



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

Studio degli equilibri in soluzione del Fe(III) e dell'Al(III)
con leganti caratterizzati da siti di coordinazione
a base di ossigeno

SUPERVISORE:

Prof.ssa Valeria Marina Nurchi

COORDINATORE:

Prof. Italo Ferino

TESI DI DOTTORATO DI

Maria Miriam Leone

DOTTORATO DI RICERCA IN CHIMICA
XIX Ciclo
A.A.2005-2006

*Alla mia famiglia
con affetto e gratitudine*

Ringrazio calorosamente la professoressa Valeria Nurchi, il mio supervisore, e il professor Guido Crisponi per l'aiuto, per la loro sempre pronta disponibilità e per i preziosi consigli che in questi tre anni di dottorato mi hanno permesso di crescere professionalmente.

Un ringraziamento particolare alla professoressa Rosalba Pinna e al professor Franco Cristiani per i numerosi e preziosi consigli umani e professionali.

Un grazie di cuore a Tiziana, per la nostra amicizia, per essermi sempre stata vicina, per il suo aiuto, per la sua disponibilità illimitata e per avermi sempre spronata e sostenuta in questi tre anni.

Un grazie particolare al mio collega Elia per l'amicizia, il sostegno e la stima che mi ha sempre dimostrato.

Infine ringrazio la mia cara famiglia, mio marito Eduardo, mio padre, mia madre e mia sorella Stefania per essermi sempre stati molto vicini, per avermi sempre spronato e sostenuto davanti a tutte le difficoltà. A loro dedico questo mio lavoro.

INDICE

Capitolo 1 – La terapia chelante

- 1.1 Introduzione
- 1.2 La terapia chelante
- 1.3 Il Ferro
- 1.4 L'Alluminio
- 1.5 Argomento della tesi
- 1.6 Riferimenti Bibliografici

Capitolo 2 - Tecniche Sperimentali

- 2.1 Il metodo potenziometrico
- 2.2 Metodo spettrofotometrico
 - 2.2.1 *Decomposizione delle gaussiane spettrali*
- 2.3 Titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche
- 2.4 Titolazioni Fluorimetriche
 - 2.4.1 *Strumentazione*
- 2.5 Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare
 - 2.5.1 *Informazioni strutturali fornite dagli spettri 1H -NMR*
 - 2.5.2 *Strumentazione*
- 2.6 Calcoli Teorici
- 2.7 Metodo Voltammetrico
 - 2.7.1 *Segnali di eccitazione in voltammetria*
 - 2.7.2 *Voltammetria ciclica*
- 2.8 Riferimenti Bibliografici

Capitolo 3 - Equilibri di formazione dei complessi tra catecolo, 4-nitrocatecolo e ioni Al(III) e Fe(III)

- 3.1 Schema del lavoro
- 3.2 Costanti di protonazione dei leganti
 - 3.2.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
 - 3.2.2 *Misure fluorimetriche*
 - 3.2.3 *Analisi dei dati*
- 3.3 Complessi del Fe(III)
 - 3.3.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
 - 3.3.2 *Misure potenziometriche*
 - 3.3.3 *Modelli di complessazione*
 - 3.3.4 *Quantomeccanica molecolare*
 - 3.3.5 *Misure Fluorimetriche*
- 3.4 Complessi dell'Al(III)
 - 3.4.1 *Misure spettrofotometriche*
 - 3.4.2 *Misure potenziometriche*
 - 3.4.3 *Misure NMR*
 - 3.4.4 *Misure fluorimetriche*
 - 3.4.5 *Modelli di complessazione*
 - 3.4.6 *Quantomeccanica molecolare*
- 3.5 Efficacia dei leganti
- 3.6 Misure Voltammetriche
- 3.7 Riferimenti bibliografici

Capitolo 4 - Equilibri di formazione dei complessi tra acido 3-metossi salicilico, orto vanillina e ioni Al(III) e Fe(III)

- 4.1 Schema del lavoro
- 4.2 Costanti di protonazione dei leganti
 - 4.2.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
- 4.3 Complessi del Fe(III)

- 4.3.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
- 4.3.2 *Modelli di complessazione*
- 4.3.3 *Quantomeccanica molecolare*
- 4.4 Complessi dell'Al(III)
 - 4.4.1 *Misure NMR*
 - Acido 3-metossi salicilico\Al(III)*
 - Orto vanillina\Al(III)*
 - 4.4.2 *Modelli di complessazione*
 - 4.4.3 *Quantomeccanica molecolare*
- 4.5 Efficacia dei leganti
- 4.6 Riferimenti Bibliografici

Capitolo 5 - Equilibri di formazione dei complessi di alcuni leganti catecol-bifosfonici con lo ione Fe(III)

- 5.1 Schema del lavoro
- 5.2 Costanti di protonazione dei leganti
 - 5.2.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
- 5.3 Complessi del Fe(III)
 - 5.3.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
- 5.4 Modelli di complessazione
- 5.5 Calcoli di quantomeccanica molecolare
- 5.6 Efficacia dei leganti
- 5.7 Riferimenti bibliografici

Capitolo 6 - Equilibri di formazione dei complessi tra il Fe(III) ed una serie di nuovi leganti contenenti un gruppo bifosfonato ed un gruppo idrossipiridinone

- 6.1 Costanti di protonazione dei leganti
 - 6.1.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
- 6.2 Complessi del Fe(III) e dell'Al(III) con il legante **1**
 - 6.2.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*

- 6.2.2 *Misure NMR*
- 6.3 Studio degli equilibri della formazione dei complessi tra Fe(III) e il legante **2**
 - 6.3.1 *Misure potenziometriche e spettrofotometriche*
 - 6.3.2 *Calcoli di quantomeccanica molecolare*
 - 6.3.3 *Misure NMR*
- 6.4 Riferimenti Bibliografici

Appendice

Reagenti

Strumentazione

Preparazione delle soluzioni

1. Soluzione di titolante
2. Mezzo ionico
3. Soluzione madre di Fe(III)
 - 3.1 *Fe/Desferal*
 - 3.2 *Fe/KSCN*
4. Soluzione madre di Al(III)
5. Soluzione dei leganti
 - 5.1 *Purificazione del catecolo*

Capitolo 1

La terapia chelante

1.1 Introduzione

Molti ioni metallici svolgono un doppio ruolo nella fisiologia dell'organismo: alcuni sono essenziali per la vita, altri tossici. Gli essenziali servono per il funzionamento delle cellule procariote ed eucariote (17 dei 30 elementi essenziali per la vita sono metalli). Alcuni hanno solo effetti tossici (cadmio), mentre altri, essenziali per il normale funzionamento cellulare, sono tossici a concentrazioni elevate: i metalli che cadono in questa categoria comprendono il rame (un cofattore essenziale per molti enzimi ossidativi, come per esempio catalasi e perossidasi), il cobalto (un cofattore essenziale per la vitamina B₁₂), il manganese (un cofattore in molte reazioni enzimatiche che coinvolgono la fosforilazione, il colesterolo e la sintesi degli acidi grassi), il ferro (richiesto per l'emoglobina), il selenio (essenziale per la glutatione perossidasi) e il molibdeno (un cofattore essenziale per la xantina ossidasi e l'aldeide ossidasi, richiesto anche nelle piante per fissare l'azoto atmosferico attraverso i batteri). L'abilità dei metalli sia di distruggere che di nutrire ha portato allo sviluppo di molti e complessi meccanismi cellulari per regolarne la locazione e la disponibilità intracellulare. Le strategie di controllo richiedono per il loro funzionamento la disponibilità dei metalli in alcuni componenti cellulari, ma la presenza di questi stessi metalli in altri componenti può essere pericolosa e nociva per l'organismo¹.

I metalli e i composti metallici possono essere assorbiti per ingestione, inalazione e per assorbimento attraverso la pelle (mercurio e composti organometallici).

I metalli e i composti metallici assunti oralmente vengono principalmente assorbiti nel tratto intestinale e l'assorbimento avviene attraverso processi di diffusione dovuti a gradienti di concentrazione; in particolare, per elementi essenziali come il ferro, esistono degli speciali meccanismi di trasporto.

Quando inalati, i gas ed i vapori idrosolubili vengono disciolti nelle mucose della regione rinofaringea e tracheobronchiale, mentre quelli meno solubili raggiungono le zone terminali delle vie respiratorie e gli alveoli polmonari, per poi immettersi nel circolo sanguigno e linfatico.

Una volta assorbiti, gli ioni metallici e i loro composti entrano nel circolo ematico, legati principalmente alle proteine del plasma sanguigno. Attraverso il circolo sanguigno i metalli vengono distribuiti nell'organismo².

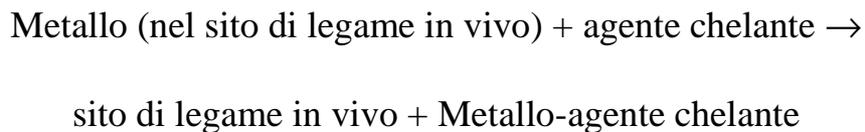
Il comportamento di un metallo in condizioni fisiologiche dipende in modo essenziale dalla sua "speciazione", ovvero dalle diverse forme in cui esso si trova in un determinato ambiente.

Dallo studio termodinamico degli equilibri in soluzione e, quindi, dai valori delle costanti di formazione dei complessi che si ottengono, si possono determinare le varie specie presenti in soluzione e le loro concentrazioni.

L'approccio termodinamico si applica allo studio di molecole leganti che interagiscono con gli ioni metallici siano essi essenziali per l'organismo vivente o capaci di produrre effetti tossici per accumulo. Queste molecole assumono un interesse di tipo biomedico in quanto potenzialmente applicabili nei processi di spostamento di un metallo dall'organismo umano (terapia chelante) nelle patologie dovute ad accumulo di metalli pesanti.

1.2 La terapia chelante

I metalli tossici esercitano molti dei loro effetti avversi formando complessi metallici con gli enzimi, DNA, o altre molecole che si trovano nell'organismo. Questi complessi metallici molto spesso hanno proprietà che differiscono notevolmente dalle molecole originarie (enzimi o DNA). Un aspetto dunque rilevante è l'uso di agenti chelanti come farmaci per rimuovere i metalli tossici dai siti nei quali essi sono legati in vivo. L'uso di un agente chelante come farmaco dipende dall'abilità di competere efficacemente con i siti naturali di coordinazione per formare un complesso con lo ione metallico tossico. Questo processo di detossicazione può essere scritto come:



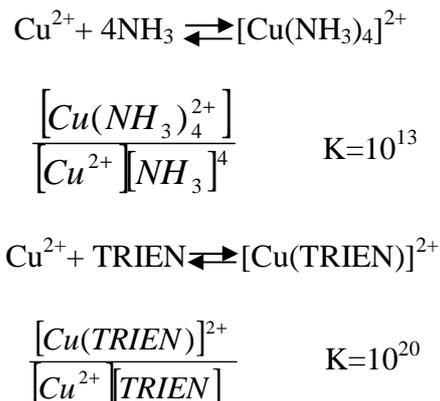
Gli studi sull'uso degli agenti chelanti come antagonisti dei metalli tossici iniziò nel 1940 e da quella data la letteratura è cresciuta considerevolmente.

La parola "chelation" fu ideata dal chimico inglese Gilbert Morgan nel 1930 per descrivere il legame che avviene quando una data molecola (legante) è legata ad uno ione metallico da uno o più dei suoi atomi. I complessi metallici risultanti hanno spesso proprietà inusuali come l'abilità di essere risolti in forme otticamente attive e una stabilità maggiore rispetto ai complessi analoghi nei quali i gruppi legati al metallo non appartengono alla stessa molecola. Questa differenza in stabilità diventa più pronunciata se si considerano soluzioni sempre più diluite.

Questo fattore riveste particolare importanza dal momento che lo scopo principale del trattamento delle intossicazioni da metalli mediante l'utilizzo di agenti chelanti è quello

di complessare gli ioni tossici sotto condizioni nelle quali sia il metallo che il legante sono presenti in soluzioni diluite nel plasma sanguigno o nei vari tessuti.

Questo è dimostrato dal confronto del comportamento dell'ammoniaca (NH₃) e della trietilentretrammina (TRIEEN) nel legare il rame (II) a diluizioni crescenti. Le costanti di stabilità per i corrispondenti complessi sono:



Agenti chelanti come il TRIEEN sono capaci di legare lo ione metallico molto più efficacemente di un legante semplice come l'NH₃.

Infatti una soluzione 0.1 M di [Cu(NH₃)₄]²⁺ è dissociata in misura di circa l'1%, mentre una soluzione 0.1 M di [Cu(TRIEEN)] è dissociata solo in misura di circa 1×10⁻⁸ %³.

I composti attuali usati in terapia chelante sono quelli per i quali l'esperienza clinica ha fornito alcune giustificazioni in termini di disponibilità, efficacia e abilità a controllare gli effetti collaterali. Il requisito principale di un agente chelante, è la formazione con uno ione tossico di un complesso più stabile di quello formato con il suo sito di legame in vivo.

Quando un legante interagisce con un metallo, questa interazione può essere "positiva" o "negativa". Per esempio, un aumento di tossicità può avvenire quando il legante

protegge il metallo dai normali processi di disintossicazione o ne incrementa la capacità di indurre stress ossidativo, o ne modifica la capacità di attraversare le barriere.

Il chelante ideale deve, quindi, ridurre la tossicità del metallo favorendone la mobilizzazione dal suo comparto e l'escrezione, o modificandone lo stato di ossidazione.

Nel design di una molecola con funzione di chelante nei confronti di specifici metalli si deve tener conto dell'affinità del legante nei confronti dei metalli stessi: se il metallo ha caratteristiche *hard* il legante deve contenere gruppi *hard*; se il metallo ha caratteristiche *soft* il legante deve contenere gruppi *soft*. Il legante deve essere selettivo nei confronti di un determinato metallo e non coordinarne altri; in particolare non dovrebbe interagire con i metalli essenziali. Parametri importanti per la scelta del chelante sono la stabilità dei complessi, la velocità di formazione e la stechiometria di reazione. Se il legante ha caratteristiche acido-base è indispensabile anche conoscerne le costanti di acidità.

Affinché un legante possa essere utilizzato come farmaco è necessario conoscerne la farmacocinetica (le trasformazioni del farmaco ad opera dell'organismo) e la farmacodinamica (le azioni del farmaco sui diversi organi).

La concentrazione di un legante all'interno dell'organismo dipende dal suo trasporto e dalla trasformazione chimica delle sue molecole.

Il legante viene trasportato nell'organismo o per trasferimento all'interno di compartimenti fluidi come il sangue o per diffusione.

Il grado di diffusione di una sostanza dipende dalle dimensioni delle molecole (il coefficiente di diffusione è inversamente proporzionale alla radice quadrata del peso molecolare) o dalla polarità (un'elevata solubilità in mezzi non polari permette

l'attraversamento delle membrane). Il superamento delle membrane può avvenire anche attraverso canali ionici o mediante trasportatori.

Nel processo di permeazione è importante considerare il valore di pH, poiché il legante, acido o basico, può presentarsi in forma protonata o deprotonata. Per un acido debole vale la relazione $HA \rightleftharpoons A^- + H^+$ il cui pKa può essere espresso come:

$$pK_a = pH + \log \frac{[AH]}{[A^-]}$$

Nel caso di una base debole un'analogha relazione è valida per il suo acido coniugato BH^+ . Le forme ioniche BH^+ e A^- hanno una solubilità molto bassa nei lipidi e non sono in grado di attraversare le membrane cellulari. La solubilità di B o AH dipenderà invece solo dalla natura chimica del legante. Il pH e quindi la ionizzazione delle molecole regolano anche la concentrazione stazionaria del legante in vari compartimenti con pH significativamente diversi. Le differenze di pH influenzano in maniera determinante l'escrezione renale e il superamento della barriera ematoencefalica, mentre influenzano solo limitatamente l'assorbimento gastrointestinale, in quanto il maggior assorbimento avviene nell'ileo (pH 8.0) che ha una superficie assorbente efficace molto maggiore di quella gastrica (pH 1.5).

Il compartimento non polare più esteso è il grasso e l'assorbimento è regolato dal coefficiente di ripartizione acqua-ottanolo. Un legante assorbito nel grasso non avrà alcuna attività farmacologica, ma costituirà una riserva in comunicazione con il comparto plasmatico.

Le vie più comuni di eliminazione dei leganti o dei complessi sono quella renale, il sistema epato-biliare e i polmoni limitatamente a specie gassose o volatili.

Il metabolismo dei leganti o dei complessi avviene essenzialmente in due fasi: la prima porta alla formazione di un derivato e la seconda alla formazione di un coniugato.



Il coniugato solitamente è inattivo, più polare, e viene escreto attraverso le vie biliari o urinarie.

1.3 Il Ferro

Il ferro è il quarto elemento come abbondanza sulla crosta terrestre; si ritiene, in particolare, che sia il principale costituente del nucleo terrestre ed il componente più abbondante delle meteoriti dette “sideriti”, composti formati dal ferro con l’ossigeno.

I composti più comuni contengono l’ossigeno come l’ematite, la magnetite, la siderite oppure lo zolfo come la pirite.

Il ferro è un metallo di transizione, ha numero atomico 26, peso atomico 55.845 Dalton e configurazione elettronica esterna $3d^64s^2$.

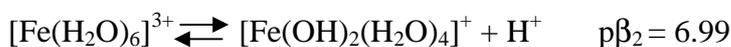
Nei suoi composti, i numeri di ossidazione più comuni sono +2 e +3 con configurazione elettronica⁴ rispettivamente $3d^6$ e $3d^5$.

Il ferro ha un ruolo fondamentale in biologia, nel trasporto e nell’immagazzinamento di ossigeno.

Il corpo di un uomo adulto contiene circa 4g di ferro (cioè ~ 0,005 % del peso corporeo), di cui 3g sotto forma di emoglobina. Il ferro fu il primo elemento in tracce riconosciuto come essenziale per l’uomo; nel 1681, il medico T. Sydenham utilizzò il ferro “immerso in vino del Reno” nel trattamento dell’anemia.

Già a pH≈1 lo ione Fe(III) in soluzione acquosa inizia a formare complessi con lo ione ossidrile per cui lo studio degli equilibri in soluzione presuppone l'approfondita conoscenza di questi equilibri nelle condizioni sperimentali usate. La difficoltà nello studio dell'idrolisi del Fe(III) è dovuto all'instabilità delle forme intermedie e alla tendenza a formare specie polinucleari che tendono a precipitare.

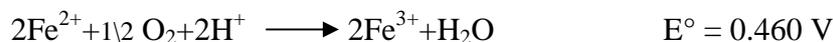
Le specie ossidrilate presenti in soluzione sono $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ e le reazioni principali sono:



A pH>3 inizia la formazione della specie neutra $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ($pK_s = 10^{-38}$) che precipita in forma colloidale rosso-bruna e la cui struttura può variare con le caratteristiche chimiche della soluzione e con la temperatura⁵.

I sali di Fe(III) si sciolgono in soluzioni molto acide (pH 1), a pH più alti idrolizzano formando idrossocomposti solubili gialli; a pH ancora maggiori formano specie colloidali fino al $\text{FeO}(\text{OH})$, un ossido idrato bruno.

Il potenziale della coppia Fe(II)\Fe(III) è 0.771V, per cui all'aria lo ione Fe(II) si ossida a Fe(III), la reazione è favorita in ambiente basico ma avviene anche in ambiente acido.



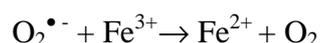
Il Fe(III) forma prevalentemente composti ottaedrici.

La preminenza del ruolo del ferro in biologia riflette la sua versatilità chimica, cioè la spontaneità della reazione di ossidazione da Fe(II) a Fe(III). Questa capacità è stata sfruttata dalla natura utilizzando il ferro nel trasporto elettronico citocromico⁶.

I citocromi sono degli organuli cellulari in cui il ferro presente allo stato di ossidazione II, è racchiuso in un anello porfirinico. Il loro ruolo consiste in un'azione mediatrice nell'ossidazione metabolica del glucosio da parte dell'ossigeno molecolare (respirazione e trasporto elettronico), che si realizza apparentemente in una serie di stadi, in ciascuno dei quali lo stato di ossidazione del ferro passa continuamente da +2 a +3 e viceversa. Poiché sono coinvolti diversi citocromi, il potenziale di ossido-riduzione di ciascuno stadio aumenta progressivamente formando così un 'gradiente redox'. In tal modo è possibile la graduale liberazione di energia associata ai processi di ossidazione del glucosio ed il suo immagazzinamento sotto forma di ATP.

Il ferro, come l'ossigeno molecolare, è essenziale per la vita ma allo stesso tempo può essere una sostanza altamente tossica se presente nella forma libera ad elevate concentrazioni. Per questo motivo in natura esistono complessi sistemi biochimici per la sua distribuzione sicura, il trasporto e l'utilizzo⁷.

L'importanza funzionale del ferro, associata alla sua scarsa biodisponibilità, ha obbligato gli organismi viventi ad adottare sistemi di riciclaggio del metallo e a sintetizzare proteine che lo mantenessero in soluzione e al contempo evitassero la sua pericolosa disponibilità a fungere da catalizzatore nella reazione di formazione di dannosi radicali idrossili a partire da anione superossido attraverso la reazione di Fenton:



Nei vertebrati questa funzione è esplicata in sede extracellulare dalla transferrina e in sede intracellulare dalla ferritina, molecola sferica formata da 24 catene polipeptidiche, o subunità, che racchiudono una cavità entro la quale si possono depositare fino a 4000 atomi di ferro; questa rappresenta la sede di deposito del metallo all'interno della cellula. Ambedue conservano il ferro nella forma Fe(III) che non catalizza la produzione di radicali; in particolare la ferritina, che agisce all'interno della cellula, dove risiedono i principali potenziali bersagli del danno ossidativo mediato dal ferro, svolge la sua azione trasformando il Fe(II), altamente reattivo, nel meno tossico Fe(III) e sequestrando quest'ultimo al suo interno.

La quantità di ferro presente nel corpo dipende dall'assorbimento gastrointestinale. L'assorbimento avviene lungo tutto il tratto gastrointestinale ma è maggiore nel duodeno e nel vicino digiuno. Il meccanismo coinvolge due fasi:

- un processo attivo, enzimatico o di trasporto, predominante in presenza di una dieta equilibrata;
- un trasporto passivo del primo ordine che si attiva in presenza di alte dosi di ferro.

