Quattro atomi di azoto appartengono al macrociclo e i restanti due al braccio laterale e al sistema **PyPD**. La geometria di coordinazione intorno al metallo è un ottaedro distorto, come indicato dal valore degli angoli di legame tra atomi donatori adiacenti, N-M-N, compresi tra 77.7 (1) e 106.4 (1) ° per la specie [ZnL1]²⁺ e tra 77.65 (8) e 104.38 (8) ° per [CuL1]²⁺. Come mostrato in Figura 39 e 40, il gruppo fluoroforo è coinvolto nella coordinazione del metallo mediante l'atomo di azoto della piridina, secondo il modello scorpionand-like.⁸⁴ Tra le distanze di legame Zn(II)-N, quelle tra lo Zn(II) e gli atomi d'azoto della piridina del macrociclo e dell'ammina secondaria dello spaziatore risultano di lunghezza inferiore, 2.068 (3) e 2.113 (3) Å rispettivamente, rispetto alle altre. Analoga situazione si presenta per le lunghezze coordinative nella struttura di Cu(II), dove anche qui le distanze Cu-N che coinvolgono i due atomi donatori assiali, N(1) della piridina del macrociclo e N(5) gruppo amminico secondario della catena spaziatrice, sono significativamente più corti delle altre quattro. Interessante notare come il legame tra l'atomo di azoto della piridina del PyPD con il metallo sia più lungo di quello con l'azoto piridinico appartenente al

macrociclo; questo può essere attribuito all'impedimento sterico derivante dall'ingombro del sistema aromatico del **PyPD**. La maggior distanza di legame porta a supporre che questo sia il legame più labile e quindi il primo a rompersi o ad essere sostituito in presenza di un legante secondario.

In letteratura sono riportati due complessi di Cu(II) e di Mn(II) ottenuti dal precursore **L^I** (Figura 34) aventi come “side-arm” un anello piridinico (i codici di riferimento sono FUTPIV e ZUCHPAV rispettivamente).⁸⁵ Gli studi di comparazione tra le varie strutture cristalline evidenziano che le geometrie risultano analoghe ai complessi $[\text{ML1}]^{2+}$ e che le distanze di legame M-N che coinvolgono la piridina dell'anello macrociclico sono in ogni caso, quelle inferiori nella sfera di coordinazione.⁸⁶ Gli anelli benzenico e ossadiazolico nei complessi qui riportati $[\text{ML1}]^{2+}$ risultano pressoché coplanari, in accordo con quanto riscontrato in strutture simili depositate nel CSD, mentre l'anello piridinico si trova in posizione perpendicolare. Tale arrangiamento è attribuito all'ingombro sterico tra gli anelli del **PyPD** e la struttura macrociclica nel complesso ed in particolare all'anello piridinico. Inoltre, la sovrapposizione spaziale dell'ossadiazolo con la piridina del macrociclo, che si trovano disposti parallelamente l'uno sull'altro (il centro dei due anelli è in entrambi i casi a 3,5 Å), determina una interazione di π - π stacking che stabilizza la conformazione. Dall'analisi della struttura si nota che lo Zn(II) si trova al centro della cavità formata dal macrociclo e dal pendaglio e difficilmente può essere raggiunto dall'ambiente circostante, se non per rimozione di uno dei legami di coordinazione metallo-legante, lo stesso vale per il complesso di Cu(II). Nella struttura cristallina, ogni anione perclorato è coinvolto in legami a idrogeno con le ammine secondarie del macrociclo, come evidenziato dall'analisi delle distanze tra gli atomi (N(2)-H(2N)···O(12), 2.21(4) Å, 155(4)°; N(4)-H(4N)···O(22), 2.15(4) Å, 171(4)° in $[\text{ZnL1}]^{2+}$ e N(2)-H(2N)···O(12), 2.17(3) Å, 158(3)°, N(4)-H(4N)···O(22), 2.12(2) 174(2)° in $[\text{CuL1}]^{2+}$).

3.1.3.2 Coordinazione del catione Zn^{2+}

L1 è un legante politopico, formato da un'unità recettrice poliamminica macrociclica, in grado di coordinare ioni metallici. La presenza di più atomi donatori permette al legante di formare complessi in rapporti stechiometrici metallo/legante maggiori di 1:1. Infatti, in letteratura sono presenti studi su composti formati dal frammento piridil-ossadiazolo in grado di formare complessi mono e dinucleari stabili con lo ione Zn(II). Abbiamo deciso di focalizzare l'attenzione sullo Zn(II) per due fattori principali, innanzitutto per la complementarità geometrica con la cavità macrociclica, come precedentemente osservato nella struttura cristallina, perché lo zinco, come il Cu(II), presenta le giuste dimensioni per essere accolto nella tasca recettoriale e venir incapsulato dal braccio laterale in modo tale che anche il fluoroforo partecipi alla coordinazione. In secondo luogo, per le sue proprietà da CHEF, è noto infatti che il Cu(II), per la sua natura paramagnetica, induce un *quenching* di fluorescenza, abbassando la fluorescenza del legante. Lo studio delle proprietà coordinative del legante **L1** è stato per tanto approfondito utilizzando come catione metallico lo Zn(II).

Le capacità coordinative del legante sono state studiate mediante titolazioni potenziometriche, con aggiunte di Zn(II) in differenti concentrazioni, al fine di comprenderne il comportamento in soluzione acquosa. I risultati, riportati in *Tabella 2*, dimostrano che in soluzione coesistono due complessi in cui il rapporto di metallo:legante, è rispettivamente 1:1 e 3:2. In rapporto stechiometrico 1:1 è presente solo il complesso $[ZnL1]^{2+}$, mentre in rapporto 3:2 sono stati riscontrati il complesso $[Zn_3L1_2]^{6+}$ e le due forme idrossilate dello stesso. Il legante **L1**, quindi, è in grado di formare sia un complesso mononucleare con $\log K=16,50$, che complessi in cui il rapporto metallo:legante è 3:2 con $\log K$ di formazione piuttosto elevate. La stabilità di tali complessi è dovuta probabilmente al coinvolgimento di tutti gli atomi donatori nella coordinazione dello ione metallico, come avviene nella struttura cristallina riportata in *Figura 39*.

Reazioni ^[a]

Log K **L1**

$L1 + Zn \rightleftharpoons ZnL1$	16.50(5) ^[b]
$2L1 + 3Zn \rightleftharpoons Zn_3L1_2$	40.98(4)
$2L1 + 3Zn + 2H_2O \rightleftharpoons Zn_3L1_2(OH)_2 + 2H$	24.59(5)
$2L1 + 3Zn + 3H_2O \rightleftharpoons Zn_3L1_2(OH)_3 + 3H$	14.5(1)

^[a] Le cariche sono state omesse. ^[b] I valori tra parentesi sono le deviazioni standard dell'ultima cifra significativa.

Tabella 2 Logaritmi delle costanti di equilibrio per i complessi di Zn(II) con L1, le misure sono state determinate in H₂O a concentrazione 0,15 M di NaClO₄ a 298.1 ± 0.1 K.

In Figura 41, quindi, è in grado di formare sia un complesso mononucleare con log K=16,50, che complessi in cui il rapporto metallo:legante è 3:2 con log K di formazione piuttosto elevate. La stabilità di tali complessi è dovuta probabilmente al coinvolgimento di tutti gli atomi donatori nella coordinazione dello ione metallico, come avviene nella struttura cristallina riportata in Figura 39.

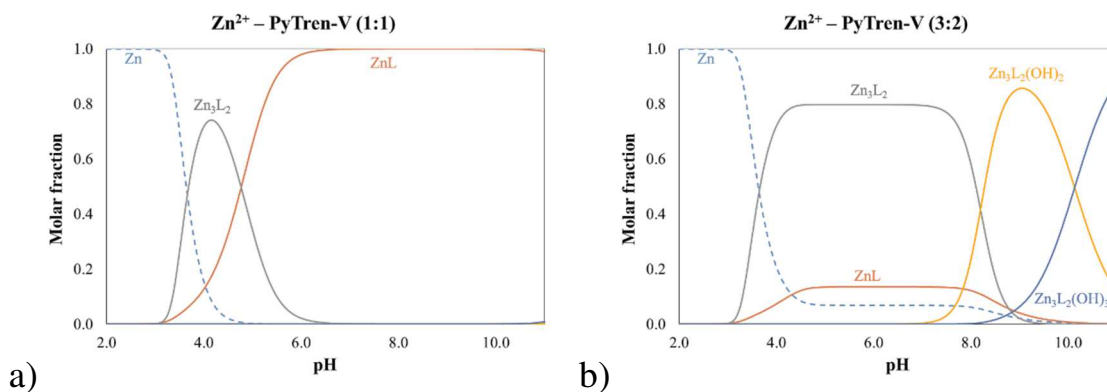


Figura 41 Diagrammi della distribuzione delle specie per il complesso Zn²⁺- L1 a differenti rapporti di concentrazione: a) metallo:legante 1:1, b) metallo:legante 3:2. Le cariche delle specie sono state omesse.

La stechiometria dei complessi è stata analizzata anche attraverso il metodo delle variazioni continue, o Job-plot,⁸⁷ per il quale sono state misurate le curve dell'emissione di fluorescenza per il legante

libero e per il legante in presenza di Zn(II) a differenti rapporto molari, mantenendo però costante la concentrazione totale.⁸⁸ Gli esperimenti sono stati condotti in soluzione acquosa di HEPES a pH=7,4 alla concentrazione totale di $1 \cdot 10^{-4}$ M. Come mostrato in Figura 42, il massimo della curva si ottiene quando la frazione molare dello ione metallico è pari a 0,5, questo suggerisce la formazione del complesso in rapporto stechiometrico 1:1 ossia della specie $[\text{ZnL1}]^{2+}$. La disposizione lineare dei punti e la conformazione a cuspide del punto di massimo sono indice di stabilità del complesso.

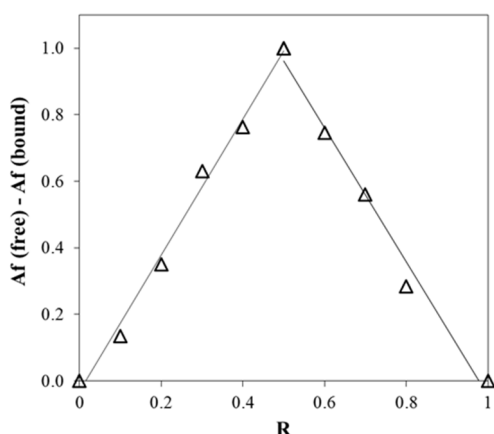


Figura 42 Job-plot per la formazione del complesso tra L1 e Zn^{2+} . Lo spettro di emissione di fluorescenza è stato analizzato a 297 nm in una soluzione a pH 7,4 (0,05 M di HEPES) ad una concentrazione totale di $[\text{L1}] + [\text{Zn}^{2+}] = 1 \cdot 10^{-4}$ M. $R = [\text{Zn}^{2+}] / ([\text{L1}] + [\text{Zn}^{2+}])$.

3.1.3.3 Studio spettrofotometrico di L1 in presenza del catione Zn^{2+}

In primo luogo, la selettività del legante è stata indagata mediante uno screening con diversi cationi metallici al fine di individuare una selettività di coordinazione per uno di essi (Figura 43). Le analisi sono state condotte per via spettrofotometrica in soluzione di HEPES a pH fisiologico di 7,4 a 298 K. Come mostrato in figura, l'emissione di fluorescenza a 370 nm è fortemente incrementata all'aggiunta di 1 equivalente di Zn(II).

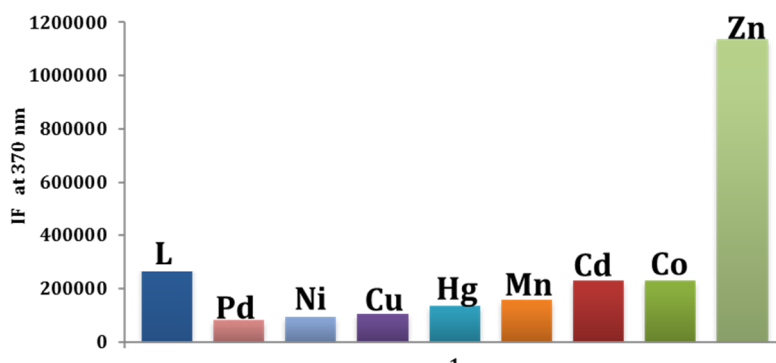


Figura 43 Screening dei metalli Cd(II), Co(II), Cu(II), Hg(II), Mn(II), Ni(II) e Pb(II) in emissione di fluorescenza, analisi condotta in una soluzione di HEPES a pH 7.4, per ogni metalli è stato aggiunto un equivalente rispetto alla concentrazione di L1 (1×10^{-5} M) $\lambda_{ex} = 370$ nm

Le proprietà spettrofotometriche del complesso sono state approfondite attraverso titolazioni di assorbimento e di fluorescenza del legante con aggiunte di Zn(II) in soluzione acquosa e in acetonitrile, al fine di comprendere il ruolo del motivo PyPD nella coordinazione del catione e di valutarne una risposta spettrofotometrica in soluzione.

Le titolazioni sono state condotte con concentrazioni molari 1:1 e 3:2 di Zn(II) e L1, gli spettri ottenuti mostrano una risposta fotochimica molto simile, a conferma del fatto che in soluzioni diluite ($L1 = 5,0 \cdot 10^{-6}$ M) la specie prevalente è quella mononucleare (1:1), come mostrato in Figura 44.

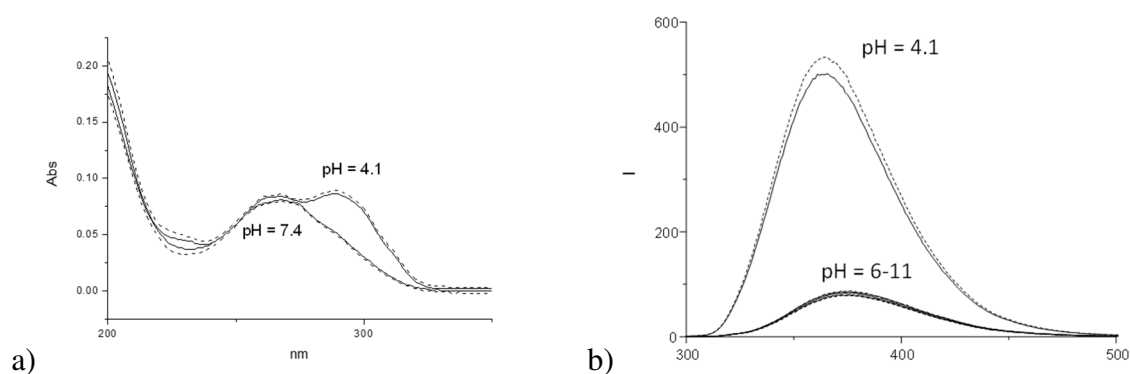
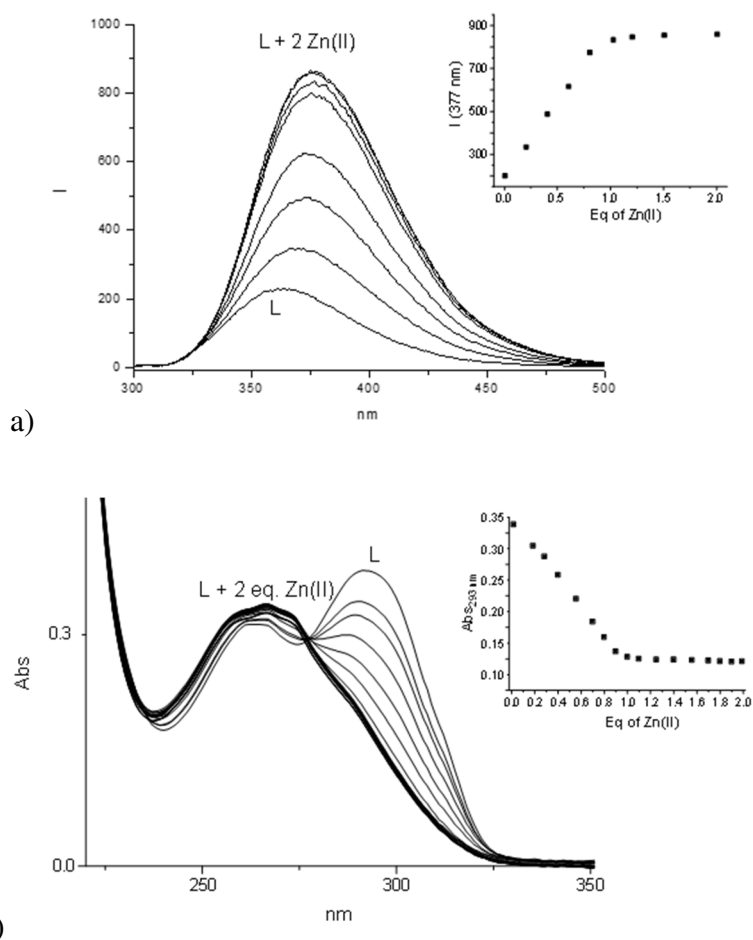


Figura 44 Spettri di assorbimento (a) ed emissione (b) della specie $[ZnL1]^{2+}$ in funzione del pH in soluzione acquosa; le analisi sono state condotte a due differenti rapporti molar di legante-metallo: L : Zn(II) 1:1 (linea -), L : Zn(II) 2:3 (linea - - -). La concentrazione di $[L1] = 4,8 \cdot 10^{-6}$ M, $\lambda_{ex} = 275$ nm.

Per comprendere il comportamento nei sistemi biologici, le titolazioni spettrofotometriche sono state condotte in soluzioni acquose a pH fisiologico 7,4, nel quale la specie Zn^{2+} -**L1** 1:1 è completamente formata e sono state riportate in [Figura 45](#). Tutti gli spettri sono stati valutati dopo un tempo di attesa di 2 ore, per permettere la formazione e la stabilizzazione dei complessi. Dallo spettro di assorbimento UV-Vis ottenuto per la titolazione con Zn(II), si può notare che la banda a energia inferiore ($\lambda_{max} = 290$ nm) scompare con la formazione del complesso Zn(II)-**L1**, questo comportamento suggerisce che la piridina del fluoroforo PyPD è coinvolto nella coordinazione del metallo. Il profilo mostra il raggiungimento di un plateau dopo l'aggiunta di un equivalente di Zn(II) e non subisce ulteriori cambiamenti dopo l'aggiunta di altri equivalenti di zinco. Analizzando lo spettro di emissione di fluorescenza ottenuto per eccitazione alla λ del punto isosbastico ($\lambda_{ex} = 275$ nm), lo ione zinco genera un apprezzabile aumento dell'intensità della banda di emissione a λ 363 nm e un suo spostamento verso campi maggiori, da 364 nm a 377 nm, in soluzione acquosa tamponata a pH 7.4. Ulteriore conferma si osserva lo spettro di emissione di fluorescenza ottenuto per il legante libero a pH variabile e comparato con quello del legante in presenza di Zn(II), si può osservare che il quenching della fluorescenza mostrato nello spettro del legante non complessato all'aumentare del pH è molto meno evidente nello spettro in presenza del metallo. L'effetto dello zinco sull'emissione di fluorescenza è attribuibile all'effetto PET, dovuto al coinvolgimento nella coordinazione della coppia di elettroni di non legame dell'ammina alifatica della catena spaziatrice, così come l'azoto della piridina del PyPD. I risultati sono dunque in accordo con ciò che era emerso nello studio della struttura cristallina. La complessazione dello Zn(II) da parte della piridina del fluoroforo potrebbe anche spezzare la coniugazione con gli altri anelli aromatici del sistema, come mostrato nello stato solido, portando alla scomparsa della banda nello spettro di assorbimento e nello spostamento della λ_{em} nello spettro della fluorescenza.



*Figura 45 Spettri delle titolazioni di (a) assorbimento UV-Vis e di (b) emissione di fluorescenza del sistema Zn^{2+}/LI , le analisi sono state condotte in soluzione acquosa (HEPES, 0,5 M) a $pH = 7.4$ a 298 K; ottenute aggiungendo aliquote di Zn^{2+} fino a 2 equivalenti rispetto alla concentrazione del legante **L1**; $[L1] = 3 \times 10^{-5}$ M. Si osserva una variazione dell'assorbanza a $\lambda = 293$ nm e dell'emissione a $\lambda = 377$ nm in funzione delle aggiunte di Zn^{2+} .*

Le analisi sono state ripetute in acetonitrile, perché è noto che la costante dielettrica del solvente gioca un ruolo cruciale per i chemosensori di fluorescenza che sono attivati/disattivati per effetto PET, incrementando l'emissione per la bassa polarità del solvente.⁸⁹ I risultati ottenuti, riportati in [Figura 46](#), sono molto simili agli spettri determinati in soluzione acquosa, mantenendo le stesse bande di assorbimento e di fluorescenza. Tuttavia, l'aggiunta di $Zn(II)$ comporta ad un significativo aumento dell'intensità di emissione, maggiore sia a quella ottenuta in soluzione acquosa che a quella del legante libero. Questo comportamento è dovuto all'effetto CHEF (chelating enhancement of fluorescent), per il quale l'emissione aumenta più di 80 volte rispetto a quella riscontrata dal **L1**

libero e rende il complesso un vero e proprio sensore per il catione metallico in soluzione. Anche in questo solvente il massimo di emissione è stato raggiunto con l'aggiunta di un equivalente di metallo con formazione della specie mononucleare; per il complesso $[\text{ZnL1}]^{2+}$ è stata quindi calcolata la resa quantica pari a $\Phi_f = 0,24$ a 374 nm. I dati raccolti evidenziano la capacità del legante come chelante per lo ione Zn(II) e che il nuovo fluoroforo sviluppato PyPD ha sia proprietà di fluorescenza e sia di coordinazione dei metalli, dando origine ad una risposta spettrofotometrica.

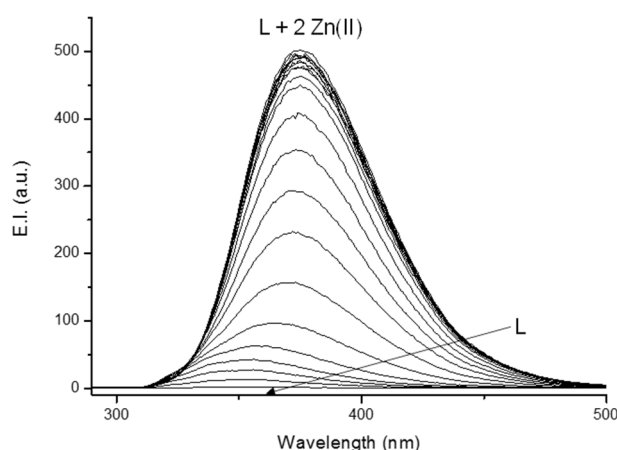
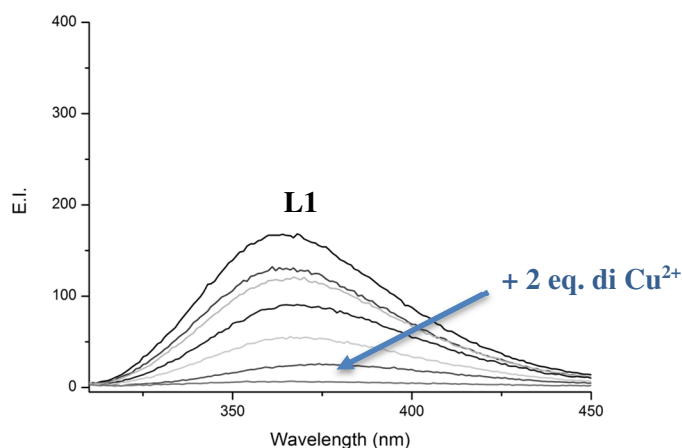


Figura 46 Spettro di emissione per il sistema Zn^{2+}/L in acetonitrile, la soluzione è stata ottenuta per aggiunte di Zn^{2+} fino a 2 equivalenti rispetto alla concentrazione del legante; $[\text{L1}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Il legante è stato anche titolato per via spettrofotometrica con il metallo Cu(II), in soluzione acquosa a pH 7,4. A conferma di ciò che era stato precedentemente testato, le aggiunte di catione inducono uno “spegnimento” del fluoroforo provocando una diminuzione dell'intensità di emissione per effetto paramagnetico.



*Figura 47 Spettro della titolazione di emissione di fluorescenza del sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{L1}$, le analisi sono state condotte in soluzione acquosa (HEPES, 0.5 M) a $\text{pH} = 7.4$ a 298 K; ottenute aggiungendo aliquote di Cu^{2+} fino a 2 equivalenti rispetto alla concentrazione del legante **L1**; $[\text{L1}] = 3 \times 10^{-5} \text{ M}$.*

3.1.3.4 Studio del complesso $[\text{ZnL1}]^{2+}$ come metallo-recettore per anioni

Data la forte emissione di fluorescenza del complesso mononucleare $[\text{ZnL1}]^{2+}$ in acetonitrile, è stato studiato il comportamento del complesso in presenza di specie anioniche in soluzione. È stato effettuato uno screening di una serie di anioni per indagare possibili interazioni da parte del complesso e una risposta spettrofotometrica alla loro presenza. Gli anioni testati sono stati F^- , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , HSO_4^- , H_2PO_4^- e CH_3COO^- , tutti utilizzati come sale di tetrabutylammonio, lo screening è stato condotto aggiungendo gli anioni a una soluzione di $[\text{ZnL1}](\text{ClO}_4)_2$ in acetonitrile. Solamente con lo ione cloruro è stata riscontrata una significativa variazione della fluorescenza, l'anione è in grado di diminuire l'emissione del complesso di un quinto rispetto a quella di partenza. La risposta fotometrica del complesso allo ione cloruro è stata confermata aggiungendo un equivalente di Cl^- in co-presenza con un equivalente degli altri anioni in soluzione, l'emissione di fluorescenza generata è comparabile con quella ottenuta per il cloruro. Ciò sta ad indicare che solamente il cloruro è in grado di perturbare il complesso Zn(II)-**L1** senza coinvolgere altre specie anioniche presenti, come mostrato nel grafico in Figura 48.

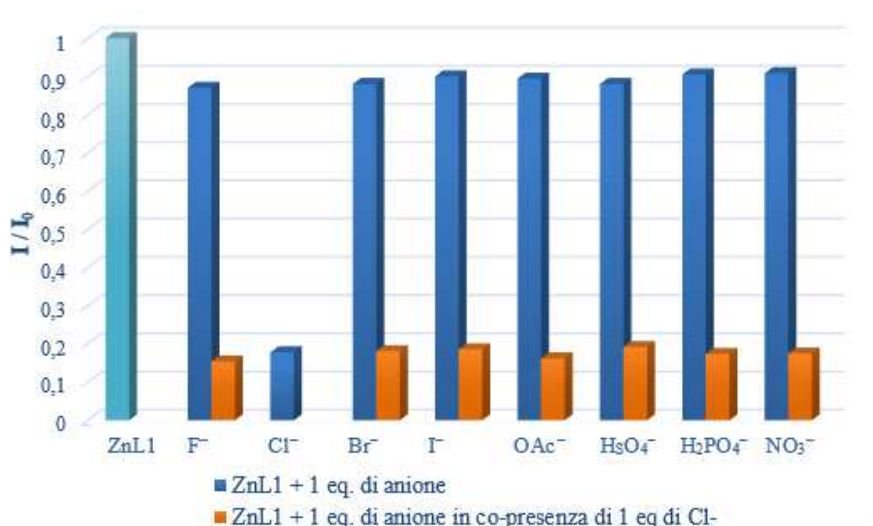


Figura 48 Confronto tra l'emissione di fluorescenza del complesso $[ZnL1]^{2+}$ a 374 nm ($\lambda_{ex} = 277$ nm) (I) e l'emissione in presenza di 1 equivalente degli anioni F^- , Cl^- , Br^- , I^- , OAc^- , $H_3O_4^-$, $H_2PO_4^-$ and NO_3^- (barre blu), o in co-presenza di 1 equivalente di Cl^- e 1 equivalente di F^- , Cl^- , Br^- , I^- , OAc^- , $H_3O_4^-$, $H_2PO_4^-$ and NO_3^- (barre arancioni).

Le analisi sono ripetute in soluzione acquosa a pH 7,4, ma non è stato ottenuto lo stesso riscontro da parte del complesso nei confronti dell'anione, solamente un debole decremento della fluorescenza. Per comprendere a fondo il comportamento del complesso, è stata effettuata una titolazione per via spettrofotometrica del complesso $[ZnL1]^{2+}$ con aggiunte di Cl^- , dal profilo degli spettri ottenuti è stato dimostrato che l'anione è in grado di interagire con il complesso sia per quanto riguarda l'assorbimento UV-Vis che nell'emissione di fluorescenza. Il cloruro perturba la coordinazione del complesso metallico provocando un distacco del fluoroforo dalla coordinazione, ciò emerge dall'analisi dello spettro di assorbimento nel quale si nota un ripristino della banda di assorbimento a 292 nm per aggiunte crescenti di Cl^- alla soluzione, ma la banda presenta un massimo di intensità inferiore a quella del legante non complessato, indice del fatto che il cloruro provoca il distacco della piridina del fluoroforo dalla complessazione ma della rottura del complesso (Figura 50). Per quanto riguarda lo spettro di fluorescenza, il complesso $[ZnL1]^{2+}$, eccitato a $\lambda_{ex} = 298$ nm), mostra una significativa diminuzione dell'intensità di emissione della banda a 374 nm pari al 20% rispetto al complesso di partenza e, contemporaneamente, uno spostamento della banda verso campi a maggior energia, per aggiunte di Cl^- (Figura 52). In entrambi i profili, la risposta massima è stata ottenuta con

l'aggiunta di 1 equivalente di anione, ulteriori aggiunte non hanno portato ad alcuna variazione negli spettri, evidenziando che solo uno ione cloruro si interagisce con il complesso.

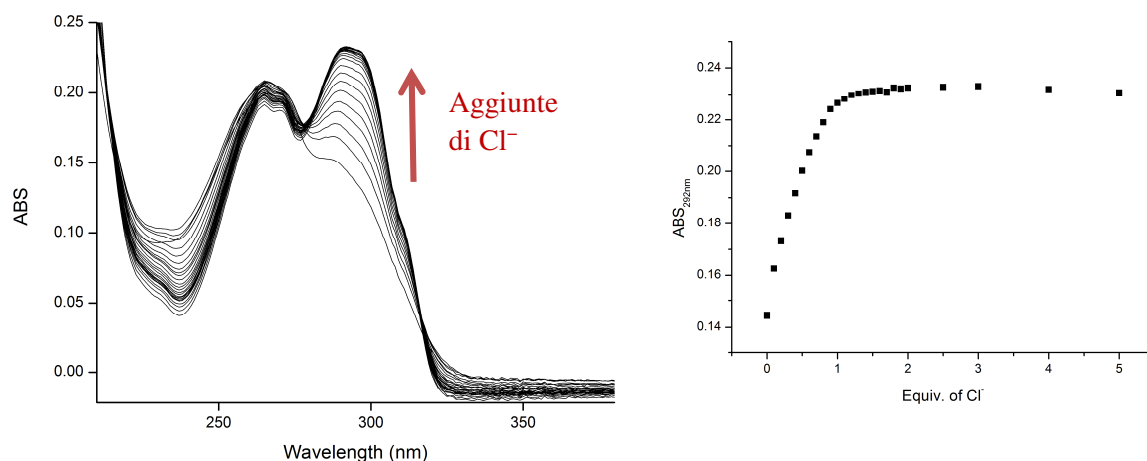


Figura 49 Titolazione di assorbimento UV-vis del complesso $[ZnLI]^{2+}$ ($1.35 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) con una soluzione di Bu_4NCl in CH_3CN a 298 K. La banda di assorbimento a λ_{max} 292 nm incrementa per aggiunte di Cl^- .

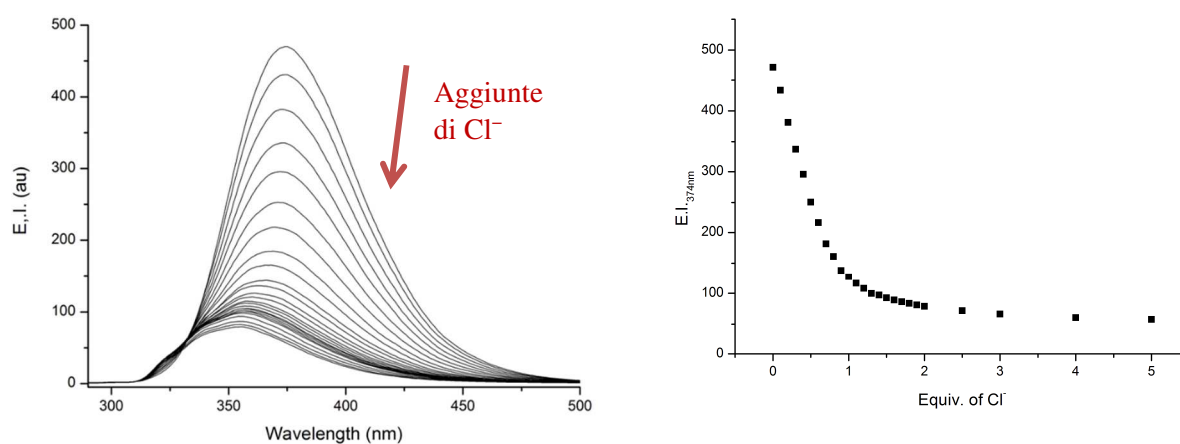


Figura 50 Titolazione della fluorescenza del complesso $[ZnLI]^{2+}$ ($1.35 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{ex} = 278 \text{ nm}$) con una soluzione di Bu_4NCl in CH_3CN a 298 K. La banda di emissione a 374 nm subisce una variazione in funzione dell'aggiunta di Cl^- .

I risultati ottenuti dai profili dagli spettri delle titolazioni spettrofotometriche di assorbimento e fluorescenza sono in accordo tra loro; il primo evidenzia il ripristino della banda di assorbimento

relativa alla piridina del fluoroforo dopo l'aggiunta di Cl^- , il secondo un "quenching" dell'emissione di fluorescenza. Entrambi i comportamenti sono attribuiti al distacco del fluoroforo dalla coordinazione dello ione Zn(II) per opera del cloruro, questo fenomeno è detto saggio di spiazzamento intramolecolare indicatore metallo-assistito (MIIDA).

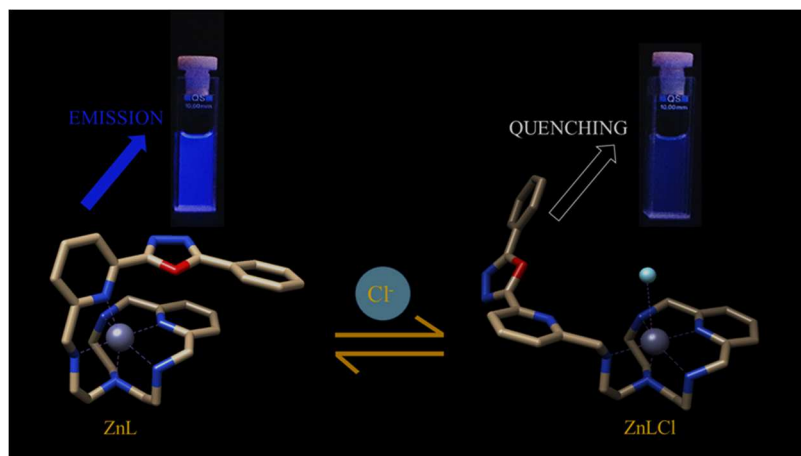


Figura 51 Rappresentazione della struttura dei complessi $[\text{ZnL}]^{2+}$ e $[\text{ZnLCl}]^+$ e la relativa emissione di fluorescenza.

È interessante notare che la fluorescenza viene incrementata di nuovo quando viene aggiunto un equivalente di AgNO_3 , come si può osservare nella immagine delle cuvette in [Figura 52](#), per rimuovere il cloruro del complesso suggerendo un dispositivo di "sensing" del cloruro, basato su un sistema ON - OFF.

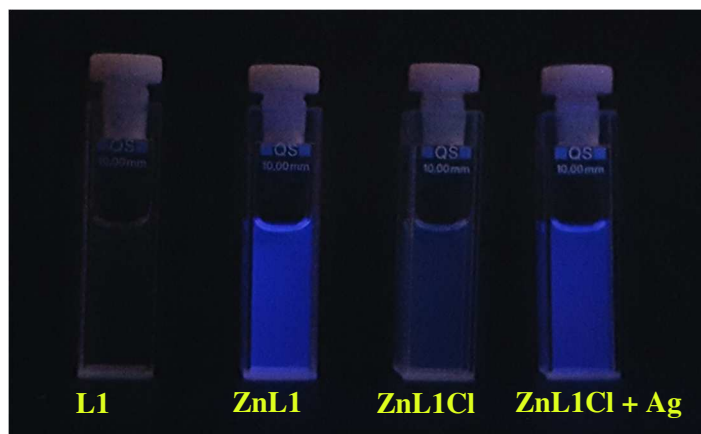


Figura 52 Emissione di fluorescenza in funzione delle specie formate in soluzione.

3.1.3.5 Analisi NMR del complesso $[ZnL1]^{2+}$ e del complesso in presenza di Cl^-

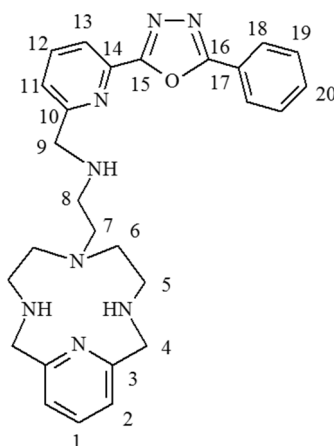


Figura 53 Struttura schematica del legante **L1**. I numeri si riferiscono agli atomi di C e H per l'interpretazione degli spettri NMR.

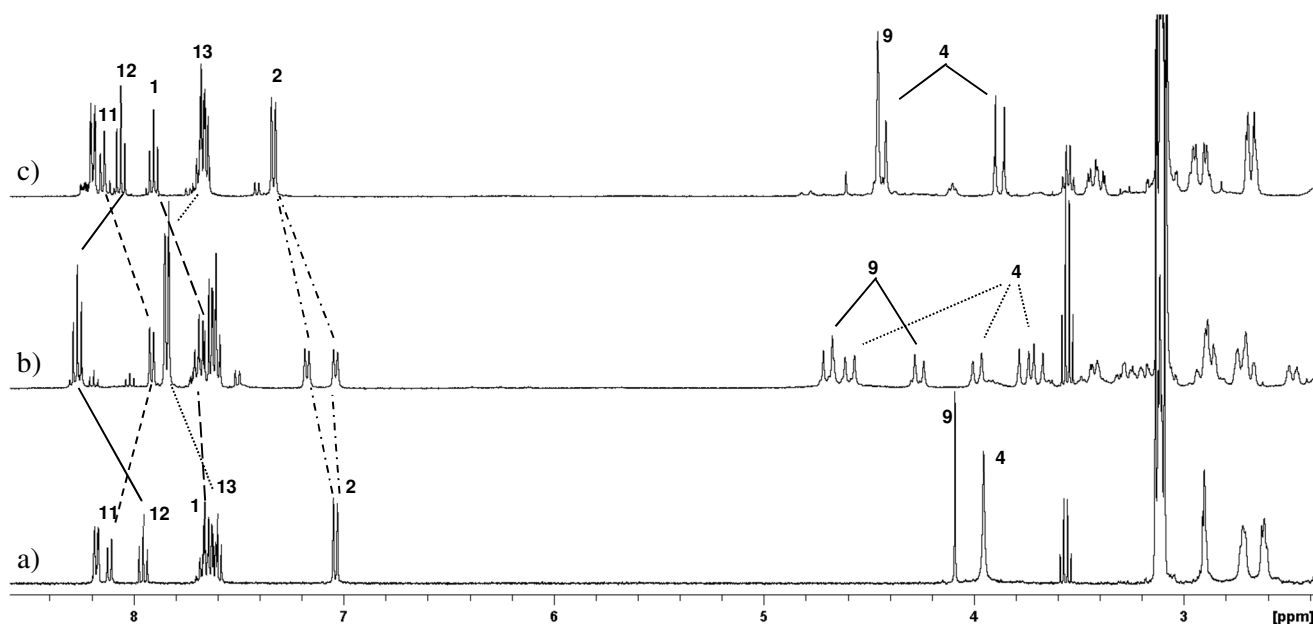
Lo studio è stato ulteriormente approfondito attraverso uno studio 1H -NMR del complesso $[ZnL1]^{2+}$. Le analisi sono state condotte in una soluzione di CD_3CN , ottenuta sciogliendo il legante libero in fase solida nel solvente deuterato e aggiungendo un equivalente di $Zn(II)$ per lo studio del complesso $[ZnL1](ClO_4)_2$. Lo spettro della specie complessata non mostra ulteriori modifiche per successive aggiunte di metallo, suggerendo che l'unica specie formata in tali condizioni sperimentali è $[ZnL1]^{2+}$.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ per il legante **L1** libero, per il complesso $[\text{ZnL1}]^{2+}$ e per la specie $[\text{ZnL1Cl}]$ sono mostrati in [Figura 54](#). Dal confronto degli spettri della specie $[\text{ZnL1}]^{2+}$ e di **L1** libero emergono numerose variazioni nella regione alifatica, lo spettro relativo al complesso Zn(II)-L1 , presenta un numero molto maggiore di segnali rispetto a **L1** libero in questa regione, dovuto alla perdita di equivalenza dei protoni alifatici in seguito all'irrigidimento del legante dopo la chelazione dello zinco. I segnali H4 e H9, appartenenti agli idrogeni piridinici del macrociclo e del fluoroforo PyPD rispettivamente, appaiono spostati verso campi più bassi a conferma del coinvolgimento dei due atomi di azoto nella coordinazione del metallo. In particolare, dopo la formazione del complesso, H4 presenta due gruppi di segnali ben distinti dovuti al sistema AB ($J_{\text{AB}} = 16,6 \text{ Hz}$), ciò significa che i due gruppi metilenici non sono equivalenti tra loro così come gli atomi di idrogeno appartenenti ai due gruppi. I segnali infatti si spostano in modo diverso verso campi maggiori e campi minori, probabilmente perché uno di essi si trova nelle vicinanze del cono di descheratura esercitato dall'anello aromatico. D'altra parte, anche gli idrogeni H9 presentano un sistema AB ($J_{\text{AB}} = 16,8 \text{ Hz}$), ma dopo la coordinazione con il metallo lo spostamento di entrambi i segnali è verso campi minori. Tutti questi spostamenti sono attribuibili al coinvolgimento delle funzioni amminiche in posizione benzilica alle piridine del macrociclo e di PyPD nella coordinazione di Zn(II) , come era stato sostenuto dallo studio della struttura cristallina del complesso. Dall'osservazione della regione aromatica, possiamo notare ugualmente uno spostamento dei segnali tra la specie complessata rispetto a quelle di libera **L1**. In particolare, H1 e H2 appartenenti alla parte piridinica del macrociclo si spostano verso campi minori e i segnali appartenenti ai due protoni H2 mancano di equivalenza, infatti i segnali passano da un doppietto nello spettro di **L1** libero a due doppietti in quello del complesso di Zn(II) . Ciò potrebbe essere attribuibile al coinvolgimento della piridina del macrociclo nella coordinazione del metallo. Anche i protoni H12 e H13 della piridina del PyPD mostrano uno spostamento verso campi minori, al contrario il protone H11 si muove verso campi maggiori. Dall'analisi completa dello spettro, possiamo confermare il coinvolgimento della piridina del PyPD nella coordinazione, suggerendo un'organizzazione nella struttura di coordinazione per lo zinco in

soluzione simile a quella osservata nella struttura solida cristallina. In altre parole, è stato confermato il coinvolgimento di tutte le funzioni amminiche del macrociclo e del braccio laterale contenente il fluoroforo PyPD nella chelazione di Zn(II), incluso l'azoto piridinico.

Le proprietà del complesso $[\text{ZnL1}]^{2+}$ 1:1 come sensore di Cl^- sono state valutate anche mediante titolazione $^1\text{H-NMR}$ e comparate con gli studi spettrofotometrici e fluorimetrici precedentemente analizzati. L'aggiunta di un equivalente di cloruro ha portato a notevoli cambiamenti nel profilo dello spettro NMR rapportato a quello del complesso $[\text{ZnL1}]^{2+}$, inoltre ulteriori aggiunte di anione non hanno generato altre variazioni nello spettro, indice del fatto che solamente uno ione cloruro è in grado di legarsi al complesso. Confrontando i due spettri, i principali cambiamenti si osservano per i segnali relativi alla catena laterale e agli protoni piridinici H4 e H9. I segnali di risonanza del frammento PyPD ritornano simili ai chemical shift mostrati nello spettro di **L1** libero, soprattutto per quanto riguarda gli idrogeni H11, H12 e H13; suggerendo il distacco della piridina del fluoroforo dalla coordinazione del metallo e probabilmente la sua sostituzione con l'atomo di cloro. Contrariamente, i segnali della piridina appartenente al macrociclo non corrispondono a quelli dello spettro del legante libero, la stessa situazione si osserva nella zona alifatica. In particolare, i protoni H1 e H2, appartenenti alla piridina del macrociclo, si spostano a campi bassi e la non-equivalenza del segnale di H2 viene risolta. Nella parte alifatica si può osservare che il segnale di H9 ritorna a singoletto dopo l'aggiunta di cloruro, mentre H4 mostra solo un sistema AB e quindi appare come due doppietti. Tuttavia, sia per H4 che per H9, i chemical shift si trovano mediamente nelle stesse posizioni osservate per il complesso $[\text{ZnL1}]^{2+}$, suggerendo che l'ammina alifatica del braccio laterale continua ad essere coinvolto nella coordinazione del metallo. Tutti i risultati ottenuti sono attribuibili al rilascio del PyPD dalla coordinazione di Zn(II) e la successiva chelazione da parte del cloruro, probabilmente rafforzata dai legami tra il metallo e il macrociclo, che ne riducono la rigidità molecolare. Giustificando lo spostamento dei segnali di H1 e H2 a campi maggiori e la riduzione del numero di segnali. Lo zinco resta coordinato dal macrociclo ma non dal fluoroforo, dando luogo ad una nuova specie $[\text{ZnL1Cl}]^-$. I risultati sono in accordo con quanto osservato dagli spettri delle

titolazioni spettrofotometriche di assorbimento e fluorescenza. Le prime evidenziano il ripristino della banda di assorbimento relativa alla piridina del fluoroforo dopo l'aggiunta di Cl^- , le seconde un "quenching" dell'emissione di fluorescenza. Entrambi i fenomeni sono attribuiti al distacco del fluoroforo dalla coordinazione dello ione zinco. Dai risultati ottenuti è stata osservata una marcata selettività per lo ione cloruro, sia negli spettri di assorbimento e fluorescenza che nello studio ^1H -NMR del complesso.



*Figura 54 Sono stati riportati gli spettri ^1H -NMR per a) legando **L1** libero, per b) il complesso **ZnL1** e per c) il complesso **ZnL1** in presenza di 1 equivalente di Bu_4NCl , le analisi sono state condotte in CD_3CN a 303 K.*

3.1.4 CONCLUSIONI

È stato sintetizzato il legante **L1**, costituito da un anello macrociclico poliamminico a un nucleo piridinico ed avente una funzione amminica secondaria su un braccio laterale collegata, tramite un ponte metilenico, al fluoroforo piridin-ossadiazolo-fenil (PyPD). Il nuovo legante presenta tre equilibri di protonazione, a pH fisiologico si trova nella forma $[\text{H}_2\text{L1}]^{2+}$ che non è in grado di emettere fluorescenza. Il composto **L1** forma complessi mononucleari stabili con Zn(II) e Cu(II) in soluzione acquosa; dallo studio diffrattometrico delle strutture solide cristalline è emerso che il catione viene esacoordinato attraverso tutti gli atomi d'azoto appartenenti alla cavità macrociclica, l'azoto

amminico secondario del braccio laterale e l'azoto benzilico del fluoroforo, che partecipa alla coordinazione ripiegandosi sul metallo secondo il modello "scorpionand-like".

Le proprietà coordinative di **L1** sia in soluzione acquosa che in acetonitrile sono state investigate per via spettrofotometrica; il legante ha dimostrato essere un ottimo sensore per il catione metallico Zn(II) formando la specie mononucleare $[\text{ZnL1}](\text{ClO}_4)_2$. La formazione del complesso provoca sia variazioni allo spettro di assorbimento sia un significativo aumento dell'emissione di fluorescenza.

La capacità della specie $[\text{ZnL1}](\text{ClO}_4)_2$ di agire come metallo-recettore per anioni in soluzione è stata investigata tramite analisi spettrofotometriche e NMR. Il complesso si è rilevato in grado di rispondere selettivamente alla presenza di ione cloruro attraverso un decremento della fluorescenza e alterazione dello spettro di assorbimento e NMR, agendo sensore ON – OFF per l'anione.

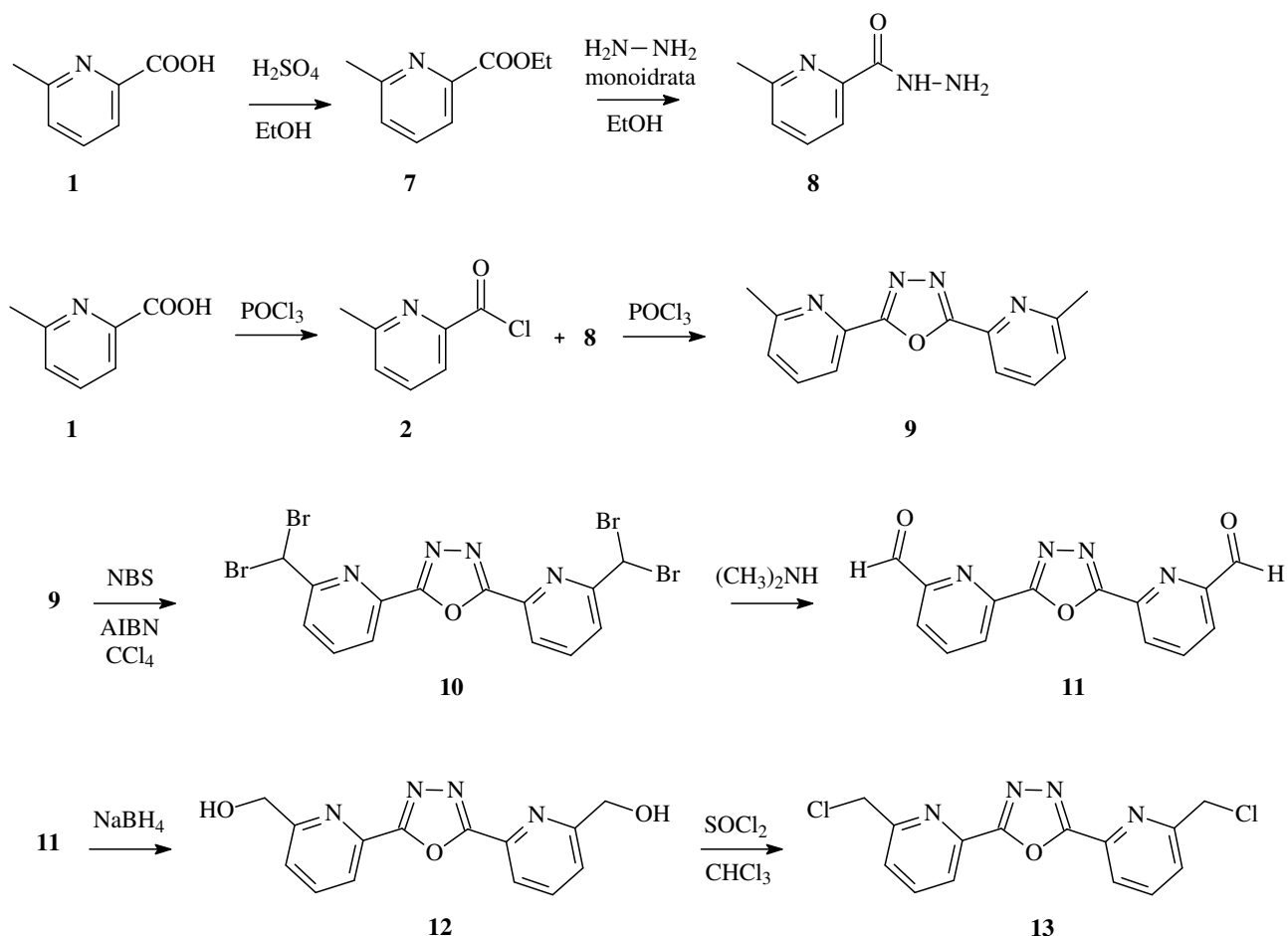
3.2 SVILUPPO DI LEGANTI BASATI SULL'UNITÀ FOTOATTIVA PyPyD

I promettenti risultati ottenuti con il legante macrociclico **L1** ci hanno condotto alla progettazione dell'unità fluoroforo PyPyD, in cui entrambe le funzioni benziliche del PPD, capostipite della serie di leganti basati sull'anello ossadiazolico, sono state sostituite con delle funzioni piridiniche. L'obiettivo principale, delle modifiche apportate alla struttura, è stato quello di coinvolgere gli atomi di azoto delle piridine del fluoroforo nella coordinazione del metallo, ipotizzando che le interazioni di complessazione inducano una conformazione coplanare dei tre anelli tale da incrementare l'emissione di fluorescenza e la risposta alla presenza dei metalli. Pertanto abbiamo sintetizzato con successo due nuovi chemosensori macrociclici **L2** e **L3**, per ciclizzazione del nuovo fluoroforo PyPyD con due catene alifatiche poliamminiche di diversa lunghezza e composte da 3 o 4 atomi di azoto, rispettivamente i frammenti **L^{II}** e **L^{III}** precedentemente sintetizzati nel nostro laboratorio. La differenza del numero di atomi compresi nel macrociclo influenzeranno le dimensioni della tasca di legame, rendendolo un fattore discriminante per la selettività di coordinazione.

3.3 SINTESI E STUDIO DI L2

3.3.1 SINTESI DEL FLUOROFORO PyPyD

La sintesi del nuovo fluoroforo tricyclico PyPyD opportunamente funzionalizzato è stata riportata nello [Schema 3](#).



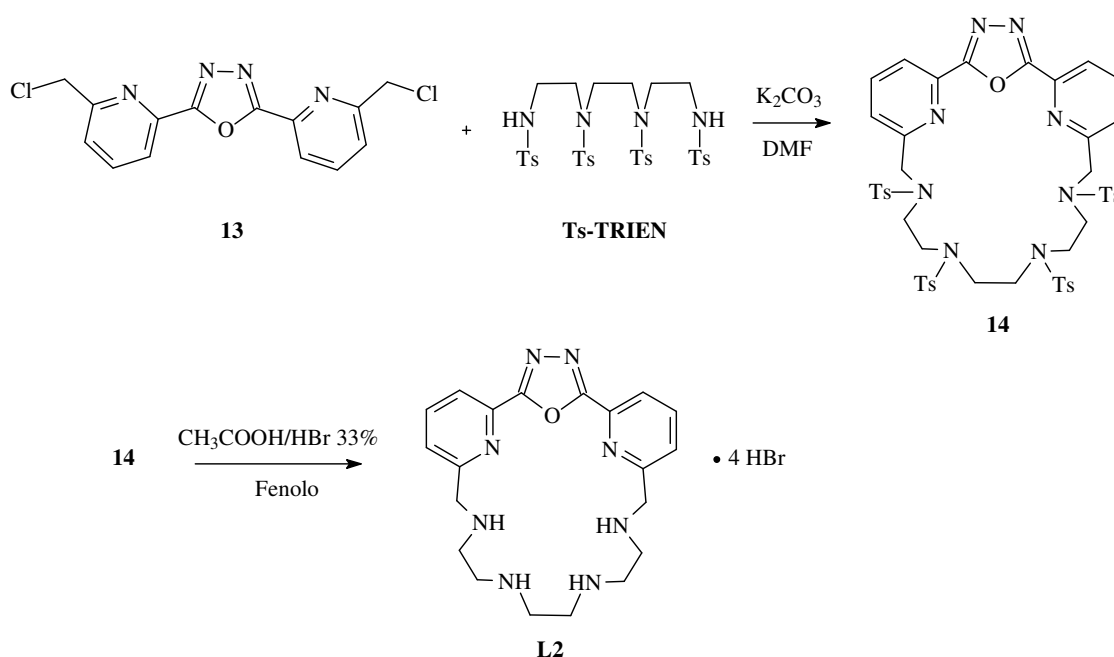
Schema 3 Sintesi dell'unità fluorofora PyPyD funzionalizzata.

La struttura tricyclica 2,5-bis(6-metilcloro-2-piridil)[1,3,4]ossadiazolo (**13**) è basato sul fluoroforo piridin-ossadiazolo-piridin (**PyPyD**). Il composto **13** è stato sintetizzato in buone rese attraverso 4 step di reazione mediante le quali i metili presenti sugli anelli piridinici sono stati opportunamente funzionalizzati al fine di ottenere dei gruppi adatti a reagire con le ammine primarie delle catene poliamminiche. Innanzitutto, è stato sintetizzato il precursore **8** derivato dell'acido 6-metil-2-piridincarbossilico (**1**), mediante prima una classica reazione di Fisher in etanolo e acido solforico, poi formazione dell'idrazide desiderata utilizzando idrazina monoidrata in etanolo. Il fluoroforo **9** è stato ottenuto per accoppiamento dei precursori acido 6-metil-2-piridincarbossilico (**1**) e 6-metil-2-piridinidrazide (**8**), in primo luogo è stato fatto reagire l'acido **1** con POCl_3 , per la formazione del cloruro acilico corrispondente, di seguito è stato aggiunto il precursore **3** direttamente nella miscela

di reazione. Il composto **13** è stato ottenuto con successo attraverso 4 reazioni consecutive; la prima di bromurazione per la sintesi di **10** con 4 equivalenti di N-bromosuccinimide, a cui è seguita la formazione dell'aldeide derivata **11**, per sostituzione con dimetilammina, i gruppi idrossilici del composto **12** sono stati ottenuti per riduzione dell'aldeide con NaBH₄, i quali sono stati successivamente sostituiti a cloruro per reazione con SOCl₂.

3.3.2 SINTESI DI L2

Per la sintesi del legante macrociclico **L2** è stato seguito il procedimento descritto nello [Schema 4](#).



Schema 4 Sintesi del legante L2.

Il composto **13** sintetizzato presenta i gruppi funzionali idonei per la reazione di ciclizzazione con una catena poliamminica **L^{II}** opportunamente protetta con gruppo tosilato nelle funzioni amminiche. Il composto **Ts-TRIEEN** (tetratosil-trietilentetrammina) è stato sintetizzato secondo quanto riportato nel riferimento bibliografico.⁹⁰ Il macrociclo **14** è stato sintetizzato per accoppiamento e successiva condensazione del frammento luminescente **13** e la catena **Ts-TRIEEN** in dimetilformaldeide a 60° C,

per evitare la formazione di prodotti secondari di polimerizzazione abbiamo lavorato con alte diluizioni. Le funzioni amminiche del precursore **14** sono state deprotette mediante l'utilizzo di CH₃COOH/HBr in fenolo, ottenendo così il legante desiderato **L2** puro in buone rese sotto forma di sale bromo idrato. Il nuovo composto è stato sintetizzato e purificato con successo, sarà studiato al fine di valutarne le proprietà acido-base e la capacità di coordinare in soluzione acquosa per via spettrofotometrica.

3.3.3 STUDIO SPETTROFOTOMETRICO DI L2

Ad oggi, il legante **L2** è stato solamente analizzato attraverso una titolazione preliminare per via spettrofotometrica UV-Vis al variare del pH (da 2 a 12). Dallo spettro registrato possiamo notare un lieve cambiamento di assorbimento nel range di pH studiato, dovuto al cambiamento di polarità dell'anello ossadiazolico dovuto alla deprotonazione delle ammine del macrociclo che porta ad una variazione della conformazione del fluoroforo e quindi uno spostamento delle bande di assorbimento. Il legante sarà ulteriormente studiato al fine di comprendere a fondo il suo comportamento in soluzione acquosa sia libero che in presenza di cationi metallici, come agente complessante.

3.3.4 CONCLUSIONI

Il nuovo fluoroforo triciclico PyPyD e il primo legante che la contiene **L2** sono stati sintetizzati con successo. L'unità fotoattiva è basata sul motivo piridin-ossadiazolo-piridin ed è parte integrante dell'anello macrociclico di **L2**.

Le proprietà spettrofotometriche del legante sono state indagate attraverso uno studio preliminare in soluzione acquosa in funzione del pH. Da una prima analisi il legante **L2** si dimostra sensibile alla variazione di pH rispondendo con un'alterazione dell'assorbimento nel campo UV-Vis, ma non nell'emissione di fluorescenza. Il legante sarà ulteriormente studiato al fine di comprendere il

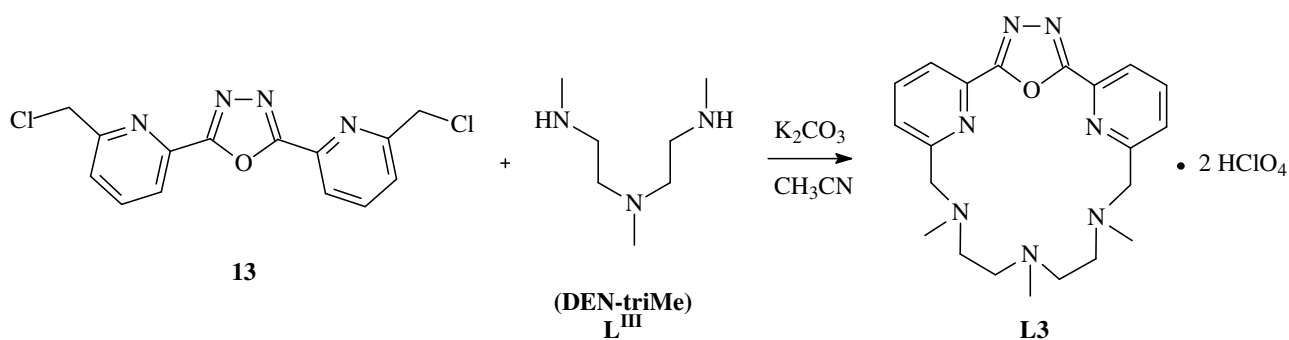
comportamento acido-base in soluzione e la capacità di agire come sensore per cationi metallici sia in soluzione che in fase solida cristallina. Le analisi saranno approfondite attraverso misure NMR in un lavoro successivo a questo progetto di tesi.