L'escrezione giornaliera varia da 0.5 a 2 mg, avviene principalmente attraverso le feci, la desquamazione della cute, della mucosa gastrica e dei capelli e solo alcune tracce del metallo sono eliminate attraverso la bile e il sudore.

La produzione di radicali idrossili catalizzata dal ferro mediante la reazione di Fenton spiega l'elevata citotossicità dell'elemento, infatti la risultante perossidazione lipidica causa danni alle membrane plasmatiche e a quelle intracellulari dei mitocondri e dei lisosomi.

La dose letale di ferro per gli uomini è 180-300 mg/Kg, ma anche dosi inferiori possono essere letali per alcuni individui.

I sintomi che seguono l'assunzione di una dose elevata del metallo sono dolore epigastrico, irritazione gastrointestinale, vomito, diarrea, successivamente sopravvengono disfunzioni epatiche, danni ai reni, collasso cardiovascolare e in molti casi morte.

Quando viene assunta una dose letale di ferro, la concentrazione del metallo nel siero arriva a valori di 4-5 mg/L ed occorre intervenire con una terapia chelante a base di desferal.

L'accumulo cronico di ferro nell'organismo umano è dovuto principalmente a cause di tipo alimentare, a un incremento di assorbimento intestinale di tale metallo e a periodiche trasfusioni sanguigne.

L'emocromatosi invece è una patologia genetica nella quale l'iperassorbimento del metallo è dovuto alla carenza di proteine necessarie per la sua escrezione. L'eccesso di ferro nell'organismo porta alla sua deposizione nel fegato, nel cuore, nel pancreas e in altri organi endocrini. Attualmente, la riduzione della quantità di ferro viene effettuata mediante salasso.

Altra patologia è la talassemia, la *β-talassemia major*, dove c'è la completa assenza della catena β della globina. L'emoglobina fetale è un tetramero di due α-globine e due γ-globine (α₂γ₂). Dopo alcuni mesi dalla nascita il gene per la trascrizione della γ-globina viene sostituito da quello della β-globina, dando inizio alla produzione dell'emoglobina adulta α₂β₂. Un bambino affetto da *β-talassemia major* sopravvive alla fase fetale ma dopo alcuni mesi è incapace di produrre un'emoglobina adulta funzionale ed è mantenuto in vita tramite le trasfusioni.

Le basi molecolari della talassemia e la sequenza del gene della globina sono stati ampiamente studiati ed è stata proposta la terapia di modificazione genetica come cura per questa patologia. Ma la complessità dell'espressione del gene della globina comporta un numero elevato di difficoltà tecniche per quanto riguarda l'impiego di questa terapia.

Il trapianto di midollo invece può essere effettuato solo in quei casi in cui esiste un donatore compatibile ma comporta ancora un rischio di decesso del paziente del 10% circa.

Attualmente i pazienti vengono trattati con una terapia chelante a base di desferal. Tale chelante ha un'elevata affinità per il Fe(III) e compete efficacemente con il ferro della ferritina e dell'emosiderina ma non nella transferina. Questo farmaco è poco assorbibile a livello gastrointestinale e per questo viene somministrato per via parenterale. Purtroppo provoca numerosi effetti collaterali.

Il chelante ideale per il trattamento dell'accumulo di ferro nell'organismo deve essere selettivo nei confronti del ferro, efficacemente assorbibile nel tratto gastrointestinale, non attraversare la barriera emato-encefalica ed avere una bassa tossicità.

Nonostante i ben conosciuti successi del desferal nella terapia medica dell'accumulo di ferro in pazienti talassemici, sottoporsi per un periodo prolungato di tempo a perfusione sottocutanea per tutta la notte è problematico per alcuni pazienti, mentre in zone ancora in via di sviluppo tale somministrazione è impraticabile per motivi economici. A questo proposito, la ricerca per chelanti del ferro che possano essere assunti oralmente come alternativa al desferal nel trattamento e nella prevenzione di accumulo cronico di ferro, sono oggetto di ampi studi negli ultimi decenni. A questo scopo i chimici hanno usato le

loro conoscenze per sintetizzare una vasta varietà di chelanti, spesso prendendo esempio dalla natura. Le proprietà desiderabili per un chelante del ferro sono:

- specificità ed affinità per il ferro;
- peso molecolare minore di 400 Dalton, per l'assorbimento gastrointestinale;
- lipofilità sufficiente per l'assorbimento gastrointestinale e la chelazione intracellulare;
- idrofilicità sufficiente per limitare l'assorbimento dal fegato.

In ambiente ossidativo e al pH fisiologico, la specie Fe^{3+} è favorita rispetto a quella Fe^{2+} e il problema della terapia chelante per il ferro è quella di stabilizzare lo ione ferrico. Nella classificazione “hard e soft” degli ioni, il Fe^{3+} è hard e perciò forma complessi più stabili con leganti a base di ossigeno. La configurazione d^5 del Fe^{3+} favorisce la coordinazione ottaedrica, perlopiù invariabilmente nello stato ad alto spin con leganti poly-oxo. Gli orbitali molecolari dell'ossigeno e quelli dello ione metallico si sovrappongono meglio nella coordinazione ottaedrica quando sono separati da uno spazio di tre legami.

Negli ultimi 20 anni, sono stati sistematicamente testati una grande varietà di leganti contenenti ossigeno, (idrossamati, catecoli, idrossipiridinoni e bifosfonati), come farmaci potenzialmente attivi per via orale. Alcuni di questi purtroppo non presentano appropriati valori di pM come chelanti per il ferro (il pM fu definito da Harris et al.⁸ come il logaritmo negativo della concentrazione del Fe(III) libero in una soluzione dove la concentrazione del legante è 10 μM e quella del metallo è 1 μM a pH 7.4). Il concetto di pM è ora di uso comune per valutare l'efficacia chelante, tenendo conto della competizione con il protone.

Alcuni leganti, sebbene promettenti dal punto di vista chimico, presentano effetti tossici e questo li preclude dall'impiego nella terapia clinica⁹.

Molti siderofori naturali che contengono i gruppi leganti sopra indicati presentano un effetto chelante molto efficiente come leganti esadentati.

1.4 L'alluminio

L'alluminio è il metallo più abbondante sulla crosta terrestre (8,3 % in peso); come elemento è superato solo dall'ossigeno (45,5%) e dal silicio (25,7%) e solo ferro (6,2%) e calcio (4,6%) hanno abbondanze confrontabili. È un costituente di molti minerali ignei comuni, tra i quali i feldspati e le miche. Si trova anche in minerali meno comuni, quali la criolite (Na_3AlF_6), lo spinello (MgAl_2O_4), il granato [$(\text{Ca}_3\text{Al}_2(\text{SiO}_4)_3$], il berillo ($\text{Be}_3\text{Al}_2\text{Si}_6\text{O}_{18}$), il turchese [$\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}/\text{Cu}$] e il corindone. Molte pietre preziose sono forme impure di Al_2O_3 , come il rubino (Cr) e lo zaffiro (Co).

Il minerale più importante dal punto di vista commerciale è la bauxite che è una roccia di colore che va dal rosso bruno al giallo costituita principalmente da Gibbsite e Boehmite, che sono i veri minerali della Bauxite, assieme ad altri idrossidi di alluminio, sostanze amorfe e prodotti argillosi, che conferiscono le varie colorazioni.

La bauxite viene estratta senza difficoltà a cielo aperto poiché si trova normalmente in grandi strati di spessore variabile dai 3 ai 10 metri, a piccole profondità e facilmente accessibili¹⁰.

In soluzione acquosa, al di sotto di pH 5, l'alluminio libero esiste principalmente come $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Intorno a pH 7, l'alluminio si trasforma in $\text{Al}(\text{OH})_3$ estremamente insolubile che polimerizza e forma un precipitato che si ridiscioglie quando il pH si avvicina al valore di 8 per formare $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, più solubile.

Quindi a pH fisiologico e in assenza di leganti l'alluminio è insolubile e non disponibile per le interazioni con l'organismo. Si lega fortemente all'ossigeno e al fluoro, meno fortemente all'azoto e non ha essenzialmente affinità per i leganti a base di zolfo, per cui tra i probabili leganti biologici per l'interazione con l'alluminio vi sono gli anioni OH^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} e CH_3COO^- .

Gli ioni con i quali l'alluminio potrebbe competere per i leganti nei sistemi biologici sono il ferro, il calcio e il magnesio. L' Al^{3+} scambia 10^4 volte più lentamente del Mg^{2+} , 10^7 più lentamente del Ca^{2+} e solo 10 volte più lentamente del Fe^{3+} .

Il raggio ionico dell' Al^{3+} è molto simile a quello del Fe^{3+} e dato che l'interazione ferro-proteina avviene in seguito all'inserimento del metallo in cavità specifiche, questo giustifica la provata interazione con la transferrina (Tf) e la ferritina. Il Ca^{2+} ha un raggio ionico molto più grande di quello dell' Al^{3+} per cui potrebbe competere con esso solo per leganti piccoli come l'anione PO_4^{3-} . La bassa solubilità dei fosfati di alluminio rispetto a quelli di calcio a pH fisiologico è stata proposta come causa dell'accumulo di alluminio nelle ossa.

La similarità di carica, dimensione e velocità di scambio di legante tra Al^{3+} e Fe^{3+} potrebbe favorire la competizione tra i due metalli ma in realtà l'inibizione da parte dell'alluminio delle reazioni Fe-dipendenti è di basso significato biologico. Al contrario, l'alluminio inibisce le reazioni che coinvolgono Mg^{2+} e Ca^{2+} avendo maggior affinità di legame e più bassa velocità di reazione nei confronti dei leganti biologici che non questi due ioni¹¹.

L'alluminio esiste solo come catione trivalente. Le reazioni con l'alluminio sono caratterizzate da polimerizzazione, una lenta cinetica di complessazione e una rilevante idrolisi in soluzione acquosa.

Il suo numero di coordinazione è 6 e infatti produce complessi ottaedrici. L'alluminio è il più forte ione metallico trivalente (forte acido di Lewis), il suo raggio ionico effettivo è 0.5 Å. È fortemente elettropositivo e non facilmente polarizzabile. Il legame Al-legante è un'interazione non covalente, generalmente coinvolge legami ionici o elettrostatici. L'Al preferisce coordinarsi con forti basi di Lewis come OH⁻, F⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, CH₃COO⁻, ROH, RO⁻ e RNH₂, che donano elettroni al suo orbitale elettronico vuoto. I complessi più stabili dell'alluminio sono quelli con leganti multidentati con atomi di ossigeno donatori carichi negativamente.

Un chelante è un composto che lega uno ione metallico attraverso almeno due gruppi funzionali, in cui ogni gruppo dona una coppia di elettroni per formare un anello eterociclico. Per formare l'anello il legante deve avere almeno due atomi donatori (il fluoro, ad esempio, può complessare ma non chelare l'alluminio perché ogni fluoro forma solo un legame singolo con l'alluminio. Il termine denticità, che dal latino sta per denti, denota il numero di atomi donatori che il chelante usa per legare il metallo. Questi gruppi donatori formano complessi molto stabili con l'alluminio attraverso interazione con i due gruppi -O⁻.¹² L'affinità di questi leganti multidentati, che contengono gruppi ossigeno donatori negativi, per l'alluminio cresce con l'aumento del numero e della basicità dei gruppi donatori¹³.

L'alluminio e il ferro sono acidi forti con raggi ionici simili (54 e 64 pm). Essi si legano alle stesse proteine del sangue. Tutti i chelanti che si conoscono per il Fe sono pure chelanti per l'alluminio, ma i complessi del ferro sono molto più stabili di quelli dell'alluminio e questo è dovuto all'abilità del ferro di riempire i suoi orbitali 3d durante la formazione del complesso esadentato. La selezione e lo sviluppo di chelanti per l'alluminio è stata largamente influenzata dai chelanti del ferro, più intensamente

studiata. La terapia chelante usata per ridurre la concentrazione di alluminio potrebbe ridurre svantaggiosamente anche metalli essenziali.

Un legante efficace per l'alluminio dovrebbe possedere le proprietà riportata nella tabella 1:

Tabella 1: proprietà di un agente chelante per l'alluminio¹².

Proprietà di un chelante per l'alluminio	Effetti desiderati
Essere sufficientemente lipofilo da permeare le membrane per diffusione o servire da substrato per un trasportatore delle membrane.	Distribuzione ai siti intracellulari di immagazzinamento dell'alluminio.
Essere una base forte	Si complessa fortemente con l'alluminio che è un acido forte
Avere un'alta selettività e una selettività ragionevole per l'alluminio	Minimizzare l'impoverimento del ferro e di altri metalli essenziali
Avere una costante di stabilità con l'alluminio più grande di quella con altri leganti endogeni.	Rimuovere più efficacemente dai leganti endogeni
Il legante libero dovrebbe essere efficace a lungo	Avere il tempo sufficiente per complessare l'alluminio che potrebbe ridistribuirsi fuori dai siti di immagazzinamento prima che l'Al libero sia complessato.
Formare complessi ottaedrici con l'alluminio	Ridurre la tossicità dovuta alla parziale complessazione del metallo
Formare un complesso solubile in acqua	Accrescere la rimozione dell'alluminio dai reni e ridurre quindi la tossicità
I complessi dell'alluminio devono essere stabili all'idrolisi al pH fisiologico e resistenti alla degradazione metabolica	Promuovere l'allontanamento dell'alluminio piuttosto che la sua ridistribuzione
I complessi dell'alluminio non devono essere riassorbiti	Promuovere l'eliminazione dell'alluminio
Minima tossicità sia per i chelanti che per i complessi che formano	Diminuire la tossicità
Buona somministrazione	Facilità di somministrazione, vasta approvazione per l'uso, una più sicura somministrazione del farmaco per un'applicazione potenziale per il trattamento delle malattie neurodegenerative

Nelle condizioni inusuali nelle quali il livello di alluminio tissutale comincia ad aumentare sembrano presentarsi differenti disfunzioni, quali encefalopatia,

osteodistrofia e anemia. L'esposizione all'alluminio si verifica per inalazione, ingestione e contaminazione di fluidi intravenosi. La fonte principale è rappresentata dai farmaci come ad esempio l'idrossido di alluminio che si somministra ai dializzati per abbassare il livello di fosfato nell'intestino¹⁴.

Nonostante l'alluminio non sia un elemento essenziale, una volta che penetra nell'organismo diventa biologicamente attivo. Nella sua forma ionica ogni metallo può interagire con la funzionalità della cellula. L'alluminio come altri metalli può penetrare la cellula senza un particolare meccanismo di accumulo. Una volta all'interno della cellula, l'alluminio sembra avere una serie di effetti che potrebbero essere spiegati mediante l'interazione-interferenza con i sistemi Fe-, Mg-, o Ca- dipendenti.

Nel 1972 Alfrey ed altri misero in allerta i nefrologi circa i problemi neurologici nei pazienti in emodialisi. L'encefalopatia era caratterizzata da disturbi della parola che progredivano al cambio di personalità fino alla demenza. Nel caso di una normale funzionalità renale, l'alluminio non si deposita ma viene escreto fino a quando vengono ingerite dosi giornaliere di 3-5 gr, al contrario gli uremici accumulano alluminio fino a livelli tossici. E' stato riscontrato che nell'insufficienza renale l'alluminio si bioaccumula dai gel orali contenenti fosfati. Come conseguenza sono stati introdotti nella dialisi gel leganti a base di calcio.

Negli individui con normale funzionalità renale perfino una dose orale di alluminio può diventare biodisponibile in certe condizioni, ad esempio in presenza di citrato. Un repentino attacco di demenza, che conduce al decesso, è stato riportato nel caso di pazienti non sottoposti a dialisi ma ai quali era stata somministrata una dose orale di citrato di sodio in combinazione con gel leganti a base di fosfato e idrossido di alluminio.

La mancanza di riproducibilità di dati nell'accumulo di alluminio nei tessuti ha però nutrito lo scetticismo della comunità scientifica. Sono tre i fattori che giocano un ruolo preminente nell'alimentare tale incertezza:

- ⇒ la difficoltà di misurare accuratamente l'alluminio, dovuta ai bassi livelli di concentrazione nei tessuti se confrontati con quelli elevati riscontrabili nell'ambiente, rendendo la contaminazione dei campioni un serio problema;
- ⇒ la mancanza di informazioni circa la speciazione e l'equilibrio tra le specie nei sistemi biologici;
- ⇒ la scarsa conoscenza dei fattori che controllano i meccanismi di assorbimento e della biodisponibilità in presenza di leganti provenienti dall'alimentazione.

L'esposizione cronica all'alluminio provoca effetti deleteri di rimodellamento osseo. Il sistema osseo rappresenta infatti l'organo di accumulo del corpo umano preferito da questo metallo. L'alluminio assorbito dall'intestino abbandona velocemente il plasma per accumularsi nelle ossa.

L'alluminio contribuisce ai disturbi ossei degli uremici interferendo nel meccanismo di turnover (via diretta) e modificando l'attività del calcio (via indiretta). Per via diretta, l'alluminio inibisce la mineralizzazione della matrice ossea formando cristalli nei siti dove il calcio ordinariamente dovrebbe essere depositato e inibendo la produzione ossea degli osteoblasti. Per via indiretta, l'alluminio si deposita nella ghiandola paratiroidea impedendo la normale produzione di ormone paratiroideo (PTH), alterando la relazione tra PTH e calcio e tra il calcio sierico e il fosforo.

1.5 Argomento della tesi

L'argomento della tesi verte sullo studio degli equilibri in soluzione del Fe(III) e dell'Al(III) con diversi leganti che possano essere impiegati nella terapia chelante nelle patologie umane associate all'accumulo di ioni metallici.

Il farmaco utilizzato attualmente nella terapia chelante per la complessazione del Ferro è il Desferal, il sale metan sulfonato della desferriossammina B.(figura1)

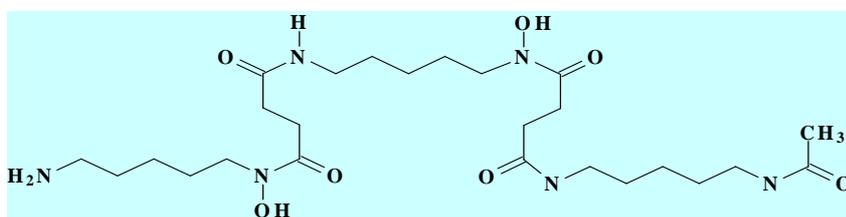


Figura 1 Desferriossammina B

Il desferal, idrossilammina isolata dagli Streptomiceti, ha un'elevata affinità per il Fe(III) e una bassa affinità per il calcio e compete efficacemente per il Ferro nella ferritina e nell'emosiderina, ma non nella transferrina. In pazienti affetti da β -talassemia e sottoposti a trasfusione, la terapia chelante si rende necessaria già dopo le prime 10-20 trasfusioni¹⁵. Il Desferal può essere somministrato solo per perfusione sottocutanea in tempi molto lunghi, in quanto è caratterizzato da un'emivita brevissima (20-25 minuti), non può essere assunto per via orale perché non assorbito attraverso il tratto gastrointestinale e viene somministrato con dosi di 25-50 mg/Kg/die in perfusione sottocutanea di 8-12 ore al giorno a mezzo di microinfusori portatili.

Attualmente, la ricerca è indirizzata allo sviluppo di nuove molecole a causa del fatto che tale farmaco, oltre al disagio della perfusione, presenta una serie di effetti collaterali quali ipotensione, rash cutaneo e cataratta. In questi ultimi anni è stato introdotto il

Deferiprone o L1 (figura 2), sufficientemente efficace e assumibile oralmente, pur presentando anch'esso effetti collaterali come l'agranulocitosi.

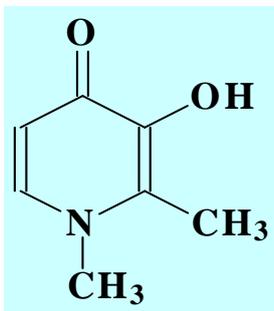


Figura 2. L1 o Deferiprone

Per questo motivo è di particolare importanza nella terapia chelante la necessità di studiare nuovi chelanti per il Fe(III) e l'Al(III) che siano alternativi a quelli attualmente utilizzati.

La scelta di un agente chelante, come visto prima, è influenzata da parametri come la stabilità dei complessi, la velocità di formazione e la stechiometria di reazione. Le proprietà generali di un buon agente chelante sono: elevata affinità e selettività per il metallo, cinetica di scambio veloce con le molecole che naturalmente legano lo ione metallico nell'organismo, bassa tossicità, opportuni valori di peso molecolare, di idrofilicità e di lipofilicità. Poiché sia il ferro che l'alluminio in quanto metalli hard, presentano grande affinità per l'ossigeno, la ricerca si è rivolta verso molecole contenenti gruppi donatori a base di ossigeno come il gruppo ossidrilico, idrossamico, carbossilico e bifosfonico.

Nel corso del lavoro verranno riportati i risultati dello studio delle costanti di protonazione dei leganti e delle costanti di stabilità dei loro complessi con Al(III) e Fe(III).

Per la ricerca sono state utilizzate tecniche di analisi come la potenziometria, la spettrofotometria (UV-Visibile, Fluorimetria, NMR) e tecniche elettrochimiche (voltammetria ciclica). Inizialmente sono state determinate le costanti di protonazione dei soli leganti ad una forza ionica 0.1 M e alla temperatura di 25°C. Successivamente e nelle stesse condizioni di temperatura e forza ionica sono state studiate le reazioni di complessazione dei leganti con il Fe(III) e l'Al(III) al fine di determinare le costanti di formazione dei complessi.

Lo studio spettrofotometrico ha permesso di ottenere informazioni sul numero delle specie assorbenti, sulle stechiometrie dei complessi che si formano tra il legante e i metalli e gli spettri dei singoli componenti.

Da tutte le informazioni ricavate è stato possibile fare delle ipotesi strutturali e calcolare le energie di formazione dei complessi .

Infine noti i valori di pK dei leganti e le costanti di formazione dei complessi è stata calcolata la concentrazione del metallo libero a particolari concentrazioni di legante e metallo al pH fisiologico 7.4 ($pM = -\log[M]$ libero per $[L]=10^{-5}M$ e $[M]=10^{-6}M$) potendo così confrontare i valori ricavati con quelli di altre molecole utilizzate attualmente nella terapia chelante e valutare quindi oggettivamente l'efficacia dei leganti.

1.6 Riferimenti Bibliografici

¹ R.A. Goyer, M.G. Cherian, *Toxicology of Metals–Biochemical Aspects*, Handb.Exp.Pharm. pag.93

² H.G. Seiler, A. Sigel, H. Sigel, *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, pag 13

³ R.A. Goyer, M.G. Cherian, *Toxicology of Metals–Biochemical Aspects*, Handb.Exp.Pharm. pag.279

⁴ N.N.Greenwood, A.Earnshaw, *Chimica degli elementi*, ed.Piccin, pag. 1279-1315)

⁵ R.A. Goyer, M.G. Cherian, *Toxicology of Metals–Biochemical Aspects*, Handb.Exp.Pharm.

- ⁶ N.N.Greenwood, A.Earnshaw, *chimica degli elementi*, ed.Piccin,
- ⁷ R.A. Goyer, M.G. Cherian, *Toxicology of Metals – Biochemical Aspects*, ed. Springer, Vol. 115, pag 305
- ⁸ R.W.Harris, K.N. Raymond and F.L. Keitl, *J.Am.Chem.Soc.*, 103,2667 (1981)
- ⁹ G.Faa, G.Crisponi, *Coord.Chem.Rev.* 184 (1999), 291-310
- ¹⁰ N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chimica degli elementi*, ed. Piccin, pgg 255-257
- ¹¹ R.A. Goyer, M.G. Cherian, *Toxicology of Metals – Biochemical Aspects*, ed. Springer, Vol. 115, pgg 139-141
- ¹² R.A. Yokel, *Coord.Chem.Rev.* 228, (2002), 97-113
- ¹³ A.E.Martell, R.D. Hancock, R.Smith, *Coord.Chem.Rev.* 149 (1996), 311
- ¹⁴ www.amershamhealth.com/medcyclopaedia/medical/Volume%20III%201/Aluminium%20poisoning.as
- ¹⁵ G.Bona, R.Miniero, P.Boffi, G.Oderda, S.Martino, R.Vair, L.Peyron, *Pediatria Pratica* Edizioni Minerva Medica, pg189.

Capitolo 2

Tecniche Sperimentali

2.1 Il metodo potenziometrico

La potenziometria permette di studiare un sistema costituito da un legante e un metallo fatti interagire tra loro, attraverso la misura della variazione di concentrazione di una delle specie presenti.

Spesso accade che i leganti in studio siano acidi o basi deboli per cui è possibile ricavare informazioni sulla natura del sistema misurando solo la variazione del pH con un elettrodo a vetro.

Il potenziale misurato all'elettrodo dipende dall'attività dello ione H^+ attraverso la legge di Nerst. In presenza di un mezzo ionico a concentrazione elevata e costante, i coefficienti di attività si mantengono costanti al variare delle concentrazioni delle altre specie presenti in soluzione purché queste siano inferiori (10%) a quella del mezzo ionico.

La *legge di Nerst* espressa nel caso di H^+ è:

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \cdot \ln a_{H^+} + E_j$$

dove E è la forza elettromotrice (fem.) determinata sperimentalmente, E^0 il potenziale standard dell'elettrodo, E_j il potenziale di giunzione liquida della cella, R la costante universale dei gas, T la temperatura assoluta, F la costante di Faraday ed a_{H^+} l'attività degli ioni H^+ . Convertendo il logaritmo neperiano in quello decimale, per $T=25^\circ C$ ed esprimendo la fem in mV la relazione diventa:

$$E = K + 59.16 \cdot \log a_{\text{H}^+}$$

L'attività tiene conto dell' interazione con l'intorno ionico della soluzione e viene definita come la concentrazione attiva di una specie in quel contesto chimico. Attività e concentrazione sono in relazione tramite l'equazione:

$$a_{\text{H}} = \gamma_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+]$$

Il valore del coefficiente di attività γ_{H} è costante se la forza ionica è costante; per cui, se sono rispettate le condizioni esposte precedentemente, γ_{H} tende a 1 per cui risulta:

$$a_{\text{H}} = [\text{H}^+]$$

Per determinare le costanti di formazione dei complessi in un sistema dove viene variata la concentrazione idrogenionica, occorre conoscere le concentrazioni analitiche del legante, del metallo e del protone (quest'ultima misurata nel corso della titolazione). La concentrazione del protone libero viene determinata misurando sperimentalmente la F.E.M. nella cella mentre quella del legante libero si ricava noti i pK di deprotonazione. Le costanti di deprotonazione dei leganti si determinano eseguendo una serie di titolazioni su soluzioni contenenti il solo legante e la forza ionica.

Dalla relazione:

$$n_i = \frac{[\text{H}]_0 - [\text{H}]_i + [\text{OH}^-]_i}{[\text{L}]}$$

dove [L] è la concentrazione totale del legante, $[\text{H}]_0$ la concentrazione iniziale del protone e $[\text{H}]_i$ la concentrazione idrogenionica, per ogni punto i di titolazione è possibile calcolare il numero medio di protoni legati n, che dipende quindi dal pH, dal numero di specie presenti e dalle costanti di deprotonazione.

Una volta noti i pK di deprotonazione del legante, le costanti di formazione dei complessi si determinano calcolando il numero medio di leganti per ione metallico utilizzando la seguente equazione:

$$Z_i = \frac{[L]_0 - [L]_i}{[Me]_0}$$

dove $Z = f(\beta_{pqr})$ e β_{pqr} è la costante globale di formazione del complesso $M_pL_rH_q$, definita come:



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

Riportando in grafico Z contro $\log[L]_i$ si ricostruisce la curva di formazione dei complessi. I metodi di calcolo impiegati partono dalla stechiometria del complesso e da una $\log\beta$ iniziale proposta dall'operatore, il valore di $\log\beta$ viene affinato col metodo dei minimi quadrati.

Prima di procedere alla raccolta dei dati potenziometrici, occorre controllare giornalmente la risposta dell'elettrodo, il suo potenziale standard e il titolo della soluzione titolante. A questo scopo si titolano 20 mL di una soluzione contenente il tampone di forza ionica e una quantità nota di HCl normex nelle stesse condizioni sperimentali di temperatura e forza ionica.

Ad ogni aggiunta di titolante, prima del punto equivalente, la concentrazione del protone H^+ è data da:

$$[H^+] = (V^o C^o - V_T C^o_T) / (V^o + V_T)$$

C° = molarità dell'acido

V° = volume iniziale della soluzione

V_T = il volume di titolante aggiunto

C°_T = molarità del titolante

Sostituendo poi la concentrazione di H^+ nell'equazione:

$$E = E^0 + (59.16/n) \log[H^+] + E_j$$

la quale non è altro che l'equazione di Nernst in cui al posto del logaritmo neperiano è presente quello decimale, la temperatura considerata è $25^\circ C$ e il potenziale viene espresso in mV, si ottiene:

$$V^\circ C^\circ - V_T C^\circ_T = (V^\circ + V_T) \times 10^{-E/0.05916}$$

Riportando in un grafico i punti $V_T \times 10^{-E/0.05916}$ in funzione di V_T per il primo ramo e anche per il secondo si ottiene (Figura 1):

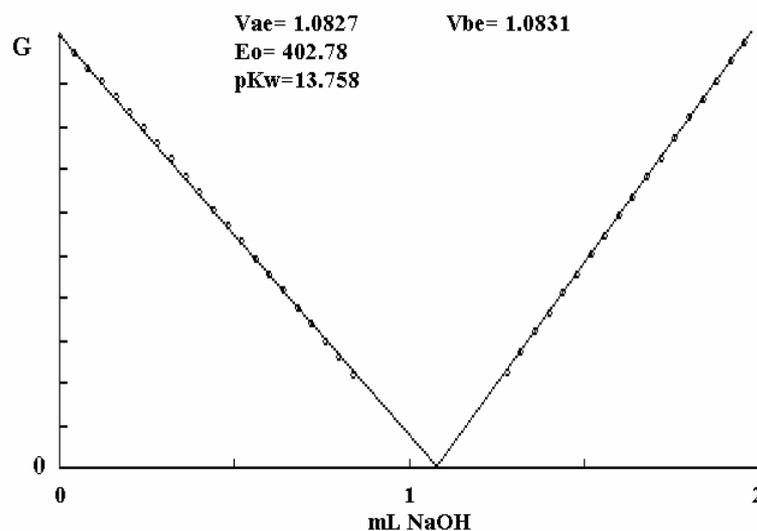


Figura 1: Esempio di grafico ottenuto col metodo di Gran.

La taratura giornaliera dell'elettrodo è stata analizzata con il metodo di Gran¹, utilizzando il programma GRANPLOT. Le informazioni ottenibili da questo grafico sono il valore di E^0 del potenziale dell'elettrodo e il pK_w che deve avere un valore $\cong 13,75$ alla temperatura di 25°C e in presenza di un tampone di forza ionica 0.1M in KCl. La perfetta linearità dei punti è indice di un corretto funzionamento dell'elettrodo. La mancata intersezione delle due rette sull'asse delle ascisse indica che la soluzione di KOH è carbonatata.

L'errore sul volume equivalente è:

$$[\mathbf{V_{be}/V_{ae}-1}] \times 100$$

dove V_{ae} e V_{be} sono i volumi acido e basico. La soluzione di KOH va scartata quando l'errore è maggiore del 2%. Il titolo della base è verificato mediante titolazione con HCl normex e ricavando:

$$[\mathbf{OH^-}] = (\mathbf{mL\ HCl} \cdot \mathbf{M\ HCl}) / \mathbf{V_M}$$

in cui si considerano i millilitri di HCl posti nella cella di titolazione, la molarità dell'HCl utilizzato e il volume medio V_M dato dalla media di V_{ae} e V_{be} .

Per la misura delle costanti di formazione acide i leganti sono stati titolati nelle medesime condizioni sperimentali (T 25°C, F.I. 0.1 M KCl).

Per la determinazione delle costanti di formazione dei complessi sono stati studiate soluzioni contenenti il legante e il metallo in diversi rapporti molari 1:1, 2:1 e 3:1, mantenendo costante la concentrazione del legante. Le costanti di formazione acide e quelle dei complessi sono state calcolate col programma PSEQUAD², e HYPERQUAD³.

2.2 Metodo spettrofotometrico

La spettrofotometria è uno strumento valido per la delucidazione di ioni complessi in soluzione e per la determinazione delle loro costanti di formazione. La potenza della tecnica sta nel fatto che misure di assorbimento quantitativo possono essere eseguite senza disturbare gli equilibri in considerazione.

La spettrofotometria si basa sulla legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

dove A è l'assorbanza, ϵ il coefficiente di estinzione molare caratteristico di ogni sostanza ad ogni lunghezza d'onda, c è la concentrazione molare della specie assorbente ed l è la lunghezza del cammino ottico espressa in cm. Quando si considerano sistemi con più di un componente, in ogni punto dello spettro il valore dell'assorbanza sarà la somma dei contributi delle singole specie:

$$A = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots \dots \dots + \epsilon_n c_n) \times l$$

2.2.1 Decomposizione delle gaussiane spettrali

Considerando un equilibrio del tipo $A+B \rightleftharpoons C$, le concentrazioni all'equilibrio per le specie analitiche a e b sono calcolate risolvendo un'equazione di secondo grado.

Supponendo di analizzare N_{sl} soluzioni a concentrazione variabile dei reagenti, registrando cioè N_{sl} spettri e N_{wl} lunghezze d'onda, si possono riportare i dati sperimentali in una matrice.

	Soluzioni			
	A _{1,1}	A _{1,2}	A _{1,Nsl}
	A _{2,1}	A _{2,2}	A _{2,Nsl}
Lunghezze d'onda
	A _{Nwl,1}	A _{Nwl,2}	A _{Nwl,Nsl}

Per determinare i valori delle costanti K e i coefficienti di estinzione ε, si deve minimizzare la funzione:

$$\sum_{i=1}^{N_{sl}} \sum_{j=1}^{N_{wl}} (A_{j,i} - A_{calc j,i})^2$$

Partendo da un valore iniziale K^0 si calcolano : $A_{j,1} = X_i * \epsilon_j$, si determina K_1 e si reitera il calcolo fino all'autoconsistenza.

Utili informazioni sui meccanismi di formazione dei complessi si possono ottenere dall'andamento delle altezze dei picchi gaussiani che compongono gli spettri di assorbimento in funzione del pH.

La forma del picco è matematicamente esprimibile come una gaussiana che può essere scomposta in un numero n di gaussiane, secondo la formula:

$$A = H e^{-k(\lambda - \lambda_o)^2 / W_o^2}$$

H= altezza del picco

λ_0 = posizione del picco

W_0 = ampiezza del picco

in cui H è un parametro lineare, λ_0 e W_0 sono non-lineari. La procedura può essere divisa in due tipi di calcolo, uno lineare per la determinazione dell'altezza dei picchi e uno non-lineare per la determinazione della posizione e dell'ampiezza di banda. La decomposizione delle bande è stata effettuata col programma SPECPEAK⁴.

2.3 Titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche

Le titolazioni potenziometriche sono state effettuate con un titolatore automatico Dosimat 665 Metrohm, connesso ad un pHmetro 691 Metrohm.



Figura 2: Sonda a fibra ottica.

Gli spettri UV-Visibili sono stati misurati con uno spettrofotometro Varian Cary50 equipaggiato di fibra ottica a immersione (Figura 2) dotata di puntali di differente cammino ottico (0,2 e 1 cm). L'immersione della fibra direttamente nella cella di titolazione permette una determinazione

contemporanea dei dati potenziometrici e spettrofotometrici.

La cella di misura, (Figura 3) termostata, contiene un agitatore magnetico, un elettrodo Long Life UNITRODE Metrohm ad alta alcalinità, un dispenser di titolante, un erogatore di gas Argon, un termometro e la fibra ottica.

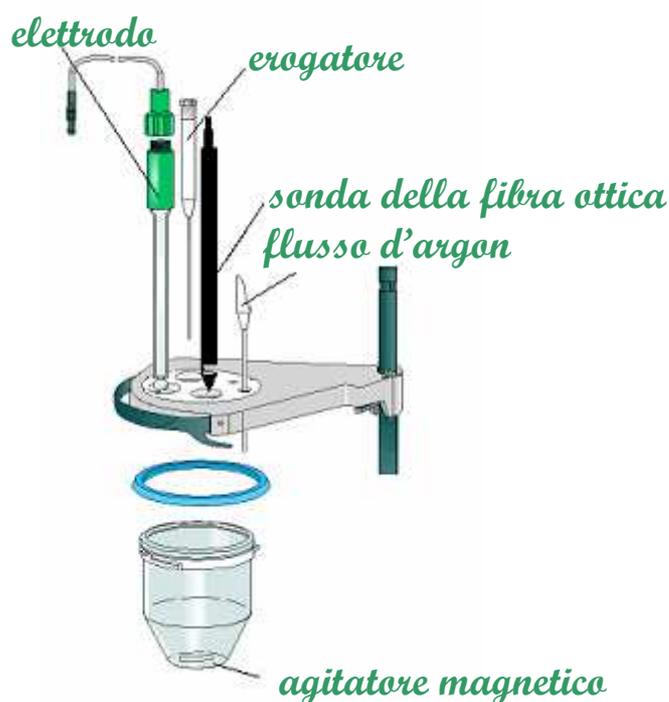
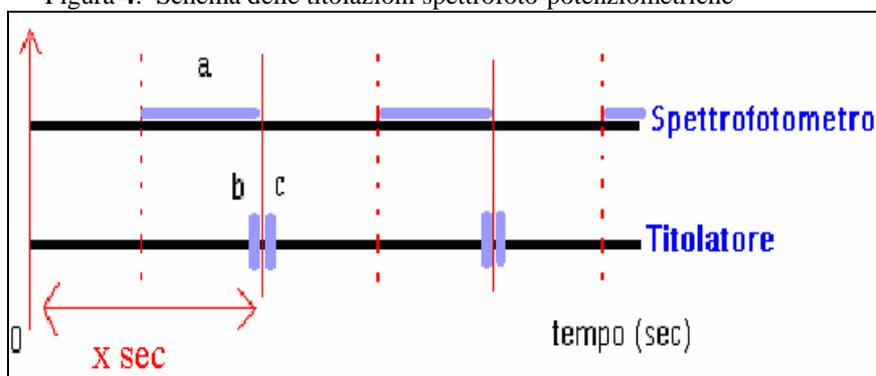


Figura 3 : Assemblaggio della cella potenziometrica-spettrofotometrica

Tutte le titolazioni sono state effettuate in presenza di un tampone di forza ionica e alla temperatura costante di 25°C o di 37°C.

L'intervallo di tempo fra le aggiunte è stato tenuto costante pari a 1 minuto e per tutti i casi è stata preventivamente studiata la cinetica di reazione per determinare il tempo minimo di attesa. Lo schema delle titolazioni spettrofotopotenziometriche è riportato in figura 4:

Figura 4: Schema delle titolazioni spettrofotopotenziometriche



- a** = registrazione dello spettro
- b** = misura del potenziale
- c** = erogazione della soluzione titolante

La possibilità di registrare direttamente nella cella lo spettro permette di eliminare alcuni inconvenienti associati all'uso delle cuvette a flusso, in particolare:

- Variazioni di temperatura dovute al trasferimento della soluzione;
- Perdita di sostanza per adsorbimento dei tubi di collegamento;
- Formazione di bolle d'aria nel tubo e nella cuvetta.

Il grande vantaggio di poter automatizzare tutto il processo, sincronizzando il titolatore, il pHmetro e lo spettrofotometro, permette di effettuare titolazioni con un numero di punti sperimentali elevato.

I dati spettrali raccolti sono stati analizzati con i programmi SPECFIT e SPEAKPEAK.

2.4 Titolazioni Fluorimetriche

La luminescenza è l'emissione di luce da parte di alcune sostanze che avviene da stati elettronici eccitati. La luminescenza è formalmente divisa in due categorie, fluorescenza e fosforescenza, a seconda della natura dello stato eccitato. La fosforescenza è l'emissione di luce da uno stato eccitato di tripletto nel quale l'elettrone nell'orbitale eccitato ha la stessa orientazione di spin dell'elettrone nello stato fondamentale. Le transizioni allo stato fondamentale sono proibite e le velocità di emissione sono lente (10^3 - 10^0 s⁻¹).

La fluorescenza avviene per emissione di luce da uno stato eccitato di singoletto; l'elettrone nell'orbitale eccitato è accoppiato (ha spin opposti) al secondo elettrone che si trova invece nello stato orbitalico fondamentale. Di conseguenza, il ritorno allo stato fondamentale è permesso e avviene rapidamente attraverso l'emissione di un fotone. Le

velocità di emissione di fluorescenza sono tipicamente 10^8 s^{-1} , ne deriva che il tempo di vita della fluorescenza è vicino a 10 ns (10^{-8} s).

Questi stati sono raffigurati in Figura 5:

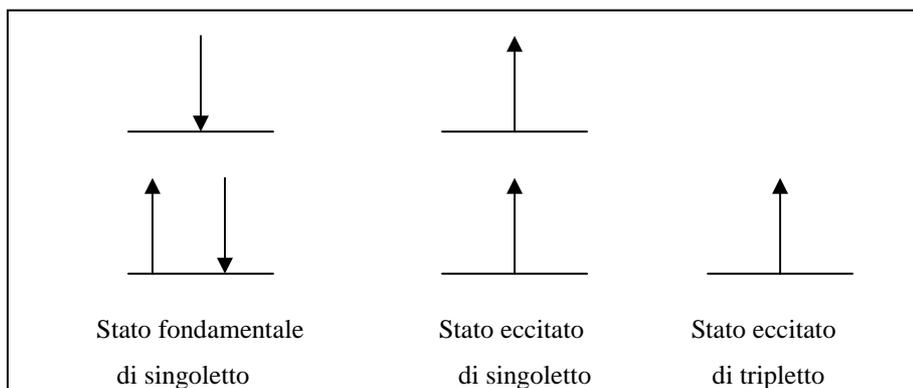


Figura 5: Stati eccitati di singoletto e tripletto

Il tempo medio di vita di un fluoroforo è il tempo medio che intercorre fra la sua eccitazione e il suo ritorno nello stato fondamentale.

I processi che avvengono tra l'assorbimento e l'emissione di luce sono spiegati dal diagramma di Jablonski (figura 6), che spesso viene utilizzato come discussione iniziale sull'emissione e sull'assorbimento di luce.

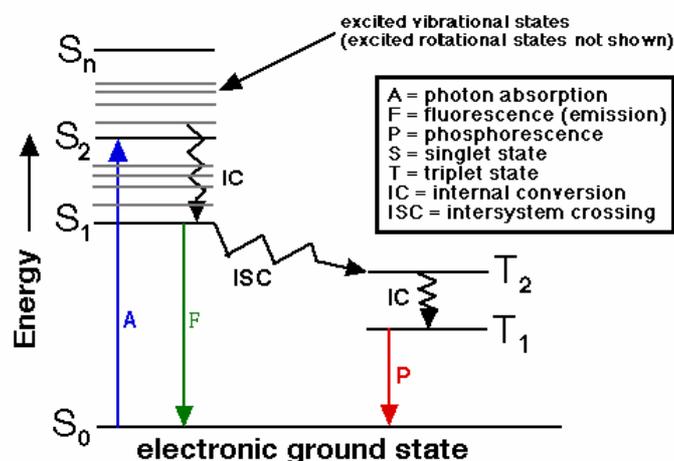


Figura 6: Diagramma di Jablonski

Dall'analisi del diagramma di Jablonski, si nota che l'energia di emissione è tipicamente minore rispetto a quella di assorbimento. Ne deriva, che la fluorescenza avviene di solito a basse energie o a lunghezze d'onda più alte. Questo fenomeno fu osservato per la prima volta da Sir G.G. Stokes nel 1852 a Cambridge. La perdita di energia tra l'eccitazione e l'emissione viene osservata solamente per le molecole fluorescenti in soluzione. Una causa comune dello shift di Stokes è il rapido decadimento al livello vibrazionale più basso di S1. Inoltre i fluorofori generalmente decadono a livelli vibrazionali più alti di S0, e questo porta ad un'altra perdita di energia di eccitazione sotto forma di energia termica.