3.4 SINTESI E STUDIO DI L3

Il legante macrociclico **L3** appartiene alla serie di leganti macrociclici basati sul fluoroforo PyPyD, presenta una cavità recettrice poliamminica composta da 5 atomi donatori di azoto, appartenenti alle tre funzioni amminiche alifatiche e due atomi di azoto piridinici. La struttura, confrontata con quella del legante **L2** precedentemente sintetizzato, presenta un atomo di azoto amminico in meno del legante precedentemente analizzato; questo comporta la riduzione sia dell'anello macrociclico per l'eventuale coordinazione di uno ione metallico, sia una diminuzione del numero di atomi donatori per la sua stabilizzazione. Dalle modifiche apportate ci si può aspettare un aumento di selettività per la coordinazione di ioni metallici anche se a discapito della loro stabilità rispetto a **L2**.

3.4.1 SINTESI DI L3

La reazione di sintesi del nuovo macrociclo **L3** è stata riportata nello [Schema 5](#).



Schema 5 Sintesi del legante L3.

Per la sintesi del nuovo legante **L3** abbiamo utilizzato il composto precursore 2,5-bis(6-metilcloro-2-piridil)[1,3,4]ossadiazolo (**13**), ottenuto seguendo il procedimento precedentemente riportato nello [Schema 3](#), e dalla catena poliamminica 1,4,7-trimetil-1,4,7-dietiltri-ammina (**L^{III}**), **DEN-triMe**, preparata precedentemente come riportato.⁹¹ La reazione di ciclizzazione è stata condotta in

acetonitrile in presenza di K_2CO_3 , i reagenti sono stati aggiunti in forte diluizione per evitare reazioni di polimerizzazione. Il legante desiderato **L3** è stato ottenuto ad alte rese e purificato per cristallizzazione in soluzione acquosa con acido perclorico, il sale perclorato derivato è stato ottenuto per lenta evaporazione del solvente. Il nuovo legante sintetizzato sarà analizzato per via spettrofotometrica sia in soluzione acquosa che in soluzione organica, al fine di valutare il suo comportamento in funzione del pH e come chemosensore di cationi metallici. Ulteriori informazioni saranno estrapolate dalla risoluzione delle strutture in fase solida cristallina e degli spettri NMR, sia del legante libero che in presenza di metalli.

3.4.2 STUDIO DELLE PROPRIETÀ SPETTROFOTOMETRICO DI L3

Il nuovo legante macrociclico **L3** è stato in primo luogo studiato per via spettrofotometrica analizzando l'assorbimento UV-Vis e l'emissione di fluorescenza al variare del pH, in un range che va da pH= 2 a pH= 12, riportato in [Figura 55](#). Dagli spettri acquisiti possiamo osservare che il legante a pH= 2, quando tutte le funzioni amminiche sono in forma protonata, il legante presenta proprietà emissive di fluorescenza. Andando verso pH più alcalini, a pH pari a 4, la fluorescenza decresce di intensità, presumibilmente in seguito alla deprotonazione degli azoti amminici in posizione benzilica al fluoroforo che presentano un effetto PET sul sistema. Da pH= 8 a pH= 12, il legante non emette fluorescenza, a causa del quenching da parte degli azoti amminici.

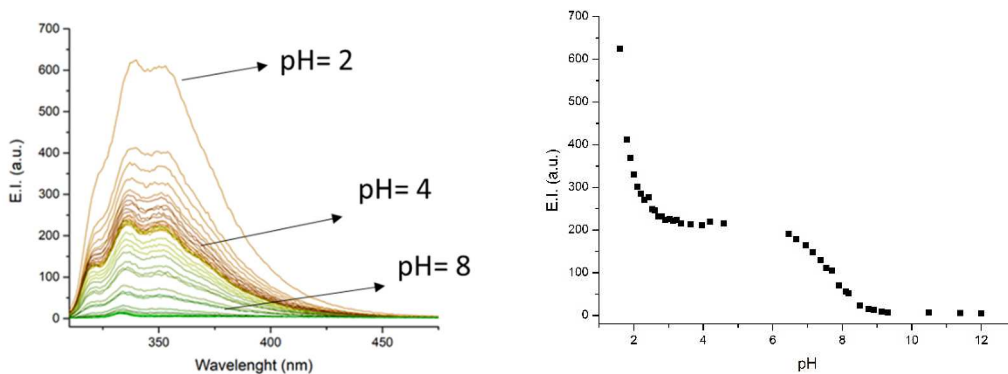


Figura 55 Emissione di fluorescenza in funzione del pH in un range da 2 a 12, soluzione acquosa di TAPS 0,01 M, concentrazione di legante L3 6×10^{-7} M a 298 K.

Il legante macrociclico **L3** ha mostrato un comportamento simile a quello riscontrato con il legante **L1** per quanto riguarda l'emissione di fluorescenza al variare del pH; pertanto potrebbe essere utilizzato come sensore di cationi metallici a pH fisiologico, regione del pH nel quale il legante non ha proprietà emissive.

Le proprietà coordinative del legante **L3** sono state studiate preliminarmente attraverso uno screening in soluzione acquosa a pH = 8 (tamponato con TAPS); è stata registrata l'emissione di fluorescenza in presenza di un equivalente di alcuni cationi metallici, quali Hg(II), Cd(II), Zn (II), Ni(II), Cu(II), Pl(II). Dall'analisi effettuata, **L3** risulta essere sensibile alla solvatazione da parte dell'acqua, tuttavia ha mostrato una risposta selettiva per lo ione Zn(II) analogamente al comportamento osservato per il chemosensore **L1**. Pertanto il macrociclo sarà studiato approfonditamente come sensore fluorimetrico per il catione Zn(II) ed eventualmente il complesso $[\text{ZnL3}]^{2+}$ sarà testato come sensore per anioni.

3.4.3 CONCLUSIONI

Il nuovo legante **L3** basato sull'unità fotoattiva PyPyD è stato sintetizzato con successo. Il fluoroforo è composto un anello ossadiazolico compreso tra due funzioni piridiniche ed è parte integrante della struttura macrociclica di **L3**. Il legante è stato studiato per le sue proprietà spettrofotometriche in

soluzione acquosa in funzione del pH, e si è dimostrato essere fluorescente a pH fortemente acidi. L'aumento del pH porta ad una diminuzione dell'intensità di emissione di **L3**, in seguito alla deprotonazione delle funzioni amminiche terziarie presenti nel macrociclo. Le proprietà coordinative sono state indagate attraverso uno screening preliminare su alcuni cationi metallici, durante il quale il macrociclo **L3** ha risposto selettivamente alla presenza dello ione Zn(II). Il legante sarà ulteriormente studiato in un lavoro successivo a questo progetto di tesi per determinare se anche **L3**, come il legante **L1**, possa essere utilizzato come sensore per lo ione Zn(II) o per altri cationi metallici in soluzione acquosa a pH fisiologico. Inoltre, potrebbe risultare interessante studiare il complesso $[\text{ZnL3}]^{2+}$ come sensore per anioni.

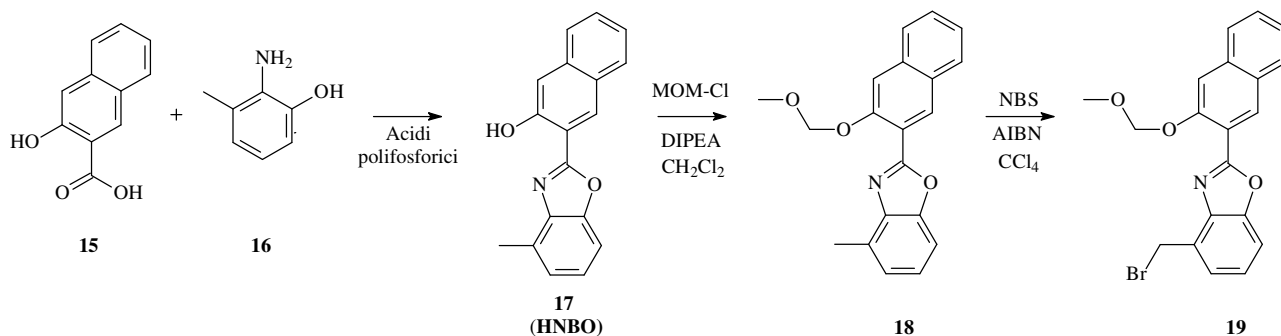
3.5 SVILUPPO DI LEGANTI BASATI SUL FLUOROFORO HNBO

La progettazione dei leganti **L4** e **L5** è ispirata agli ottimi risultati ottenuti dal fluoroforo HNBO come chemosensore otticamente attivo e in grado di complessare metalli. Il frammento presenta un'elevata solubilità in ambiente acquoso, favorevole per le analisi di coordinazione per via spettrofotometrica in soluzioni a pH fisiologico. La sintesi del fluoroforo HNBO e il legame con una unità recettrice, aciclica per **L4** e macrociclica per **L5**, sono descritte di seguito.

3.6 SINTESI E STUDIO DI L4

3.6.1 SINTESI DEL FLUOROFORO HNBO

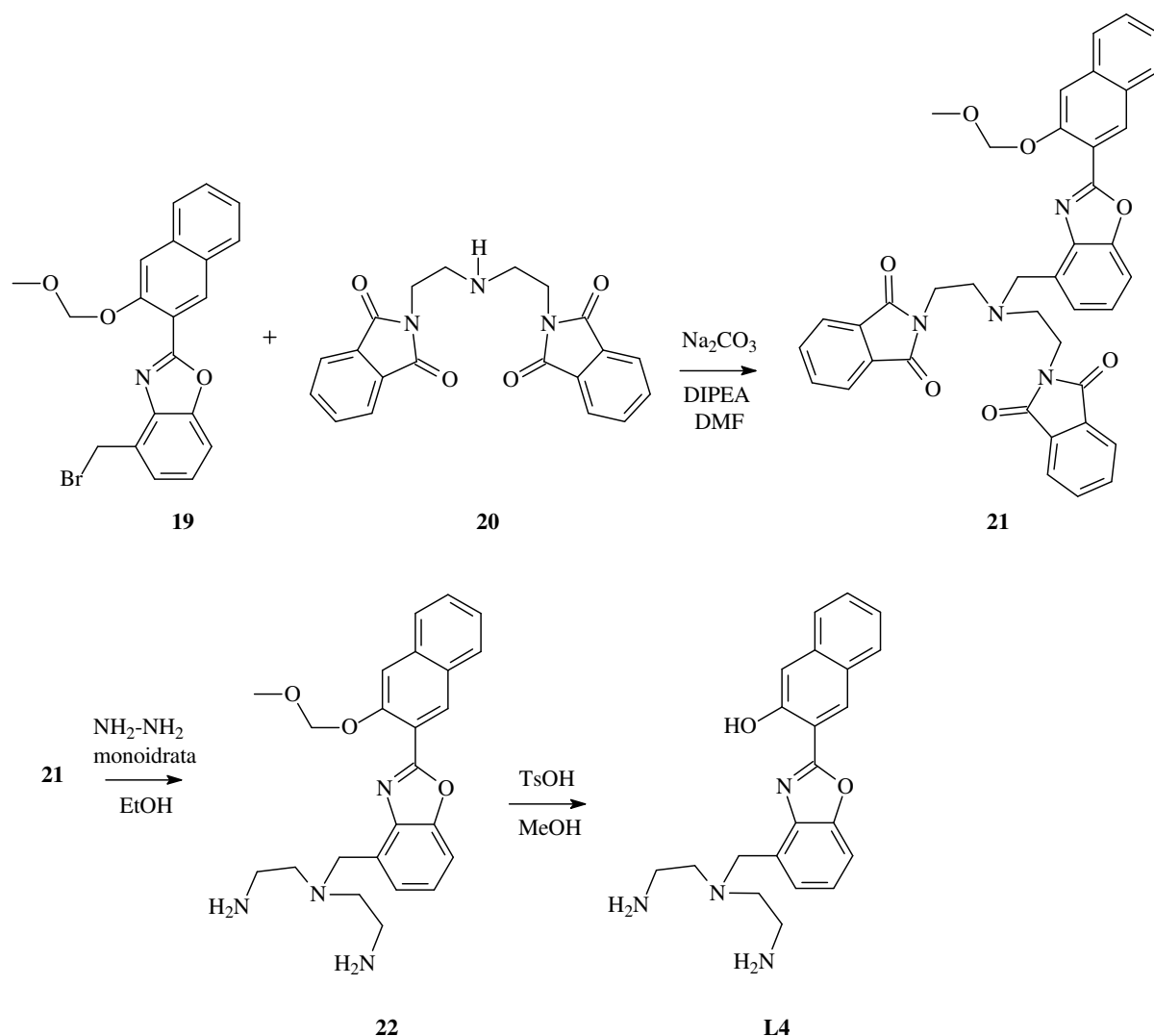
Per la sintesi del fluoroforo 2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (**HNBO**) (**17**) abbiamo seguito la procedura descritta nell'articolo Ji Eon Know et al. *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 8760-8774, riportata nello [Schema 6](#). La funzione fenolica del naftolo è stata legata ad un gruppo protettore, il metossimetil (MOM) e il metile benzilico è stato funzionalizzato a bromuro per ottenere il precursore **19** del legante **L4**, le reazioni sono in accordo con quanto riportato nella procedura di Know.



Schema 6 Sintesi del fluoroforo HNBO derivato.

3.6.2 SINTESI DI L4

Il nuovo legante **L4** è stato sintetizzato ad alte rese partendo dal composto **19** e seguendo le reazioni riportate nello [Schema 7](#).



Schema 7 Sintesi di L4.

Il legante **L4** è stato ottenuto dal coupling del precursore HNBO-derivato **19** con l'unità poliamminica recettrice **L^{IV}** (**20**) opportunamente protetta, mediante una reazione di sostituzione in DMF in ambiente basico, in presenza di Na_2CO_3 e N,N-diisopropiletilammina. Il composto **20** è stato precedentemente preparato all'interno del nostro laboratorio, in accordo con la procedura riportata nel riferimento bibliografico.⁹² Il composto **21** è stato deprotetto sulle funzioni amminiche con una soluzione di idrazina monoidrata; quindi il composto **22** è stato fatto reagire in metanolo con l'acido

p-toluensolfonico per ottenere il legante desiderato **L4**. Il prodotto di sintesi è stato precipitato come sale cloridrato per dissoluzione in una piccola quantità di etanolo e aggiunta di HCl conc. 37%.

Il nuovo legante **L4** è stato sintetizzato e purificato, adatto per gli studi successivi. Sono state pertanto indagate le sue proprietà spettrofotometriche, in funzione del pH e in presenza di cationi metallici, attraverso studi UV-Vis e di fluorescenza in soluzione acquosa. Ulteriori studi di approfondimento saranno effettuati in seguito sulla risoluzione della struttura cristallina.

3.6.3 STUDI SPETTROFOTOMETRICI DI L4 IN FUNZIONE DEL pH

Il nuovo legante **L4** è stato analizzato in soluzione acquosa in un range di pH variabile, da 2 a 12, per aggiunte di NaOH, al fine di ottenere informazioni relative agli effetti protonazione sulle proprietà di assorbimento e di emissione di fluorescenza. Lo spettro d'assorbimento UV-Vis del legante in soluzione acquosa è riportato in [Figura 56](#), la curva a pH = 2 si presenta molto strutturata, si possono individuare quattro principali massimi di assorbimento a lunghezze d'onda pari a $\lambda_{\max} = 219$ nm ($\epsilon = 25970$ cm⁻¹mol⁻¹dm³), $\lambda_{\max} = 241$ nm ($\epsilon = 23980$ cm⁻¹mol⁻¹dm³), $\lambda_{\max} = 279$ nm ($\epsilon = 19900$ cm⁻¹mol⁻¹dm³) e $\lambda_{\max} = 329$ nm ($\epsilon = 17910$ cm⁻¹mol⁻¹dm³) tutte attribuibili al cromoforo HNBO. La variazione di pH nel range studiato (da 2 a 12) porta ad un significativo cambiamento nel profilo dello spettro di assorbimento, in particolare si nota un decremento dell'intensità delle bande a $\lambda_{\max} = 219$ nm ed a $\lambda_{\max} = 317$ nm, contrariamente per quanto accade alla banda a 279 nm, che incrementa notevolmente a pH basici spostandosi leggermente verso energie inferiori (red shift) fino a $\lambda_{\max} = 285$ nm ($\epsilon = 28650$ cm⁻¹mol⁻¹dm³), inoltre compare una nuova banda a 342 nm ($\epsilon = 18310$ cm⁻¹mol⁻¹dm³). L'assorbanza a $\lambda_{\max} = 412$ nm è approssimativamente pari a zero a pH acidi ma, all'aumentare del pH, si ottiene la formazione di una banda di assorbimento che raggiunge il suo massimo a pH= 12 ($\epsilon = 4100$ cm⁻¹mol⁻¹dm³), probabilmente dovuto alla formazione della specie chetonica dal fluoroforo dovuto al riarrangiamento del fenolo nella forma deprotonata. Analizzando il profilo dello spettro di fluorescenza registrato eccitando il legante a una lunghezza d'onda di 324 nm, corrispondente a uno

dei punti isobestici, si può notare che a pH= 2 **L4** emette debolmente mostrando una banda di emissione a 542 nm, che incrementa significativamente andando verso pH maggiori fino a raggiungere un massimo di intensità a pH= 12, pari a sei volte quella iniziale, con una resa quantica di $\Phi_{em} = 0,047$. (Figura 57)

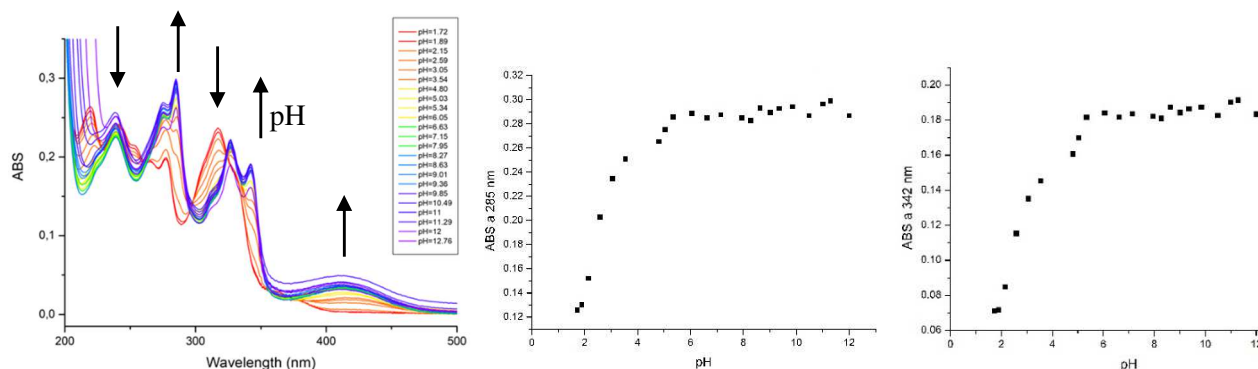


Figura 56 Spettro di assorbimento UV-Vis in funzione del pH in un range da 2 a 12 in soluzione acquosa 1×10^{-5} M di **L4** a $T=298$ K.

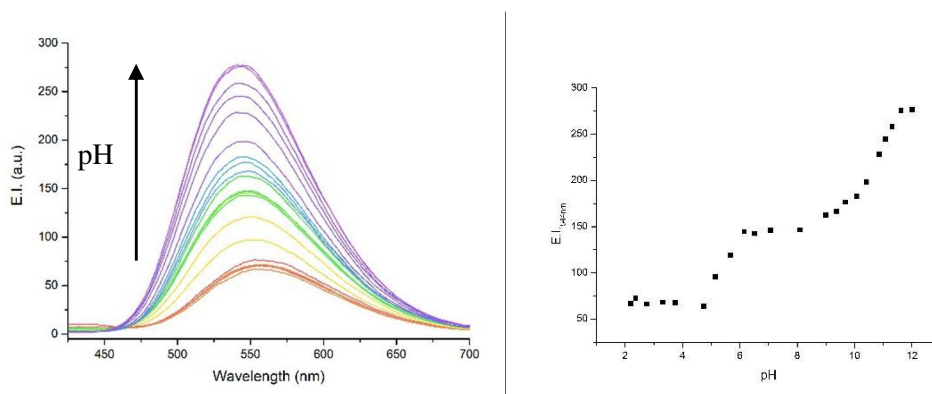


Figura 57 Emissione di fluorescenza in funzione del pH in un range da 2 a 12, con $\lambda_{ex}=364$ nm, in soluzione acquosa 1×10^{-5} M di **L4** a $T=298$ K.

Con l'incremento del pH, si osservano drastici cambiamenti sia per quanto riguarda lo spettro di assorbimento UV-Vis che per l'emissione di fluorescenza dovuti alla deprotonazione delle ammine alifatiche e del gruppo idrossilico del fenolo. Maggiori informazioni si possono trarre dallo studio dell'andamento dell'assorbimento, a $\lambda_{max} = 285$ nm e a $\lambda_{max} = 342$ nm, e dell'emissione nel range di pH studiato. Infatti, si può subito notare come per pH acidi, da 2 a 4, il legante **L4** presenta un notevole aumento dell'intensità di assorbimento, mentre non si hanno cambiamenti per quanto riguarda

l'emissione di fluorescenza. Da pH=4,5 fino a pH=6 il composto subisce un ulteriore aumento di assorbimento e incrementa di circa tre volte l'intensità di emissione, facendo pensare alla formazione di una specie rigida in cui gli anelli aromatici sono coplanari, ossia una conformazione in cui la specie è in grado di emettere fluorescenza. Per valori di pH superiori a 8, si ha nuovamente un significativo incremento dell'intensità di emissione, che continua ad aumentare per tutto il resto del range di pH analizzato, ma non si hanno altre variazioni nello spettro. Possiamo ipotizzare dunque che il legante subisce delle deprotonazioni che conducono a riarrangiamenti conformazionali rilevanti per quanto riguarda le proprietà luminescenti del composto, mostrate in FIG.

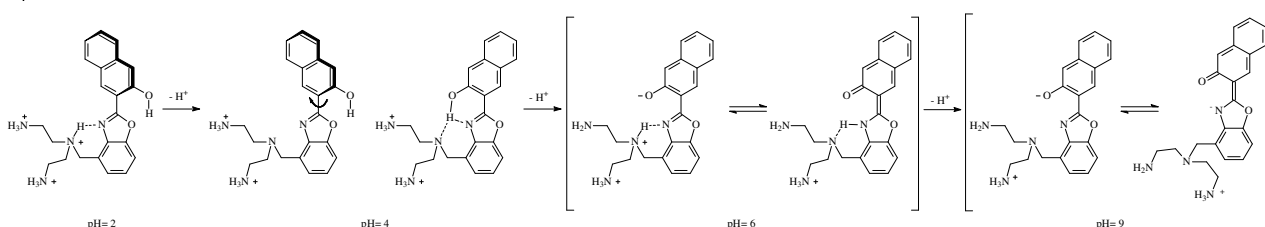


Figura 58 Ipotesi del meccanismo di riarrangiamento in funzione del pH del legante **LA**.

In particolare, a pH fortemente acido è presente la specie in cui tutte le funzioni amminiche sono protonate, il che preclude la coplanarità tra il sistema aromatico del naftolo e quello del benzossazolo. Lo spettro di assorbimento osservato è quindi dato dagli assorbimenti separati dei due anelli. Tale specie, inoltre, non emette fluorescenza in quanto lo stato eccitato del naftolo subisce un rilassamento termico dovuto proprio alla rotazione del legame che collega i due sistemi aromatici allo stato eccitato (TICT).⁹³ Aumentando il pH da 2 a 4 avviene la deprotonazione dell'ammina terziaria benzilica, il che determina un riarrangiamento dell'intera struttura che porta alla conformazione coplanare dei due sistemi aromatici stabilizzata da un forte legame a idrogeno intramolecolare che coinvolge il gruppo ossidrilico naftolico, l'atomo di azoto eterociclico del gruppo ossazolico e l'ammina terziaria stessa. Questo drastico cambiamento conformazionale è osservabile attraverso lo spostamento verso energie minori delle bande di assorbimento del sistema dovuto all'estensione della coniugazione, inoltre l'aumento della densità elettronica sull'atomo di ossigeno naftolico comporta uno spostamento verso

destra dell'equilibrio di tautomeria cheto enolica osservabile con la comparsa della banda a 412 nm. Durante questa fase, tuttavia, la specie resta non emissiva presumibilmente a causa di un riarrangiamento protonico dovuto all'aumento di acidità dell'atomo di azoto ossazolico nello stato eccitato. Da pH=5 a pH=6 si registra un ulteriore brusco aumento di intensità delle bande di assorbimento dovuto alla deprotonazione del naftolo, con conseguente comparsa di emissione di fluorescenza attribuita alla forma carbonilica del legante. Per valori di pH superiori a 6 lo spettro di assorbimento non cambia ulteriormente, mentre si osserva un notevole aumento della fluorescenza da pH=9 a pH=11,5. Questo comportamento dimostra che lo stato eccitato non viene spento per effetto PET da parte dei doppietti delle ammine alifatiche, altrimenti all'aumento del pH l'emissione di fluorescenza sarebbe diminuita. Al contrario sembra un ulteriore passaggio di deprotonazione, che avviene a partire da pH=9, aumenta ulteriormente la densità elettronica sul sistema naftolico rendendolo più emissivo. (Figura 59 Tautomeria cheto-enolica dell'unità HNBO.).

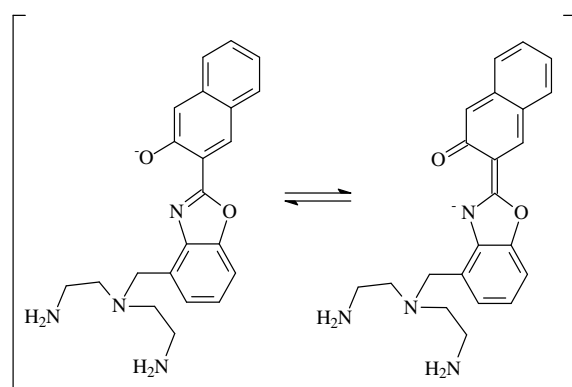


Figura 59 Tautomeria cheto-enolica dell'unità HNBO.

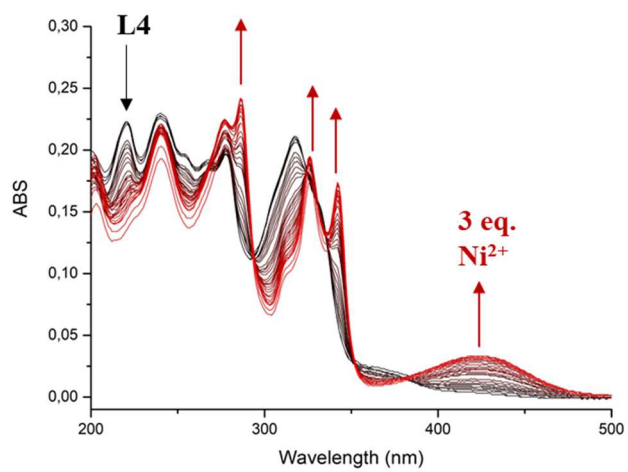
Come dimostrato da uno studio precedentemente effettuato sull'unità HNBO e sul chemosensore HNBO-DPA⁹⁴ basato sulla medesima unità fotoattiva di **L4**, il fluoroforo HNBO presenta tipicamente l'effetto ESIPT. In particolare, l'effetto di trasferimento intramolecolare di protoni allo stato eccitato, o ESIPT, è un comportamento caratteristico di molecole che possiedono un legame a idrogeno intramolecolare tra un atomo donatore, ad esempio nel nostro caso l'idrossile fenolico, e un

atomo accettore, come l'atomo d'azoto dell'ossazolo, in anello composti da 5 o 6 termini. L'irraggiamento del composto induce una tautomeria transiente verso la forma chetonica del sistema, si genera perciò il carbonile C=O e l'ammina -NH-, responsabile delle significative variazioni nello spettro di assorbimento e del grande Stokes shift tipico di questo effetto. Al contrario, il trasferimento di protoni dallo stato fondamentale della forma enolica a quella dallo stato eccitato della specie chetonica per tornare allo stato fondamentale della forma enolica, prevede un trasferimento di protoni ciclico a quattro livelli ($E \rightarrow E^* \rightarrow K^* \rightarrow K \rightarrow E$).⁹⁵⁹⁶⁹⁷

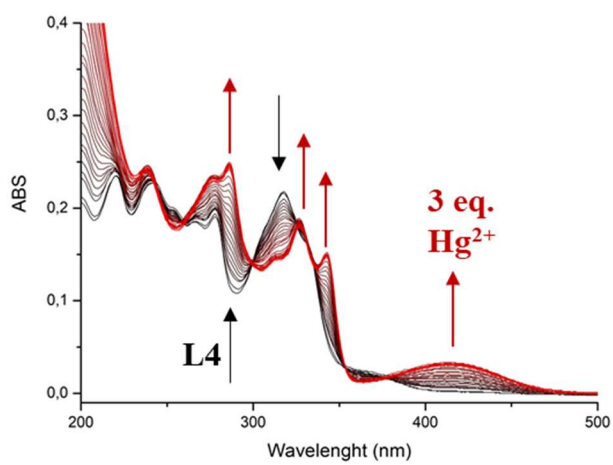
In accordo con quanto riportato, lo spettro d'assorbimento mostra profonde variazioni in seguito al riarrangiamento conformazionale e la banda a 412 nm è tipica della specie chetonica, nello spettro di fluorescenza si registra una banda di emissione a $\lambda_{em} = 542$ nm per eccitazione del legante **L4** ad una lunghezza d'onda pari a 324 nm, l'ampio Stokes shift è un'ulteriore conferma della formazione del chetone dovuta all'effetto ESIPT.