Un'altra proprietà generale della fluorescenza, è che viene osservato lo stesso spettro di emissione di fluorescenza a prescindere dalla lunghezza d'onda di eccitazione. Questo fenomeno è conosciuto come la regola di Kasha. Dopo l'eccitazione in più alti livelli elettronici e vibrazionali, l'energia in eccesso viene rapidamente dissipata, lasciando il fluoroforo nel più basso livello vibrazionale di S1. Questo rilassamento avviene in circa 10^{-12} s ed è probabilmente il risultato di una forte sovrapposizione tra numerosi stati vicini di energia uguale. A causa di questo rapido rilassamento, gli spettri di emissione sono di solito indipendenti dalle lunghezze d'onda di eccitazione. Eccezioni sono fluorofori che esistono in due stati di ionizzazione ognuno dei quali mostra un differente spettro di assorbimento e di emissione.

L'intensità di fluorescenza può attenuarsi a causa di una larga varietà di processi. Tali diminuzioni di intensità sono chiamate quenching. Il fenomeno di quenching può avvenire attraverso vari meccanismi. Il quenching di collisione avviene quando lo stato eccitato del fluoroforo è disattivato per il contatto con altre molecole che si trovano in soluzione, che sono chiamate i quencher. In questo caso il fluoroforo ritorna allo stato

fondamentale dopo uno scontro diffusivo con il quencher. Le molecole non vengono chimicamente alterate dal processo.

Accanto al quenching di collisione, il quenching di fluorescenza può avvenire attraverso molti altri processi. I fluorofori possono formare complessi non fluorescenti con i quenchers. Questo fenomeno si chiama quenching statico dato che avviene nello stato fondamentale e non si rilevano collisioni o diffusioni molecolari. Il fenomeno di quenching può anche avvenire a causa di meccanismi non molecolari come l'attenuazione della luce incidente dallo stesso fluoroforo o da altre specie assorbenti⁵.

2.4.1 Strumentazione

Gli strumenti utilizzati per le misure di fluorescenza sono i *fluorimetri* e gli *spettrofluorimetri*. Il fluorimetro impiega dei filtri per la selezione della lunghezza d'onda; la maggior parte degli spettrofluorimetri, al contrario, impiega un filtro per limitare la radiazione di eccitazione e un monocromatore a reticolo per disperdere la radiazione di fluorescenza del campione.

Gli strumenti per la fluorescenza sono usualmente a doppio raggio per compensare le fluttuazioni della potenza della sorgente. Il fascio che attraversa il campione passa attraverso un filtro primario o monocromatore primario, il quale trasmette la radiazione che eccita la fluorescenza ma esclude o limita la radiazione che corrisponde alla lunghezza d'onda di fluorescenza.

La radiazione di fluorescenza è emessa dal campione in tutte le direzioni ma è più convenientemente osservata ad angoli retti rispetto al fascio di eccitazione; ad altri angoli, una maggiore dispersione da parte della soluzione e delle pareti della cella può causare errori nella misura dell'intensità.

La radiazione emessa raggiunge un rivelatore fotoelettrico dopo aver attraversato il filtro o monocromatore secondario, che isola il picco di fluorescenza per la misura.

Il fascio di riferimento passa attraverso un attenuatore per diminuire la sua potenza approssimativamente a quella della radiazione di fluorescenza (la riduzione di potenza è usualmente di un fattore 100 o più).

Lo strumento utilizzato per questo lavoro è uno spettrofotometro di fluorescenza Cary Eclipse (Figura 7), dotato di cuvette in quarzo la cui lunghezza del cammino ottico è di 1 cm; tale strumento è stato utilizzato per titolazioni acide e basiche in soluzione acquosa.



Figura 7: Spettrofotometro di fluorescenza Cary Eclipse

2.5 Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare

La prima osservazione fisica del fenomeno della *risonanza magnetica nucleare* (NMR) risale al 1945, e si deve al lavoro di Felix Bloch e Edward Purcell, due scienziati che pervennero alle medesime conclusioni indipendentemente l'uno dall'altro e per le quali ottennero il premio Nobel per la Fisica nel 1952. Tuttavia è nella Chimica che la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ha trovato la sua più vasta applicazione, da quando fu evidente che nuclei della stessa specie isotopica in diversi intorni chimici risuonano a frequenze diverse.

La spettroscopia NMR, mediante lo studio delle proprietà magnetiche dei nuclei, permette di ricavare informazioni dettagliate sulla struttura delle molecole, sulla natura di molti degli atomi presenti, sul loro numero, e anche sul tipo di “intorno molecolare” in cui un dato atomo si trova.

Non tutti gli atomi possono essere osservati con questa tecnica, ma solo quelli magneticamente attivi, aventi cioè momento di spin nucleare non nullo.

Pertanto sono magneticamente attivi quei nuclei che hanno un numero dispari di protoni, di neutroni o di entrambi.

Il più importante degli elementi magneticamente attivi è l'idrogeno, il quale è presente nella quasi totalità dei composti organici, e proprio per questo la spettroscopia NMR al protone, o $^1\text{H-NMR}$, è stata la prima ad essere sviluppata.

Ha invece momento angolare di spin nullo il ^{12}C , l'isotopo più abbondante in natura del carbonio, componente essenziale di tutte le molecole organiche.

La moderna strumentazione permette comunque, di ottenere informazioni dirette sugli atomi di carbonio delle molecole studiando il ^{13}C , cioè l'isotopo presente in natura per l'1,1% ed avente spin $I = 1/2$.

Quando si introduce una sostanza in un campo magnetico per registrarne lo spettro, il movimento degli elettroni in essa presenti crea dei piccoli campi magnetici locali che schermano in qualche misura i nuclei del campo magnetico applicato. Quando un atomo viene sottoposto all'azione di un campo esterno B , la nuvola elettronica che ne circonda il nucleo genera un piccolo campo magnetico avente direzione opposta a B , dando luogo ad uno schermaggio del nucleo stesso.

Il risultato è che ogni nucleo della sostanza in esame è immerso in un campo effettivo B_{eff} diverso da quello applicato,

$$B_{eff} = B (1 - \sigma)$$

dove σ rappresenta la costante di schermaggio. Il valore di σ dipende dall'intorno chimico in cui si trova il nucleo in questione, ed è generalmente più grande per quei nuclei che sono circondati da una densa nuvola elettronica.

La differente densità elettronica nelle vicinanze di nuclei di uno stesso elemento in intorni diversi fa quindi sì che a parità di frequenza della radiazione incidente si osservino spettri costituiti da tanti segnali quanti sono i nuclei chimicamente diversi presenti nella sostanza in esame.

In particolare, nuclei molto schermati risuonano a campi magnetici alti, mentre nuclei poco schermati o deschermati risuonano a campi bassi.

Normalmente gli spettri NMR vengono registrati a frequenza ν_0 costante, facendo una scansione del campo magnetico dai valori più bassi a quelli più alti, e si presentano con il campo che cresce da sinistra a destra.

La separazione in unità di campo magnetico tra due picchi spettrali dipende dal tipo di spettrometro utilizzato, essendo direttamente proporzionale alla sua frequenza operativa.

La separazione tra i segnali di due nuclei chimicamente diversi è sei volte più grande in uno spettrofotometro che opera a 360 MHz rispetto ad uno che opera a 60 MHz.

Poiché in questo modo spettri registrati su strumenti operanti a frequenze e campi magnetici diversi non sono paragonabili, si fa ricorso ad unità dimensionale, che permette di misurare in maniera assoluta la posizione delle righe spettrali.

Questa grandezza è chiamata *spostamento chimico* δ (o chemical shift), ed è definito come la differenza della frequenza di risonanza di un particolare segnale (ν_{campione}) e quella del trimetilsilano TMS (ν_{standard}) espresse in Hz, divisa per la frequenza operativa dello strumento espresso in MHz, ν_0 :

$$\delta = [(\nu_{\text{campione}} - \nu_{\text{standard}}) / \nu_0] \times 10^6$$

2.5.1 Informazioni strutturali fornite dagli spettri $^1\text{H-NMR}$

I parametri spettroscopici ricavabili dagli spettri NMR sono gli spostamenti chimici dei vari segnali, i valori delle eventuali costanti di accoppiamento spin-spin e gli integrali dei multipletti.

Spostamento Chimico δ : Dal momento che lo spostamento chimico di un nucleo dipende principalmente dalla densità elettronica attorno ad esso, tutti i nuclei di uno stesso elemento che vengono a trovarsi in intorni chimici analoghi danno luogo a segnali caratterizzati da valori simili di δ . Alcuni Valori tipici di spostamento chimico di ^1H sono riportati in figura 8:

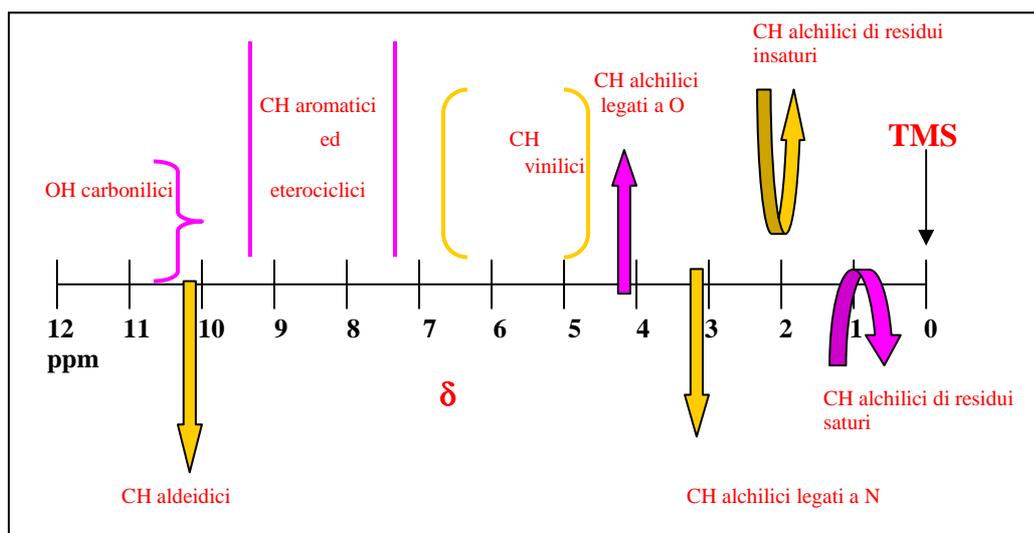


Figura 8: Valori tipici di spostamento chimico di ^1H in composti organici

La mancanza di segnali nell'intervallo compreso tra 7-9 ppm esclude la presenza di anelli aromatici; segnali a $\delta \geq 10$ ppm sono caratteristici di idrogeni aldeidici, di ossidrili carbossilici o di gruppi ammidici; segnali tra 0-2,5 ppm indicano la presenza di gruppi alchilici primari, secondari o terziari; nell'intervallo tra 4,5-6,5 ppm si trovano normalmente i segnali dovuti agli idrogeni legati ad atomi di carbonio insaturi.

Accoppiamento spin-spin: Ulteriori informazioni, oltre a quelle ottenibili dai valori di spostamento chimico, si ricavano dalla molteplicità dei segnali NMR, poiché esse dipendono dal numero di accoppiamenti con altri protoni o con altri nuclei magneticamente attivi. Così un singoletto è indice di un nucleo o un gruppo di nuclei non accoppiati; un doppietto 1:1 indica l'interazione con un gruppo CH; un tripletto 1:2:1 con un gruppo CH_2 ; un quadrupletto 1:3:3:1 con un gruppo CH_3 .

Nella spettroscopia ^1H -NMR normalmente si osserva accoppiamento tra atomi che non distano più di tre legami: così gli accoppiamenti più comuni sono quelli tra protoni *vicinali*, indicando con tale termine i protoni legati ad atomi di carbonio adiacenti.

L'accoppiamento tra protoni *geminali*, cioè legati allo stesso atomo di carbonio, per quanto sia spesso elevato, non viene solitamente osservato a causa della equivalenza di questi protoni.

Accoppiamenti eteronucleari: Frequentemente, protoni legati a nuclei magneticamente attivi quali ^{10}B , ^{11}B , ^{19}F , o ^{31}P sono con essi accoppiati, e forniscono ulteriori informazioni sulla struttura della molecola in esame⁶.

2.5.2 Strumentazione

Per la registrazione degli spettri $^1\text{H-NMR}$ è stato utilizzato uno spettrometro Varian VXR-300 a 299.93 e 78.15 MHz rispettivamente; il diametro della provetta contenente il campione era di 5 mm e si è operato ad una temperatura di 25°C. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati utilizzando D_2O come solvente e gli spostamenti o chemical shifts sono stati riferiti al segnale del solvente residuo (4.8 ppm).

2.6 Calcoli Teorici

I calcoli sono stati effettuati con il programma "Spartan 02" per Linux⁷. La geometria dei leganti è stata ottimizzata utilizzando metodi "ab initio" con un set di base 3-21G^{*8}, le geometrie dei complessi sono state affinate con metodi semi-empirici⁹, con un set di base AM1¹⁰, AM1/SM2^{11,12} e PM3¹³. Per ogni molecola sono stati determinati i calori di formazione, le cariche atomiche, elettrostatiche^{14,15}, naturale¹⁶ e di Mulliken¹⁷, sono state ricostruite le superfici di densità elettronica e sono stati determinati gli orbitali HOMO e LUMO.

2.7 Metodo Voltammetrico

Il termine *voltammetria* si riferisce ad un insieme di metodi analitici dove le informazioni sull'analita sono ottenute dalla misura della corrente come funzione del potenziale applicato. La misura è eseguita in condizioni tali da favorire la polarizzazione dell'elettrodo indicatore o di lavoro. In voltammetria, per aumentare la polarizzazione, si usano come elettrodi di lavoro *microelettrodi*, che presentano aree superficiali di pochi millimetri quadrati e, per alcune applicazioni, di pochi micrometri quadrati. La quantità di analita necessaria per una misura voltammetrica è minima e questo rappresenta uno dei tanti vantaggi associati a questa tecnica.

La voltammetria si è sviluppata storicamente a partire dalla *polarografia*, un tipo particolare di voltammetria scoperto dal chimico cecoslovacco Jaroslav Heyrovsky nei primi anni '20.

La polarografia è tuttora un settore importante della voltammetria e si differenzia dagli altri metodi voltammetrici per l'impiego di un microelettrodo di lavoro costituito da un elettrodo a gocciolamento di mercurio (DME).

La voltammetria è ampiamente utilizzata da chimici inorganici, fisici e dai biochimici per scopi analitici come: studi fondamentali dei processi di ossidazione e di riduzione in matrici diverse, dei processi di assorbimento sulle superfici e dei meccanismi di trasferimento elettronico su superfici chimicamente modificate.

2.7.1 Segnali di eccitazione in voltammetria

In voltammetria un *segnale di eccitazione* a potenziale variabile è inviato ad una cella elettrochimica contenente un microelettrodo. Il metodo si basa sulla risposta in corrente provocata da tale segnale. In Figura 9 sono riportate due delle forme d'onda dei segnali

di eccitazione più comunemente usati in voltammetria. Nella voltammetria classica il segnale di eccitazione è del tipo a scansione lineare mostrato in Figura 9-a. In questo caso il potenziale in corrente continua applicato alla cella aumenta linearmente in funzione del tempo. La forma triangolare dell'onda mostrata in Figura 9-b rappresenta un potenziale che varia ciclicamente tra due valori, prima aumentando linearmente fino ad un massimo, e poi diminuendo linearmente, con la stessa pendenza, fino al valore originale. Si può ripetere il processo per molte volte, registrando la corrente generata in funzione del tempo. Un ciclo completo può durare 100 secondi o più.

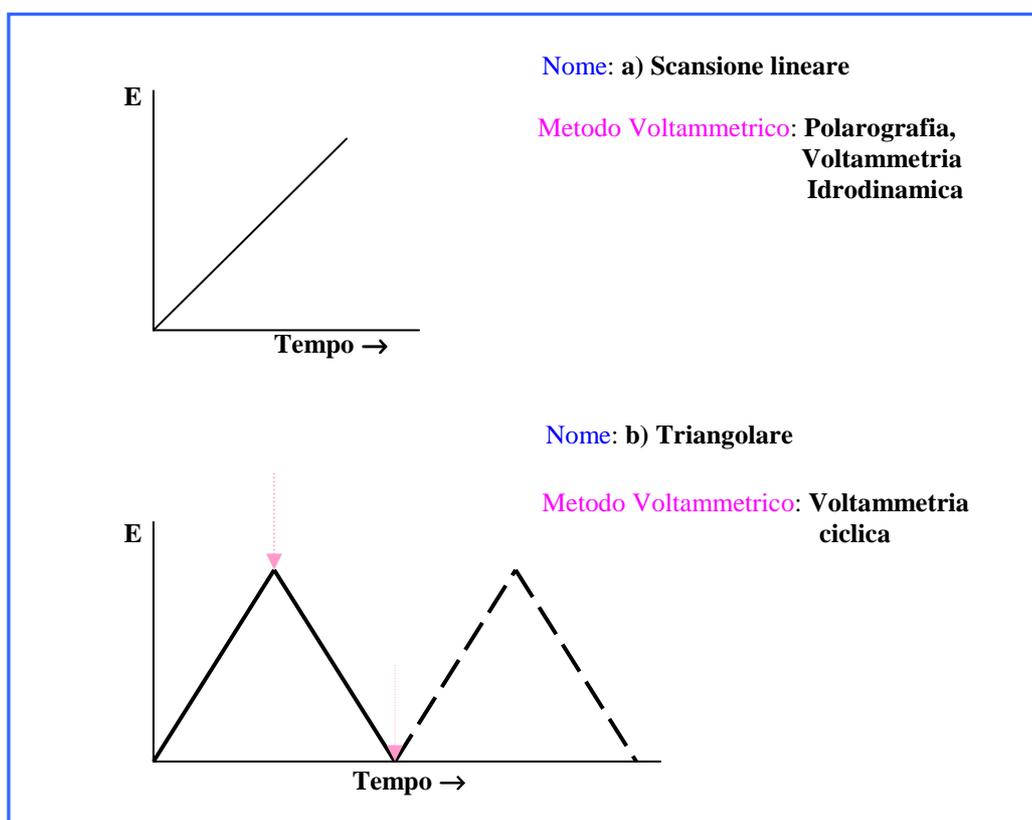


Figura 9: Segnali dei potenziali di eccitazione usati in voltammetria

2.7.2 Voltammetria ciclica

In voltammetria ciclica, ad un elettrodo stazionario immerso in una soluzione non agitata, si applica un potenziale a forma d'onda triangolare (Figura 9-b), per produrre una risposta di corrente. I potenziali al punto di inversione (indicati dalle frecce in Figura) vengono chiamati *potenziali di inversione*.

L'intervallo tra i potenziali di inversione, scelto per una determinata reazione, deve essere tale che la reazione di ossidazione o riduzione di una o più specie da analizzare avvenga in regime di controllo diffusionale. In relazione alla composizione del campione si può scegliere una scansione iniziale positiva o negativa (una scansione nella direzione di potenziali più negativi è chiamata *scansione diretta*, mentre una in direzione opposta è chiamata *scansione inversa*). La durata del ciclo può essere compresa tra -1ms e $+100\text{s}$.

I parametri più importanti in una voltammetria ciclica sono: il potenziale catodico di picco, E_{pc} , il potenziale anodico di picco, E_{pa} , la corrente catodica e anodica corrispondenti al picchi.

La voltammetria ciclica si usa principalmente come strumento diagnostico in grado di fornire informazioni qualitative sui processi elettrochimici in condizioni diverse.

La voltammetria ciclica, benché non venga utilizzata per analisi di routine, è diventata uno strumento importante per lo studio dei meccanismi e della velocità dei processi di ossidoriduzione, in particolare nel caso di sistemi organici e metallorganici. Spesso è possibile mediante questa tecnica rivelare la presenza di intermedi nelle reazioni di ossidoriduzione¹⁸.

Le scansioni effettuate con la voltammetria ciclica sono state registrate con un potenziostato-galvanostato Autolab PG-STAT 30, in soluzione acquosa, in presenza di

un tampone di forza ionica KCl 1M alla temperatura di 25°C. La cella conteneva un elettrodo di lavoro di platino, un elettrodo di riferimento ad Ag/AgCl e un contro elettrodo di carbonio/grafite.

Prima di ogni scansione la soluzione è stata degasata con Argon per 20 minuti. In figura 10 è riportato un tipico voltamogramma ciclico:

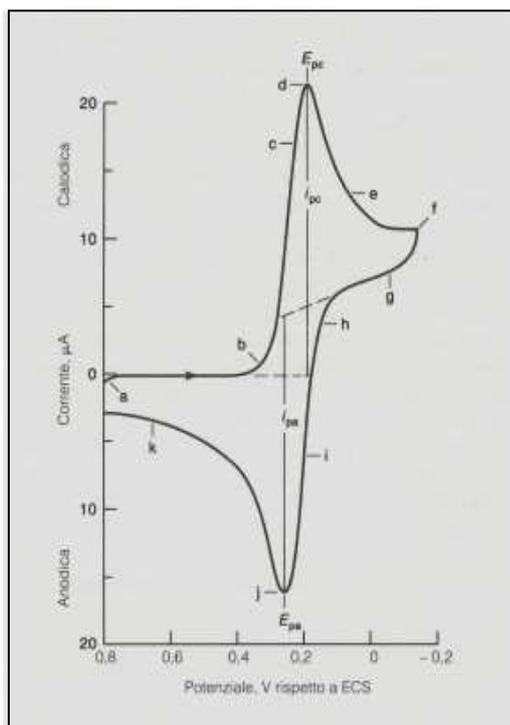


Figura 10: Voltamogramma ciclico

2.8 Riferimenti Bibliografici

¹ G. Gran, *Analyst*, **77**, 661 (1952)

² L. Zekany and I. Nagypal, in D.J. Legget (ed) *Computational methods for the determination of formation constants*, Plenum Press, New York 1985, Ch.8

³ P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, (1996), **43**, 1739-1753.

- ⁴ M.C. Aragoni, M. Arca, G. Crisponi, V.M. Nurchi, *Anal. Chim. Acta*, 316, 195, (1995)
- ⁵ J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Edition.
- ⁶ G.F. Pedulli, *Metodi fisici in Chimica Organica*, ed. Piccin, pgg 210-212, 227, 228, 233
- ⁷ SPARTAN'02 for LINUX, Wavefunction, Inc
- ⁸ C. C. J. Roothan, *Rev. Mod. Phys.*, **23**, 69 (1951); G. G. Hall, *Proc. Roy. Soc. (London)*, A205, 541 (1951)
- ⁹ J. A. Pople and D.A. Beveridge, *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, New York, 1970
- ¹⁰ M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy and J. J. P. Stewart, *J. Amer. Chem. Soc.*, 107, 3908 (1985)
- ¹¹ C. C. Chambers, G. D. Hawkins, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Chem. Phys.*, 100, 16385 (1996)
- ¹² C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *Structure and Reactivity in Aqueous Solution*, ACS Symposium Series, no. 568, American Chemical Society, Washington, D.C., 1994
- ¹³ J. J. P. Stewart, *J. Computational Chem.*, **10**, 209 (1989)
- ¹⁴ L. E. Chirlian and M. Francl, *J. Computational Chem.*, **8**, 894 (1987)
- ¹⁵ C. M. Breneman and K. B. Wiberg, *J. Computational Chem.*, **11**, 361 (1990)
- ¹⁶ A. E. Reed, R. B. Weinstock and F. Weinhold, *J. Chem. Phys.*, **83**, 735 (1985)
- ¹⁷ R. S. Mulliken, *J. Chem. Phys.*, **23**, 1833, 1841, 2338, 2343 (1955)
- ¹⁸ D.A. Skoog, J.J. Leary, *Chimica Analitica Strumentale*, ed. EdiSES, pgg 771-773, 813-816

Capitolo 3

Equilibri di formazione dei complessi tra catecolo,

4-nitrocatecolo e ioni Al(III) e Fe(III)

Il catecolo (2-idrossifenolo) e il 4-nitrocatecolo (3-nitro,2-idrossifenolo) presentano proprietà chimiche e fisiche molto simili al fenolo, da cui derivano. Il fenolo è un idrocarburo aromatico in cui un ossidrile è direttamente legato all'anello benzenico; il catecolo (Figura 1) è caratterizzato dal fatto che i gruppi ossidrilici presenti sono due, ognuno in orto rispetto all'altro; per quanto riguarda invece il 4-nitrocatecolo (Figura 2), l'unico aspetto che lo differenzia è la presenza di un gruppo nitro in posizione para rispetto ad uno dei raggruppamenti ossidrilici.

Il catecolo e il 4-nitrocatecolo sono specie altamente reattive e possono subire ossidazione da parte dell'ossigeno dell'aria. I gruppi ossidrilici -OH, fra loro in orto, sono responsabili del fatto che tali specie costituiscano degli ottimi leganti e formino complessi stabili con il ferro con un basso potenziale di riduzione.

In letteratura è riportato che il catecolo si comporta come un legante bidentato¹, forma un complesso ottaedrico triscatecolo-Fe(III)² e che i derivati del 4-nitrocatecolo sono potenziali anti-ossidanti³.

La reazione di formazione del complesso tra il Fe(III) e il catecolo è seguita da una reazione redox che porta a Fe(II) e ad un prodotto dell'ossidazione del catecolo⁴. Le molecole contenenti catecolo hanno una ricorrenza ed un'importanza biologica molto elevata.

La classe più importante è costituita dalle catecolammine, le quali hanno una funzione di neurotrasmettitori⁵ e sono utilizzate dal punto di vista farmacologico in molteplici campi quali trattamento del morbo di Parkinson⁶, ipertensione⁷ e cancro al seno⁸.

Il gruppo orto-difenolico è facilmente ossidato al corrispondente chinone o semichinone dall'ossigeno presente nell'ambiente^{9,10}. Questi intermedi possono polimerizzare, ossidare altre specie oppure essere ridotti nuovamente a o-difenoli¹¹.

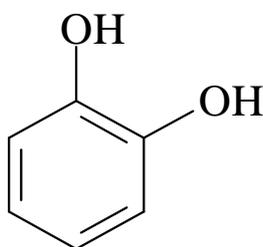


Figura 1. Catecolo
(2-idrossifenolo)

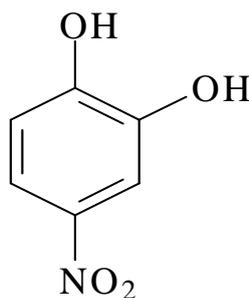


Figura 2. 4-nitrocatecolo
(3-nitro,2-idrossifenolo)

3.1 Schema del lavoro

Lo studio degli equilibri di formazione dei complessi tra catecolo e 4-nitrocatecolo con gli ioni Al(III) e Fe(III) è stato suddiviso in due fasi principali:

- Studio dei pK di deprotonazione dei leganti catecolici alle temperature di 25°C e 37°C;
- Studio della formazione dei complessi del catecolo e del 4-nitrocatecolo con il Fe(III) e l'Al(III).

In funzione del sistema, per lo studio degli equilibri in soluzione si sono utilizzate tecniche potenziometriche, spettrofotometriche quali UV-Visibile, fluorimetria, NMR, ed elettrochimiche (voltammetria ciclica).

Lo studio dei pK di deprotonazione dei leganti è stato eseguito mediante misure potenziometriche, spettrofotometriche e fluorimetriche.

I complessi formati dal catecolo col Fe(III) sono stati studiati mediante titolazioni potenziometriche, spettrofotometriche e fluorimetriche. Per i complessi formati dal catecolo con l'alluminio sono state effettuate solamente misure potenziometriche e fluorimetriche, dato che a causa della precipitazione non sono stati registrati spettri NMR e, non manifestandosi variazioni spettrali durante il corso della titolazione, non sono stati raccolti gli spettri UV-Visibile. I complessi formati dal 4-nitrocatecolo sono stati studiati potenziometricamente e spettrofotometricamente nel caso del Fe(III) e sono stati registrati anche gli spettri NMR per l'Al(III). Il metodo fluorimetrico non è stato applicato in quanto il 4-nitrocatecolo non dà luogo a fluorescenza.

Nella Tabella 1 è riportato uno schema riassuntivo delle tecniche utilizzate.

Tabella 1 Schema riassuntivo delle tecniche utilizzate

Tecniche	Catecolo Fe(III)	Catecolo Al(III)	4-nitroCat Fe(III)	4-nitroCat Al(III)
Titolazione Spettrofotometrica	X		X	X
Titolazione Potenziometrica	X	X	X	X
Misure NMR				X
Misure fluorimetriche	X	X		

I reagenti $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , HCl , KCl , KOH , D_2O , DCl , NaOD , Catecolo e 4-nitrocatecolo, utilizzati nelle varie fasi del lavoro, sono tutti prodotti Aldrich.

Il catecolo e' stato sottoposto a ricristallizzazione con toluene prima dell'uso.

3.2 Costanti di protonazione dei leganti

3.2.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

I pK dei leganti sono stati determinati mediante titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche, eseguite in presenza di un tampone di forza ionica 0,1M in KCl alle temperature di 25°C e 37°C .

Il catecolo è caratterizzato da due valori di pK, il più basso intorno a 9 e il più alto a circa 13. Solo il primo pK del catecolo è stato determinato anche per via potenziometrica; infatti, il secondo, cadendo a valori di $\text{pH} > 11$, è stato determinato

attraverso delle titolazioni spettrofotometriche in batch, ossia registrando lo spettro di 30 soluzioni a varie concentrazioni di KOH.

Tuttavia, il dato ottenuto per il secondo pK non è accurato a causa del valore di forza ionica a cui si arriva con concentrazioni di KOH >0.1 M. La bassa risoluzione spettrale (Figura 4) è attribuita alla concorrente reazione di ossidazione del catecolo, la quale è favorita dal pH basico. Nelle figure seguenti vengono riportate le titolazioni spettrofotometriche di una soluzione di catecolo $1.7 \cdot 10^{-3}$ M utilizzando un cammino ottico di 0.2 cm a 25°C (Figure 3,4,5), seguite dal grafico delle concentrazioni molari in funzione del pH e dallo spettro in ϵ .(figure 6 e 7)

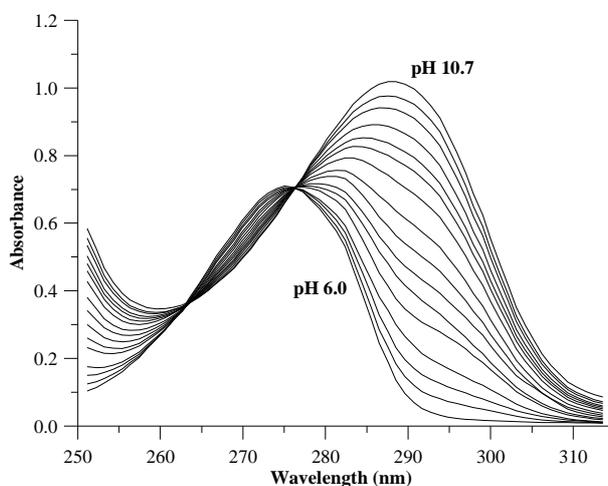


Figura 3: Titolazione spettrofotometrica del catecolo da pH 6 a pH 10.7

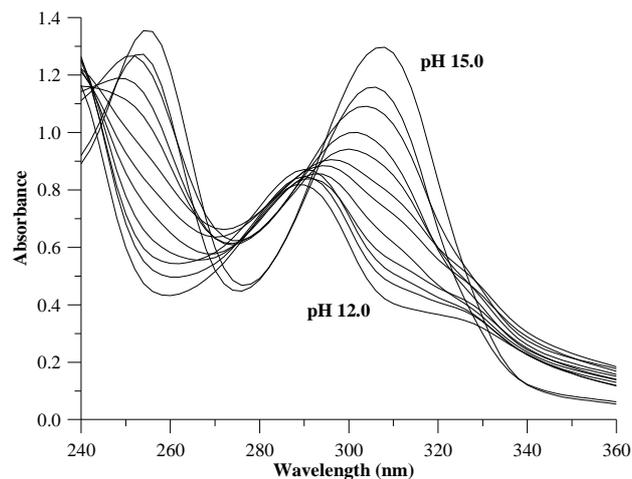


Figura 4: Titolazione spettrofotometrica del catecolo da pH 12 a pH 15

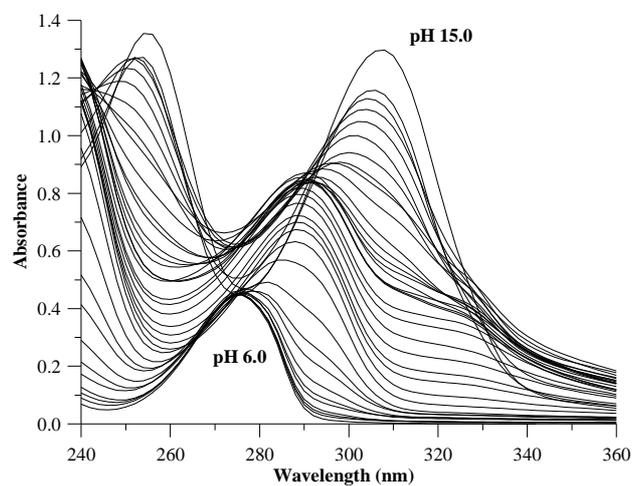


Figura 5: Titolazione spettrofotometrica del catecolo da pH 6 a pH 15

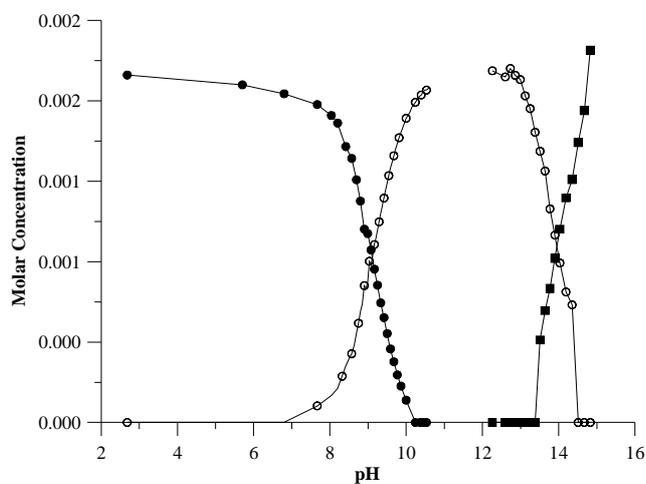


Figura 6: Model free concentration distribution calculated with SPECFIT** program

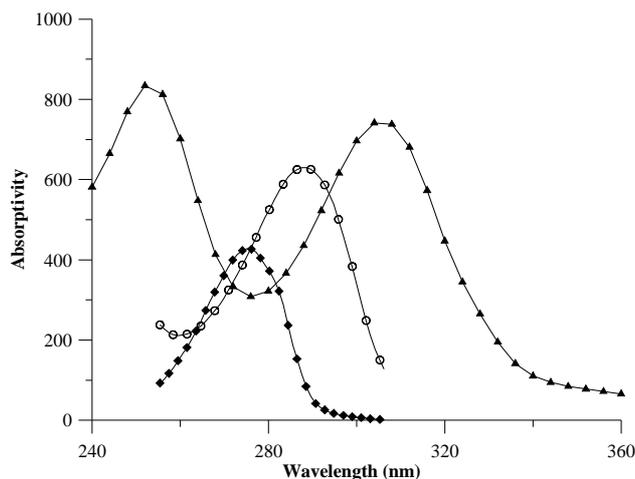


Figura 7: Spectra model free calculated with SPECFIT** program

Per quanto riguarda invece la determinazione delle costanti di deprotonazione del 4-nitrocatecolo, l'introduzione del nitro gruppo nell'anello catecolico, producendo sia un forte effetto induttivo $-I$ e mesomero $+M$, aumenta l'acidità di entrambi i protoni e rende pertanto possibile la determinazione di entrambi i pK oltre che per via spettrale anche per via potenziometrica. Nei grafici seguenti vengono riportate le titolazione spettrofotometriche di una soluzione di 4-nitrocatecolo $6.7 \cdot 10^{-4} M$ utilizzando un cammino ottico di 0.2 cm a $25^{\circ}C$.

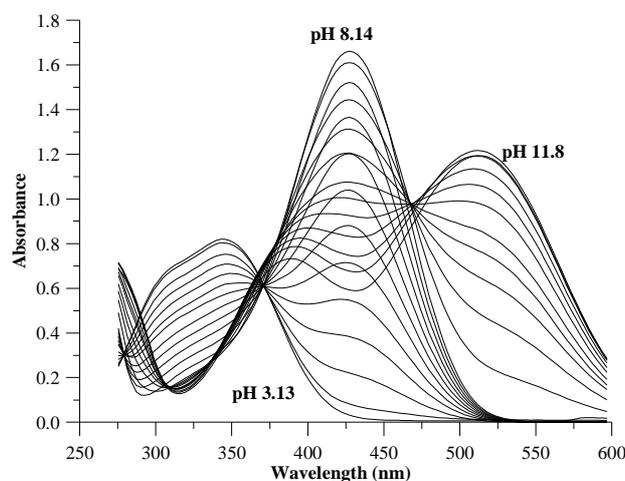


Figura 8: Titolazione spettrofotometrica del 4-nitrocatecolo da pH 3 a pH 11.8.

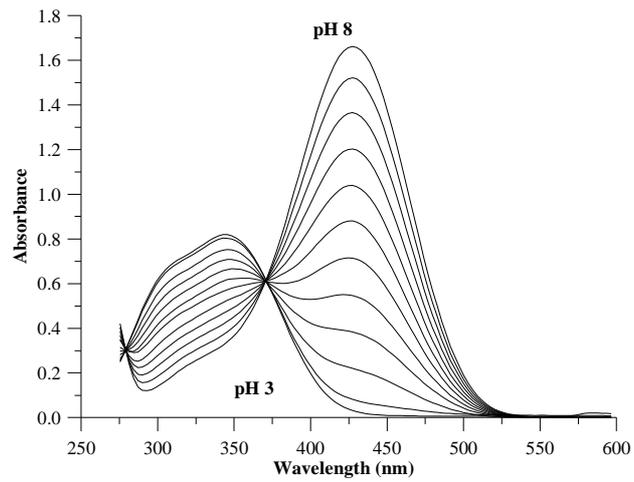


Figura 9: Titolazione spettrofotometrica del 4-nitrocatecolo da pH 3 a pH 8

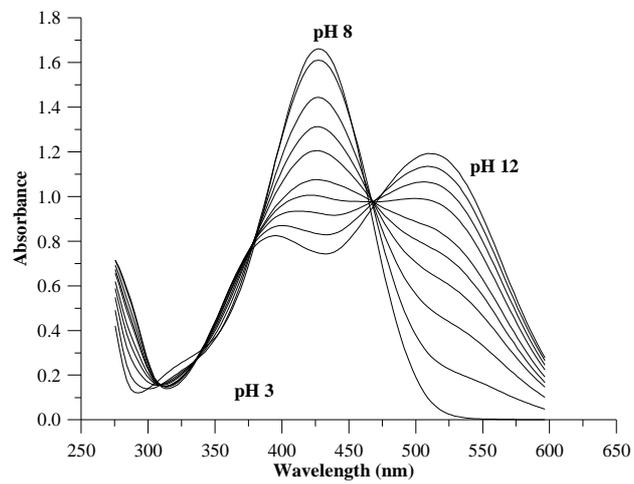


Figura 10: Titolazione spettrofotometrica del 4-nitrocatecolo da pH 8 a pH 11.8.

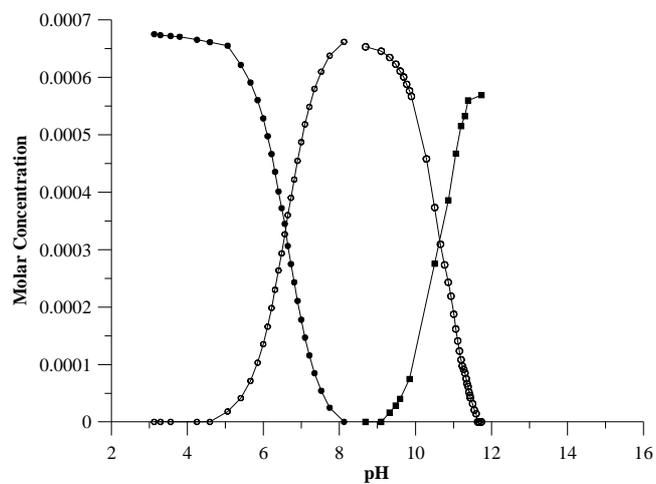


Figura 11: Model free concentration distribution calculated with SPECFIT** program

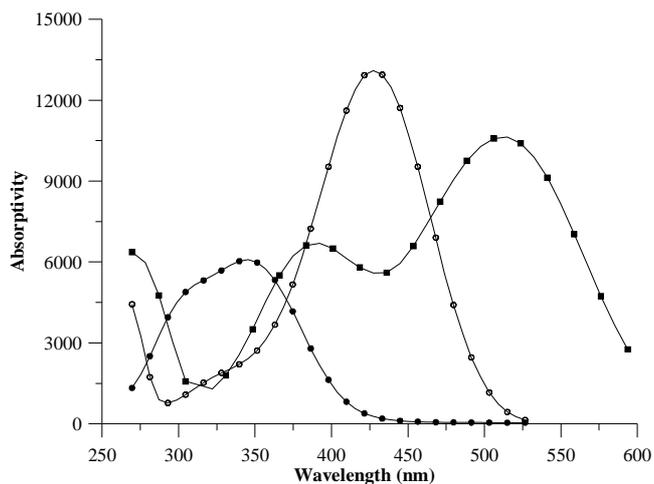


Figura 12: Spectra model free calculated with SPECFIT** program

3.2.2 Misure fluorimetriche

La prima costante di protonazione del catecolo è stata studiata anche attraverso titolazioni fluorimetriche a 25 °C. La titolazione fluorimetrica è stata condotta preparando trenta soluzioni del legante alla stessa concentrazione e variando il pH con aggiunte di HCl per il primo ramo della titolazione e di KOH per il secondo ramo. Il pH e lo spettro sono stati misurati molto velocemente per evitare l'ossidazione del gruppo –OH che avviene facilmente a questi valori di pH. Il legante è stato eccitato a 262 nm e sono stati registrati gli spettri di emissione nel range 200-400 nm con un voltaggio al fotomoltiplicatore di 600 V. Lo spettro di fluorescenza della forma protonata mostra 2 picchi, a 313 nm e a 613 nm, con un rapporto di intensità di 2.8. L'intensità di entrambi i picchi diminuisce con il pH, dato che la forma neutra è emissiva a differenza di quella anionica che invece non è fluorescente. Riportando l'altezza della banda a 313 nm (piu'intensa) contro il pH si ottiene una curva avente forma sigmoidale con un flesso a 9.15 unità di pH, in accordo con i risultati potenziometrici e spettrofotometrici. L'emissione diminuisce in ambiente acido fino a un valore di $p[HCl] -1$, con un flesso a

circa ≈ 0 . In figura 13 sono riportati gli spettri del catecolo registrati da pH 5.5 a pH 11 nel range tra 275 e 375 nm, mentre in figura 14 gli spettri registrati da pH -1 a pH 11 .