3.6.4 STUDI DELLE PROPRIETÀ COORDINATIVE DI **L4**

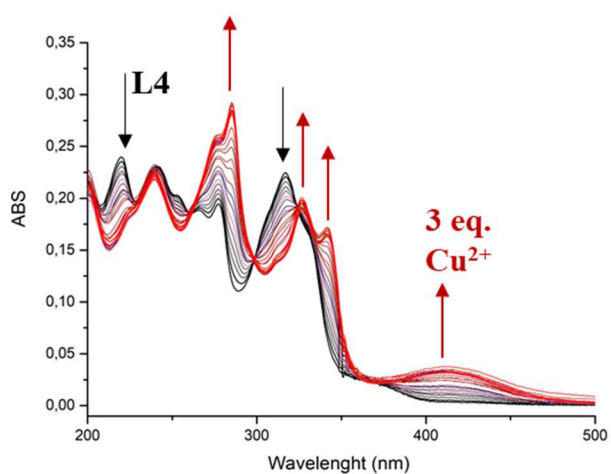
Il legante **L4** presenta atomi donatori potenzialmente in grado di formare legami di complessazione, pertanto è stato studiato spettrofotometricamente in presenza di alcuni cationi metallici al fine di ottenere informazioni sulle proprietà coordinative e di selettività in soluzione acquosa e la conseguente risposta luminescente. Sono stati registrati gli spettri di assorbimento e di emissione per aggiunte di ioni Zn(II), Cd(II), Cu(II), Ni(II) e Hg(II) ad una soluzione di **L4** 1×10^{-5} M in soluzione acquosa tamponata a pH 7,4 con TRIS (0,001 M) a 298 K. Sono state eseguite titolazioni spettrofotometriche di assorbimento e di fluorescenza per ogni ione metallico fino ad una aggiunta totale di 3 equivalenti di catione. Gli spettri di assorbimento UV-Vis per le titolazioni di Ni(II), Hg(II) e Cu(II) sono riportati di seguito.



a)



b)



c)

Figura 60 Spettri delle titolazioni UV-Vis del legante L4 per aggiunte di ioni (a) Ni²⁺, (b) Hg²⁺ e (c) Cu²⁺

Come precedentemente descritto, il legante **L4** nelle condizioni sperimentali in soluzione acquose a $\text{pH} = 7,4$ è presente nella forma enolato e due delle tre ammine alifatiche sono in forma protonata. Dall'analisi degli spettri registrati per le titolazioni con i tre cationi, possiamo notare che le bande di assorbimento del legante **L4** subiscono significative variazioni in presenza degli ioni, indice del fatto che in soluzione acquosa si formano complessi metallici con le specie analizzate. In particolare, si può osservare un comportamento simile tutti e tre gli spettri riportati, le aggiunte di metallo portano alla comparsa della banda a $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$, tipica della formazione della forma chetonica del fluoroforo, già riscontrata nello spettro di assorbimento in funzione del pH . Le aggiunte di catione metallico incrementano notevolmente l'intensità di questa banda, probabilmente dovuto al fatto che è la specie più favorevole alla complessazione del metallo. Inoltre, si riscontrano le stesse variazioni principali su quasi tutto il resto dello spettro: aumento delle bande a $\lambda_{\text{max}} = 285 \text{ nm}$, spostamento e diminuzione della banda da $\lambda_{\text{max}} = 317 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{max}} = 327 \text{ nm}$ e comparsa della banda a $\lambda_{\text{max}} = 342 \text{ nm}$, confrontabili con quanto registrato per l'aumento del pH . Possiamo quindi ipotizzare che i complessi che si formano inducono la conformazione coplanare degli anelli aromatici del cromoforo, generando così apprezzabili variazioni dell'assorbimento. Per tutti i cationi metallici la risposta massima si è ottenuta dopo l'aggiunta di 2 equivalenti, dopodiché non sono state registrate ulteriori variazioni al profilo dello spettro. Il catione che apporta maggiori alterazioni per quanto riguarda l'intensità dell'assorbimento è il Cu(II) ($\epsilon_{285 \text{ nm}} = 29170 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$, $\epsilon_{342 \text{ nm}} = 16970 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$, $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 3570 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$).

Le analisi sono state condotte a pH tamponato pari a 7,4 in cui il legante libero si trovando in forma enolato, caratterizzata da una debole intensità emissione di fluorescenza a una lunghezza d'onda di 542 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$). L'emissione del legante è stata utilizzata per investigare l'effetto CHEF dei diversi cationi presi in esame, per aggiunte di 3 equivalenti a $\lambda_{\text{em}} = 542 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$). Solamente gli ioni Zn(II) e Cd(II) l'intensità di emissione subisce un sensibile aumento, rispettivamente di circa otto e quattro volte. Le rese quantiche calcolate dei cationi metallici sono: Ni(II) $\Phi_{\text{em}} = 0.009$, Hg(II) $\Phi_{\text{em}} = 0.016$, Cu(II) $\Phi_{\text{em}} < 0.001$, Zn(II) $\Phi_{\text{em}} = 0.378$ e Cd(II) $\Phi_{\text{em}} = 0.210$. È noto che gli ioni Cu(II) e

Ni(II) producono un quenching alla fluorescenza per effetto paramagnetico; mentre lo ione Hg(II) genera uno spegnimento per effetto metallo pesante.

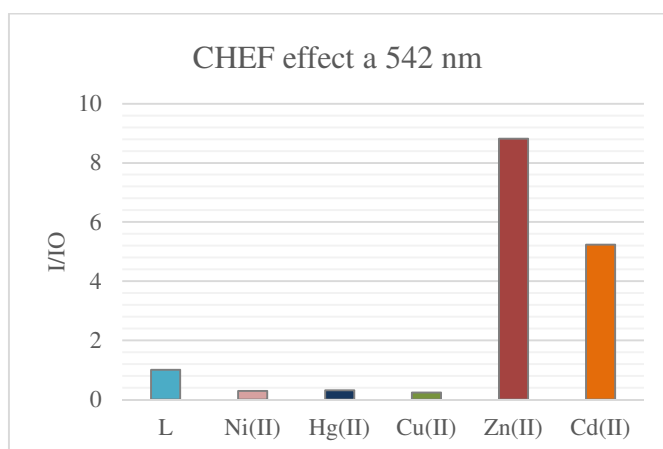


Figura 61 Effetto CHEF dei metalli Ni(II), Hg(II), Cu(II), Zn(II) e Cd(II) in emissione di fluorescenza, analisi condotta in una soluzione di TRIS a pH 7.4, per ogni metalli sono stati aggiunti 3 equivalenti rispetto alla concentrazione di **L4** (1×10^{-5} M) $\lambda_{ex} = 325$ nm.

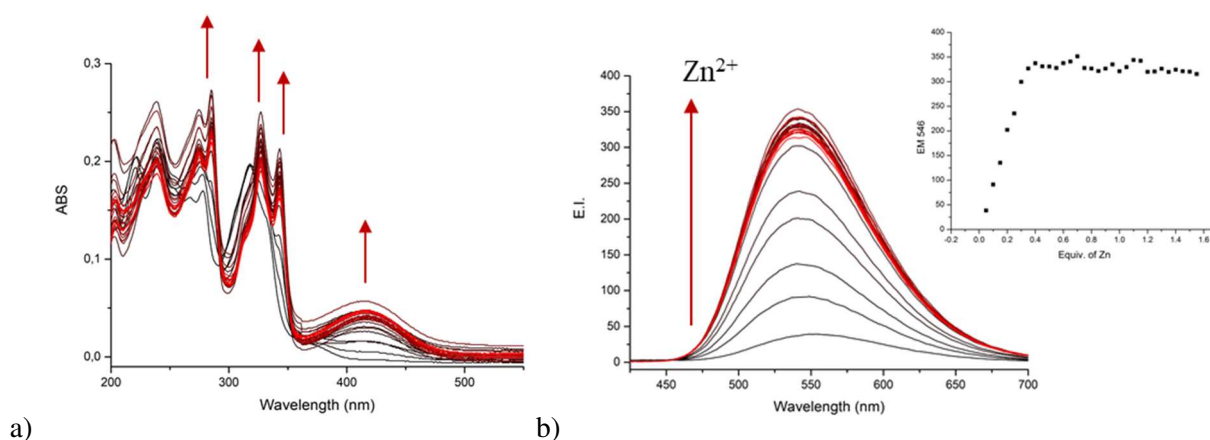
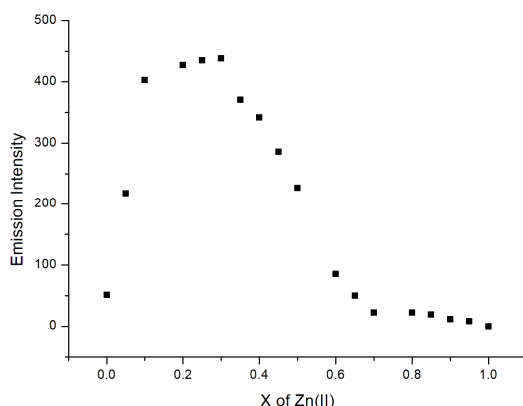


Figura 62 Spettri delle titolazioni di (a) assorbimento UV-Vis e di (b) emissione di fluorescenza del sistema $Zn^{2+}/L4$, le analisi sono state condotte in soluzione acquosa (TRIS, 0.001 M) a pH = 7,4 a 298 K; ottenute aggiungendo aliquote di Zn^{2+} fino a 3 equivalenti rispetto alla concentrazione del legante **L4**, come $Zn(ClO_4)_2$; $[L4] = 1 \cdot 10^{-5}$ M. ($\lambda_{ex} = 324$ nm).

Il legante **L4** è titolato per via spettrofotometrica con aggiunte di Zn(II) a pH fisiologico, per quanto riguarda l'assorbimento UV-Vis si può osservare lo stesso profilo registrato in presenza degli altri cationi metallici. In particolare, la presenza di catione Zn(II) porta alla comparsa di quattro bande principali a $\lambda_{max} = 286$ nm ($\epsilon = 25500$ $cm^{-1} \cdot mol^{-1} \cdot dm^3$), a $\lambda_{max} = 326$ nm ($\epsilon = 23190$ $cm^{-1} \cdot mol^{-1} \cdot dm^3$), a λ_{max}

= 343 nm ($\epsilon = 20010 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$) e a $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5600 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$). Più interessante, invece, risulta lo spettro di emissione di fluorescenza, in quanto il catione metallico incrementa l'intensità di emissione del fluoroforo con una resa quantica di 0.378, di circa 9 volte superiore a quella del legante libero. L'emissione massima si raggiunge con 2 equivalenti di Zn(II), suggerendo la formazione di un complesso in rapporto metallo:legante 1:2. I dati ottenuti dagli spettri di assorbimento e di emissione di fluorescenza portano a pensare che specie carbonilica dell'HNBO sia quella più favorevole per la coordinazione del metallo e che questa coincida con la conformazione coplanare del sistema, confermato dalla comparsa della banda relativa al chetone, alla lunghezza d'onda di 412 nm, e dall'aumento dell'intensità di emissione, e dalle significative alterazioni delle bande di assorbimento.



*Figura 63 Job-plot per la formazione del complesso tra **L4** e Zn^{2+} . Lo spettro di emissione di fluorescenza è stato analizzato a 325 nm in una soluzione a pH 7,4 (0,001 M di TRIS) ad una concentrazione totale di $[\text{L4}] + [\text{Zn}^{2+}] = 1 \cdot 10^{-5}$ M. $R = [\text{Zn}^{2+}] / ([\text{L4}] + [\text{Zn}^{2+}])$.*

La stechiometria del complesso del legante **L4** con Zn(II) sono stata approfondita utilizzando la tecnica del Job plot, [Figura 63](#), l'emissione di fluorescenza è stata registrata a concentrazione totale costante ma frazione molare crescente di Zn(II). Dallo spettro ottenuto con una soluzione acquosa tamponata a pH 7,4 con TRIS, si può notare che il massimo di emissione è stata registrata quando la frazione molare del catione metallico è di 0,3 per una concentrazione totale di $1 \cdot 10^{-5}$ M. Questo conferma ciò che era stato ipotizzato dallo studio degli spettri, si presume il legante formi complessi

[ML₂] con lo ione Zn(II) in rapporto stechiometrico metallo:legante 1:2. Le proprietà coordinative del legante **L4** sono state ulteriormente indagate anche con lo ione Cd(II), noto essere in grado di produrre un effetto CHEF sull'emissione di fluorescenza.

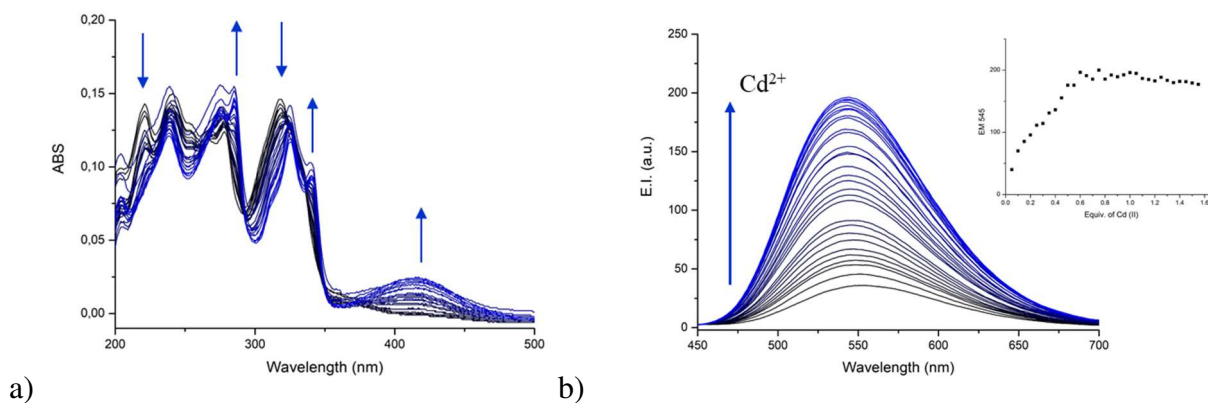


Figura 64 Spettri delle titolazioni di (a) assorbimento UV-Vis e di (b) emissione di fluorescenza del sistema Cu²⁺/L4, le analisi sono state condotte in soluzione acquosa (TRIS, 0.001 M) a pH = 7,4 a 298 K; ottenute aggiungendo aliquote di Cu²⁺ fino a 3 equivalenti rispetto alla concentrazione del legante L4, come Cu(ClO₄)₂; [L4] = 1·10⁻⁵ M. (λ_{exc} = 324 nm).

Il legante è stato, inoltre, titolato con aggiunte di Cd(II) in soluzione a pH 7,4, dai dati ottenuti si può osservare che lo spettro dell'assorbimento in presenza di 3 equivalenti di catione riporta lo stesso profilo degli spettri degli altri metalli indagati. Indice del fatto che il legante **L4** è in grado di formare stabilmente complessi metallici in soluzione acquosa. Dallo spettro di fluorescenza si può osservare che il legante si “accende” in presenza di Cd(II), aumentando l'intensità di emissione di circa quattro volte rispetto a quella del legante libero, tuttavia l'emissione massima raggiunta è di intensità inferiore rispetto a quella registrata per lo ione Zn(II).

I dati raccolti evidenziano la capacità del legante **L4** a formare complessi con cationi metallici di transizione con stechiometria [ML₂] presenti in soluzione acquosa a pH fisiologico. Il chemosensore risponde otticamente sia all'assorbimento che in emissione di fluorescenza ai metalli Cd(II) e Zn(II). Ulteriori analisi saranno effettuate per approfondire le caratteristiche dei complessi metallici formati, investigando la stabilità e la geometria dei sistemi sia in soluzione che in fase solida.

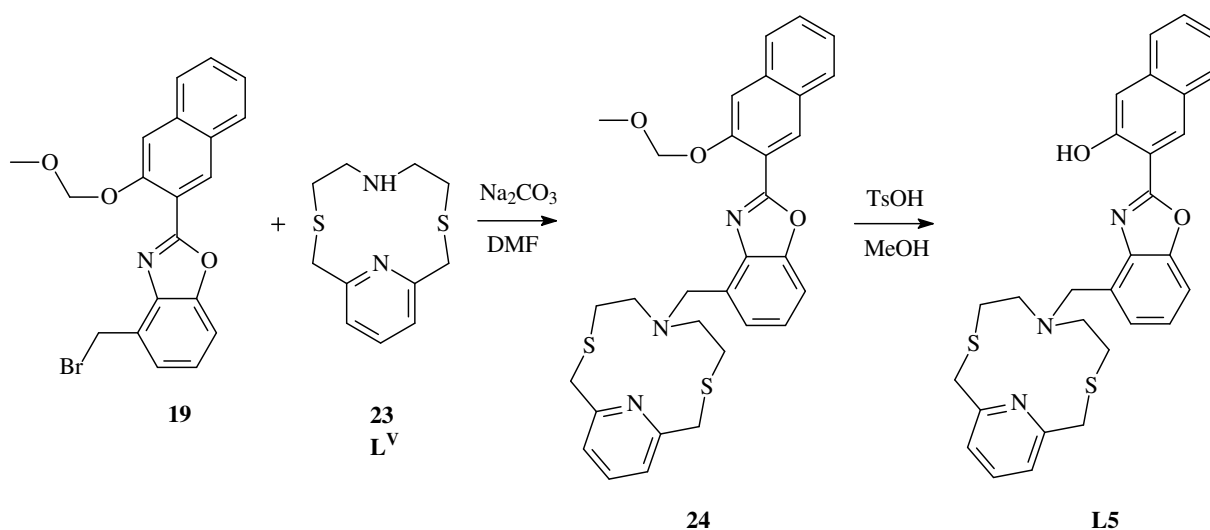
3.6.5 CONCLUSIONI

Il nuovo legante **L4**, composto dall'unità luminescente HNBO, è stato sintetizzato con successo. Il fluoroforo è formato dal un sistema benzossazolico collegato ad un naftolo attraverso un legame covalente, la struttura così ottenuta presenta tautomeria cheto-enolica tra l'anello fenolico e quello ossazolo in soluzione acquosa. La formazione della specie carbonilica è caratterizzato da un'elevata intensità di emissione di fluorescenza e da un ampio Stroke Shift e da bande di assorbimento caratteristiche nel campo UV-Visibile, la sua presenza è quindi rilevabile spettrofotometricamente. Il comportamento del legante in funzione del pH è stato determinato per via spettrofotometrica, **L4** mostra un significativo incremento nell'intensità di emissione di fluorescenza all'aumentare di pH e notevoli variazioni nello spettro di assorbimento, nel range studiato da pH= 2 a pH= 12. Evidenziando che, la deprotonazione degli atomi d'azoto della catena poliamminica, favorisce il riarrangiamento del legante e la conseguente formazione della specie carbonilica del fluoroforo, per tautomeria cheto-enolica. L'unità recettrice possiede tre atomi d'azoto donatori potenzialmente in grado di formare complessi di coordinazione con cationi metallici. Dalla valutazione degli studi spettrofotometrici, il legante **L4** ha mostrato la capacità di coordinare i cationi metallici Hg(II), Ni(II), Cd(II), Zn(II), Cu(II) in soluzione acquosa a pH= 7. Inoltre, si è rivelato un ottimo chemosensore di fluorescenza per i cationi Zn(II) e Cd(II), attraverso la formazione di complessi metallici [ML₂] secondo il rapporto metallo:legante 1:2. La formazione del complesso favorisce la formazione della specie carbonilica del naftolo, incrementando notevolmente l'emissione di fluorescenza. Le specie in soluzione saranno studiati ulteriormente sia in fase acquosa, come metallo-recettore per anioni, che in fase solida, mediante la risoluzione della forma cristallina per diffrazione a raggi X, tutt'ora in corso.

3.7 STUDIO DI L5

3.7.1 SINTESI DI L5

Il legante **L5** è stato sintetizzato in alte rese seguendo le reazioni riportate nello [Schema 38](#).



Schema 8 Sintesi del legante L5.

Per lo sviluppo del legante **L5** siamo partiti dalla sintesi dell'unità fotoattiva, il precursore **19**, ottenuta in accordo con il procedimento precedentemente descritto nello [Schema 6](#), e dell'unità macrociclica recettrice **23** (L^V), le reazioni di sintesi sono riportate nel riferimento A.J. Blake, et al., *Dalton Trans.*, **2004**, 2771-2779.

I precursori **19** e **23** sono stati accoppiati in rapporti stechiometrici in DMF sotto atmosfera inerte, ottenendo il composto **24** in buone rese. Il chemosensore **L5** è stato sintetizzato per deprotezione del prodotto **24** in metanolo in presenza di acido *p*-toluensolfonico.

3.7.2 STUDIO DELLE PROPRIETÀ COORDINATIVE DI L5

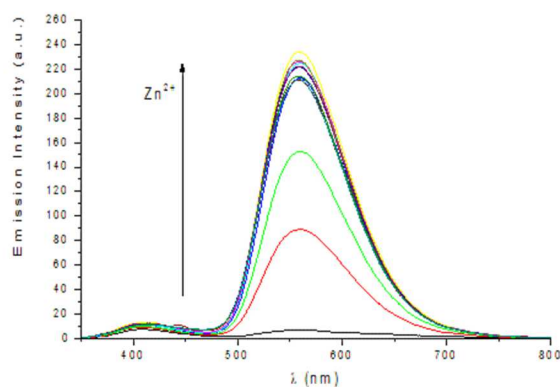
Il nuovo legante **L5**, basato sull'unità fotoattiva HNBO, è stato studiato come sensore di cationi metallici per preparare membrane polimeriche otticamente attive in soluzione acquosa, in collaborazione con l'Università "Tor Vergata" di Roma.⁹⁸

Le proprietà coordinative di **L5** sono state analizzate per via spettrofotometrica, attraverso misure di assorbimento UV-Vis e di emissione di fluorescenza in ambiente acquoso a diversi pH, in presenza di alcuni cationi del primo e del secondo gruppo. In primo luogo, il legante è "caricato" sulle membrane polimeriche precedentemente formate (1-3% (m/v) di ionoforo, 2-8% (m/v) di TpCIBK (sito anionico lipofilo), 30-33% (m/v) di PVC e plasticizzante (DOS, oNPOE o TOP) disciolti in 1 mL di THF. Successivamente è stata registrata la variazione della risposta spettrofotometrica in presenza di una prima soluzione contenente i cationi Cd(II) e Zn(II) e poi aggiungendo una seconda soluzione contenente diversi metalli, come Na(I), K(I), Ca(II), Mg(II), Co(II), Cu(II) e Pb(II) come possibili ioni interferenti. I cationi sono stati utilizzati come sali nitrato. Lo screening è condotto a pH = 5,5, pH = 7,5 e pH = 8,6 utilizzando vari tamponi, MES, HEPES e TRIS rispettivamente, eccitando il composto con una radiazione a $\lambda_{ex} = 380$ nm e la risposta fotoattiva del film polimerico all'aggiunta di diversi cationi, è stata valutata rispetto ai segnali dei tre colori principali: rosso, verde e blu (RGB). I video catturati dalla fotocamera sono stati trasferiti nel segnale digitale e l'intensità ottica del film è stata plottata rispetto al cambiamento di concentrazione dell'analita. In totale sono state preparate 6 membrane di diverse composizioni.

Membrana	Plasticizzante	Fluoroforo <i>% m/v</i>	TpCIBK <i>% m/v</i>
Mb 1a	DOS	HNBO, 1	-
Mb 1b	oNPOE	HNBO, 1	-
Mb 1c	oNPOE	HNBO, 1	2
Mb 1	DOS	HNBO, 1	2
Mb 2	DOS	HNBO, 1	5
Mb 6	TOP	HNBO, 1	5

Tabella 3 Composizione delle membrane testate basate sul legante **L5**.

Dall'analisi dei dati ottenuti, è emerso che **L5** l'emissione di fluorescenza da parte del legante è strettamente dipendente dal pH della soluzione, a causa dell'equilibrio cheto-enolico dell'anello naftolico otticamente attivo, come dimostrato per l'analogo legante **L4**.



*Figura 65 Spettro di emissione di fluorescenza della titolazione del legante **L5** in soluzione MeCN/H₂O 4:1 a pH = 8,6 tamponato con TRIS con aggiunte di Zn(II), il catione metallico è utilizzato come Zn(NO₃)₂ in una soluzione di legante alla concentrazione 1×10^{-5} M ad una $\lambda_{ex} = 380$ nm.*

I cationi metallici Cd(II) e Zn(II) sono stati analizzati mediante titolazione spettrofotometrica, il legante è in grado di coordinare i metalli quando si trova nella forma deprotonata e la formazione dei complessi viene registrata come un cambiamento dell'intensità delle bande di emissione, in particolare si può notare un incremento sia della banda a $\lambda_{em} = 418$ nm corrispondente alla regione del verde che della banda a $\lambda_{em} = 568$ nm nella regione del rosso. Le proprietà coordinative del legante più interessanti sono state ottenute con l'aggiunta del catione Zn(II) in soluzione acquosa di TRIS a pH= 8,6, quando l'ambiente basico promuove la protonazione del fluoroforo e quindi il conseguente aumento dell'intensità di emissione e favorisce la complessazione del catione. Purtroppo, l'aggiunta di analiti come idrossidi porta alla formazione degli idrossidi metallici derivati, che non sono solubili nelle condizioni sperimentali, precipitando in soluzione e impedendo di testare la risposta delle membrane polimeriche a concentrazioni superiori di cationi. Tutte le misure sono state ripetute in HEPES a pH 7,5. Allo scopo di promuovere il deprotonazione iniziale del fluoroforo HNBO, le membrane sono state inizialmente imbevute in una soluzione di TRIS a pH 8,6 per 15 minuti, quindi

risciacquate con acqua distillata e immersi in HEPES a pH 7,5, a cui sono stati aggiunti CdCl₂ e / o Zn (NO₃)₂. Le prove di selettività delle membrane verso diversi metalli alcalini, alcali e metalli di transizione sono stati eseguiti alle stesse condizioni. Non è stata riscontrata alcuna risposta per le membrane **Mb 1a, 1b, 3a, 3b** senza siti anionici lipofili, mentre tutte le membrane oNPOE plastificate hanno mostrato una debole risposta ottica, a causa dello spegnimento della fluorescenza di **L5**. Le membrane DOS-plastificate **Mb 1-3** contenenti 1% in peso del fluoroforo HNBO e 2-5% in peso di TpCIPB⁻ come sito anionico lipofilo hanno mostrato l'incremento della fluorescenza sia in presenza di Zn(II) che per Cd(II) nell'intervallo di concentrazione da $3,3 \times 10^{-7}$ a $2,2 \times 10^{-2}$ M, indicando un comportamento come carrier neutro del legante.

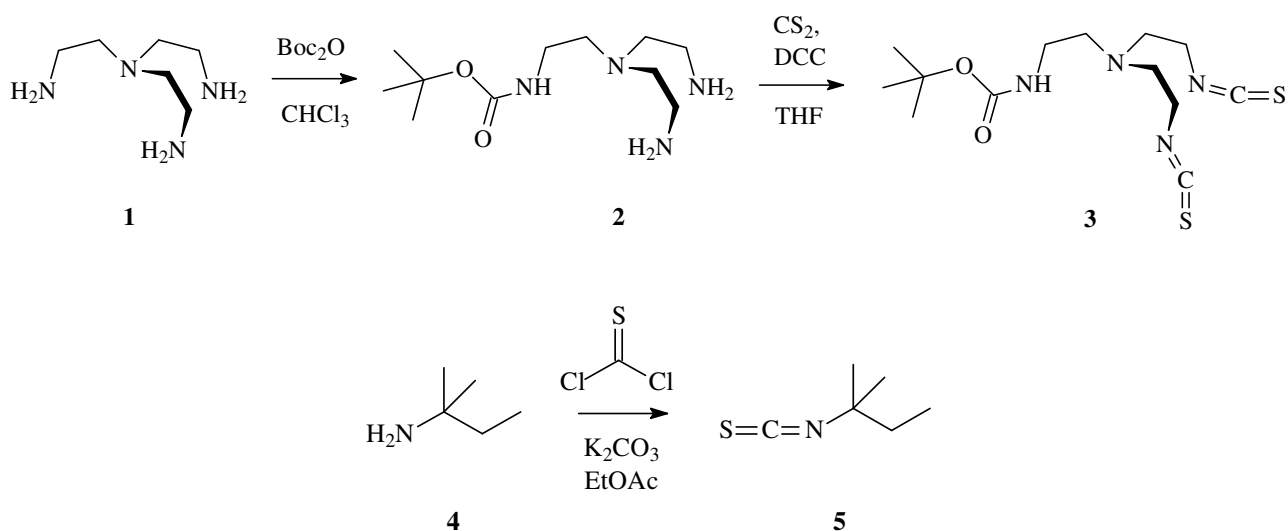
3.7.3 CONCLUSIONI

Il legante **L5**, derivato del fluoroforo HNBO, è stato sintetizzato con successo. Il composto presenta un anello macrociclico composto da quattro atomi donatori, S e N, che possono coordinare selettivamente catini metallici. Il legante è stato utilizzato come sensore fluorimetrico all'interno di membrane polimeriche. I risultati ottenuti indicano il potenziale utilizzo del legante come sensore simultaneo per la determinazione degli ioni Cd(II) e Zn(II) in soluzione acquosa a pH 7,5. Lo studio sarà approfondito attraverso ulteriori studi spettrofotometrici.

3.8 SVILUPPO DI TRASPORTATORI PER IONE CLORURO

3.8.1 SINTESI DEI TRASPORTATORI T1, T2, T3 E T4

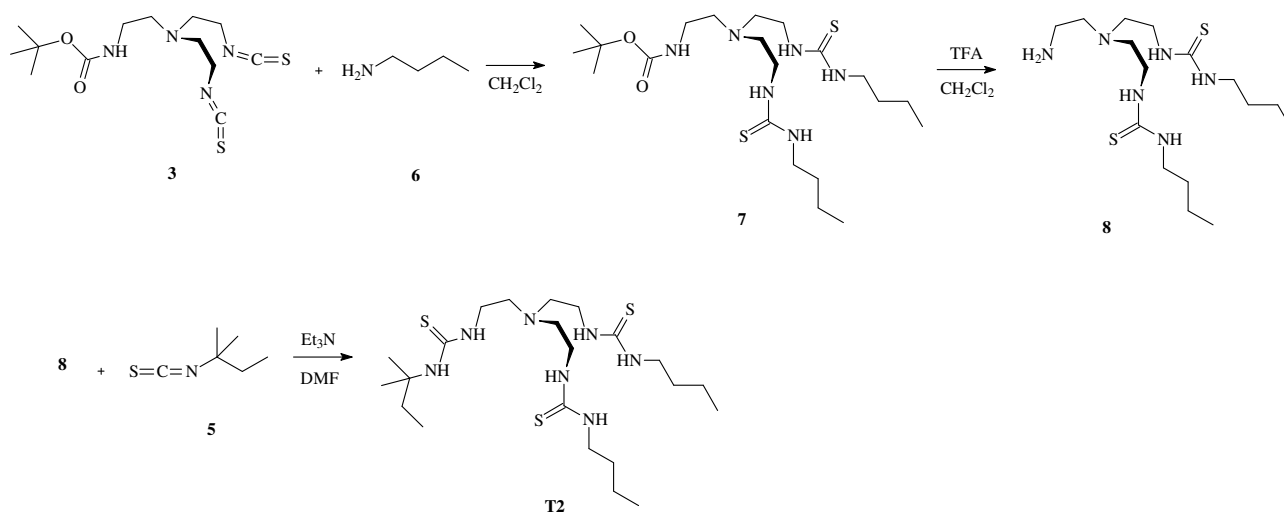
I composti analizzati per il trasporto di ione cloruro sono stati sintetizzati secondo la procedura indicate nello [Schema 9](#).



Schema 9 Sintesi dei composti precursori 3 e 5.

Per la sintesi di **T2**, **T3** e **T4** sono stati utilizzati come precursori i composti **3** e **5**. Il composto **3** è stato ottenuto in accordo con la procedura riportata nel riferimento.⁹⁹ Il composto tris(2-amminoetil)ammina **1** è stato protetto solamente su una funzione amminica con il gruppo metil-O-metilcloruro (Boc_2O), utilizzando il gruppo protettore in rapporto molare 1:10 con il composto amminico, la reazione è stata condotta in cloroformio a 0°C ottenendo il composto **2**; il prodotto formato è stato successivamente funzionalizzato a isotiocianato sugli atomi di azoto delle ammine secondarie per formare il composto **3**. Il composto **5** è stato ottenuto partendo dalla *tert*-amilammina, **4** in etilacetato utilizzando il tiofosgene in presenza di K_2CO_3 .

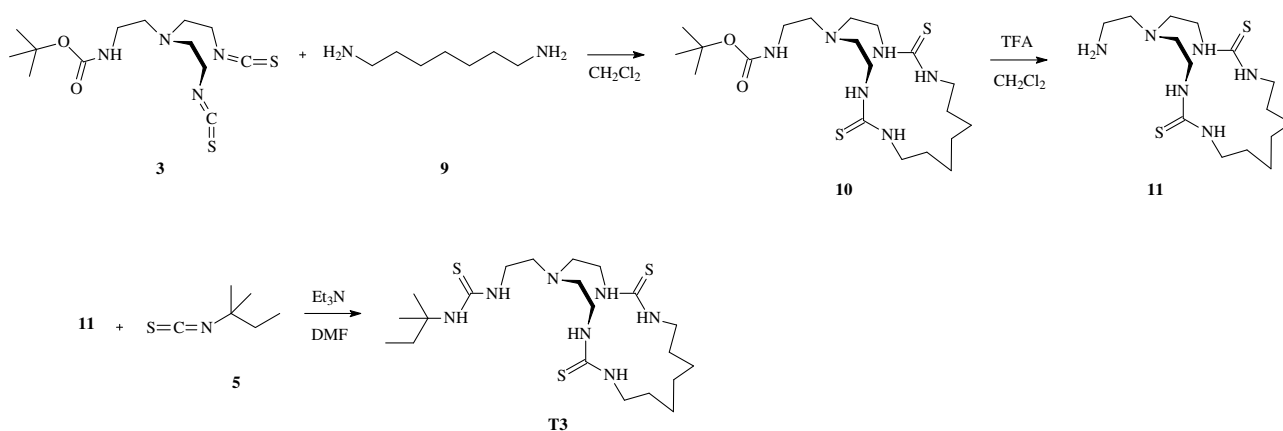
Sintesi di T2



Schema 10 Sintesi del nuovo composto T2.

Il composto **T2** è stato ottenuto ad alte rese seguendo la sintesi riportata nello [Schema 10](#). Dalla reazione di coupling dei precursori **3** e **6** in rapporto molare 1:2 in diclorometano a temperatura ambiente è stato ottenuto il prodotto **7**, il gruppo amminico è stato quindi deprotezionato mediante l'uso di acido trifluoroacetico in diclorometano. Il prodotto **8** ottenuto è stato utilizzato per la reazione successiva di accoppiamento con il composto **5** in DMF in presenza di tri-etilammina, per sintetizzare il nuovo trasportatore **T2**.

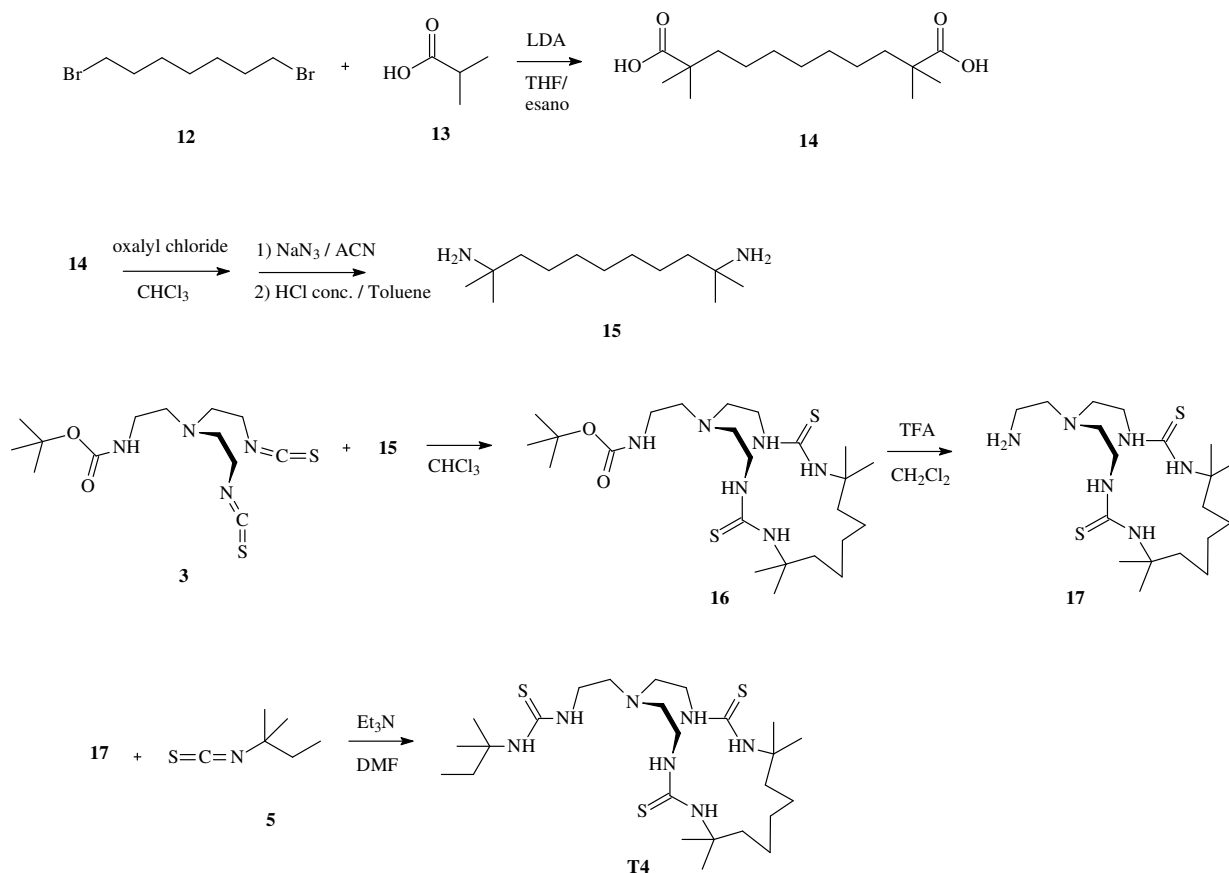
Sintesi di T3



Schema 11 Sintesi del composto T3.

Il nuovo composto **T3** è stato sintetizzato seguendo la procedura riportata nello [Schema 11](#). Il precursore **3**, precedentemente sintetizzato, è stato utilizzato per la reazione di ciclizzazione con due equivalenti di **9**, in diclorometano. Il composto **10** ottenuto è stato deprotetto con acido trifluoroacetico in diclorometano, il prodotto **11** è stato legato al frammento **5** precedentemente sintetizzato, in diclorometano e tri-etilammina. Il composto **T3** è stato sintetizzato in buone rese di reazione.

Sintesi di T4



Schema 12 Sintesi del composto **T4**.

Il secondo trasportatore macrociclico **T4** della serie di composti, è stato sintetizzato seguendo la procedura riportata nello [Schema 12](#). Innanzitutto è stato sintetizzato il precursore amminico, il composto **15**, partendo dalla formazione dell'acido 2,2,8,8-tetrametilnonan-dioico **14** per addizione del 1,5-dibromopentano **12** con l'acido isobutilico **13** e successiva riduzione ad ammina attraverso una reazione a tre step, in accordo con quanto riportato nel riferimento bibliografico.¹⁰⁰ Il composto **3** è stato quindi addizionato alla catena poliamminica **15** in rapporto molare stechiometrico, la ciclizzazione è avvenuta in cloroformio in condizioni di alta diluizione per evitare la formazione di prodotti di polimerizzazione. Il prodotto **16** è stato sintetizzato con successo ad alte rese, quindi è stato deprotezionato sulla funzione amminica primaria utilizzando acido trifluoro acetico in

diclorometano. Il composto **17** è stato impiegato per la reazione di formazione del trasportatore **T4**. Purtroppo non è stato possibile isolare il composto finale con un grado di purezza tale da effettuare i test di trasporto sui liposomi.

Pertanto solamente i nuovi composti **T2** e **T4** sono stati utilizzati per i saggi su vescicole, al fine di determinare il trasporto transmembrana dello ione cloruro e valutare la selettività di trasporto dell'anione rispetto a protoni o ione idrossido.

I due trasportatori sono analoghi strutturali, rispettivamente aciclico e macrociclico, i risultati ottenuti permetteranno di verificare l'effetto dell'incapsulamento dell'anione sulla selettività di trasporto.

3.8.2 STUDI DI TRASPORTO: METODO GENERALE DEL SAGGIO HPTS NMDG-Cl

Alla luce dei promettenti risultati ottenuti con il recettore **T1** come trasportatore transmembrana parzialmente selettivo per l'anione cloruro, sono stati progettati i composti **T2** e **T3** e sono sintetizzati con successo. I recettori sono stati studiati per la loro capacità come trasportatori ionici attraverso il doppio strato lipidico di membrana ed è stata indagata una eventuale selettività per l'anione cloruro rispetto a H^+/OH^- mediante il saggio specifico HPTS NMDG-Cl su liposomi che permette di rilevare la dissipazione protonica (e ioni idrossilici) mediante il cambiamento di pH interno alle vescicole. Sono state eseguite quattro differenti analisi per ogni trasportatore testato: 1) su liposomi non trattati, 2) su liposomi trattati con albumina sierica bovina (BSA) per rimuovere residui di acidi grassi dalla membrana fosfolipidica, 3) su liposomi non trattati in presenza di acido oleico (OA) e 4) su liposomi non trattati in presenza di gramicidina (Gra).

I composti analizzati come trasportatori possono dissipare il gradiente protonico tramite un meccanismo di simporto H^+/Cl^- oppure di antiporto Cl^-/OH^- . La gramicidina D è nota essere un ionoforo per protoni, è stata utilizzata per valutare la dissipazione del gradiente di pH indotto dal composto testato. In altre parole, se il trasporto di ioni H^+/OH^- è modesto, significa che i processi di

simporto per H^+/Cl^- o di antiporto per Cl^-/OH^- sono limitati, il che si traduce come un'elevata selettività per il trasporto di ione cloruro rispetto a quelle di H^+/OH^- da parte del composto in analizzato; inoltre la risposta dell'HPTS sarà accelerata dall'aggiunta gramicidina D la quale facilita il trasporto dei protoni. Al contrario, se il valore della risposta ottenuta dall'HPTS non sarà influenzata dalla presenza di gramicidina D, significa che il trasporto degli ioni H^+/OH^- è più veloce di quello dell'anione cloruro.

Il saggio prevede l'utilizzo di fosfolipidi POPC per la formazione di liposomi, caricati all'interno con una soluzione a $pH = 7,0$ tamponata con HEPES (10 mM), in presenza dell'indicatore di fluorescenza HPTS (1 mM), N-metil-d-glucamina cloruro (NMDG-Cl) come fonte di ione cloruro (100 mM), poi sospesi ad una concentrazione di 0,1 mM nella stessa soluzione di HEPES e NMDG-Cl eccetto HPTS. La soluzione esterna è stata portata a $pH = 8$ mediante un'ulteriore aggiunta della base NMDG (5 mM) ottenendo così un gradiente di concentrazione protonico. Ogni saggio prevede l'aggiunta del trasportatore in esame, **T2** o **T3**, a diverse concentrazioni alla sospensione contenente i liposomi; per ogni campione abbiamo monitorato l'emissione di fluorescenza di HPTS intra-vescicolare a due diverse lunghezze d'onda al tempo 0, corrispondente alla formazione del gradiente di pH, e dopo 200 sec.

3.8.2.1 Risultati e Discussione del Saggio HPTS NMDG-Cl per la Selettività di Trasporto

I composti **T2** e **T3** studiati attraverso il saggio HPTS NMDG-Cl, per ognuno di essi sono stati effettuate quattro analisi, a differenti concentrazioni molarie % di composto rispetto alla concentrazione di lipidi in soluzione (almeno 6 concentrazioni):

1. Liposomi non trattati, in presenza solo del trasportatore in esame,
2. Liposomi trattati con BSA (1 mol%)
3. Liposomi non trattati, in presenza di acido oleico (2 mol%)

4. Liposomi non trattati, in presenza di gramicidina D (0,1 mol%).

Soluzione esterna:

pH 8

HEPES (5 mM)

NMDG-Cl (100 mM)

NMDG (5 mM)

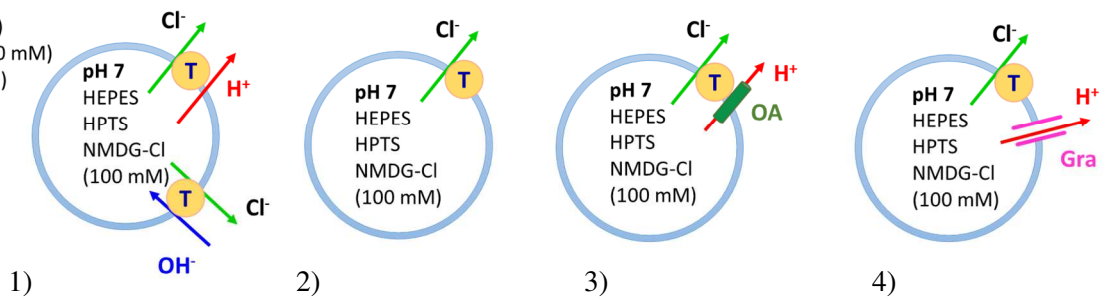
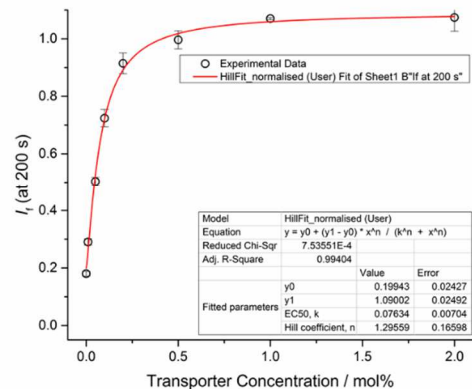
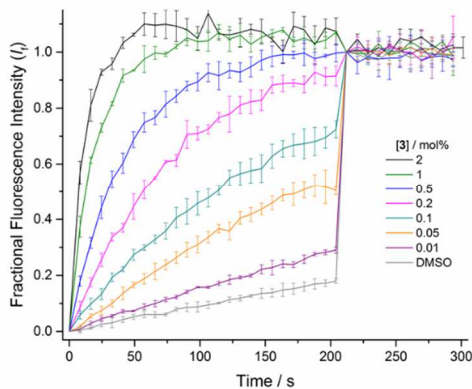


Figura 66 Rappresentazione schematica del saggio NMDG-Cl con HPTS per il trasporto di Cl^- rispetto a H^+/OH^-

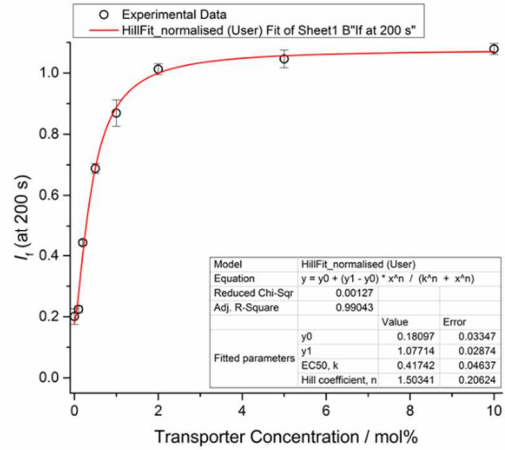
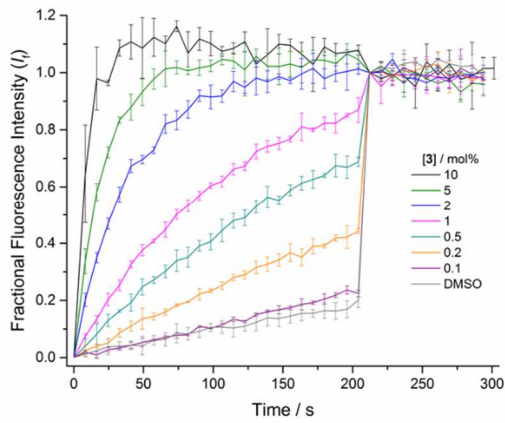
Per ogni saggio sono stati acquisiti gli spettri di emissione di fluorescenza e sono stati costruiti i grafici Hill Plot, sono stati riportati nelle figure Figura 67 e Figura 68.

• **Composto T2:**

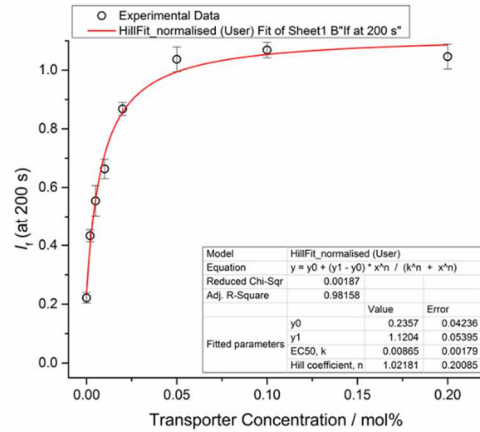
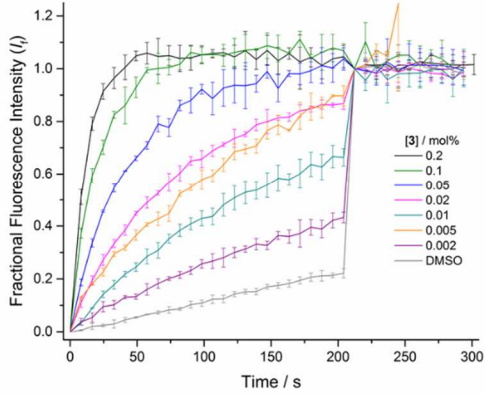
1) Liposomi non trattati (in assenza di gramicidina e acido oleico) (N.T.):



2) Liposomi trattati con BSA:



3) Liposomi non trattati in presenza di acido oleico (OA):



4) Liposomi non trattati in presenza di gramicidina (Gra):

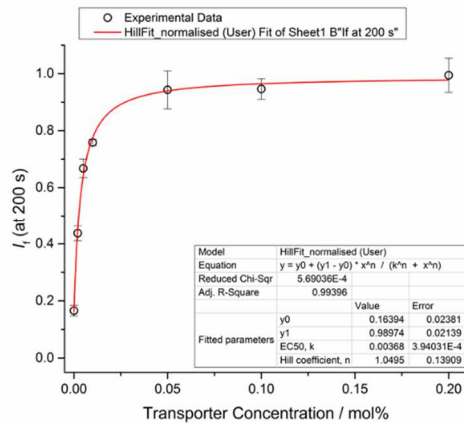
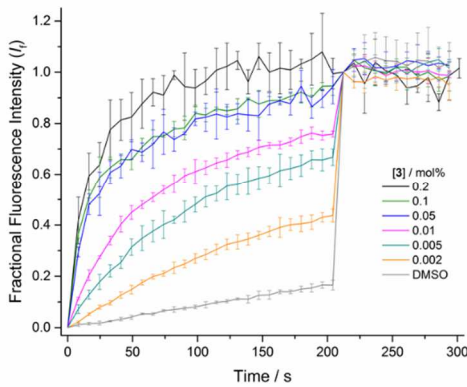
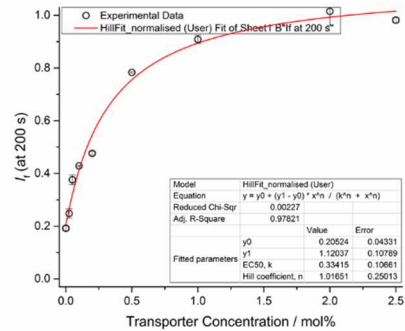
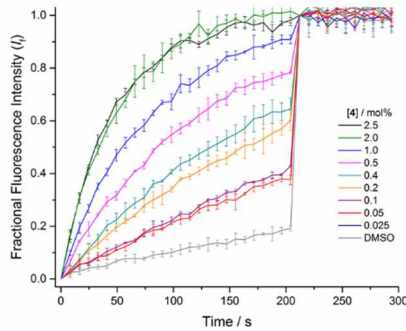


Figura 67 Hill plot dei test di simporto H^+/Cl^- o di antiporto Cl^-/OH^- trasportati dal composto **T2** in (1) liposomi non trattati in assenza di gramicidina e in assenza di acido oleico, (2) liposomi trattati con BSA (in assenza di gramicidina), (3) liposomi non trattati in presenza di acido oleico (2 mol%) e (4) liposomi non

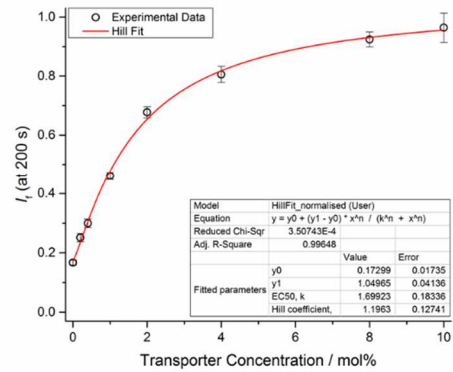
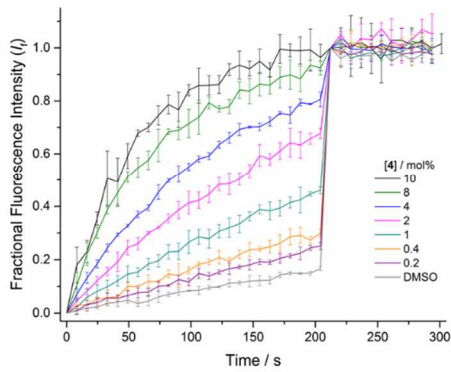
trattati in presenza di gramicidina (0,1 mol%). La concentrazione molare è riferita alla concentrazione dei lipidi in soluzione. Il trasportatore analizzato è stato addizionato a 0 sec e il detergente è stato addizionato a 200 sec. L'errore è rappresentato dalla barra SD ed è calcolata da almeno due ripetizioni.

- **Composto T3:**

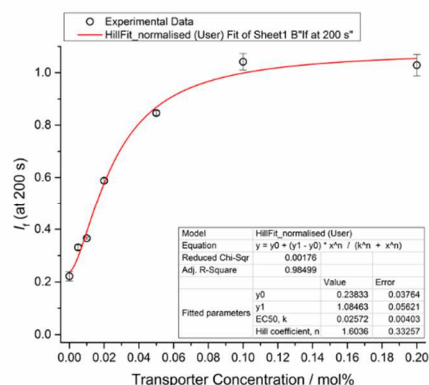
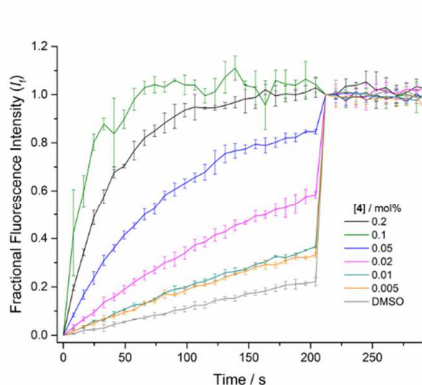
1) Liposomi non trattati (in assenza di gramicidina e acido oleico) (N.T.):



2) Liposomi trattati con BSA:



3) Liposomi non trattati in presenza di acido oleico (OA):



4) Liposomi non trattati in presenza di gramicidina (Gra):

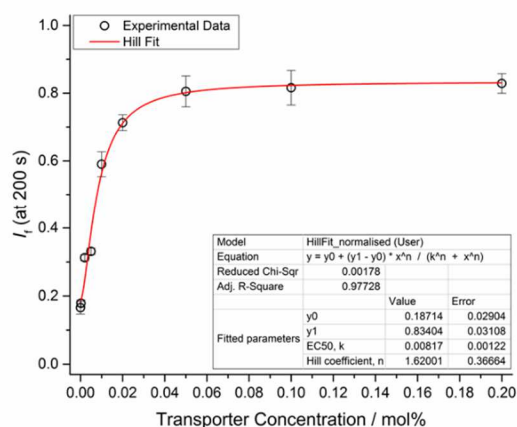
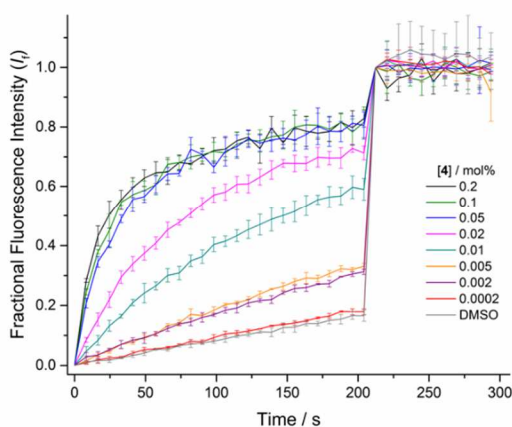


Figura 68 Hill plot dei test di simporto H^+/Cl^- o di antiporto Cl^-/OH^- trasportati dal composto **T3** in (1) liposomi non trattati in assenza di gramicidina e in assenza di acido oleico, (2) liposomi trattati con BSA (in assenza di gramicidina), (3) liposomi non trattati in presenza di acido oleico (2 mol%) e (4) liposomi non trattati in presenza di gramicidina (0,1 mol%). La concentrazione molare è riferita alla concentrazione dei lipidi in soluzione. Il trasportatore analizzato è stato aggiunto a 0 sec e il detergente è stato aggiunto a 200 sec. L'errore è rappresentato dalla barra SD ed è calcolata da almeno due ripetizioni.

Dagli Hill Plot ottenuti, sono stati ricavati i valori di EC_{50} per ogni saggio effettuato con **T2** e con **T3**, i dati sono riportati in

Tabella 4. Per ogni composto sono stati inoltre calcolati i logP mediante il software VCClab,¹⁰¹ utili per valutare l'intercalazione dei composti attraverso il doppio strato lipidico.

Composto	ALogPs	EC ₅₀ (mol %)			
		N.T.	BSA	OA	GRA
T2	3.09	0.07634	0.41742	0.01125	0.00368
T3	2.21	0.33415	1.69923	0.02572	0.00817
Composto	Selettività (S)				
	N.T.	BSA	OA		
T2	21	113	3.1		
T3	41	208	3.1		

Tabella 4 Nella tabella sono riportati i dati ottenuti dagli Hill Plot per i composti **T2** e **T3** attraverso i saggi HPTS NMDG-Cl in assenza e in presenza di gramicidina. I valori di AlogP sono stati calcolati con VCCLab. Le vescicole (LUVs) sono stati ottenuti con lipidi POPC di diametro 200 nm, sono state caricate con una soluzione pH 7 HEPES (10 mM), HPTS (1 mM) e NMDG-Cl (100 mM). Sono state sospese in una soluzione esterna pH 7 HEPE (10 mM) e NMDG-Cl (100 mM).

Per quantificare la selettività (S) per l'anione cloruro rispetto a trasporto degli ioni H⁺/OH⁻, si riportano i valori di EC₅₀ ottenuti in assenza e presenza di gramicidina (valore S riportato nella *Tabella 4*).

$$S = \frac{EC_{50} \text{ in assenza di Gra}}{EC_{50} \text{ con Gra}}$$

Il valore EC₅₀ ottenuto in presenza di gramicidina viene perciò utilizzato per valutare l'attività di trasporto del cloruro, poiché in questa condizione il composto in esame dovrà solamente veicolare l'anione cloruro per dissipare il gradiente di pH, perché la permeazione protonica è facilitata dalla gramicidina. Il valore di EC₅₀ può anche essere utilizzato per calcolare il rapporto stechiometrico del complesso *host-guest* coinvolto nel trasporto, interessante per studiarne il meccanismo.

Come precedentemente descritto, gli acidi grassi presenti nella membrana sfruttano le interazioni ioniche e legami a idrogeno, che si creano tra la porzione carbonilica e le gli atomi donatori delle

tiouree nei composti trasportatori nella parte esterna della membrana fosfolipidica dei liposomi, per bypassare le repulsioni elettrostatiche e ruotarsi verso la parte interna del doppio strato lipidico. Questo meccanismo è chiamato “flip-flop”, e consente agli acidi grassi di veicolare, attraverso la protonazione e deprotonazione, ioni H^+ verso l'esterno dei liposomi. I saggi effettuati in assenza di acidi grassi, rimossi per trattamento delle vescicole con BSA, permettono di comprendere meglio la selettività del trasportatore nei confronti dello ione Cl^- , eliminando ogni altra interazione. Mentre quelle condotte in presenza di un eccesso di acido oleico, permettono di comprendere l'affinità dei trasportatori per la porzione carbonilica degli acidi grassi di membrana; informazione di fondamentale importanza sia per valutare la selettività del trasportatore nei confronti dell'anione cloruro rispetto al gruppo carbossilico sia per valutare l'effetto elettrogenico del composto, cruciale per un possibile impiego delle molecole su cellule *in vivo*.

Analizzando i dati ottenuti, si osserva che entrambi i composti raggiungono elevati valori di selettività nei saggi su liposomi trattati con BSA, i valori sono $S= 113$ per il composto **T2** e $S= 208$ per il composto **T3**. I risultati registrati suggeriscono che i trasportatori, in queste condizioni, sono altamente selettivi per il trasporto di cloruro rispetto agli ioni H^+ e OH^- . La selettività è attribuibile sia all'elevata acidità delle tre tiouree presenti nelle strutture che sfavoriscono il legame di H^+ favorendo quello per gli anioni, che alla presenza di atomi donatori più affini all'anione cloruro rispetto allo ione idrossilico. Inoltre, come precedentemente ipotizzato, il trasportatore **T3** mostra una selettività pari al doppio del valore di quella del composto **T2**, confermando che il macrociclo aumenta l'incapsulamento dell'anione favorendo il legame del cloruro rispetto a quella di OH^- , presumibilmente per un fattore entalpico legato all'energia di desolvatazione della specie. La selettività testata su liposomi non trattati non è altrettanto elevata, tuttavia quella del composto macrociclico risulta anche in questo caso il doppio rispetto a quella del suo analogo aciclico ($S= 21$ per **T2**, $S= 41$ per **T3**). Una situazione differente è stata riscontrata per quanto riguarda i saggi su liposomi trattati con un eccesso di acido oleico, infatti in questo caso, la selettività decresce drasticamente e risulta pari a 3,1 per entrambi i trasportatori. È stato ipotizzato che la struttura

macrociclica non è abbastanza rigida per eliminare o ridurre le interazioni con il gruppo carbonilico degli acidi grassi di membrana. La flessibilità dei composti rendono accessibile la cavità di legame, diminuendo la coordinazione dello ione cloruro. Inoltre, i bassi valori di logP potrebbero influire negativamente sull'intercalazione dei composti nel doppio strato lipidico di membrana.

3.8.3 CONCLUSIONI

I nuovi composti tripodali **T2**, **T3** e **T4** sono stati sintetizzati, sono derivati del composto **T1** e il sito di legame presenta tre tiouree sostituite. I composti **T2** e **T3** sono stati purificati con successo e sono stati studiati per le loro proprietà di coordinazione e di trasportato transmembrana attraverso saggi HPTS NMGD-Cl su liposomi. I carrier sono stati confrontati al fine di valutare gli effetti del macrociclo sulla selettività di trasporto dello anione cloruro rispetto a ioni H^+/OH^- . I composti hanno mostrato avere la capacità di legare e trasportare il cloruro con una elevata efficienza in assenza di acidi grassi. In particolare, i dati ottenuti dimostrano che il macrociclo **T3** possiede una selettività per l'anione Cl^- di circa il doppio rispetto a quella del suo analogo aciclico **T2**, dimostrando che l'incapsulamento migliora la selettività di trasporto. Lo stesso risultato non è stato riscontrato in presenza di un eccesso di acidi grassi, probabilmente in seguito al basso indice di lipofilia dei composti, che intercalano con maggior difficoltà nel doppio strato lipidico di membrana, e alla flessibilità del sito di legame. Il macrociclo non è abbastanza rigido da sfavorire il legame con il gruppo carbossilico degli acidi grassi, pertanto si ha una significativa diminuzione della selettività di trasporto per l'anione rispetto alla veicolazione di H^+ . Tuttavia i risultati sono promettenti e saranno effettuati ulteriori studi di trasporto.