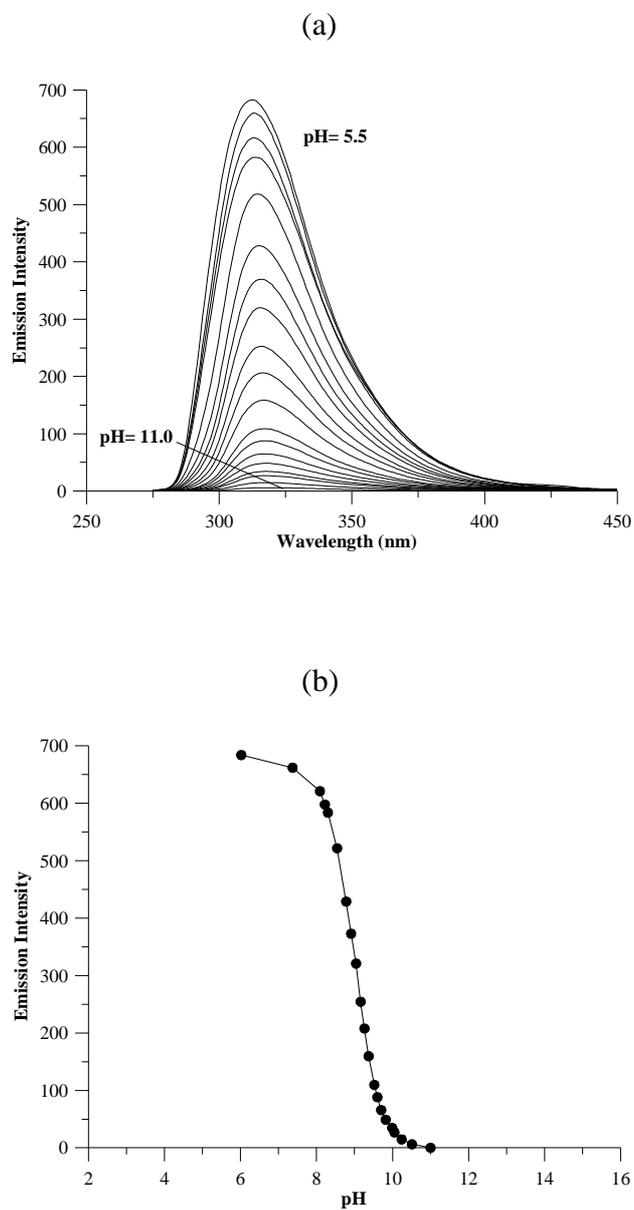


Figura 13. **A)**Titolazione fluorimetrica del Catecolo ($7.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$) da pH 5.5 a pH 11 **B)** Profilo di fluorescenza al variare del pH per il Catecolo ($7.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$)

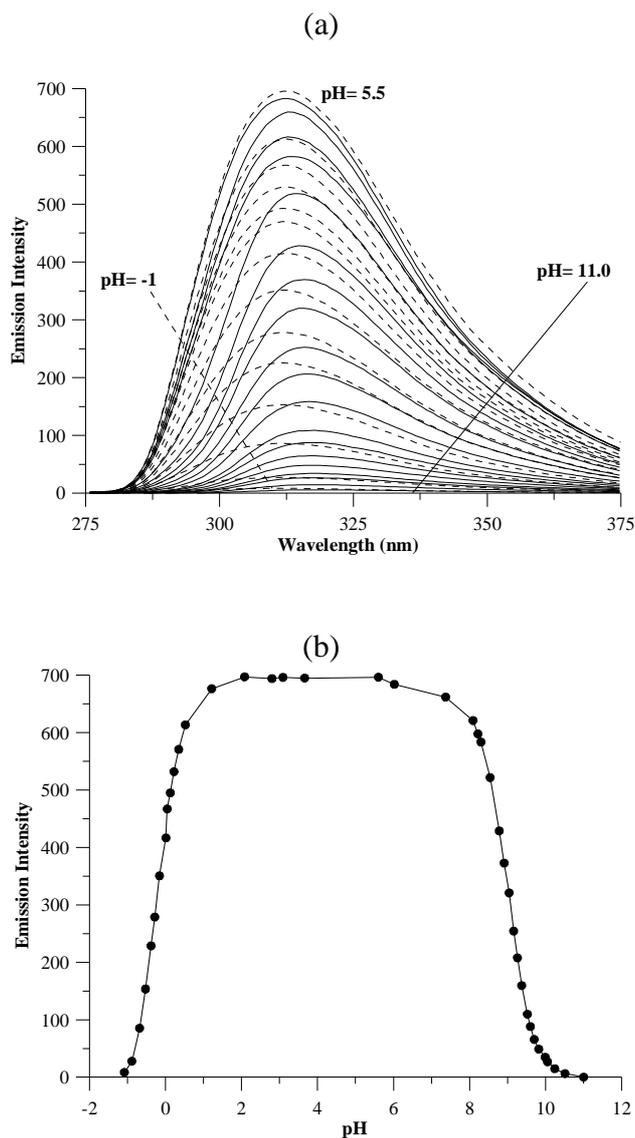


Figura 14. **A)**Titolazione fluorimetrica del Catecolo ($7.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$) da pH -1 a pH 11, basica (—) e acida(--); **B)** Profilo di fluorescenza al variare del pH per il Catecolo ($7.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$).

3.2.3 Analisi dei dati

In Tabella 2 sono riportate le costanti di protonazione per i leganti catecolo e 4-nitrocatecolo ottenute dai dati potenziometrici, spettrofotometrici e fluorimetrici. Nelle Tabelle 3 e 4 sono riportati i valori dei pK di letteratura di Catecolo e 4-nitrocatecolo rispettivamente.

Legante	pK ₁ 25°C	PK ₂ 25°C	pK ₁ 37°C	pK ₂ 37°C
Catecolo	9.17(1)	13.77(2)	9.03(1)	13.77(1)
4-nitro catecolo	6.60(1)	10.74(1)	6.45(1)	10.56(1)

Tabella 2: Costanti di protonazione sperimentali del catecolo e 4-nitrocatecolo, tra parentesi è riportata la deviazione standard sull'ultima cifra significativa.

Condizioni sperimentali	Temperatura °C	pK	Riferimento Bibliografico
KCl 0.1M, sp	25	8.81 13.43	Aust.J.Chem., 37 (1984)885
KCl 0.1M, gl	25	9.28	Aust.J.Chem., 35 (1982)739
KNO ₃ 0.1M, gl	25	9.22	Inorg. Chem., 23 (1984) 18
KCl 0.2M, gl	25	9.28 13.0	J.Coord.Chem., 29 (1993) 81
KNO ₃ 0.2M, gl	35	9.09 12.88	J. Coord.Chem, 20 (1989) 69

Tabella 3: Valori di pk di letteratura per il catecolo

Condizioni sperimentali	Temperatura °C	pK	Riferimento Bibliografico
KCl 0.1M, gl	25	6.67 10.88	Anal.Chim.Acta, 345 (1997) 5
NaCl 0.1M, gl	25	6.63 10.54	J.Coord.Chem., 23 (1993) 133
KCl 0.1M, gl	25	6.70 10.83	Finn.Chem.Lett., (1984) 9
KCl 0.1M, sp	25	6.78 10.64	Anal. Chem., 44 (1972) 1857
KNO ₃ 0.2M, gl	35	6.54 10.28	J. Coord. Chem, 20 (1989) 69

Tabella 4: Valori di pK di letteratura per il 4-nitrocatecolo

Nella colonna relativa alle condizioni sperimentali sono presenti le sigle **gl** ed **sp**, che indicano rispettivamente l'elettrodo a vetro e lo spettrofotometro. Per valori di $\text{pH} < 3$ e > 8 gli elettrodi a vetro non seguono la legge di Nernst, pertanto i dati ottenuti a questi valori di pH sono meno precisi e accurati di quelli raccolti con lo spettrofotometro.

Confrontando i risultati ottenuti con i dati di letteratura, si osserva un buon accordo per entrambi i pK nel caso del 4-nitrocatecolo. Per il catecolo i valori sono in buon accordo per il primo pK ; il secondo pK ha invece un valore superiore a quelli riportati in letteratura determinati potenziometricamente.

Nella Figura 15 sono riportate le curve di distribuzione per i due leganti in funzione del pH .

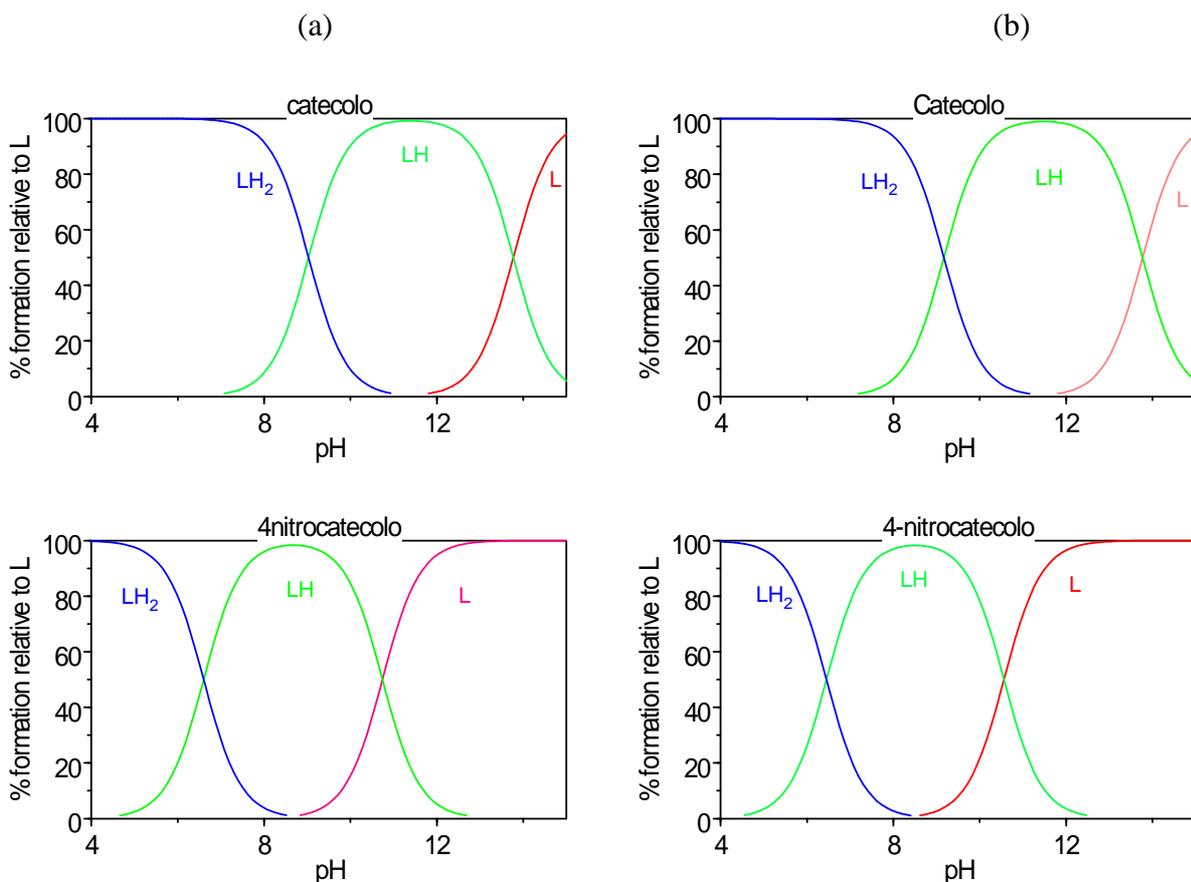


Figura 15. Curve di distribuzione del Catecolo e 4-nitrocatecolo a 25(a) e a 37(b)°C.

Poiché siamo interessati alla chelazione nel comparto fisiologico sangue, è opportuno conoscere in quale forma si presenta il legante a pH 7.4. A tale valore di pH il catecolo è presente quasi esclusivamente come LH₂, specie neutra.

Il 4-nitrocatecolo è invece per l'80% presente come LH⁻. La presenza di una carica può influenzare notevolmente la solubilità del legante nel comparto ematico e la sua capacità di attraversare le barriere cellulari. Normalmente composti carichi sono più idrofili e si localizzeranno negli spazi intracellulari. Nella tabella 5 sono stati riportati i siti cellulari accessibili a diversi tipi di chelanti¹².

Tipi di agenti chelanti	Siti accessibili
Neutri (non carichi)	
Polari	Molti siti extra e intracellulari
Altamente idrofobici	Siti extracellulari, cervello, tessuto grasso...
Singola carica negativa	Spazi extracellulari, cellule aventi un appropriato sistema di trasporto monoanionico nelle loro membrane (es.reni e fegato)
Doppia carica negativa	Spazi extracellulari, cellule aventi un appropriato sistema di trasporto
> Tripla carica negativa	Prevalentemente Spazi extracellulari
Alto peso molecolare	Cellule del fegato se il composto viene escreto dalla bile

Tabella 5: Siti accessibili a vari siti di agenti chelanti

3.3 Complessi del Ferro(III)

3.3.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

Le reazioni di complessazione tra i leganti e il Ferro(III) sono state studiate mediante titolazioni potenziometriche, spettrofotometriche e, quando possibile, mediante titolazioni fluorimetriche.

Sono state preparate diverse soluzioni aventi rapporti molari legante-metallo 1:1, 2:1 e 3:1 con concentrazione costante di legante. Le misure sono state effettuate a 25°C e a 37°C in presenza di un tampone di forza ionica 0.1M in KCl.

Nel caso del sistema nitrocatecolo Fe non si è osservata la formazione di alcun precipitato per nessun rapporto molare neanche ad alti valori di pH, mentre nel rapporto molare 1:1 per il sistema catecolo Fe si è osservata una precipitazione che ci ha impedito la registrazione dello spettro UV-Visibileibile.

Nel range di pH 3-9 è stata evidenziata la formazione dei complessi FeL , FeL_2 e FeL_3 , a pH 3 non è presente metallo libero.

La formazione dei complessi a tali valori di pH può essere seguita titolando la soluzione contenente il metallo ed il legante con HCl da pH 3 a pH 1. Nella figura 16 sono riportati gli spettri della titolazione del catecolo-Fe(III) nei rapporti molari 3:1 mentre nelle figure 17 e 18 vengono riportati rispettivamente i grafici del profilo di concentrazione in funzione del pH e gli spettri calcolati per le specie.

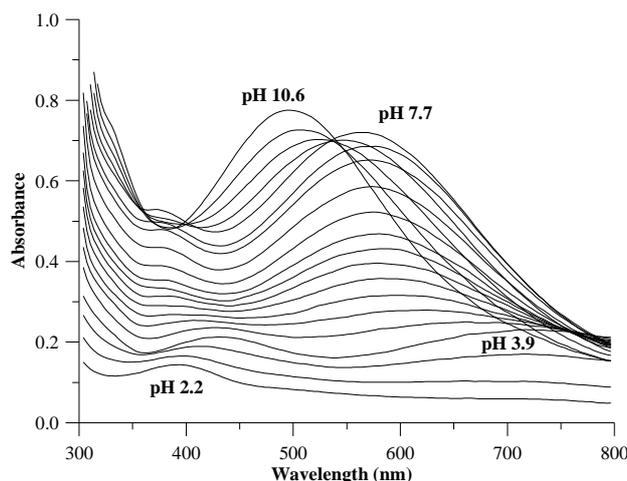


Figura 16: Titolazione spettrofotometrica del catecolo.ferro 3:1 [Catecolo]= $3.3 \cdot 10^{-3}$ M, $l=0.2$ cm

Osservando lo spettro del sistema catecolo-Fe(III) nel rapporto 3:1, si vede che a pH acidi, è presente un picco di bassa intensità a ~ 400 nm, che non corrisponde allo spettro del Fe a questo valore di pH. All'aumentare del pH (3.9), compare una nuova banda intorno a 700 nm. A pH vicini alla neutralità si ha la formazione di un picco intenso a 550 nm che decresce all'aumentare del pH a favore di una banda a 475 nm. La banda che si osserva a pH basici è dovuta alla formazione del complesso FeL_3 , la banda a 550 nm al complesso FeL_2 e la formazione del complesso 1:1 è invece evidenziata dalla banda a 700 nm. Dall'analisi dei dati potenziometrici si può spiegare la banda a 400 nm con la formazione di una specie Fe_2L_2H .

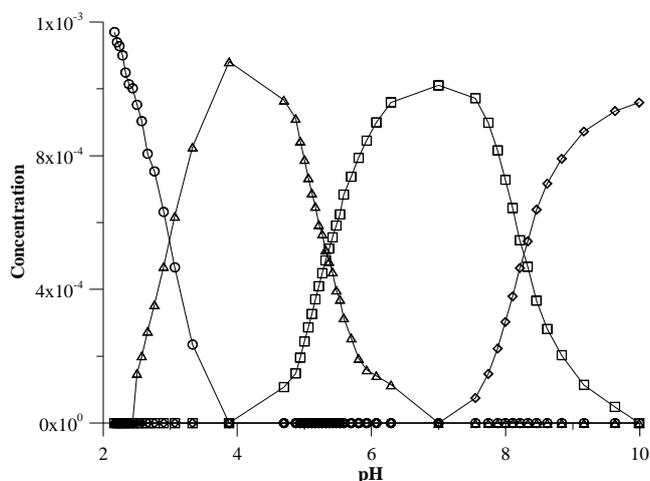


Figura 17: Model free concentration distribution calculated with SPECFIT program del catecolo.ferro 3:1

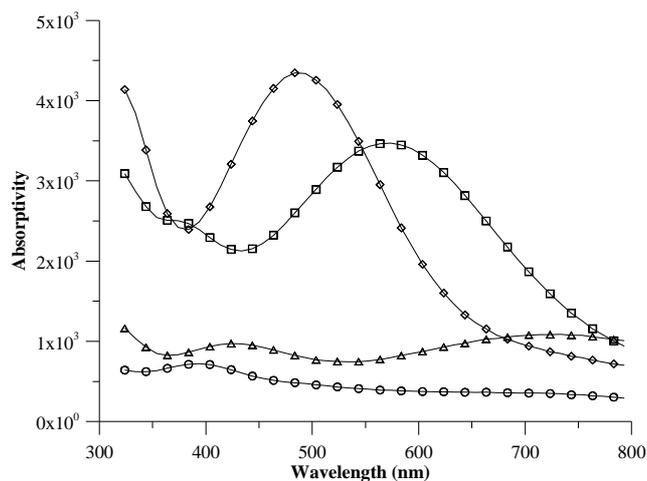


Figura 18: Spectra model free calculated with SPECFIT** program del catecolo.ferro 3:1

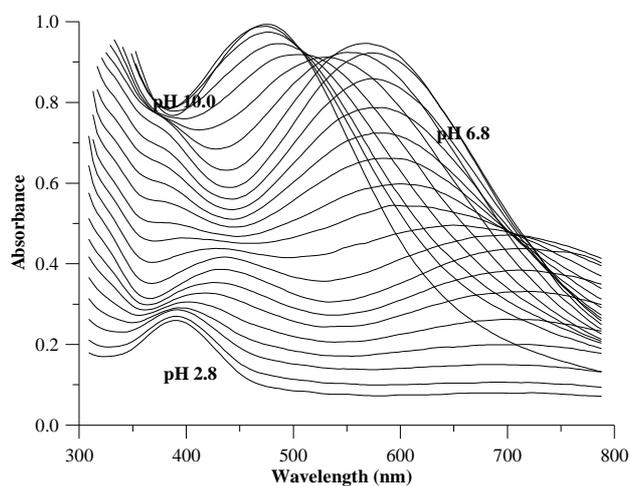


Figura 19: Titolazione spettrofotometrica del catecolo.ferro 2:1 [Catecolo]= $6.7 \cdot 10^{-4}$ M, $l=1$ cm,

Analizzando lo spettro del sistema catecolo-Fe(III) nel rapporto molare 2:1 (Figura 19), si osserva la formazione delle stesse bande aventi però un'intensità maggiore di quelle osservate nel rapporto molare 3:1.

Nelle figure 20, 21 e 22 sono riportati gli spettri delle titolazioni del 4-nitrocatecolo-Fe(III) in tutti i rapporti molari con il profilo di concentrazione in funzione del pH e gli spettri calcolati per le specie.