Il secondo trasportatore macrociclico **T4** sarà analizzato e confrontato con il corrispondente composto analogo aciclico **T1** per le sue capacità di trasportatore e selettività per il cloruro. Una minor flessibilità e maggiore rigidità potrebbero essere cruciali per eliminare l'interazione con gli acidi grassi e ridurre il trasporto di H^+ .

Capitolo 4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 SPETTROSCOPIE

Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

Gli spettri ^1H -NMR e ^{13}C -NMR, sono stati registrati con un macchinario Bruker Advance 400 che opera ad una frequenza di 400.13 MHz per lo spettro ^1H e a 100.16 MHz per lo spettro ^{13}C , equiparati con una sonda a gradiente diretto PABBO-Z e un'unità di temperatura variabile. Gli spettri ^1H e ^{13}C sono riferiti ai segnali dei solventi residui. I chemical shifts sono stati riportati in ppm (δ) utilizzando come riferimento il trimetilsilano ($\delta = 0$ ppm) oppure, in soluzione acquosa, HOD ($\delta = 4,75$ ppm) per ^1H e il diossano ($\delta = 67,4$ ppm) per ^{13}C . L'assegnazione dei segnali di risonanza sono stati supportati da 135-DEPT ed esperimenti 2D. Gli esperimenti a due dimensioni (COSY, NOESY e HMQC) sono stati registrati utilizzando una sequenza standard Bruker a impulsi. Gli esperimenti 2D-NOESY sono stati registrati utilizzando una tempo di mescolamento (d8) di 0.35 sec. Titolazioni ^1H NMR sono state condotte in un solvente misto di CD_3CN e D_2O a pH= 7,4. Tutti i reagenti e solventi utilizzati puri per analisi.

Spettroscopia elettronica ultravioletto-visibile (UV-Visibile)

Gli spettri elettronici UV-Visibile sono stati registrati utilizzando unospettrofotometro Varian mod. Cary 100 SCAN con partacelle termostattizzato a 25°C , per le misurazioni sono state utilizzate celle di quarzo da 1 cm.

Spettroscopia di emissione di fluorescenza

Lo spettro di emissione di fluorescenza è stato registrato a 298 K mediante lo spettrofotometro Varian Cary-Eclipse. La resa quantica (Φ_f) è stata determinata dal comparando lo spettro di fluorescenza registrato per il composto in esame con quello del composto di riferimento 2,2'-bifenolo in acetonitrile ($\Phi_f = 0,29$).¹⁰²

Spettroscopia di massa (ESI)

Gli spettri di massa sono stati registrati con la tecnica ESI su uno spettrometro ThermoQuest LCQ Duo LC/MS/MS.

Diffrattometria ai raggi X

Le strutture cristalline riportate sono state determinate con il metodo della diffrattometria ai raggi X su cristallo singolo. Per la raccolta dei dati è stato utilizzato un diffrattometro Xclibur della ditta Oxford Diffraction dotato di CCD area detector e un monocromatore di grafite per la radiazione Mo K α (0,71070 Å). I dati sono stati raccolti con l'aiuto del programma CrysAlis CCD mentre la riduzione è stata condotta con il programma CrysAlis RED. La correzione di assorbimento è stata applicata ai dati attraverso il programma SABADS. Le strutture sono state risolte utilizzando il metodo Walzer e Stuart attraverso il programma SIR97 e affinate in accordo con il metodo dei minimi quadrati (SHELX97).

Gli atomi di idrogeno sono stati generalmente introdotti in porzioni calcolate e le loro coordinate raffinate isotropicamente tenendo conto delle interazioni di legame formate dagli atomi a cui sono legati. Le coordinate degli atomi diversi dall'idrogeno sono state, invece, affinate anisotropicamente per un basso rapporto atomi osservati/parametri. I fattori di scattering e le dispersioni anomale sono state corrette seguendo il protocollo descritto nel riferimento bibliografico. Tutti i disegni riportati sono stati elaborati con il programma ORTEP3. Infine, le lunghezze e gli angoli di legame sono stati calcolati con il programma PARST97.

4.2 POTENZIOMETRIA

Le misure potenziometriche sono state effettuate mediante un sistema potenziometrico automatizzato costruito dalle seguenti parti:

- Potenzimetro da ricerca Metrohom 713 pH-meter
- Buretta automatica Metrohom 765 Dosimat
- Agitatore meccanico Metrohom 728 Stirrer
- Cella termostatica dalla capacità di circa 50 cm³ termoregolata mediante circolazione di acqua
- Elettrodo a vetro da ricerca Metrohom 6.0232.100
- Pc con tutte le sue parti hardware

Tutte le soluzioni usate per le misure potenziometriche sono state preparate con acqua bidistillata, disareata per ebollizione, raffreddata in ambiente inerte, successivamente passate sotto un sistema Millipore, che garantisce l'eliminazione di specie ioniche e sostanze organiche. Le soluzioni di NaOH, HCl e NMe₄OH sono state preparate impiegando prodotti commerciali di elevata purezza, e le loro concentrazioni sono state determinate seguendo procedure analitiche standard.

Tutte le misure sono state effettuate a $25,0 \pm 0,1$ °C ($298 \pm 0,1$ K). Durante le misure è stato mantenuto all'interno della cella un flusso continuo di azoto, al fine di evitare la carbonatazione delle soluzioni in esame. Prima di entrare in cella, il gas è fatto passare attraverso una bottiglia di lavaggio contenente una soluzione concentrata di NaOH concentrato e successivamente in una seconda bottiglia di lavaggio contenente lo stesso mezzo ionico utilizzato nelle misure potenziometriche. Questo passaggio è necessario per eliminare tutte le eventuali tracce di CO₂ presenti nel gas e di presaturare il gas in vapore acqueo prima dell'ingresso nella cella. Le misure sono condotte a forza ionica costante utilizzando soluzioni di NaCl, NMe₄Cl o NMe₄NO₃ 0,15 M.

Il pc, sulla base dello schema fornito dal programma installato, controlla il sistema di misura regolando le aggiunte di soluzione titolante ed eseguendo letture dei valori di forza elettromotrice (f.e.m.). Quest'ultima operazione è resa possibile dall'interfaccia che collega il potenziometro al computer. Il programma richiede dei parametri di input, che sono scelti in modo da definire le caratteristiche dell'acquisizione potenziometrica:

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

Inseriti questi dati al pc, il potenziometro misura i valori di f.e.m. che vengono misurati dal potenziometro. Nell'intervallo di tempo stabilito secondo il parametro 2, vengono raccolti dieci valori di f.e.m. ed il valore medio così determinato (lettura) viene memorizzato e visualizzato sul video, accanto ad un numero progressivo. Questa procedura è ripetuta fino a quando non si ottiene un gruppo di dieci letture, di queste il computer calcola il valore medio e determina se la deviazione standard sul valor medio è maggiore o minore della tolleranza impostata, parametro 3. Se il numero di letture effettuate è uguale al numero massimo prestabilito dal parametro 1, il computer memorizza e stampa sulla stessa riga il volume di titolante aggiunto, il valor medio delle ultime dieci letture, il numero di letture eseguite ed un segnale grafico che indica se la deviazione standard sul valor medio è superiore alla tolleranza imposta per la stessa. Nel caso in cui, invece, il numero di letture eseguite è inferiore al numero massimo imposto, il sistema effettua un'altra lettura, calcola il valore medio delle ultime dieci misure, ed esegue nuovamente il controllo sulla deviazione standard. Tale sequenza può protrarsi fino al raggiungimento del massimo numero di letture imposto. Nel caso in cui deviazione standard sul valor medio sia inferiore alla tolleranza imposta, viene calcolata la differenza fra il primo

ed il decimo valore di f.e.m., usati per calcolare il valor medio, e viene controllato che il valore assoluto di questa differenza non superi il valore fissato per la tolleranza sulla deriva (parametro 4). In questo modo vengono scartati quei valori che, anche se rispettano la condizione imposta sulla deviazione standard, sono il risultato di una serie di letture di f.e.m. di cui l'ultima e la prima sono molto diverse. Se quest'ultima condizione non è verificata, viene eseguita una nuova lettura, calcolato il nuovo valore medio e controllati i valori della deviazione standard e della deriva. Altrimenti, se tutti i valori risultano positivi, il computer considera valida la misura, memorizza i dati e procede per un'altra aggiunta.

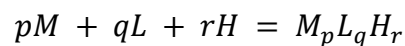
I dati potenziometrici sono stati acquisiti utilizzando il programma PASAT e sono stati elaborati con il programma di calcolo HYPERQUAD2003.

4.2.1 METODI DI CALCOLO

La determinazione delle costanti di equilibrio sarebbe semplice se fosse possibile ottenere una misura diretta della concentrazione all'equilibrio di tutte le specie presenti in soluzioni, è evidente che questo generalmente non è possibile. D'alto canto è possibile mettere in relazione la concentrazione di uno dei componenti con le costanti di equilibrio e le concentrazioni iniziali del sistema, per cui, in principio, la misura della variazione della concentrazione di questa sola specie, con la composizione totale del sistema, può permettere la determinazione delle costanti di equilibrio. Tale determinazione può esser fatta per via potenziometrica, attraverso la misura della differenza di potenziale esistente tra un elettrodo di riferimento ed un altro elettrodo, il cui potenziale è funzione della concentrazione della specie considerata. Nel caso degli equilibri di complessazione, in cui sono coinvolti un legante protonabile, la determinazione delle costanti di equilibrio può essere effettuata mediante la misura, con un elettrodo a vetro, misurando la concentrazione dello ione idrogeno. La concentrazione dello ione H^+ in soluzione ed il suo potenziale, sono in relazione tra loro secondo l'equazione di Nernst:

$$E = E^0 + \left(\frac{RT}{F}\right) \ln[H^+]$$

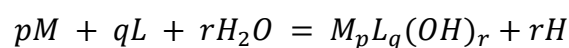
E° deve essere determinato sperimentalmente per le condizioni specifiche delle misure potenziometriche a breve distanza da esse. La calibrazione dell'elettrodo di riferimento nelle condizioni sperimentali impiegate, cioè la determinazione di E° , si realizza attraverso la titolazione di una quantità esattamente nota di un acido forte con una base forte, nel nostro caso è stato determinato con la procedura del Gran. Dalla stessa titolazione si ottiene il valore di E^0 e il prodotto ionico dell'acqua K_w . In forma generale, la formazione in soluzione di acquosa di un complesso derivante dall'interazione di uno ione metallico M con un legante L protonabile può essere espressa con la seguente equazione (le cariche sono state omesse per semplicità):



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

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

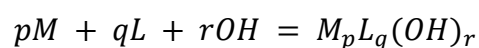
Nel caso di specie ossidrilate la costante β'_{pqr} sarà riferita all'equazione:



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

$$\beta'_{pqr} = \frac{[M_pL_q(OH)_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r}$$

riferita all'equilibrio:



mediante il prodotto ionico dell'acqua:

$$\beta_{pqr} = \beta'_{pqr}K_qr$$

Nel corso di una misura potenziometrica la soluzione conterrà ad ogni punto quantità note di metallo, legante ed acido. Le concentrazioni totali sono totali di queste tre specie sono definite da:

$$TM = [M] + \sum_{pqr} p[M_p H_q H_r]$$

$$TL = [L] + \sum_{pqr} q[M_p H_q H_r]$$

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

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

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

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

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

Sperimentalmente, si misura la concentrazione dello ione idrogeno libero e si ottiene la curva di titolazione sperimentale riportando il potenziale di elettrodo contro volume di titolante aggiunto. Così che a ciascun punto sperimentale corrisponde un sistema di tre equazioni in n+2 incognite, dove n è il numero di specie formate. Per N punti sperimentali avremo un sistema di 3N equazioni in n+2N incognite. Il trattamento matematico di tale sistema è estremamente complicato per cui si ricorre a metodi di calcolo iterativi che richiedono l'impiego di un computer. Le costanti di stabilità riportate in questa tesi sono state ottenute con il programma di calcolo HYPERQUAD 2003.

4.3 HILL PLOT: SAGGIO HPTS NMGD-Cl

Per il saggio di trasporto HPTS sono state utilizzate larghe vescicole unilamellari (LUVs) preparate con i lipidi POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; di diametro 200 nm) mediante la tecnica riportata nel riferimento bibliografico.¹⁰³ Sono state caricate con HPTS (1 mM)

e NMDG-Cl (100 mM), in una soluzione a pH = 7 con 10 mM HEPES. Le vescicole sono state sospese in una soluzione esterna di NMDG-Cl (100mM) a pH = 7 con 10 mM HEPES. Una soluzione di POPC in cloroformio è stata evaporata a pressione ridotta, il film lipidico residuo è stato lasciato asciugare sottovuoto per almeno 6 ore. Poi, è stato disciolto nella soluzione interna di HEPES. La sospensione è stata sottoposta a cicli di congelamento/riscaldamento per 9 volte e quindi estratta 25 volte attraverso una membrana di policarbonato con pori di 200 nm. L'eccesso di HPTS è stato rimosso mediante cromatografia ad esclusione in una colonna Sephadex G-25 usando la soluzione esterna di HEPES come eluente. Al tempo 0 sec è stato aggiunto NMDG (5 mM) per creare un gradiente di pH. La concentrazione lipidica è di 0,10 mM. Lo spettro ottenuto è stato registrato dividendo l'emissione per $\lambda_{ex} = 460$ nm, $\lambda_{em} = 510$ nm, con quella a $\lambda_{ex} = 403$ nm, $\lambda_{em} = 510$ nm, relative alle due forme acida e basica, pH dipendenti, del fluoroforo. Dopo 200 secondi dall'aggiunta del composto in esame, si aggiunge un detergente, per lisare i liposomi e annullare il gradiente di pH, per calibrare perciò il saggio e raggiungere l'intensità di emissione di fluorescenza massimale. La frazione dell'intensità di fluorescenza (I_f) si calcola secondo la seguente equazione:

$$I_f = \frac{R_t - R_0}{R_d - R_0}$$

dove R_t è il rapporto dell'emissione di fluorescenza al tempo t , R_0 è il rapporto dell'emissione al tempo t_0 e R_d è il rapporto di fluorescenza dopo l'aggiunta di detergente. Per elaborare i dati ottenuti si ricorre all'utilizzo dell'equazione di Hill, che correla la frazione dell'intensità di fluorescenza I_f a 200 sec con la concentrazione del trasportatore ottenuto graficamente come EC_{50} (concentrazione per ottenere il 50% dell'effetto massimale):

$$y = V_{max} \frac{x^n}{k + x^n} = 100\% \frac{x^n}{(EC_{50})^n + x^n}$$

In cui y è la quantità di efflusso di ione cloruro a 200 sec, x è la concentrazione del trasportatore (come mol % rispetto alla concentrazione molare dei lipidi), V_{max} è il massimo di efflusso (generalmente fissato come la massima quantità di cloruro che può effluire 100 %), n è il coefficiente

di Hill e k è la concentrazione del trasportatore necessario per raggiungere il 50 % dell'efflusso di ione cloruro, EC_{50} . Il valore di EC_{50} sarà inoltre utilizzato per calcolare la selettività di trasporto e per calcolare il rapporto stechiometrico del complesso *host-guest* coinvolto nel trasporto.

La curva dose-dipendente Hill plot è stata formata dal coefficiente Hill (n) e dalla concentrazione per raggiungere il 50% del trasporto massimo (EC_{50}) a 200 sec. La concentrazione dei composti analizzati si riferisce alla concentrazione molare % rispetto a quella dei lipidi. Il detergente utilizzato per lisare i liposomi è il triton X-100 in 7:1 (v/v) H₂O/DMSO, 20 μ L 11% m/v.

4.4 METODI GENERALI DI SINTESI

Le reazioni sono state condotte in ambiente anidro e mantenute in atmosfera inerte di azoto. I solventi utilizzati sono stati forniti anidri dalla ditta produttrice in contenitori a tenuta sure-seal.

Le cromatografie su strato sottile (Thin Layer Chromatography) sono state realizzate su fogli di gel di silice pronti per l'uso, TLC Silica gel 60 F₂₅₄ della ditta Merck o su fogli di alluminio ossido pronti per l'uso, Aluminum on TLC-PET G/UV₂₅₄ della ditta Fluka.

Le TCL sono state controllate mediante lampada UV MODEL UVG-11 Mineralight lamp operante ad una lunghezza d'onda $\lambda = 254$ nm, oppure quando le condizioni non lo permettevano, sviluppate in:

- soluzione acida di una miscela contenente $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ e $(NH_4)_4Ce(SO_4)_4$ chiamata "svilupina";
- soluzione basica di $KMnO_4$;
- soluzione di 2,2-dihydroxyindane-1,3-dione (Ninhydrin).

Per la purificazione dei prodotti per flash-cromatografia, è stato utilizzato gel di silice 60 (70-230 mesh ASTM) o alluminio ossido attivo neutro (70-230 mesh ASTM) prodotti dalla Merck.

I prodotti acquistati (starting material e reattivi), se non specificato diversamente, sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

4.5 SINTESI DEL LEGANTE L1:

Il legante **L1** è stata ottenuto seguendo la procedura riportata nella *Schema 1* e nello *Schema 2*.

2-(6-metil-2-piridil)-5-fenil-[1,3,4]ossadiazolo (4): Un soluzione di acido 6-metil-2-piridincarbossilico **1** (7 g, 0,05 mol), tionil cloruro (35 mL, 0,5 mol) e DMF (2,5 mL) sono stati riscaldati a refluxo per 90 min in diclometano anidro (165 mL). La miscela contenente il cloruro acilico **2** è stato evaporato ed essiccato sotto vuoto. Il solido residuo è stato disciolto in 1,4-diossano anidro (100 mL) e la benzidrazide **3** (7 g, 0,05 mol) è stata aggiunta alla soluzione. La miscela di reazione è stata riscaldata a refluxo per circa 12 ore, fino a cessazione dei vapori di HCl, quindi è stato aggiunto POCl₃ (8,3 mL) e la reazione è stata ulteriormente scaldata per altre 3 ore. La reazione, portata a temperatura ambiente, è stata purificata per cauta aggiunta di 165 mL di acqua e ghiaccio, e poi neutralizzata per aggiunta di Na₂CO₃ ottenendo la formazione di un precipitato. Il solido è stato filtrato, lavato con acqua e asciugato a 60 ° C sottovuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante colonna cromatografica (gel di silice, CHCl₃). Il composto ottenuto si presenta come solido bianco (6 g). Resa: 50 %. MS m/z (ESI): 238,1 (M+1⁺). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.23 (2H, m), 8.10 (1H, d, J= 7.8 Hz), 7.79 (1H, t, J=7.8 Hz), 7.55 (3H, m), 7.34 (1H, d, J= 7.6 Hz), 2.71 (3H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 165.3, 164.0, 142.9, 137.3, 131.9, 129.0, 127.2, 125.6, 123.6 120.4, 24.6 ppm; Anal. Per C₁₄H₁₁N₃O (237.3): Calc. C 70.87, H 4.67, N 17.71; Trovato C 70.7, H 4.6, N 17.6.

2-(6-dibromometil-2-piridil)-5-fenil[1,3,4]ossadiazolo (5): Il composto **4** (6 g, 0,025 mol), N-bromosuccinimide (9,8 g, 0,055 mol) e 2,2'-azobis(2-metilpropionitrile) (125 mg, 0,75 mmol) sono stati disciolti in 240 mL di CCl₄ sotto atmosfera di azoto. La reazione è stata lasciata a refluxo sotto agitazione per 10 ore, e poi raffreddata, filtrata e il solvente rimosso sotto pressione ridotta. Il prodotto di reazione è stato purificato per colonna cromatografica (gel di silice, eluente: CH₂Cl₂) per ottenere il composto **5** come solido bianco (4 g). Resa: 40 %. MS m/z (ESI): 393.9 (M+H⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.23 (3H, m), 8.05 (2H, m), 7.56 (3H, m), 6.80 (1H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 172.0, 138.8, 133.8, 132.2, 130.2, 129.3, 129.1, 128.5, 127.4, 123.6, 123.5, 122.1 ppm; Anal. Per C₁₄H₉Br₂N₃O: Calc. C 42.56, H 2.30, N 10.64; Trovato C 42.3, H 2.3, N 10.5.

2-(6-formil-2-piridil)-5-fenil[1,3,4]ossadiazolo (6): **5** (3,9 g, 0,01 mol) e una soluzione di dimetilammina al 40% in soluzione acquosa, sono state mantenute a 60°C sotto agitazione per tutta la notte. La soluzione risultante è stata raffreddata a temperatura ambiente ed estratta con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL); la fase organica riunita è stata anidrificata s Na₂SO₄, filtrata e concentrata. Il prodotto desiderato è stato purificato per cromatografia su colonna (gel di silice, eluente CH₂Cl₂). Il prodotto ottenuto **6** si presenta come solido bianco (1,7 g). Resa: 68 %. MS m/z (ESI): 252.1 (M+H⁺); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 10.24 (1H, s), 8.54 (1H, m), 8.26 (2H, m), 8.13 (2H, m), 7.60 (3H, m); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 192.5, 165.9, 163.1, 153.0, 144.2, 138.5, 132.3, 129.2, 127.4, 127.0, 123.4, 123.2 ppm; Anal. Per C₁₄H₉N₃O₂: Calc. C 66.93, H 3.61, N 16.72; Trovato C 67.0, H 3.7, N 16.5.

6-{2-[N-(6-(5-fenil[1,3,4]ossadiazolo-2-il)-2-piridil)metilammino]etil}-3,6,9-traza-1-(2,6)-piridinciclododecafano (L1·3HClO₄·H₂O): il composto **L^I** (236 mg, 0,95 mmol) e il composto **6** (238 mg, 0,95 mmol) sono stati disciolti in 30 mL di etanolo anidro; la soluzione è stata mantenuta sotto

agitazione a temperatura ambiente per 2 ore, poi sodio boroidruro (359 mg, 9,5 mmol) è stato aggiunto in un'unica porzione e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione ulteriormente per 2 ore. Il solvente è stato quindi rimosso sotto pressione ridotta e 10 mL di acqua sono stati lentamente addizionati. La soluzione è stata purificata per estrazione con CH₂Cl₂ 20 mL per 6 volte. La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente evaporato sotto pressione ridotta. Il residuo solido è stato ridissolto in 30 mL di etanolo e trattato con una soluzione di acido perclorico (70%) in etanolo assoluto (1:10 v/v), ottenendo un solido bianco. Il prodotto desiderato è stato quindi cristallizzato da una miscela di metanolo/etanolo ottenendo il legante **L1** come sale **L1**·3HClO₄·H₂O (487 mg). Resa: 62 %. MS m/z (ESI): 243.0 (H₂L²⁺); ¹H-NMR (D₂O, 25 °C): δ = 8.09 (1H, d, J=7.2 Hz), 8.00 (3H, m), 7.82 (1H, t, J=7.8 Hz), 7.52 (4H, m) 7.32 (2H, d, J=7.8 Hz), 4.50 (4H, s), 4.47 (2H, s), 3.35 (2H, t, J=7.1 Hz), 3.16 (4H, t, J=5.3 Hz), 3.06 (2H, t, J=7.1 Hz), 2.81 (4H, t, J=5.3 Hz); ¹³C NMR (D₂O, 25 °C): δ = 172.5, 166.0, 163.8, 151.8, 151.7, 148.9, 141.8, 139.8, 133.0, 129.4, 127.1, 126.0, 123.2, 122.3, 50.8, 50.7, 50.4, 49.5, 45.8, 43.1 ppm; Anal. per C₂₇H₃₇Cl₃N₈O₁₄ Calcd C 40.34, H 4.64, N 13.94; Trovato C 40.5, H 4.7, N 13.8.

4.6 FORMAZIONE DEI COMPLESSI DI L1

Complesso [ZnL1](ClO₄)₂: I cristalli del complesso metallo:legante sono stati ottenuti per aggiunta di Zn(ClO₄)₂·6H₂O (37 mg, 0.1 mmol) in acqua (5 mL) ad una soluzione acquosa (5 mL) contenente **L1**·3HClO₄·H₂O (40 mg, 0.05 mmol). Il pH della soluzione risultante è stato aggiustato a 7 con 0,1 M NaOH e saturato con il sale NaClO₄. Dopo pochi minuti si è ottenuto la precipitazione di un solido incolore microcristallino (27 mg, 72 %). MS m/z (ESI): 274.0 (ZnL1²⁺); Anal. Calc. per C₂₇H₃₂Cl₂N₈O₉Zn: C 43.30; H 4.31; N 14.96. Trovato: C 43.2; H 4.4; N 15.0. I cristalli, ottenuti per lenta evaporazione della soluzione acquosa contenente il complesso, sono ideanei per l'analisi a raggi X.

	[ZnL1](ClO ₄) ₂
Empirical formula	C ₂₇ H ₃₂ Cl ₂ N ₈ O ₉ Zn
Formula weight	748.87
Temperature (K)	100
Wavelength (Å)	1.54184
Crystal system, space group	Orthorhombic, Pbc _a
Unit cell dimensions (Å)	a = 12.4453(2) b = 14.3947(3) c = 33.7578(4)
Volume (Å ³)	6047.6(2)
Z, D _c (mg/cm ³)	8, 1.645
μ(mm ⁻¹)	3.352
F(000)	3088
Crystal size (mm)	0.35 x 0.28 x 0.25
θ range (°)	4.41-71.90
Reflections collected / unique	22850 / 5793
Data / parameters	5793 / 520
Goodness-of-fit on F ²	1.068
Final R indices [I>2σ(I)]	0.0432 / 0.1127
R indices (all data)	0.0659 / 0.1287

Dati cristallografici e di raffinamento della struttura cristallina [ZnL1](ClO₄)₂.

Complesso [CuL1](ClO₄)₂: I cristalli del complesso metallo:legante sono stati ottenuti per aggiunta di Cu(ClO₄)₂·6H₂O (75 mg, 0,12 mmol) in acqua (5 mL) ad una soluzione acquosa (5 mL) contenente L1·3HClO₄·H₂O (50 mg, 0,06 mmol). Il pH della soluzione risultante è stato aggiustato a 7 con 0,1 M NaOH e saturato con il sale NaClO₄. Dopo pochi minuti si è ottenuto la precipitazione di un solido

incolore microcristallino. MS m/z (ESI): 747.09 (CuL1²⁺); I cristalli, ottenuti per lenta evaporazione della soluzione acquosa contenente il complesso, sono ideonei per l'analisi diffrattometrica.

	[CuL1](ClO ₄) ₂
Empirical formula	C ₂₇ H ₃₂ Cl ₂ CuN ₈ O ₉
Formula weight	747.04
Temperature (K)	110
Wavelength (Å)	1.54184
Crystal system, space group	Orthorhombic, Pbc _a
Unit cell dimensions (Å)	a = 12.3325(3) b = 14.5161(4) c = 33.7255(7)
Volume (Å ³)	6037.5(3)
Z, D _c (mg/cm ³)	8, 1.644
μ(mm-1)	3.249
F(000)	3080
Crystal size (mm)	0.16 x 0.21 x 0.25
θ range (°)	4.44-72.08
Reflections collected / unique	16740 / 5774
Data / parameters	5774 / 520
Goodness-of-fit on F ²	1.053
Final R indices [I>2σ(I)]	0.0381 / 0.0991
R indices (all data)	0.0495 / 0.1086

Dati cristallografici e di raffinamento della struttura cristallina [CuL1](ClO₄)₂.

4.7 SINTESI DEL LEGANTE L2

Le sintesi del fluoroforo PyPyD e del legante **L2** sono riportate in [Schema 3](#) e [Schema 4](#).

Il precursore **Ts-TRIEN** è stato precedentemente sintetizzato nel nostro laboratorio, seguendo il procedimento riportato su: *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 1471–1478

Etile 6-metil-2-piridincarbossilato (7): È stata seguita la sintesi riportata su *J. Org. Chem.*, 1949, 14, 14-21, partendo dall'acido 6-metilpiridin-2-carbossilico (**1**). Resa: 95 %. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.93 (1H, d, J= 7.6 MHz), 7.71 (1H, t, J= 7.6 MHz), 7.33 (1H, d, J= 7.6 MHz), 4.47 (2H, q, J= 7.2 MHz), 2.66 (3H, s), 1.43 (3H, t, 7.2 MHz) ppm.

6-metil-2-piridinidrazide (8): Il composto **7** (7 g, 42 mmol) è stato disciolto in 50 mL di etanolo e alla soluzione è stata aggiunta idrazina monoidrata 35 % in soluzione (6.3 g, 126 mmol). La miscela di reazione è stata portata alla temperatura di riflusso e mantenuta in agitazione per 16 ore. Il solvente e l'idrazina in eccesso sono stati evaporati mediante l'utilizzo di rotavapor, il residuo solido è stato ripreso con CHCl₃, anidrificato su Na₂SO₄, filtrato ed essiccato. Il composto desiderato ottenuto è un solido bianco (5.7 g, 38 mmol). Resa: 90 %. ¹H NMR (CDCl₃): δ= 9.05 (1H, s), 7.96 (1H, d, J= 8 MHz), 7.73 (1H, t, J= 8 MHz), 7.29 (1H, d, J= 8 MHz), 4.08 (1H, brs), 2.56 (3H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.86, 157.43, 148.29, 137.41, 126.16, 119.21, 24.19 ppm.

2,5-bis(6-metil-2-piridil)[1,3,4]ossadiazolo (9): Sotto atmosfera inerte di azoto, l'acido 6-metilpiridin-2-carbossilico (**1**) (3 g, 21,9 mmol) è stato disciolto in 30 mL di POCl₃, la sospensione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora, per ottenere la formazione del cloruro acilico desiderato. Alla miscela di reazione contenente il **6-metil-2-piridoil cloruro (2)**, è stato addizionato il composto **8** (3,3 g, 21,9 mmol) in piccole porzioni, a 0° C sotto N₂. La soluzione è stata portata alla temperatura di riflusso ed è stata lasciata sotto agitazione per 2 giorni. La miscela, a

temperatura ambiente, è stata addizionata a 300 mL di acqua e ghiaccio. La soluzione è stata lentamente basificata per aggiunta di NaOH fino pH = 12, ottenendo la formazione di un precipitato bianco in sospensione. Il solido è stato filtrato e purificato per colonna cromatografica (gel SiO₂, eluente: CH₂Cl₂). Il composto desiderato isolato è un solido bianco (2.5 g, 9.8 mmol). Resa: 45%. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.14 (2H; d, J= 8 MHz), 7.79 (2H, t, J= 8 MHz), 7.35 (2H, d, J= 8 MHz), 2.71 (6 H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.6, 159.7, 142.6, 137.3, 125.8, 120.7, 24.5 ppm.

2,5-bis(6-dibromometil-2-piridil)[1,3,4]ossadiazolo (10): Sotto atmosfera inerte di N₂, 2 equivalenti di N-Bromosuccinimide (2.8 g, 16 mmol) sono stati addizionati ad una soluzione del composto **9** (2 g, 8 mmol) in 100 mL di CCl₄ anidro. La soluzione risultante è stata portata alla temperatura di riflusso e quindi 2,2'-azobis(2-metilpropionitrile) (0.13 g, 0.8 mmol) è stato aggiunto in un'unica porzione sotto atmosfera inerte. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a riflusso per 4 ore, poi sono stati aggiunti altri 2 equivalenti di NBS e AIBN. La soluzione è stata lasciata reagire per 2 giorni a riflusso. La reazione è stata poi raffreddata a temperatura ambiente, il solvente è stato evaporato mediante rotavapor. Il grezzo di reazione è stato purificato per cromatografia su colonna (gel SiO₂, eluente: CH₂Cl₂). Il prodotto desiderato si presenta come un solido di colore arancione (3.6 g, 6.32 mmol). Resa: 79 %. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.15 (2H, d, J= 8 MHz), 8.13 (2H, d, J= 8 MHz), 8.06 (2H, t, J= 8 MHz), 6.83 (2H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.04, 160.38, 141.09, 139.18, 125.38, 123.80, 40.27 ppm.

2,5-bis(6-formil-2-piridil)[1,3,4]ossadiazolo (11): Il composto **10** (3,6 g; 6,3 mmol) è stato disciolto in 32 mL di dimetilammina 40% (v/v) in soluzione acquosa (5 ml/mmol per ogni mole di prodotto da deproteggere). La soluzione di reazione è stata lasciata sotto agitazione a 60 °C tutta la notte. La reazione è stata fermata per aggiunta di acqua (25 mL) alla miscela. Il prodotto desiderato è stato estratto con CH₂Cl₂ (5 x 25 ml), le frazioni organiche raccolte sono state riunite e lavate con una

soluzione di NaHCO₃/H₂O (5 x 25 ml) per rimuovere l'ammina in eccesso. La fase organica è stata quindi anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata a pressione ridotta. Il composto desiderato è stato isolato per cromatografia su colonna (SiO₂, eluente: CHCl₃). Il prodotto ottenuto si presenta come solido giallo (1,1 g; 3,9 mmol). Resa: 62%. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 10.28 (2H, s), 8.60 (2H, d), 8.17 (4H, m), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 192.36, 164.18, 153.23, 143.68, 138.65, 127.34, 123.60 ppm.

2,5-bis(6-idrossimetil-2-piridil)[1,3,4]ossadiazolo (12): Il composto **11** (1 g, 3.6 mmol) è stato sospeso in metanolo ed alla soluzione è stato aggiunto NaBH₄ (0,55 g, 14,4 mmol) in una singola porzione a 0°C sotto N₂. La reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente ed è stata mantenuta sotto agitazione per 2 ore. La reazione è stata spenta per cauta aggiunta di acqua fredda a 0°C, il solvente è stato quindi evaporato. Il prodotto è stato isolato per estrazione con CH₂Cl₂ (25 ml) per 5 volte. Le fasi organiche raccolte sono state riunite, anidificate su Na₂SO₄, filtrate. Il solvente è stato evaporato mediante rotavapor e il composto essiccato sotto vuoto. Solido bianco (1 g, 3.6 mmol). Resa quantitativa. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.26 (2H, d, J= 8 MHz), 7.95 (2H, t, J= 8 MHz), 7.52 (2H, d, J= 8 MHz), 4.94 (4H, s), 1.97 (2H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.43, 160.63, 142.29, 137.90, 123.04, 122.17, 64.36 ppm.

2,5-bis(6-clorometil-2-piridil)[1,3,4]ossadiazolo (13): È stato seguito il procedimento riportato in: S. DasGupta et al. / Bioorg. Med. Chem, **2009**, 17, 3604 – 3617. Sotto atmosfera inerte di azoto, il composto **12** (1 g, 3,6 mmol) è stato disciolto in 20 mL di cloroformio anidro. La soluzione è stata raffreddata a 0° C e una soluzione di tionil cloruro (1 mL) in CHCl₃ (10 mL) è stata gocciolata alla soluzione di partenza sotto agitazione. Dopo che tutti i reagenti sono in soluzione, la reazione è stata scaldata a 40° C ed è stata mantenuta sotto agitazione per altri 2 giorni. Alla miscela di reazione è stata quindi aggiunta una piccola aliquota di acqua ed è stata cautamente basificata per aggiunta di una soluzione satura di NaOH in acqua fino a pH = 8. Il prodotto desiderato è stato estratto con CHCl₃

(25 mL) per 3 volte, le fasi organiche riunite sono state anidificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate. Il prodotto è stato infine purificato mediante cromatografia su colonna (gel SiO₂, eluente: CH₂Cl₂). Il prodotto ottenuto è un solido bianco (0.98 g, 3.05 mmol) Resa: 85 %. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.29 (2H, d, J= 8 MHz), 7.98 (2H, t, J= 8 MHz), 7.75 (2H, d, J= 8 MHz), 4.85 (4H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.34, 157.94, 142.67, 138.33, 125.24, 122.73, 46.14 ppm.

8,11,14,17-tetrakis(4-metilsulfonyl)-11,14,17,25,26,28,29-ottaaza-27-

ossatetraciclo[22.2.1.1^{2,6}.1^{19,23}]enneaicoso-2,4,6²⁸,19,21,23²⁹,24,26¹-ottaene (14): Sotto atmosfera inerte d'azoto, K₃CO₃ (2.1 g, 15.4 mmol) è stato aggiunto ad una soluzione di 1,4,7,10-tetrakis(4-metilfenilsulfonyl)-1,4,7,10-tetraazadecano (**Ts-TRIEN**) (1.2 g, 1.5 mmol) in 200 ml di DMF anidra e la soluzione risultante è stata riscaldata a 60 °C con bagno ad olio. Una soluzione di **13** (0.55 g, 1.7 mmol) in 100 mL di DMF anidra è stata gocciolata alla miscela di reazione sotto vigorosa agitazione per un'ora a 60° C e sotto N₂. La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 2 giorni. Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta e il solido residuo è stato purificato mediante colonna cromatografica (gel SiO₂, eluente: CHCl₃). Il prodotto desiderato è stato cristallizzato in EtOH per lenta evaporazione del solvente. (1 g, 1 mmol) Resa: 66%. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.18 (2H, d, J= 8 MHz), 7.87 (2H, t, J= 8 MHz), 7.60 (4H, d, J= 7.6 MHz), 7.53 (6H, m), 7.21 (4H, d, J= 8 MHz), 7.08 (4H, d, J= 8 MHz), 4.61 (4H, s), 3.81 (4H, dd, J¹= 7.6 MHz, J²= 8 MHz), 3.36 (4H, s), 3.25 (4H, dd, J¹= 7.6 MHz, J²= 8), 2.41 (6H, s), 2.30 (6H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 164.47, 157.00, 143.78, 143.27, 142.94, 137.79, 136.45, 134.28, 129.70, 129.45, 127.43, 127.20, 125.47, 122.34, 53.75, 49.53, 49.46, 48.52, 21.51, 21.39 ppm.

11,14,17,25,26,28,29-ottaaza-27-ossatetraciclo[22.2.1.1^{2,6}.1^{19,23}]enneaicoso-

2,4,6²⁸,19,21,23²⁹,24,26¹-ottaene tetrabromoidrato (L2): Il composto (**14**) (1 g, 1 mmol) e fenolo (3 g, 31.8 mmol) sono stati aggiunti ad una soluzione di 25 mL di HBr/acido acetico 33%, sotto

atmosfera di azoto. La sospensione è stata mantenuta sotto agitazione a 90°C per 16 ore. Il prodotto desiderato è stato quindi precipitato per aggiunta di CH₂Cl₂, filtrato mediante beuta caudata a pressione ridotta e il solido ottenuto è stato essiccato a sotto vuoto. Il composto puro è stato ottenuto per cristallizzazione, è stato solubilizzato in MeOH ed è stato aggiunto EtOH come non-solvente. (215 mg, 0.3 mmol). Resa: 30%. MS m/z ESI (M+H⁺): 795.0; ¹H-NMR (D₂O): δ = 7.90 (2H, t, J= 8 MHz), 7.84 (2H, d, J= 8 MHz), 7.51 (2H, d, J= 6.8 MHz), 4.53 (s, 4H), 3.57 (12H, m), ¹³C NMR (D₂O): δ = 169. 150.11, 148.78, 139.56, 125.87, 124.66, 49.77, 76,43.80, 44.45, 44.40 ppm. Anal. Per: C₂₀H₃₀Cl₄N₈O₁₇; Calc. C 30.17, H 3.80, N 14.07; Trovato C 30.4, H 3.6, N 14.2.

4.8 SINTESI DEL LEGANTE L3

Il legante **L3** è stata ottenuto seguendo la sintesi riportata nello [Schema 3](#) e nello [Schema 5](#). Per il composto N,N',N''-trimetildietilentriammina **L^{III}** (**DEN-triMe**) abbiamo seguito la procedura riportata nel articolo: A. Bencini et al., Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, **1992**, 1059 – 1065.

8,11,14-trimetil-8,11,14,22,23,25,26-eptaaza-24-ossatetraciclo[19.2.1.1^{2,6}.1^{16,20}]esaicosa-2,4,6²⁶,16,18,20²⁵,21,23¹ triperclorato (L3·3HClO₄): Sotto atmosfera d'azoto, sono stati aggiunti **DEN-triMe** (60 mg, 0.42 mmol) e K₂CO₃ (580 mg, 4.2 mmol) a 70 mL di acetonitrile anidro e la soluzione risultante è stata riscaldata a 60° C. Alla sospensione mantenuta sotto vigorosa agitazione, è stata gocciolata lentamente una soluzione di **13** (150 mg, 0,47 mmol) in 70 mL di acetonitrile anidro per due ore. La miscela di reazione ottenuta è stata mantenuta a 60° C sotto agitazione per 24 ore. Il prodotto desiderato è stato isolato per colonna cromatografica (Al₂O₃, eluente: CHCl₃). Il composto ottenuto è stato ulteriormente purificato per cristallizzazione in frigorifero in una soluzione di EtOH e HClO₄. (130 mg, 0,22 mmol). Resa: 52 %. MS m/z ESI (M+H⁺): 594.1; ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8.40 (2H, d, J= 7.6 MHz), 8.26 (2H, t, J= 7.6 MHz), 7.82 (2H, d, J= 7.6 MHz), 3.35 (4H, br), 4.86 (4H, s),

3.20 (4H, br), 3.09 (6H, s), 1.78 (3H, s), ^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 163.92, 151.92, 142.09, 140.50, 126.51, 123.03, 60.04, 52.53, 52.34, 41.23, 38.68$ ppm. Anal. Per: $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_9$: Calc. C 42.43, H 4.92, N 16.49; Trovato C 42.1, H 4.6, N 16.6.

4.9 SINTESI DEL LEGANTE L4

Il legante **L4** è stata ottenuto seguendo la sintesi riportata in [Schema 6](#) e [Schema 7](#).

L'unità recettrice **L^{IV}** è stata precedentemente protetta con ftalimmide sugli atomi di azoto primari come riportato nel riferimento: *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 309-320.

2-(2-idrossi-3-naftil)-4-metilbenzossazolo (HNBO) (17): In un pallone da 250 mL 40 g di acidi polifosforici sono stati riscaldati a 160°C con bagno ad olio fino a completa liquefazione. Alla soluzione sono stati aggiunti l'acido 3-idrossi-2-naftolico (**15**) (7.5 g, 40 mmol) e il composto 2-ammino-3-metilfenolo (**16**) (4.9 g, 40 mmol), il pallone è stato chiuso con tappo di CaCl_2 e la miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a 160°C per 16 ore. La soluzione è stata raffreddata a temperatura ambiente e la reazione è stata spenta per aggiunta di acqua e ghiaccio. La sospensione ottenuta è stata neutralizzata per cauta aggiunta di Na_2CO_3 , il precipitato così ottenuto è stato filtrato sotto vuoto, mediante imbuto di Buchner e beuta caudata, e infine lavato con acqua per rimuovere eventuali impurezze residue. Il prodotto pulito è stato ottenuto mediante estrazione con l'utilizzo di un estrattore Soxhlet e quindi cristallizzato in esano. Il prodotto desiderato si presenta come un solido bianco (7g, 25 mmol). Resa: 64 %. ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 8.64$ (1H, s), 7.89 (1H, d, $J = 8$ MHz), 7.75 (1H, d, $J = 8$ MHz), 7.50 (2H, m), 7.47 (1H, s), 7.37 (1H, t, $J = 7.6$ MHz), 7.33 (1H, t, $J = 8$ MHz), 7.22 (1H, d, $J = 6.8$ MHz), 2.68 (3H, s), ^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 161.77, 154.22, 149.04, 139.36, 136.60, 130.14, 128.66, 128.42, 128.34, 127.48, 126.47, 125.65, 125.55, 123.98, 112.79, 111.54, 107.94, 16.49$ ppm.

4-Metil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo (18): Sotto atmosfera inerte d'azoto, **17** (7 g, 0.025 mol) è stato disciolto in 50 ml di CH₂Cl₂ anidro e mantenuto in agitazione per favorire la completa solubilizzazione, N,N-diisopropiletilammina, è stato quindi aggiunto (24 g, 0,19 mol) in una singola porzione alla soluzione. La miscela così ottenuta è stata raffreddata a 0° C mediante bagno a ghiaccio, ed è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di cloro metilmetil etero (15 g, 0,19 mol) in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro. La miscela di reazione ottenuta è stata poi riscaldata fino a temperatura di riflusso e mantenuta sotto agitazione per tutta la notte. La reazione è stata spenta per mezzo di un'aggiunta di una piccola aliquota di acqua e il prodotto desiderato è stato estratto mediante l'utilizzo di un imbuto separatore, e dunque lavato con acqua due volte. La purificazione del composto di reazione è stata effettuata per colonna cromatografica (gel SiO₂, eluente: CH₂Cl₂/*n*-esano 1:1). Il prodotto finale è un solido di colore rosa chiaro (7 g, 0,022 mmol). Resa: 88%. ¹H NMR (DMSO): δ = 8.66 (1H, s), 8.08 (1H, d, J= 7.6 MHz), 7.92 (1H, d, J= 7.6 MHz), 7.71 (1H, s), 7.60 (2H, m), 7.50 (1H, td, J³= 7.6 MHz, J⁴= 1.2 MHz), 7.35 (1H, t, J= 7.6 MHz), 7.26 (1H, dt, J³= 7.6 MHz, J⁴= 0.8 MHz), 5.46 (2H, s), 3.53 (3H, s), 2.64 (3H, s), ¹³C NMR (DMSO): δ = 160.95, 152.52, 150.61, 141.04, 135.61, 132.55, 130.41, 129.00, 128.86, 128.60, 127.18, 125.68, 125.55, 125.51, 118.74, 111.78, 108.58, 95.34, 56.52, 16.69 ppm.

4-Bromometil-2-(2-metossimetilossi-3-naftil)benzossazolo (19): Il composto **18** (3 g, 9.4 mmol) e N-bromosuccinimide (1.8 g, 10.4 mmol) sono stati aggiunti a 100 mL di CCl₄ anidro, sotto atmosfera d'azoto, la miscela ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione fino a complete dissoluzione dei reagenti e riscaldata alla temperatura di riflusso del solvente. Successivamente, AIBN (0,75 g) è stato aggiunto alla miscela di reazione e la soluzione è stata lasciata sotto agitazione a riflusso per 24 ore sotto atmosfera inerte di N₂. La sospensione è stata quindi filtrata e il solvente evaporato mediante rotavapor, il prodotto desiderato è stato purificato per colona cromatografica (gel SiO₂, eluente: CH₂Cl₂/*n*-esano 1:1). Il prodotto è un solido di bianco (2,3 g, 5.8 mmol). Resa: 62%. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.68 (1H, s), 7.80 (1H, d, J= 8.2 MHz), 7.57 (3H, m), 7.45 (2H, m), 7.93 (1H, d, J= 8.2

MHz), 7.37 (1H, t, J= 8.7 MHz), 5.47 (2H, s), 5.01 (2H, s), 3.64 (3H, s), ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 162.06, 152.69, 150.89, 140.72, 135.68, 132.78, 129.74, 128.73, 128.61, 128.29, 126.89, 125.25, 125.11, 125.07, 118.40, 111.77, 110.74, 95.44, 56.57, 27.83 ppm.

2-(2-Metossimetilossi-3-naftil)-4-[N,N-bis(2-ftalimidoetil)amminometil]benzossazolo (21):

Sotto atmosfera di N₂, una soluzione di N,N-bis(2-ftalimidoetil)ammina (**20**) è stata disciolta in 80 mL di DMF anidra e Na₂CO₃. Alla miscela di reazione è stata fatta gocciolare lentamente una soluzione di **19** (1,5 g, 3.8 mmol) in 80 mL di DMF anidra a temperatura ambiente per un'ora. La soluzione ottenuta è stata mantenuta a 40°C sotto agitazione per 16 ore. Il prodotto desiderato è stato precipitato per cauta aggiunta di acqua fredda, è stato quindi filtrato e anidrificato. Il composto ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica (gel SiO₂; eluente: CH₂Cl₂/esano 1:1). Il prodotto si presenta come solido giallo (1,3 g, 1,9 mmol). Resa: 50 %. ¹H NMR (DMSO): δ = 8.63 (1H, s), 8.07 (1H, d, J= 8 MHz), 7.92 (1H, d, J= 8 MHz), 7.78 (4H, m), 7.70 (1H, s), 7.67 (4H, m), 7.62 (1H, td, J⁴= 1.2 MHz, J³= 7.6 MHz), 7.50 (2H, m), 3.50 (3H, s), 7.07 (1H, d, J= 7.2 MHz), 6.91 (1H, t, J= 8 MHz), 5.45 (2H, s), 4.11 (2H, s), 3.75 (4H, t, J= 6.0 MHz), 2.80 (4H, t, J= 6.0 MHz), ¹³C-NMR (DMSO): δ = 168.15, 161.00, 152.57, 150.30, 141.32, 135.63, 134.53, 132.57, 132.11, 130.95, 129.01, 128.88, 128.57, 127.19, 125.55, 125.18, 123.16, 118.53, 111.85, 109.45, 95.32, 56.49, 51.49, 51.68, 35.96 ppm.

2-(2-Metossimetilossi-3-naftil)-4-[N,N-bis(2-amminoetil)amminometil]benzossazolo (22):

Ad una soluzione di idrazina monoidrata (1,3 mL, 28 mmol) in 120 mL di EtOH è stata addizionata goccia a goccia una soluzione di composto **7** (1,9 g, 2,8 mmol) disciolto in una piccola aliquota di CHCl₃ (10 mL). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 ore. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo è stato ridisciolti in 20 mL di CHCl₃. Il solido in sospensione è stato filtrato, ed il solvente è stato evaporato sotto vuoto. Il prodotto è stato utilizzato per la reazione successiva tale e quale senza ulteriore purificazione (1,1g,

2,6 mmol). Resa: 92 %. ^1H NMR (CDCl_3): δ = 8.61 (1H, s), 7.91 (1H, d, J = 8 MHz), 7.78 (1H, d, J = 8 MHz), 7.59 (1H, s), 7.53 (2H, m), 7.42 (1H, td, J^4 = 1.2 MHz, J^3 = 4.8 MHz), 7.33 (2H, m), 5.46 (2H, s), 4.04 (2H, s), 3.59 (3H, s), 2.84 (4H, t, J = 6 MHz), 2.63 (4H, t, J = 6 MHz), ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 161.42, 152.67, 150.87, 128.69, 128.60, 128.20, 126.85, 125.01, 124.88, 124.72, 131.78, 132.53, 135.56, 141.24, 118.46, 111.54, 109.43, 95.30, 56.71, 56.43, 53.88, 39.53 ppm.

2-(2-Idrossi-3-naftil)-4-[N,N-bis(2-amminoetil)amminometil]benzossazolo (L4): Il composto **8** (1,1 g, 2,6 mmol) è stato dissolto in MeOH (100 mL), alla soluzione è stata addizionata goccia a goccia una soluzione di acido *p*-toluensolfonico (2,2 g, 11,7 mmol) in MeOH (20 mL) a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente, il decorso della reazione è stato controllato mediante TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2). Quando tutto il prodotto da deproteggere è stato consumato, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo ottenuto è stato disciolto in una piccola quantità di CH_2Cl_2 (10 mL). La soluzione è stata lavata due volte con una soluzione satura di K_2CO_3 in acqua (20 mL). La fase organica è stata quindi anidrificata su Na_2SO_4 , filtrata e il solvente evaporato con rotavapor. Il prodotto purificato è stato ottenuto per essiccazione sotto vuoto; il composto si presenta come solido bianco (0.65 g, 1,7 mmol). Resa: 65 %.

[L4·3HCl]: Il prodotto ottenuto **L4** è stato ulteriormente purificato per cristallizzazione come sale cloridrato. Il composto è stato disciolto in una piccola quantità di etanolo (5 mL) ed è stato aggiunto HCl conc. 37% goccia a goccia fino a intorbidimento, la soluzione è stata mantenuta in agitazione per circa 1 ora e lasciata all'aria. Il solido è stato filtrato a pressione ridotta e essiccato sotto vuoto.

MS m/z ESI ($\text{M}+\text{H}^+$): 485.1; ^1H NMR (CDCl_3): δ = 8.62 (1H, s), 7.88 (1H, d, J = 8.4 MHz), 7.72 (1H, d, J = 8.4 MHz), 7.57 (1H, t, J = 4.4 MHz), 7.50 (1H, td, J^4 = 1.2 MHz, J^3 = 8 MHz), 7.37 (3H, m), 4.03 (2H, s), 2.87 (4H, t, J = 5.6 MHz), 2.65 (4H, t, J = 5.6 MHz), ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 162.23, 154.14, 149.29, 139.51, 136.68, 131.01, 128.83, 128.68, 128.46, 127.47, 126.46, 125.81, 125.54, 124.03, 112.80, 111.62, 109.49, 56.57, 53.88, 39.53, 29.68 ppm. Anal. Per: $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_2$, Calc. C 54.39, H 5.60, N 11.53, Trovato C 54.1, H 5.7, N 11.4.

4.10 SINTESI DEL LEGANTE L5

La procedura di sintesi del legante **L5** è riportata in [Schema 6](#) e [Schema 8](#).

5-(2-(2-Metossimetilossi-3-naftil)benzossazol-4-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza-2,6-piridinofano (24):

Sotto atmosfera inerte di N₂, Na₂CO₃ (670 mg, 6,3 mmol) è stato aggiunto ad una sospensione di 2,8-ditia-5-aza-2,6-piridinofano **L^V (23)** (135 mg, 0,57 mmol) in 20 mL di DMF anidra. La miscela di ottenuta è stata riscaldata a 50° C mediante bagno ad olio, quindi vi è stata lentamente gocciolata una soluzione di **19** (250 mg, 0,63 mmol) in 20 mL di DMF anidra, sotto N₂. La reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 50°C per tre giorni. Il prodotto desiderato è stato ottenuto per precipitazione mediante cauta aggiunta di acqua e ghiaccio (50 ml), il precipitato è stato quindi filtrato. Il solido è stato ridisciolti in CH₂Cl₂, anidrificato su Na₂SO₄, filtrato e il solvente evaporato mediante rotavapor. Il grezzo di reazione è stato purificato per cromatografia su colonna (fase stazionaria: Al₂O₃, eluente: CH₂Cl₂). Il composto desiderato si presenta come solido bianco (120 mg, 0.22). Resa: 38 %. ¹H NMR (DMSO): δ = 8.63 (1H, s), 8.06 (1H, d, J= 8MHz), 7.91 (1H, d, J= 8MHz), 7.83 (1H, t, J= 8 MHz), 7.71 (1H, s), 7.66 (1H, dd, J³= 6.8 MHz, J⁴= 1.6 MHz), 7.61 (1H, td, J³= 7.6 MHz, J⁴= 1.1 MHz), 7.50 (1H, td, J³= 7.6 MHz, J⁴= 1.1 MHz), 7.40 (4H, m), 4.03 (2H, s), 3.83 (4H, s), 3.51 (3H, s), 2.58 (8H, m), ¹³C-NMR (DMSO): δ = 158.01, 154.18, 149.31, 138.87, 138.54, 136.80, 131.90, 129.00, 128.95, 128.81, 127.66, 126.43, 126.15, 125.10 124.86, 124.30, 121.71, 112.74, 111.23, 109.43, 52.82, 51.62, 36.05, 25.32 ppm.

5-(2-(2-Idrossi-3-naftil)benzossazol-4-ilmetil)-2,8-ditia-5-aza-2,6-piridinofano (L5): Per la sintesi abbiamo seguito il procedimento riportato in: *Inorg. Chem.*, **2015**, 51, 8760-8774. Il composto **24** (60 mg, 0.11 mmol) è stato disciolto in 10 ml MeOH anidro sotto N₂ e mantenuto sotto agitazione

fino a completa solubilizzazione. Alla soluzione è stato aggiunto acido *p*-toluensolfonico (210 mg, 1,1 mmol) in un'unica porzione e la miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per tre giorni. Successivamente, il solvente è stato evaporato mediante rotavapor e il residuo ottenuto ripreso con CH₂Cl₂ (15 mL). La soluzione ottenuta è stata lavata con una soluzione satura di NaHCO₃ in acqua (10 mL) per due volte mediante imbuto separatore. La fase organica raccolta è stata anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e il solvente evaporato. Il prodotto purificato è un solido giallo (50 mg, 0.10 mmol). Resa: 90 %. MS m/z ESI (M+H⁺): 514.1; ¹H-NMR (DMF-d₇): δ 2.66 (s, 8H), 3.90 (s, 4H), 4.14 (s, 2H), 7.46 (m, 3H), 7.54 (m, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.62 (td, 1H, *J*³ = 7.6 MHz, *J*⁴ = 1.12 MHz), 7.81 (m, 1H), 7.91 (m, 2H), 8.15 (d, 1H, *J* = 8 MHz), 8.81 (s, 1H), 11.31 (s, 1H). ¹³C-NMR (DMF-d₇): δ 25.32, 36.05, 51.62, 52.82, 109.43, 111.32, 112.74, 121.71, 124.30, 124.86, 125.10, 126.15, 126.43, 127.66, 128.81, 128.95, 129.00, 131.90, 136.80, 138.54, 138.87, 149.31, 154.18, 158.01. Anal. Per: C₂₉H₂₇N₄O₂S₂, Calc. C 67.81, H 5.30, N 8.18, Trovato C 67.9, H 5.6, N 8.0.

4.11 SINTESI DEI COMPOSTI T1, T2, T3 E T4

Le sintesi seguite per i composti sono riportate negli [Schemi Schema 10](#), [Schema 11](#) e [Schema 12](#).

tris(2-(2-metil-2-butil)amminotiocarbonilamminoetil)ammina (T1): Per la sintesi del composto **T1** è stata seguita la procedura riportata nell'articolo X. Wu et al., *Chem*, **2016**, 1, 1-20. Resa: 45% (0.30 g); ¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 7.10 (3H, t, *J* = 4.8 Hz), 6.95 (3H, s), 3.46 (6H, m), 2.60 (6H, t, *J* = 6.7 Hz), 1.85 (6H, q, *J* = 7.3 Hz), 1.33 (18H, s), 0.76 (9H, t, *J* = 7.4 Hz); ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ = 181.27, 54.73, 52.50, 41.04, 32.02, 26.81, 8.27 ppm.

HRMS (ES⁺) m/z: [M+H⁺] calcolata 534.3441, Trovata 534.3457.

N,N-bis(2-amminoetil)-N-(2-terzbutilossicarbonilamidoetil)ammina (2): Per la sintesi è stata utilizzata la procedura riportata in W. Tai et al., *Biomaterials*, 35, **2014**, 7194-7203.

Sotto atmosfera inerte d'azoto, N,N-tris-(2-amminoetil)ammina (**1**) (14.6 g, 100 mmol) è stato disciolto in CHCl₃ (250 mL) e raffreddato a 0° C con bagno a ghiaccio. Alla soluzione è stato aggiunto Boc₂O (2.4 g, 11 mmol) in 50 mL di CHCl₃, sotto N₂. La soluzione risultante è stata portata a temperatura ambiente ed è stata lasciata sotto agitazione per 16 ore. La reazione è stata spenta per cauta aggiunta di acqua fredda (50 mL). Il prodotto desiderato è stato estratto in CHCl₃ (50 mL) per 3 volte, le fasi organiche sono state riunite e anidificate su MgSO₄, filtrate e il solvente è stato evaporato mediante rotavapor. Il prodotto ottenuto è un olio giallo (2.50 g, 10,1 mmol). Resa: 92%. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 5.22 (1H, brs), 3.11 (2H, m), 2.70 (4H, t, J= 6 MHz), 2.47 (6H, m), 1.37 (1H, s) ppm.

N,N-bis(2-isotiocianoetil)-N-(2-terzbutilossicarbonilamidoetil)ammina (3): è stata seguita la sintesi riportata in: Philip G. Young et al. Supplementary Material (ESI) for Chem. Comm. RSC, **2010**.

Sotto atmosfera inerte di N₂, ad una soluzione di **2** (2.50 g, 10,1 mmol) in 150 ml di THF anidro è stato aggiunto solfuro di carbonio (15,5 g, 203 mmol). Alla sospensione è stato quindi aggiunto N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (4.19 g, 20,3 mmol) gradualmente in piccole porzioni e la miscela risultante è stata mantenuta a temperatura ambiente sotto agitazione per 16 ore. Il solvente è stato quindi evaporato mediante rotavapor e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ (30 mL). La sospensione ottenuta è stata filtrata per rimuovere DCC in eccesso, il filtrato è stato concentrato a pressione ridotta e il grezzo di reazione è stato purificato per flash-cromatografia su colonna (fase stazionaria: SiO₂; eluente: CHCl₃). Il prodotto desiderato si presenta sotto forma di olio giallo (2.13 g, 6,45 mmol). Resa: 64 %. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 5.09 (2H, brs), 3.58 (4H, t, J= 6.1 MHz), 3.22 (2H, t, J= 5.9 MHz), 2.90 (4H, t, J= 6.1 MHz), 2.73 (2H, t, J=6.1 MHz), 1.48 (9H, s) ppm.

2-Metilbut-2-il isotiocianato (5): è stata seguita la sintesi riportata in: ChemBioChem, 9, **2008**, 729-747.

Una soluzione di tiosfogene (0,5 g, 5,74 mmol) in EtOAc (40 mL) è stata portata a 0°C, successivamente è stato aggiunto alla soluzione K₂CO₃ (2,38 g, 17,22 mmol) ed è stata gocciolata *tert*-amilamina **4** (1,98 g, 1,32 ml, 17,22 mmol). La soluzione risultante è stata portata a temperatura ambiente e lasciata a reagire per 4 ore. Abbiamo quindi aggiunto una piccola aliquota di acqua (10 mL) e il prodotto desiderato è stato estratto in EtOAc. La fase organica è stata quindi lavata con acqua (25 mL) per 5 volte, è stata anidrificata su MgSO₄, filtrata e il solvente evaporato a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto è un olio di colore giallo (0,42 g, 3,25 mmol). Resa: 57 %. ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.65 (2H, q, J= 7.4 MHz), 1.38 (6H, s), 1.01 (3H, t, J= 7.4 MHz).