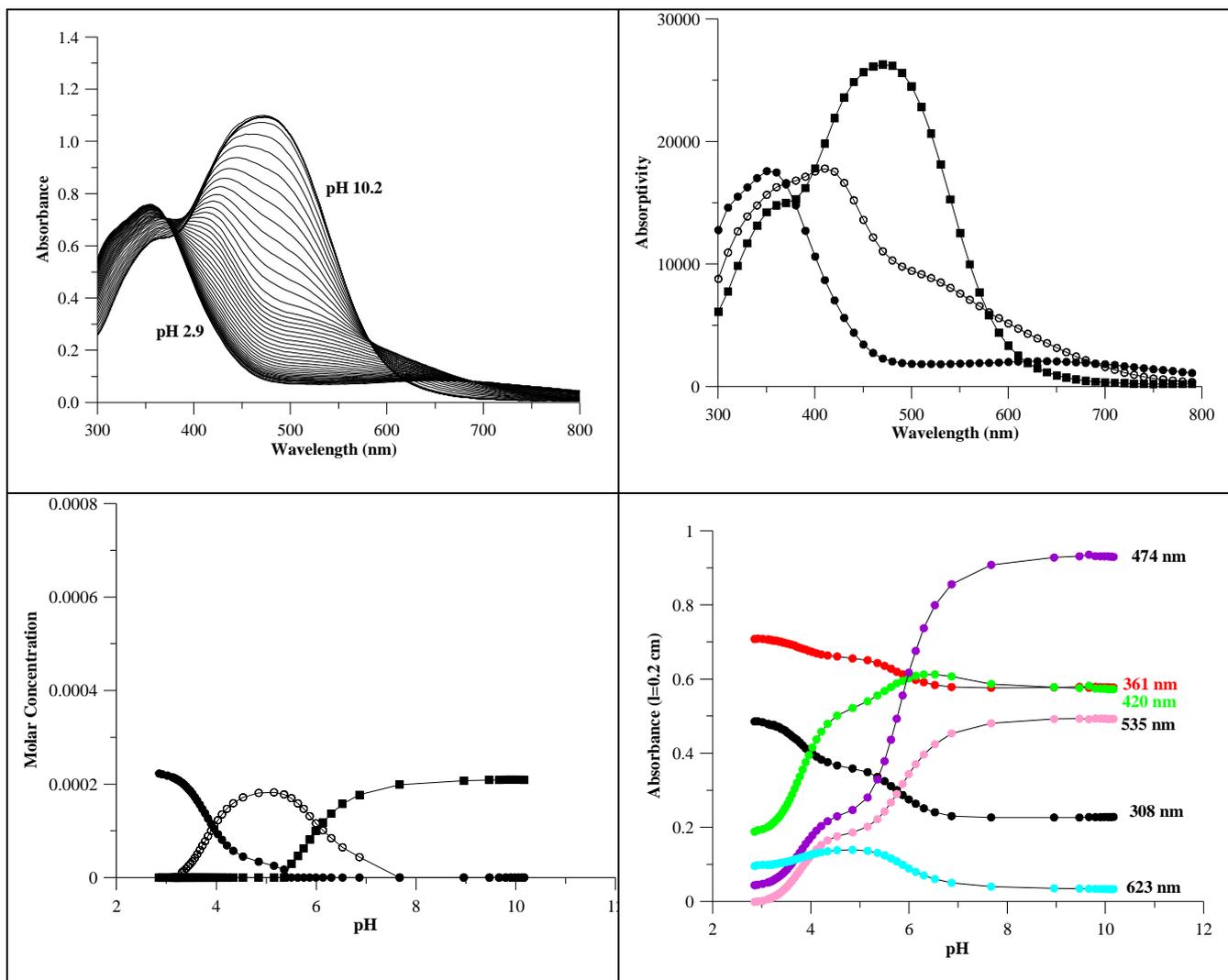


Figura 20: 4-nitro catecolo Fe(III) nel rapporto molare 3:1 [L]= $6.7 \cdot 10^{-4} \text{M}$

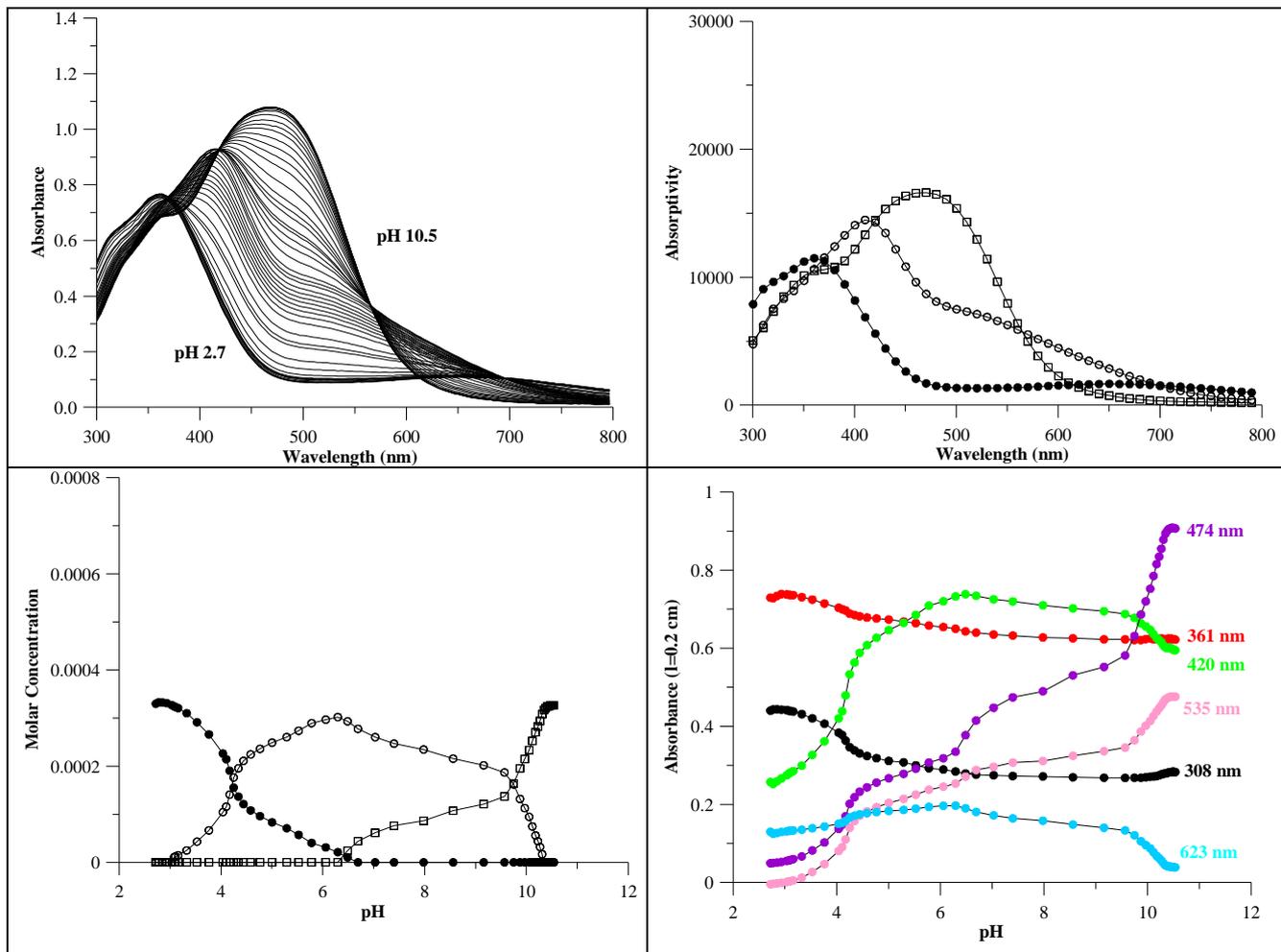


Figura 21: 4-nitro catecolo Fe(III) nel rapporto molare 2:1 $[L] = 6.7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

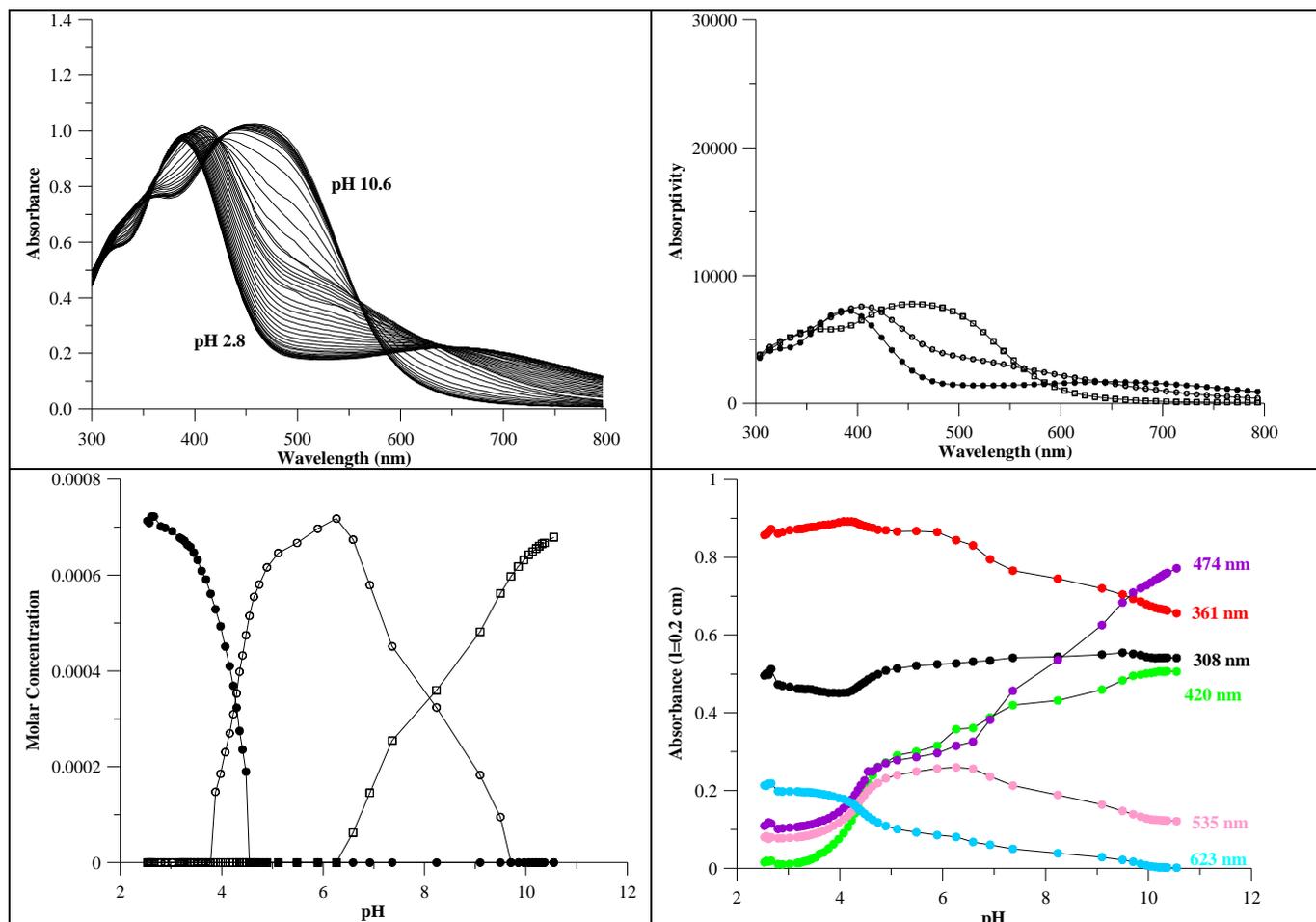


Figura 22: 4-nitro catecolo Fe(III) nel rapporto molare 1:1 [L]= $6.7 \cdot 10^{-4} \text{M}$

Dalle variazioni spettrali per la titolazione del sistema 4-nitrocatecolo-Fe(III) si nota che a $\text{pH} \cong 3$ è già presente un complesso (banda a 360 nm). Al crescere del pH si forma una prima banda a 440 nm, quindi una seconda a 480 nm. La formazione del primo complesso è stata studiata titolando la soluzione contenente il legante e il metallo in rapporto molare 1:1 da $\text{pH} 3$ a $H_0^{13} 0.6$. La titolazione acida è riportata in Figura 23 A, mentre in Figura 23 B è riportata la titolazione completa.

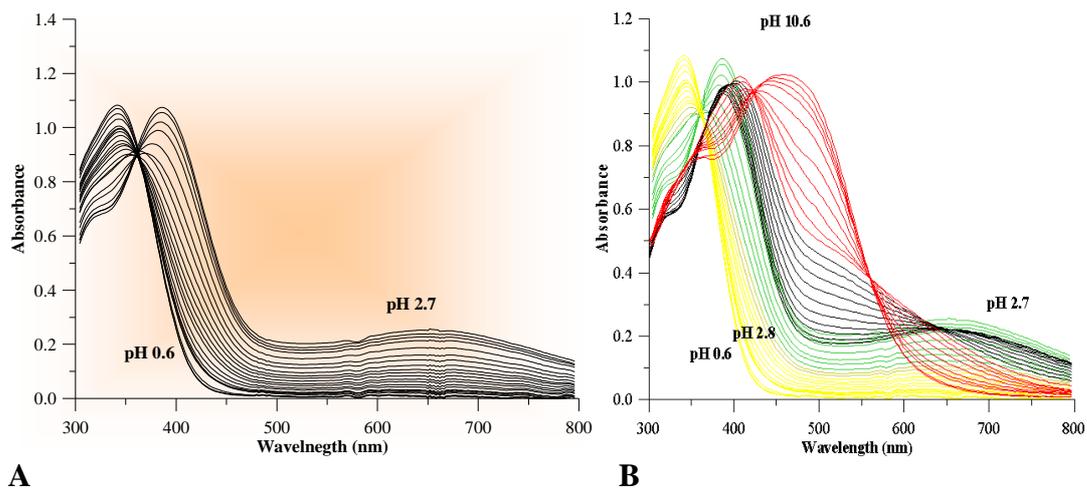
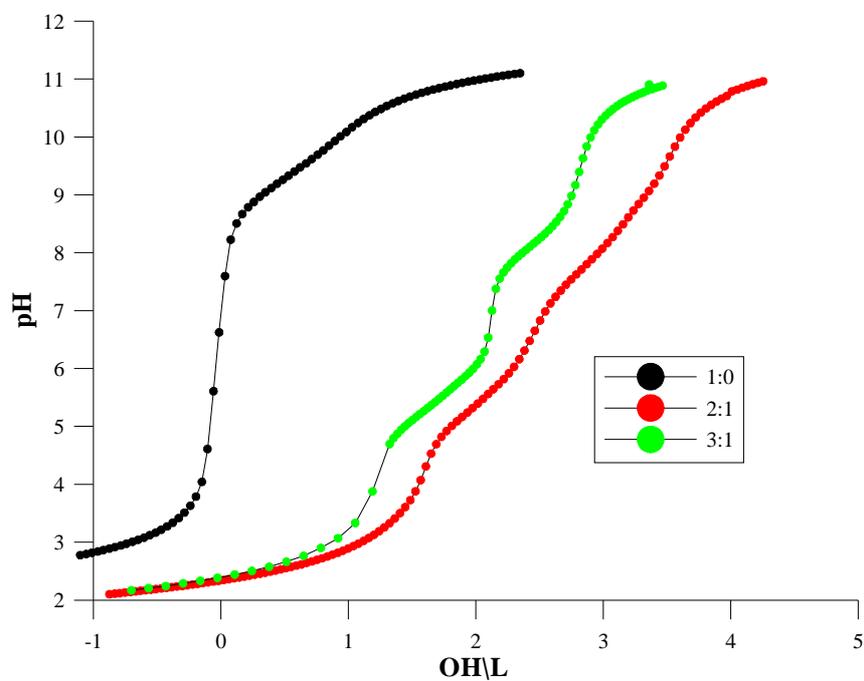
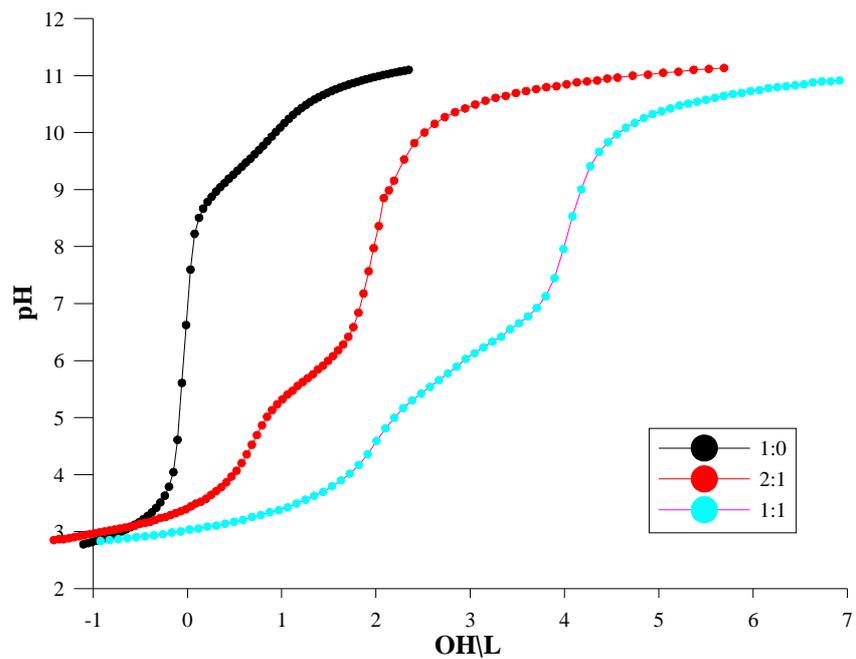


Figura 23: **A)** Titolazione spettrofotometrica 4-nitrocatecolo-Fe(III) 1:1 da pH 2.7 a H⁰ 0.6
B) Titolazione spettrofotometrica 4-nitrocatecolo-Fe(III) 1:1

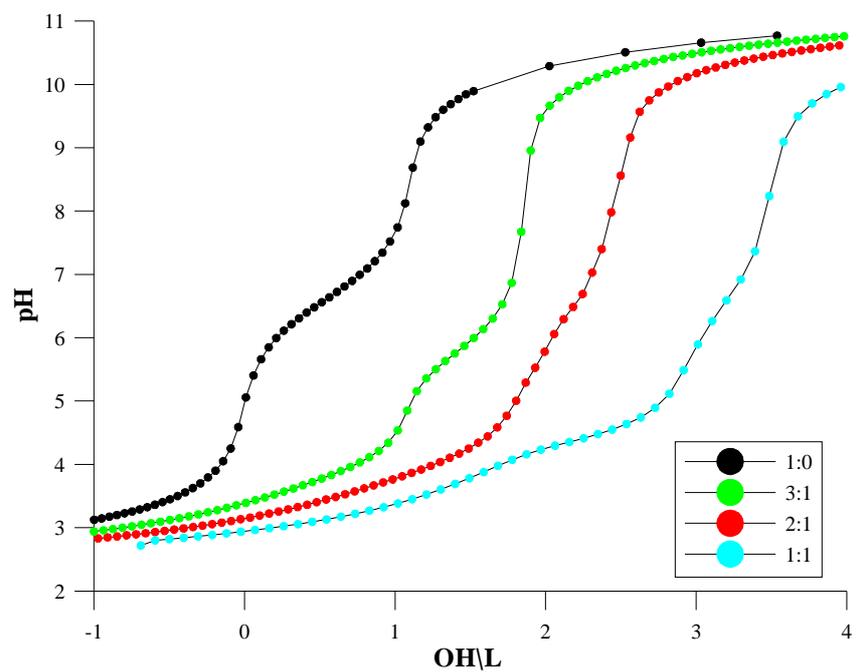
3.3.2 Misure potenziometriche



Titolazioni potenziometriche del catecolo-Fe(III). $[L]=3.3 \cdot 10^{-3}M$.



Titolazioni potenziometriche del catecolo-Fe(III). $[L]=6.4 \cdot 10^{-4}M$.



Titolazioni potenziometriche del 4-nitro catecolo-Fe(III). $[L]=6.7 \cdot 10^{-4}M$.

3.3.3 Modelli di complessazione

L'elaborazione dei dati potenziometrici e spettrofotometrici ha permesso di elaborare per i sistemi catecolo-Fe(III) e 4-nitrocatecolo-Fe(III) i modelli riportati in Tabella 6.

Modello $M_qL_1H_p$	25°C, KCl 0,1M	
	Catecolo	4-nitrocatecolo
$[Fe_2L_2H]^{3+}$	47.27	-
$[FeL]^+$	19.97	16.95
$[FeL_2]^-$	34.70	29.78
$[FeL_3]^{-3}$	44.67	39.19
$[Fe(OH)]^{+2}$	-2.75	
$[Fe(OH)_2]^+$	-6.99	

Tabella 6 Modello $M_qL_1H_p$ per il sistema Legante- Ferro

Nel caso del catecolo-Fe(III) a pH molto acidi si nota un complesso già formato la cui stechiometria può essere proposta dai dati potenziometrici come L_2Fe_2H .

A pH maggiori di 3 si forma un complesso di stechiometria 1:1 che evolve nel complesso 2:1 a valori di pH > 6. A pH basici esiste unicamente un complesso di stechiometria 3:1.

Il 4-nitrocatecolo forma complessi di stechiometria 1:1, 2:1, 3:1 come il catecolo ma a valori di pH inferiori. Le curve di distribuzione per i due leganti sono riportate nelle figure 24 e 25.

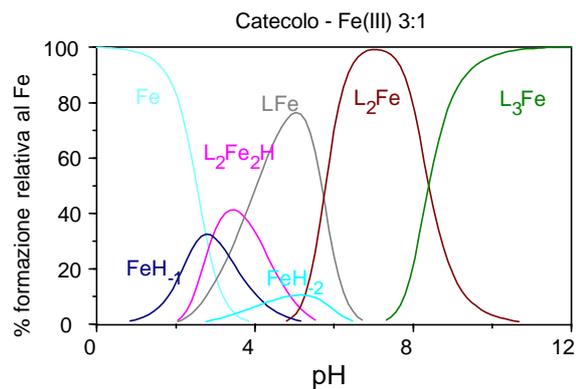


Figura 24. Curve di distribuzione del catecolo col Ferro.

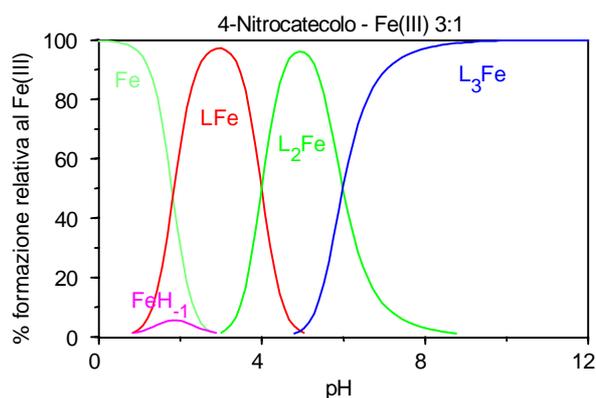


Figura 25. Curve di distribuzione del 4-nitrocatecolo col Ferro.

3.3.4 Quantomeccanica molecolare

Attraverso i calcoli di meccanica molecolare è stata prevista la geometria di coordinazione più stabile per i diversi complessi. In Figura 26 sono riportate le geometrie calcolate per i complessi 1:1, 2:1 e 3:1.