N,N-bis(2-butylamminotiocarbonilamminoetil)-N-(2-terzbutilossicarbonilamidoetil)ammina

(7): 1-Butanammina **6** (119 mg, 0,61 mmol) è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di **5** (100 mg, 0,30 mmol) in 5 mL of CH₂Cl₂ sotto atmosfera inerte di azoto. La miscela è stata fatta reagire sotto agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente. Il solvente è stato quindi evaporato mediante rotavapor e il residuo è stato ripreso con una piccola aliquota di CH₂Cl₂ (5 mL). Il prodotto desiderato è stato ottenuto mediante precipitazione in esano, decantato e lavato con esano. Il prodotto desiderato si presenta sotto forma di solido bianco (130 mg, 0.27 mmol). Resa: 90 %. ¹H NMR (DMSO): δ = 7.50 (2H, brs), 7.20 (2H, brs), 6.70 (1H, brs), 3.42 (4H, br), 3.30 (2H, br), 2.99 (2H, m), 2.58 (4H, t, J= 6.8 MHz), 1.46 (4H, quint, J= 7.2 MHz), 1.38 (9H, s), 1.32 - 1.25 (10H, m) ppm.

N,N-bis(2-butylamminotiocarbonilamminoetil)-N-(2-amminoetil)ammina (8): Sotto atmosfera di azoto, 5 ml di acido trifluoroacetico sono stati aggiunti goccia a goccia ad una soluzione di **7** (118 mg, 0,25 mmol) in CHCl₃ (5 mL) a 0°C. La soluzione è stata portata a temperatura ambiente ed è stata mantenuta sotto agitazione per 3 ore. Il solvente è stato quindi evaporato, l'eccesso di acido trifluoroacetico è stato eliminato per aggiunta di una piccola aliquota di acqua (1 ml) ed evaporato a pressione ridotta per tre volte. Il prodotto di reazione è stato utilizzato per il passaggio successivo senza ulteriori purificazioni.

N,N-bis(2-butylamminotiocarbonilamminoetil)-N-(2-(2-metil-2-

butil)amminotiocarbonilamminoetil)ammina (T2): Una soluzione di **5** e di Et₃N (1 mL) in 2 mL di DMF è stata gocciolata in una soluzione del composto **8** (94 mg, 0,25 mmol) in 10 mL of DMF a temperatura ambiente e sotto atmosfera di azoto. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione fino a scomparsa dei reagenti ed è stata monitorata mediante TLC (SiO₂, CHCl₃). Dopo due giorni la reazione è andata a completezza, il solvente è stato quindi evaporato mediante rotavapor. Il prodotto desiderato è stato purificato per flash-cromatografia su colonna (SiO₂, eluente: CHCl₃/MeOH 5%). Il prodotto ottenuto si presenta come solido bianco (50 mg, 10 mmol). Resa: 40%. MS m/z (ESI (M+1)): 506.3; ¹H NMR (DMSO): δ = 7.51 (2H, brs), 7.22 (2H, brs), 7.14 (1H, brs), 7.02 (1H, s), 3.45 (6H, br), 2.61 (6H, br), 1.86 (2H, q, J= 7.6 MHz), 1.45 (4H, quint, J= 7.4 MHz), 1.34 (6H, s), 1.29 (4H, sestetto, J= 7.6 MHz), 0.88 (6H, t, J= 7.4), 0.77 (H, d, J= 7.4 MHz), ¹³C NMR (DMSO): δ = 181.72, 55.22, 53.09, 27.28, 20.07, 14.21, 8.76 ppm. Anal. Per: C₂₂H₄₇N₇S₃, Calc. C 52.21, H 9.37, N 19.38, Trovato C 52.4, H 9.4, N 19.0.

5-(2-terzbutilossicarbonilamidoetil)-2,5,8,10,18-pentaazacicloottadeca-1,9-ditione (10): Una soluzione di 1,7-eptandiammina (**9**) (0,55 g, 4.24 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) ed una soluzione di **3** (1,4 g, 4,24 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) sono state contemporaneamente gocciolate in 100 mL di CH₂Cl₂. La miscea di reazione risultante è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 giorno. Quando tutti i reagenti sono stati consumati, il solvente di reazione è stato evaporato a pressione ridotta. Il prodotto desiderato è stato purificato mediante flash-cromatografia su colonna (SiO₂, eluente: da CHCl₃ a CHCl₃/MeOH 2%). Il prodotto isolato di presenta come solido bianco (260 mg; 57 mmol). Resa: 15%. ¹H MNR (CDCl₃): δ = 6.72 (2H, br), 6.53 (2H, br), 5.14 (1H, brs), 3.51 (4H, br), 3.41 (4H, br), 3.41 (2H, m), 3.08 (2H, brs), 2.59 (4H, t, J= 5.2 MHz), 2.49 (2H, t, J= 4.4 MHz), 1.51 (4H, m), 1.37 (9H, s), 1.29 (6H, m), ¹³C MNR (CDCl₃): δ = 177.19, 135.9, 53.41, 52.59, 28.72, 27.99 ppm.

5-(2-amminoetil)-2,5,8,10,18-pentaazacicloottadeca-1,9-ditione (11): K.M. Di Vittorio et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 17, **2009**, 141-148. Sotto atmosfera inerte di azoto, 5 ml di acido trifluoro acetico sono stati addizionati ad una soluzione di **10** (150 mg, 0,33 mmol) in 5 mL di CH₂Cl₂ a 0° C. La miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente ed è stata mantenuta sotto agitazione per 3 ore. Il solvente è stato quindi evaporato mediante rotavapor e il residuo è stato ripreso con una piccola aliquota di acqua (5 mL). L'eccesso di TFA è stato eliminato per evaporazione con rotavapor. Il prodotto ottenuto è stato essiccato sotto vuoto e utilizzato per la reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

5-(2-(2-metil-2-butil)amminotiocarbonilamminoetil)-2,5,8,10,18-pentaazacicloottadeca-1,9-ditione (T3): Sotto atmosfera di azoto, una soluzione di trietilammina (1 mL) e **5** in 2 mL di DMF sono stati aggiunti goccia a goccia ad una soluzione del composto **11** (119 mg, 0,33 mmol) in 10 mL di DMF. La soluzione risultante è stata quindi mantenuta sotto agitazione per 2 giorni a temperatura ambiente. La reazione è stata monitorata tramite TLC, quando tutti i reagenti sono stati consumati, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta. Il prodotto desiderato è stato isolato per precipitazione da CHCl₃ per aggiunta di *o*f Et₂O e purificato mediante flash-cromatografia su colonna (fase stazionaria: SiO₂, eluente: CHCl₃/MeOH 1%). Il prodotto ottenuto si presenta sotto forma di solido bianco (65 mg, 0.132 mmol). Resa: 40%. MS: 490.3; ¹H MNR (DMSO): δ = 7.44 (2H, brs), 7.21 (2H, brs.), 7.15 (1H, brs), 7.03 (1H, s), 3.45 (6H, s), 3.30 (1H, s), 2.69 (6H, s), 1.86 (2H, quartet, J= 7.44 MHz), 1.46 (4H, m), 1.34 (6H, s), 1.28 (6H, s), 0.77 (3H, t, J= 7.4 MHz), ¹³C NMR (DMSO): δ = 181.33, 79.16, 54.72, 51.66, 32.00, 27.65, 26.81, 25.23, 8.27 ppm. Anal. Per: C₂₁H₄₃N₇S₃, Calc. C 51.50, H 8.85, N 20.02, Trovato C 51.7, H 8.3, N 20.3.

Acido 2,2,8,8-tetrametilnonanoico (14): Seguita sintesi riportata in: F. Beijer H. et al., J. Am. Chem. Soc. **1998**, 120, 6761-6769, A. T. ten Cate et al., J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125, 6860-6861. Resa: 55 %. ¹H MNR (DMSO): δ = 1.41 (4H, m), 1.20 (6H, m), 1.07 (12H, s) ppm.

2,2,8,8-tetrametilnonan-2,8-diammina (15): Per la sintesi è stato seguito il procedimento riportato in A. T. ten Cate et al., J. Am. Chem. Soc., 126, **2004**, 3801-3808. Resa 55 %. ¹H MNR (DMSO): δ = 1.26 (10H, m), 0.99 (12H, s) ppm.

5-(2-terzbutilossicarbonilamidoetil)-11,11,17,17,-tetrametil-2,5,8,10,18-pentaazacicloottadeca-1,9-ditione (16): Una soluzione del composto **15** (1,16 g, 3,5 mmol) in CHCl₃ (150 mL) e una soluzione del composto precursore **3** (0,65 g, 3,5 mmol) in CHCl₃ (150 mL) sono state gocciolate contemporaneamente in 200 mL di CHCl₃. La soluzione risultante è stata mantenuta sotto agitazione per 1 giorno. Il solvente di reazione è stato evaporato a pressione ridotta e il prodotto ottenuto è stato purificato mediante flash-cromatografia (SiO₂, eluente: da CHCl₃ a CHCl₃/MeOH 2%). Resa: 25 %. (440 mg, 0,85 mmol). ¹H MNR (CDCl₃): δ = 6.46 (2H, brs), 5.95 (2H, brs), 5.16 (1H, s), 3.60 (2H, br), 3.22 (4H, t), 2.70 (4H, br), 2.63 (2H, br), 1.92 (4H, br), 1.49 (9H, s), 1.46 (12H, s), 1.35 (6H, br), ¹³C MNR (DMSO): δ = 181.45, 156.56, 65.86, 56.09, 28.48, 28.31, 28.19, 23.73, 15.28 ppm.

5-(2-amminoetil)-11,11,17,17,-tetrametil-2,5,8,10,18-pentaazacicloottadeca-1,9-ditione (17): K.M. Di Vittorio et al., Bioorg. Med. Chem., 17, **2009**, 141-148. Sotto atmosfera inerte di azoto, 5 ml di acido trifluoro acetico sono stati addizionati ad una soluzione di **10** (150 mg, 0,27 mmol) in 5 mL di CH₂Cl₂ a 0° C. La miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente ed è stata mantenuta sotto agitazione per 3 ore. Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso con una piccola aliquota di acqua (5 mL). L'eccesso di TFA è stato eliminato

per evaporazione con rotavapor. Il prodotto ottenuto è stato essiccato sotto vuoto e utilizzato per la reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

5-(2-(2-metil-2-butil)amminotiocarbonilamminoetil)-11,11,17,17-tetrametil-2,5,8,10,18-

pentaazacicloottadeca-1,9-ditione (T4): Il composto **17** (440 mg, 0,85 mmol) è stato disciolto in 10 mL di DMF anidra sotto atmosfera inerte di N₂, alla soluzione risultante è stato aggiunto 1 mL di Et₃N. Una soluzione del composto **5** (110 mg, 0,85 mmol) in 2 mL di DMF anidra è stata aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione sotto N₂. La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione per 2 giorni a temperatura ambiente. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il prodotto è fatto precipitare per aggiunta di *n*-esano. Il prodotto grezzo è sufficientemente puro, abbiamo cercato di isolare il composto per flash-cromatografia su colonna preimpaccata di SiO₂, NH₄OH come eluente. Il composto ottenuto non raggiunge il grado di purezza desiderato.

Ringraziamenti

La prima persona a cui porgo i miei ringraziamenti e grazie il quale è nato questo progetto di tesi è il Prof. Vieri Fusi. Grazie per avermi permesso di lavorare con il suo gruppo di ricerca ed per avermi avvicinata con la sua immensa passione e il suo entusiasmo al mondo della Chimica Supramolecolare, grazie per tutto quello che mi ha permesso di apprendere e per tutte le opportunità concesse, che mi hanno fatta crescere sia professionalmente che umanamente.

Ringrazio di cuore tutto il gruppo di ricerca, il Prof. Luca Giorgi, il Dott. Gianluca Ambrosi, il Prof. Mauro Formica, il Prof. Mauro Micheloni, il Dott. Roberto Pontellini e Annarita Pierleoni, perchè con mi hanno costantemente aiutata e supportata. Sono infinitamente grata per tutti i preziosi insegnamenti, per il sostegno e, sì, anche per il sorriso che mi hanno sempre regalato.

Un grandissimo ringraziamento va al Prof. Phil Gale, per avermi concesso di unirmi al suo gruppo di ricerca per qualche mese, avere la possibilità di conoscere e imparare da un professore di altissimo prestigio è stata un'esperienza indimenticabile. Un grazie di cuore va anche tutto il gruppo di ricerca dell'Università di Southampton: i dottorandi Laura Jownett, Harriet Clarke, Mike Spooner, Yufeng Tung, e i ricercatori Ethan Howe, Xiapping Bao e Xin Wu, per avermi subito accolta, per l'aiuto e i numerosi insegnamenti, ma soprattutto per aver reso la mia permanenza così piacevole.

Grazie, infine, alla mia meravigliosa famiglia, agli amici e ai colleghi dell'università, che in questi anni mi sono sempre stati accanto, mi hanno aiutata a crescere e a credere in me stessa, dandomi forza ogni giorno. Questo importante traguardo lo devo anche grazie a voi.

Grazie a tutti!

Riferimenti Bibliografici:

- ¹ J.M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, **2007**, 151-16.
- ² J.P. Behr, *The lock and key principle. The state of art 100 years on*, Chichester, **1994**.
- ³ J.M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH; Weinhiem, **2015**.
- ⁴ V. Aucagne, J. Berna, J. D. Crowley, S. M. Goldup, K. D. Hänni, D. A. Leigh, P. J. Lusby, V. E. Ronaldson, A. M. Z. Slawin, A. Viterisi, and D. B. Walker, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 11950–11963.
- ⁵ D.H. Nush, N.H. Stephenson, *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, 100, 119.
- ⁶ G. Illuminati, L. Mandolini, B. Masci, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 555.
- ⁷ J.S. Lindsey, *Self-Assembly in Synthetic Routes to Molecular Devices. Biological Principles and Chemical Perspectives: Review*. *New J. Chem.*, **1991**, 15, 153-180.
- ⁸ S. Grover, E. Hamel, The magnesium-GTP interaction in microtubule assembly, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 222, 163-172.
- ⁹ G. Gokel, J.F. Stoddard Ed., *Crown Ether and Cryptands* **1967**, 2495.,
- ¹⁰ (a) J.M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1988**, 27, 89. (b) R.M. Izatt, K. Pawalak, G. Bradshaw, R.L. Bruenig, B.J. Tabet, *Chem. Rev.*, **1992**, 1261.
- ¹¹ D. J. Cram and J. M. Cram, *Cyclophane Chemistry: Bent and Battered Benzene Rings*, **1971**, 204-213.
- ¹² C.D. Gutsche, *Calixarenes*, J.F. Stoddard Ed., **1991**.
- ¹³ (a) J. E. Richman, T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 2268. (b) A. Bianchi, M. Ciampolini, M. Micheloni, N. Nardi, B. Valtancoli, S. Mangani, E. Garcia-España, J. A. Ramirez, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1989**, 1131.
- ¹⁴ Nasir MS, Fahrni CJ, Suhy DA, Kolodsick KJ, Singer CP, O'Halloran TV. *J Bigol Inorg Chem.* **1999** dec; 4(6):775-83.
- ¹⁵ Holbrey, J. D.; Rogers, R. D. In *Ionic Liquids in Synthesis*; Wasserscheid, P, Welton, T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2003**, 41.
- ¹⁶ S. Galijasevic, K. Krylova, M. J. Koenigbauer, G. S. Jaeger, J. D. Bushendorf, M.J. Heeg, L.A. Ochrymowycz, M.J. Taschner, and D.B. Rorabacher, *Dalton Trans.*, **2003**, 1577-1586.
- ¹⁷ D.J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1986**, 25, 1039.
- ¹⁸ D.B. Smithurd; E.M. Sandford, I. Chao, Solvent effects in molecular recognition, *Pure Appl. Chem.*, **1990**, 62, 2227-2236.
- ¹⁹ K.A. Connors, *Binding Constant*, Wiley, Chichestr, **1987**.
- ²⁰ E.V. Anslyn, D.A. Dougherty, *Modern Physical Organic Chemistry*, University Science Books, Sausalito, CA, USA, **2006**, 162-168.
- ²¹ G.A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, Oxford, **1997**.
- ²² J.C. MA, D. Dougherty, The Cation- π Interaction, *Chm. Rev.*, **1997**, 97, 1030-1324.
- ²³ O.B. Berryman, V.S. Bryantsev, D.P. Stay, D.W. Johnson, B.P. Hay, Structural criteria for the Design of Anion Receptor: The interaction of Halides with Electron-deficient Arenes, *JACS*, **2007**, 129, 48-58.
- ²⁴ C.A. Hunter, K.R. Lawson, J. Perkins, C.J. Urch, Aromatic Interaction, *Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2001**, 651-669.
- ²⁵ A.I. Kitagorodski, *Molecular Crystals and Molecules*, Academic Press., **1973**, New York.
- ²⁶ B. Valeur; *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH Wenheim **2002**.
- ²⁷ (a) Bianchi, A.; Bowman-James, K.; García-España, E. *Supramolecular Chemistry of Anions*. Wiley-VCH Verlag, GmbH, New York, **1997**. (b) Sessler, J. L.; Gale, P. A.; Cho, W.-S. *Anion Receptor Chemistry. Royal Society of Chemistry*, **2006**. (c) Huston, M. E.; Akkaya, E. U.; Czarnik, A. W. Chelation enhanced fluorescence detection of non-metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8735-8737. (d) De Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunlaugson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1515-1566. (e) Pina, F.; Bernardo, M. A.; García-España, E. Fluorescent chemosensors containing polyamine receptors. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2143-2157. (f) Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419-4476. (g) Albelda M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Schneider, H.-J. Supramolecular complexation for environmental control. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3859-3877. (h) Formica, M.; Fusi, V.; Paoli, P.; Piersanti, P.; Rossi, P.; Zappia, G.; Orlando, P. New branched macrocyclic ligand and its side-arm, two urea-based receptors for anions: synthesis, binding studies and crystal structure. *New J. Chem.*, **2008**, 32, 1204-1214.

- ²⁸ F. Pina, M. A. Bernardo; Garcia Espana E.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2143-2157.
- ²⁹ M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, New Fluorescent Chemosensors for Metal Ions in Solution, *Coordination Chem. Rev.*, **2012**, 256, 170-192.
- ³⁰ T. Miniami, Y. Liu, A. Akdeniz, P. Koutnik, N. Esipenko, N.A. Nishiyabu, Y.R. Kubo, P. Jt. Anzenbacher, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 11396-11401.
- ³¹ A.E. Martell, R.D. Hancock, *Metal Complexes in Aqueous Solution*, **1996**.
- ³² (a) Pina, F.; Bernardo, M. A.; García-España, E. Fluorescent Chemosensors Containing Polyamine Receptors. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2143-2157. (b) Bencini, A.; Bernardo, M. A.; Bianchi, A.; García-España, E.; Giorgi, C.; Luis, S.; Pina, F.; Valtancoli, B. Sensing Cations and Anions by Polyamine Luminescent Receptors in solution. *Adv. Supramol. Chem.*, **2002**, 8, 79-130. (c) Albelda M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Schneider, H.-J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3859-3877. (d) Lehn, J.-M. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* **1988**, 27,89.
- ³³ S. Mitsuhiko, Kimura E. and Motoo S., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6730-6737.
- ³⁴ G. Ambrosi, P. Dapporto, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45 (1), 304-314.
- ³⁵ S. Amadori, G. Ambrosi, M. Fanelli, M. Formica, V. Fusi L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 2207-2218.
- ³⁶ A. Bianchi, K. Bowman,-James, E. Gacia-Espana, *Supramolecular Chemistry of Anions*, **1997**.
- ³⁷ J. T. Davis, O. Okunola and R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3843-3862.
- ³⁸ A. P. Davis, D. N. Sheppard and B. D. Smith, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 348-357.
- ³⁹ F. M. Ashcroft, Ion Channels and Disease, *Academic Press*, San Diego, **2000**.
- ⁴⁰ T. M. Fyles, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 335-347.
- ⁴¹ B. A. McNally, E. J. O'Neil, A. Nguyen and B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 17274-17275.
- ⁴² N. Busschaert and P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1374-1382.
- ⁴³ C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, 23, 3-25.
- ⁴⁴ B. C. Pressman, *Annu. Rev. Biochem.*, **1976**, 45, 501-530.
- ⁴⁵ H.H. Mollenhauer, D. James Morr e, L. D. Rowe, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, **1990**, 1031, 225-246.
- ⁴⁶ a) T. Sato, H. Konno, Y. Tanaka, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman and S. Ohkuma, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 21455-21462. (b) J. L. Sessler, L. R. Eller, W.-S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. T. Lee, V. M. Lynch and D. J. Magda, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 5989-5992. (c) J. T. Davis, P. A. Gale, O. A. Okunola, P. Prados, J. C. Iglesias-Sánchez, T. Torroba and R. Quesada, *Nat. Chem.*, **2009**, 1, 138-144.
- ⁴⁷ M. S. Melvin, D. C. Ferguson, N. Lindquist and R. A. Manderville, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 6861-6869.
- ⁴⁸ Gadsby D.C., Vergani P., Csan dy L, The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis, **2006**, 440 (7083), 477-83.
- ⁴⁹ J. T. Davis, O. Okunola and R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3843-3862.
- ⁵⁰ a) A. V. Koulov, T. N. Lambert, R. Shukla, M. Jain, J. M. Boon, B. D. Smith, H. Li, D. N. Sheppard, J.-B. Joos, J. P. Clare and A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4931-4933. (b) S. Rastogi, E. Marchal, I. Uddin, B. Groves, J. Colpitts, S. A. McFarland, J. T. Davis and A. Thompson, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 3834-3845. (c) S. J. Moore, M. Wenzel, M. E. Light, R. Morley, S. J. Bradberry, P. Gomez-Iglesias, V. Soto-Cerrato, R. Perez-Tomas and P. A. Gale, *Chem. Sci.*, **2012**, 3, 2501-2509.
- ⁵¹ N. Busschaert, I. L. Kirby, S. Young, S. J. Coles, P. N. Horton, M. E. Light and P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 4426-4430.
- ⁵² N. Busschaert, M. Wenzel, M. E. Light, P. Iglesias-Hernández, R. Pérez-Tomás and P. A. Gale, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 14136-14148.
- ⁵³ B. A. McNally, A. V. Koulov, T. N. Lambert, B. D. Smith, J.-B. Joos, A. L. Sisson, J. P. Clare, V. Sgarlata, L. W. Judd, G. Magro and A. P. Davis, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 9599-9606.
- ⁵⁴ V. Saggiomo, S. Otto, I. Marques, V. t. Félix, T. s. Torroba and R. Quesada, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 5274-5276.
- ⁵⁵ H. Valkenier, C. J. E. Haynes, J. Herniman, P. A. Gale and A. P. Davis, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 1128-1134.
- ⁵⁶ N. J. Knight, E. Hernando, C. J. E. Haynes, N. Busschaert, H. J. Clarke, K. Takimoto, M. Garcia-Valverde, J. G. Frey, R. Quesada and P. A. Gale, *Chem. Sci.*, **2016**.
- ⁵⁷ R. W. Hoffmann, F. Hettche and K. Harms, *Chem. Commun.*, **2002**, DOI: 10.1039/B200605G, 782-783.
- ⁵⁸ P. V. Santacroce, J. T. Davis, M. E. Light, P. A. Gale, J. C. Iglesias-Sánchez, P. Prados and R. Quesada, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1886-1887.

- ⁵⁹ A. V. Koulov, T. N. Lambert, R. Shukla, M. Jain, J. M. Boon, B. D. Smith, H. Li, D. N. Sheppard, J.-B. Joos, J. P. Clare and A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4931-4933.
- ⁶⁰ B. D. Smith and T. N. Lambert, *Chem. Commun.*, **2003**, DOI: 10.1039/B303359G, 2261-2268.
- ⁶¹ a) N. R. Clement and J. M. Gould, *Biochem.*, **1981**, 20, 1534-1538. (b) N. Sakai and S. Matile, *J. Phys. Org. Chem.*, **2006**, 19, 452-460
- ⁶² <http://supramolecular.org>.
- ⁶³ W.N. Lipscomb, N. Strater, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 2375-2433.
- ⁶⁴ A.Q. Troung-Tran, J. Carter, R.E. Ruffin, P.D. Kalewski, *Biomaterials*, **2001**, 14, 315-330.
- ⁶⁵ E. Kimura, S. Aoki, E. Kikuta, T. Koike, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 3731-3736.
- ⁶⁶ M.P. Cuajungco, G.J. Lees, *Neurobiol. Dis.*, **1997**, 4, 137-196.
- ⁶⁷ A.I. Nush, W.H. Pettingell, G. Multhaup, M.D. Paradis, J.P. Vonsattel, J.F. Gusella, K. Beyreuther, C.L. Masters, R.E. Tanzi, *Science*, **1994**, 265, 1464-1467.
- ⁶⁸ J.Y. Koh, S.W. Suh, B.J. Gwag, Y.Y. He, C.Y. Hsu, D.W. Choi, *Science*, **1996**, 1013-1016.
- ⁶⁹ (a) G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 5901. (b) L. Fabbrizzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 147.
- ⁷⁰ X. Wu, L.W. Judd, E. Howe, Y.B. Jiang, P.A. Gale, *Chem.*, **2016**, 1, 1-20.
- ⁷¹ A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-Espana, V. Fusi, M. Micheloni, P. Paoletti, J.A. Ramirez, A. Rodriguez, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1992**, 0, 1059-1065.
- ⁷² A.J. Blake, A. Bencini, C. Caltagirone, G. De Filippo, L.S. Dolci, A. Garan, F. Isaia, V. Lippolis, P. Mariani, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, C. Wilson, A new pyridine-based 12-membered macrocycle functionalised with different fluorescent subunits; coordination chemistry towards Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), and Pb(II), *Dalton Trans.*, **2004**, 2771-2779.
- ⁷³ G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 9940-9948.
- ⁷⁴ L. Tang, X. Dai, K. Zhong, D. Wu, X. Wen, A novel 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole derivated fluorescent sensor for highly selective and ratiometric recognition of Zn²⁺ in water through switching on ESIPT, *Sensor and Actuators B*, **2014**, 203, 557-564.
- ⁷⁵ A. Terenzi, M. Fanelli, G. Ambrosi, S. Amadori, V. Fusi, L. Giorgi, V. Turco Livieri, G. Barone, *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 4389.
- ⁷⁶ (a) J.E. Kwon, S. Lee, Y. You, K.H. Baek, K. Ohkubo, J. Cho, Shunichi Fukuzumi, I. Shin, Y Park, W. Nam, *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 8760-8774. (b)
- ⁷⁷ B.C. Pressman, Biological Applications of Ionophores, *Annu. Rev. Biochem.*, **1976**, 45, 501, 530.
- ⁷⁸ X. Wu et al., Nonprotonophoric Electrogenic Cl⁻ Transport Mediated by Valinomycin-like Carriers *Chem*, **2016**, 1, 127-146.
- ⁷⁹ H. M. Berschneider, M. R. Knowles, R. G. Azizkhan, R. C. Boucher, N. A. Tobey, R. C. Orlando, And D. W. Powell, *The FASEB Journal* Vol.2, **2016**, 10, 2625-2629.
- ⁸⁰ X. W, P.A. Gale, Small-Molecule Uncoupling Protein Mimics: Synthetic Anion Receptors as Fatty Acid-Activated Proton Transporters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138 (50), 16508-1651.
- ⁸¹ Clares, M. P.; Blasco, S.; Inclán, M.; del Castillo Agudo, L.; Verdejo, B.; Soriano, C.; Doménech, A.; Latorre, J.; García-España, E. *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 5988-5990.
- ⁸² Blasco, S.; Verdejo, B.; Clares, M. P.; Castillo, C. E.; Algarra, A. G.; Latorre, J.; Mañez, M. A.; Basallote, M. G.; Soriano, C.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 7016-7027.
- ⁸³ Czarnik, A. W. In *Fluorescent Chemosensor for Ion and Molecule Recognition*; American Chemical Society: Washington, DC, **1993**.
- ⁸⁴ (a) J.V. De Julián-Ortiz, B. Verdejo, V. Polo, E. Besalú, E. García-España *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, 17, 1131. (b) B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C.E. Castillo, J. Gonzalez, J. Latorre, M.A. Manez, M. Garcia Basallote, C. Soriano, E. Garcia-Espana, *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 5707-5719.
- ⁸⁵ Allen F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr.* **2002**, B58, 380-388.
- ⁸⁶ Clares, M. P.; Serena, C.; Blasco, S.; Nebot, A.; del Castillo, L.; Soriano, C.; Domenech, A.; Sánchez-Sánchez, A. V.; Soler-Calero, L.; Mullor, J. L.; García-España, A.; García-España, E. Mn(II) complexes of scorpiand-like ligands. A model for the MnSOD active centre with high in vitro and in vivo activity. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 143, 1-8.
- ⁸⁷ MacCarthy, P. Simplified experimental route for obtaining Job's curves. *Anal. Chem.* **1978**, 50, 2165.

-
- ⁸⁸ Baudoin, O.; Gonnet, F.; Teulade-Fichou, M.-P.; Vigneron, J.-P.; Tabet, J.-C.; Lehn, J.-M. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2762-2771.
- ⁸⁹ Ambrosi, G.; Ciattini, S.; Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Macedi, E.; Micheloni, M.; Paoli, P.; Rossi, P.; Zappia, G. A new versatile solvatochromic amino-macrocyclic. From metal ions to cell sensing in solution and in the solid state. *Chem. Commun.*, **2009**, 7039-7041.
- ⁹⁰ G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, G. Piersanti, R. Pontellini, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 1471-1478.
- ⁹¹ A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-Espana, V. Fusi, M. Micheloni et al., *J. of the Chem. Soc., Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)*, **1992**, 1059 – 1065.
- ⁹² G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 309-320.
- ⁹³ S. Rios Vazques, M.C. Rioz- Rodriguez, M. Mosquera, F. Rodriguez-Prieto, *J. Phys. Chem.*, **2007**, *111*, 1814-1826.
- ⁹⁴ J. E. Know, S. Lee, Y. You, K.H. Baek, K. Ohkubo, J. Cho, S. Fukuzumi, I. Shin, S.Y. Park, W. Nam, *Intorg. Chem.*, **2012**, *51*, 8760-8774.
- ⁹⁵ O.K. Abou-Zied, R. Jimenez, E.H.Z. Thompson, D. Millar, F.E. Romesberg, *J. Phys. Chem.*, **2002**, *106*, 3365-3672.
- ⁹⁶ T. Iijima, A. Momotake, Y. Shinohara, T. Sato, Y. Nishimura, F. Rodriguez-Prieto, *J. Phys. Chem.*, **2010**, *114*, 1603-1609.
- ⁹⁷ S. Rios Vazques, M.C. Rioz- Rodriguez, M. Mosquera, F. Rodriguez-Prieto, *J. Phys. Chem.*, **2008**, *112*, 376-387.
- ⁹⁸ Larisa Lvova et al., *Procedia Engineering*, **2016**, *168*, 346 – 350.
- ⁹⁹ W. Tai et al., *Biomaterials*, *35*, **2014**, 7194-7203.
- ¹⁰⁰ a) A. T. ten Cate, P. Y. W. Dankers, H. Kooijman, A. L. Spek, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer; *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 6860-6861.
b) A. T. ten Cate, H. Kooijman, A. L. Spek; R. P. Sijbesma, E. W. Meijer; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3801-3808.
- ¹⁰¹ www.vcclab.org/lab/alogps
- ¹⁰² P. Jyotirmayee, H. Pal, A.V. Sapre, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 2193
- ¹⁰³ Matile, S., N. Sakai. The characterization of synthetic ion channels and pores. **2012**,. In *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, 2 ed., C.A. Schalley, ed. (Weinheim: Wiley-VCH), 711-742.