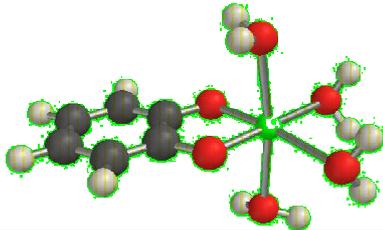
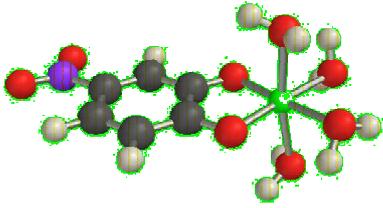
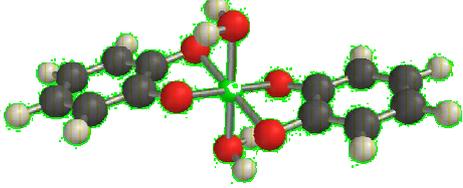
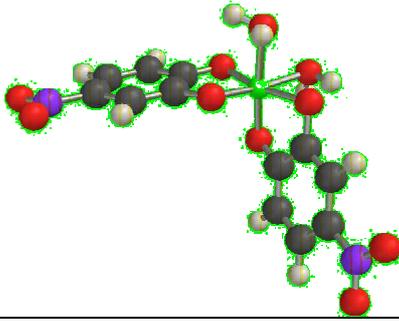
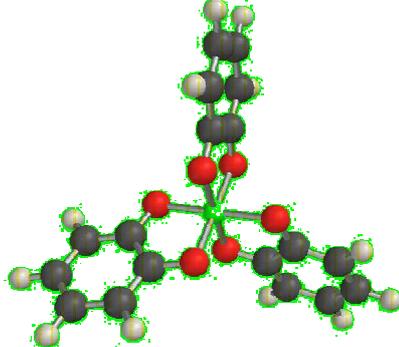
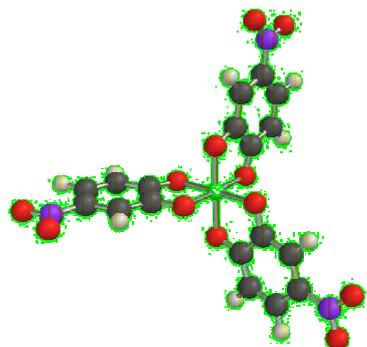
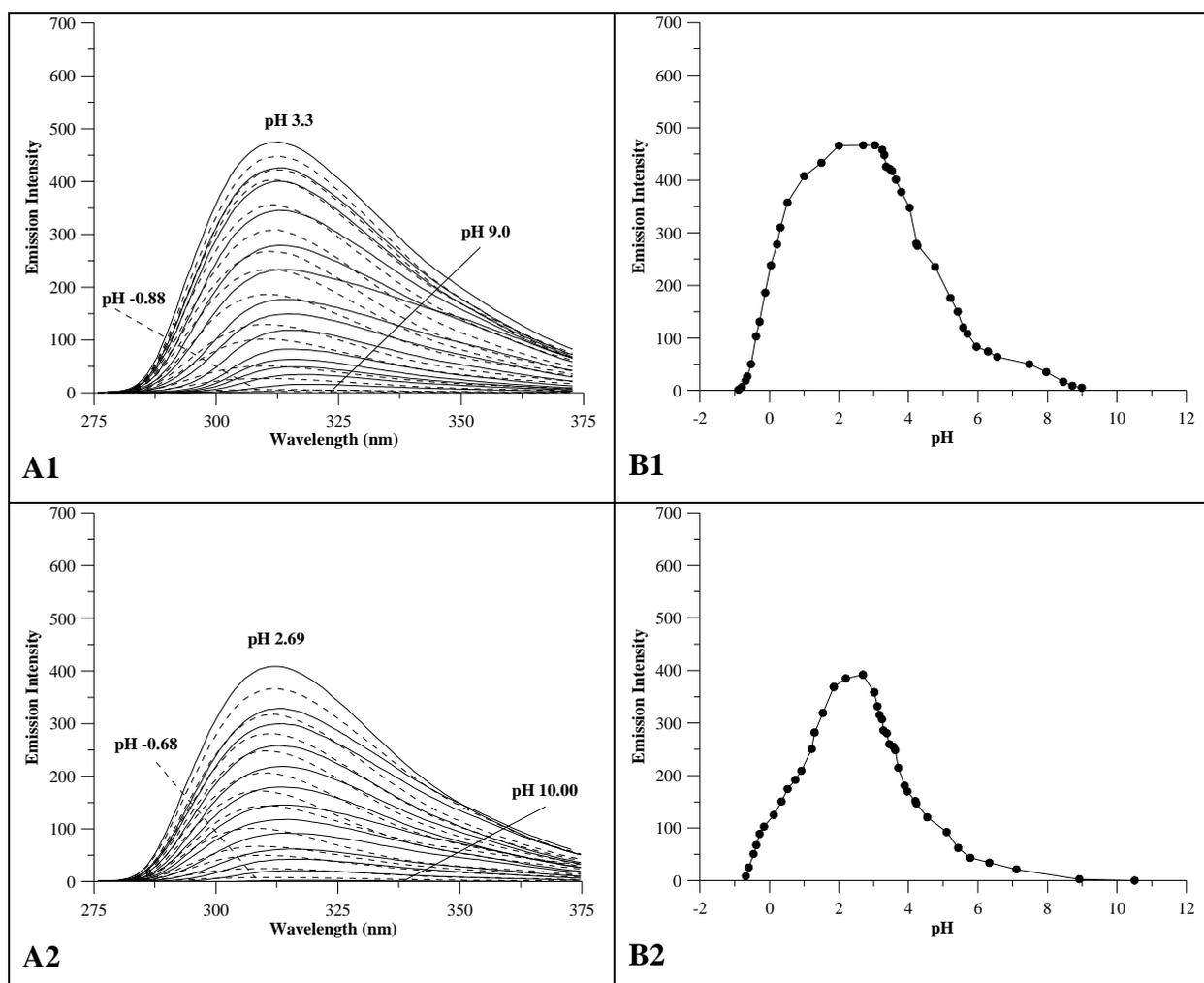
Complesso	Geometrie	
	<i>Catecolo</i>	<i>4-Nitrocatecolo</i>
$[\text{FeL}]^+$		
$[\text{FeL}_2]^-$		
$[\text{FeL}_3]^{-3}$		

Figura 26: . Geometrie di coordinazione calcolate col programma SPARTAN per i complessi formati da Catecolo e 4-nitrocatecolo col Fe(III).

3.3.5 Misure Fluorimetriche

Sono state effettuate le titolazioni fluorimetriche del catecolo in presenza di Fe(III) nelle medesime condizioni sperimentali scelte per la titolazione fluorimetrica del solo legante. Confrontando gli spettri riportati in Figura 27 con la titolazione fluorimetrica del legante (Figura 13a), si nota che è presente una forma spettrale pressoché identica a quella del solo legante ma il massimo di intensità è inferiore. L'intensità diminuisce col pH, per qualunque rapporto molare legante-metallo. Il massimo di assorbimento si ha a $\text{pH} \cong 3$, a valori di pH inferiori l'intensità diminuisce nuovamente fino a $\text{pH} \cong 1$.

Il massimo d'intensità decresce nell'ordine 3:1 > 2:1 > 1:1, all'aumentare della concentrazione del metallo. I due fenomeni indicano dunque che solo il legante fluoresce mentre non si ha emissione da parte del complesso. In figura 27 sono riportate gli spettri di fluorescenza a 313 nm delle titolazioni del catecolo con il Fe(III) nei rapporti molari 3:1, 2:1 e 1:1 rispettivamente.



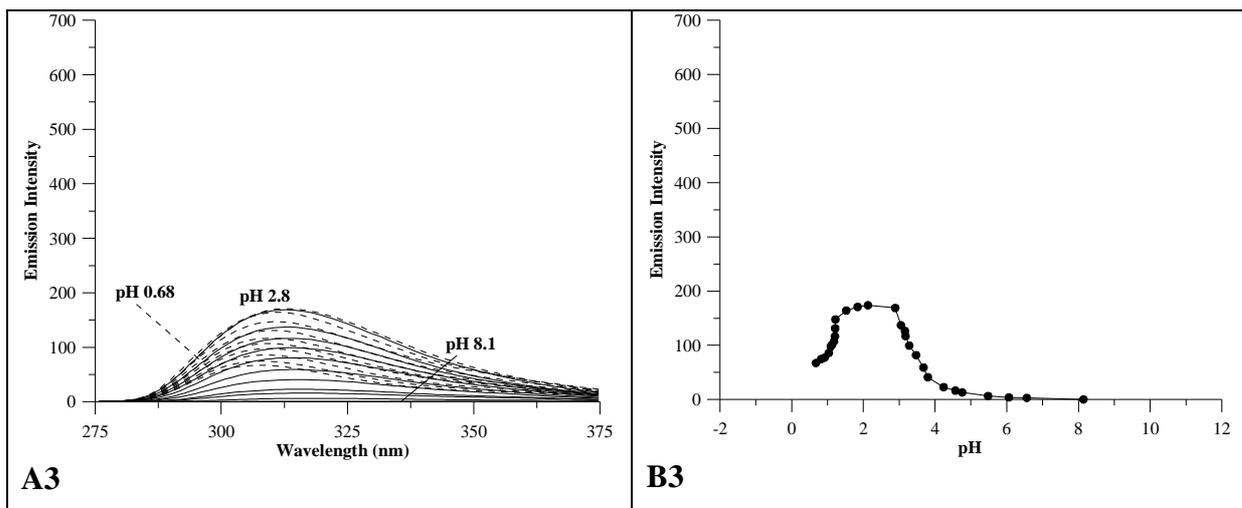


Figura 27: A Titolazioni fluorimetriche del Catecolo con il Fe(III) nei rapporti molari **A1**)3:1, **A2**) 2:1 e **A3**) 1:1. La linea continua rappresenta la titolazione da pH 3 a pH 10, quella tratteggiata da pH 3 a pH 0.6. **B** Profilo delle intensità di emissione in funzione del pH per i rapporti molari **B1**) 3:1 **B2**) 2:1 **B3**) 1:1

Nel passare dal rapporto molare 3:1 → 2:1 → 1:1 la concentrazione del legante libero diminuisce e di conseguenza si abbassa l'intensità dell'emissione. Riportando in un grafico l'altezza della banda contro il pH, si ottiene il profilo fluorescenza-pH (figura 28). Sovrapponendo il profilo fluorescenza-pH alle curve di distribuzione si vede come la variazione della fluorescenza segua perfettamente il profilo di concentrazione del legante libero H_2L . Come esempio è riportato il caso del rapporto molare 3:1.

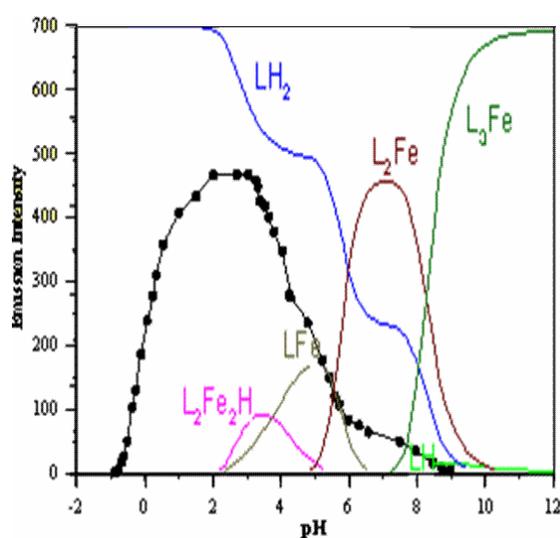


Figura 28: sovrapposizione del profilo di fluorescenza nel caso 3:1 con le curve di distribuzione (le altezze sono arbitrarie)

3.4 Complessi dell'Alluminio(III)

I complessi formati dall'alluminio(III) col catecolo sono stati studiati sia potenziometricamente che mediante misure fluorimetriche, mentre i complessi formati dall'alluminio(III) col 4-nitrocatecolo sono stati studiati con misure potenziometriche, spettrofotometriche e NMR.

3.4.1. Misure spettrofotometriche

Gli spettri sono stati registrati solo per il sistema 4-nitrocatecolo-Al(III) in quanto il sistema catecolo Al(III) non presenta variazioni spettrali.

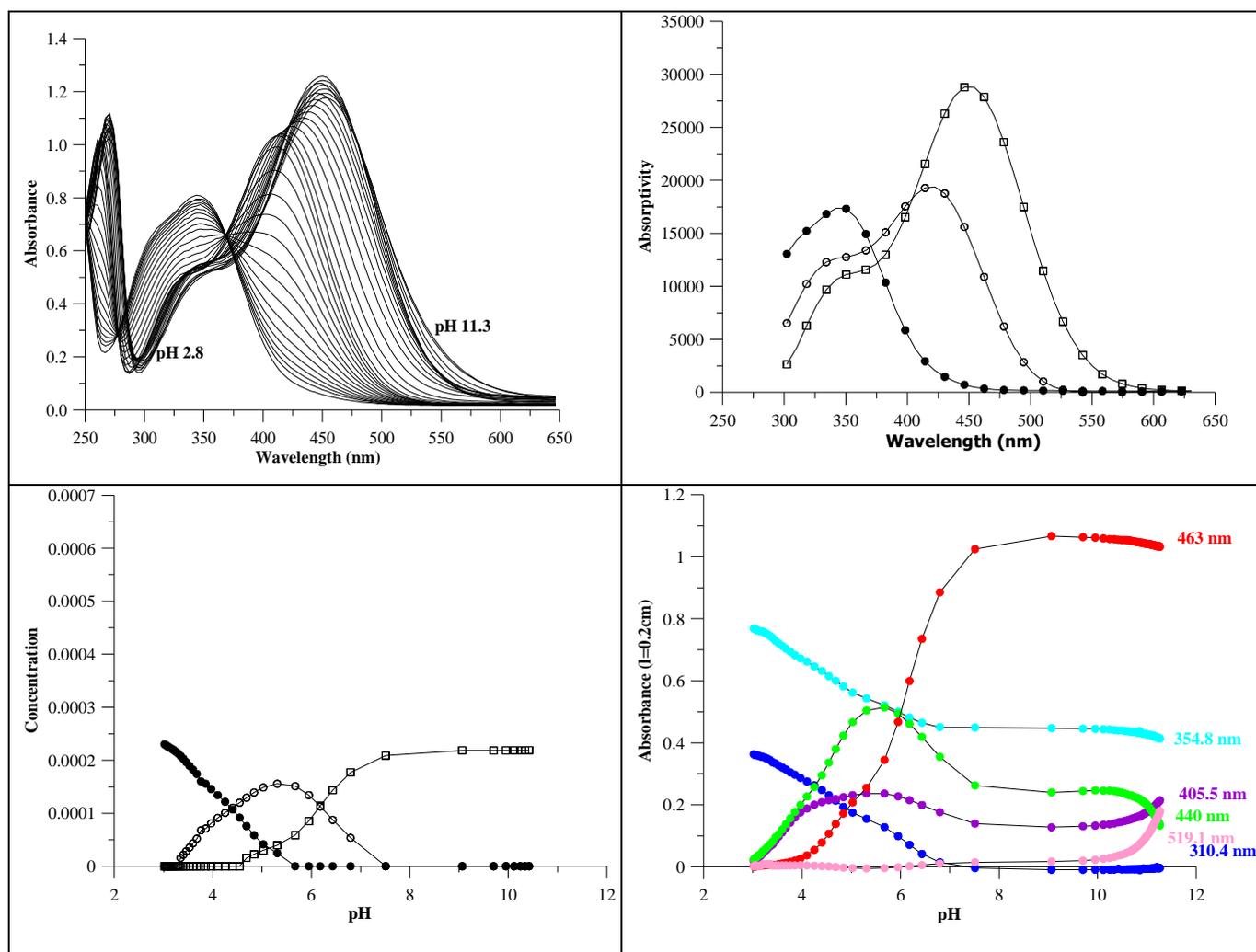


Figura 29: 4-nitro catecolo Al(III) nel rapporto molare 3:1

A pH 2 l'alluminio non viene complessato dal 4-nitrocatecolo; il primo complesso si forma a partire da pH 3, dove si osserva un' aumento dell'intensità della banda a 340 nm. A pH >5 si forma il complesso 2:1 che presenta un massimo a 410 nm. Da pH 8 inizia a formarsi il complesso 3:1 con una banda centrata a 450 nm. Nelle figure 29, 30 e 31 sono riportati gli spettri delle titolazioni del 4-nitrocatecolo-Al(III) in tutti i rapporti molari con il profilo di concentrazione in funzione del pH e gli spettri calcolati per le specie.

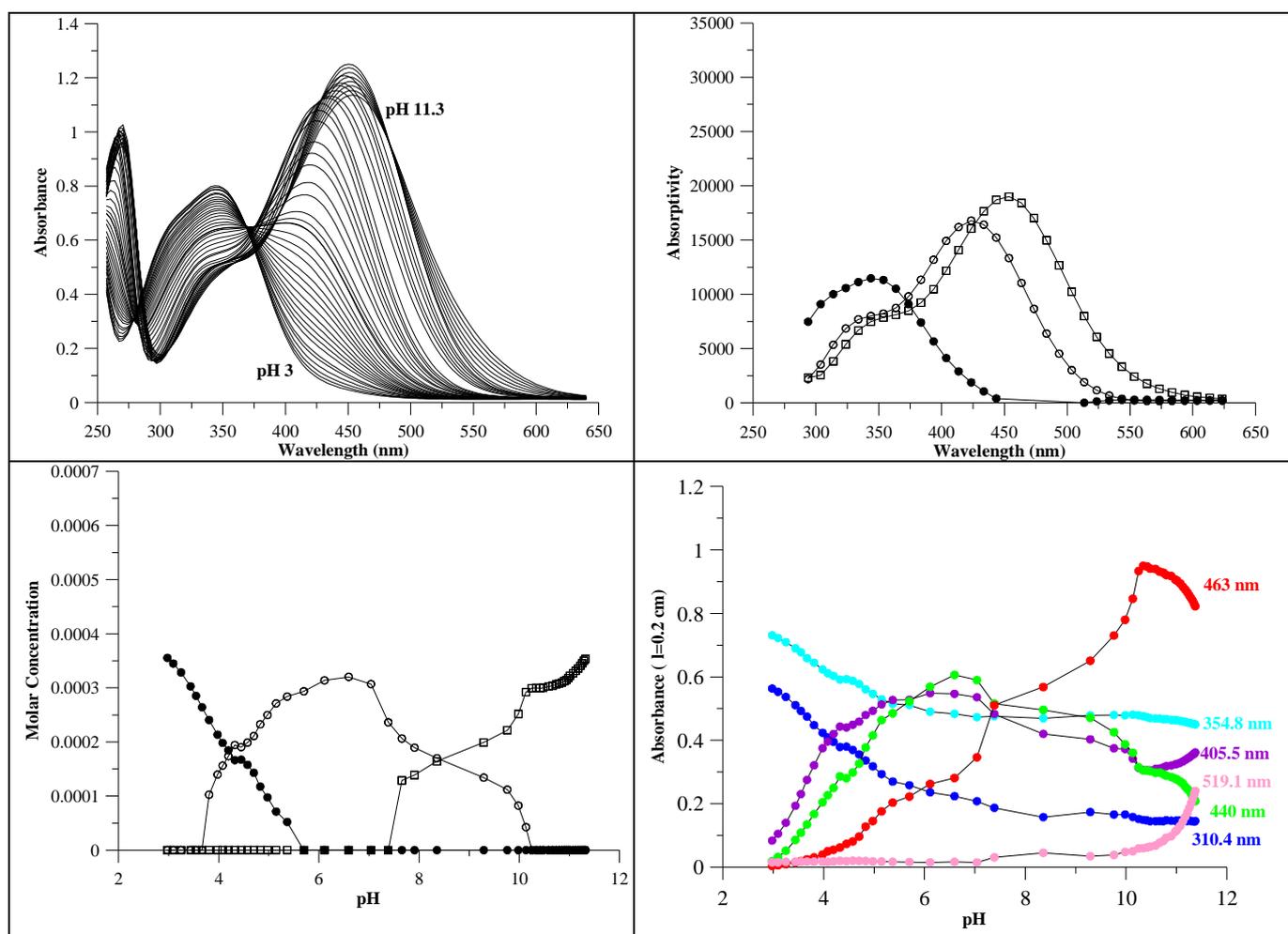


Figura 30: 4-nitro catecolo Al(III) nel rapporto molare 2:1

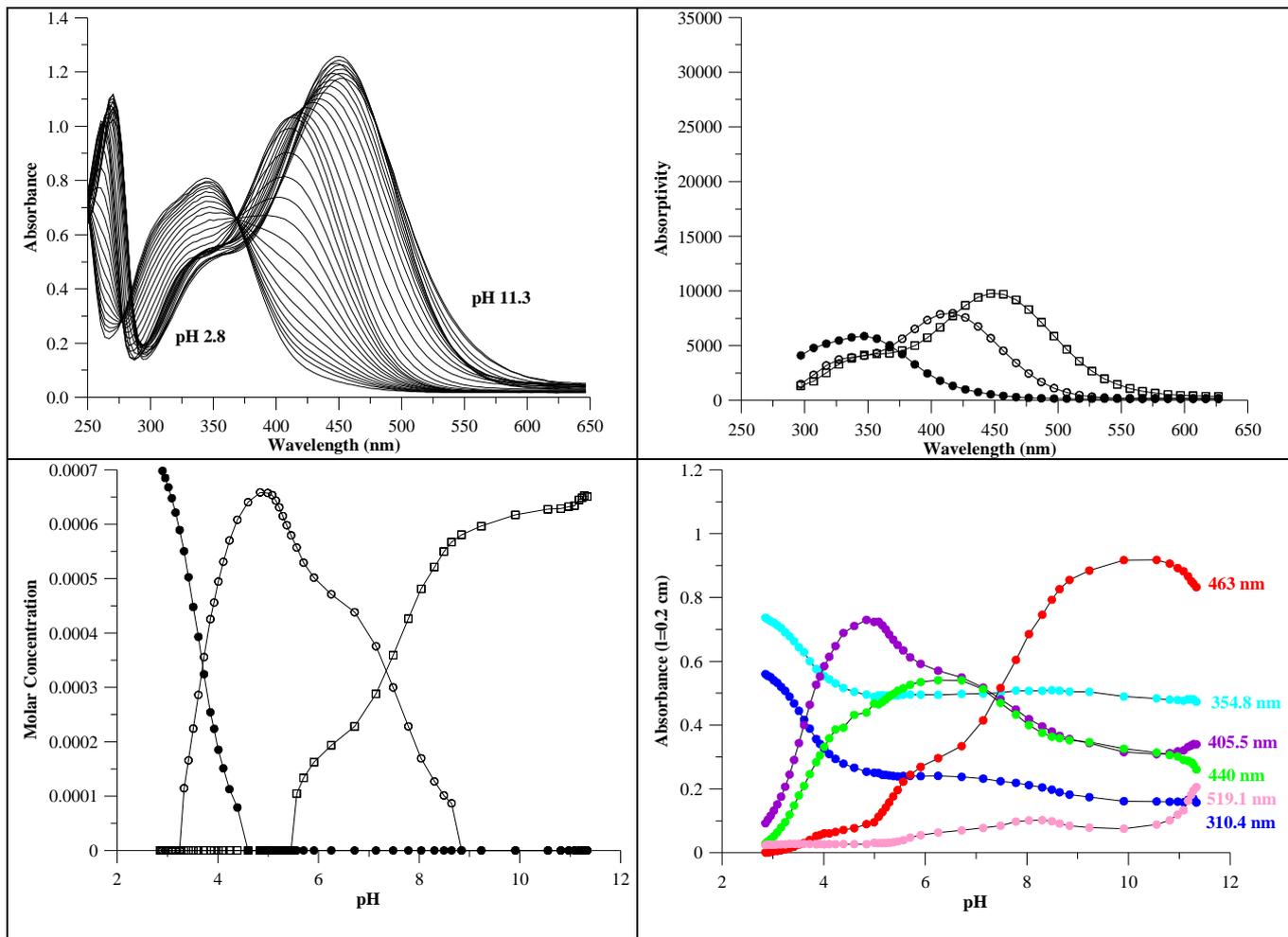
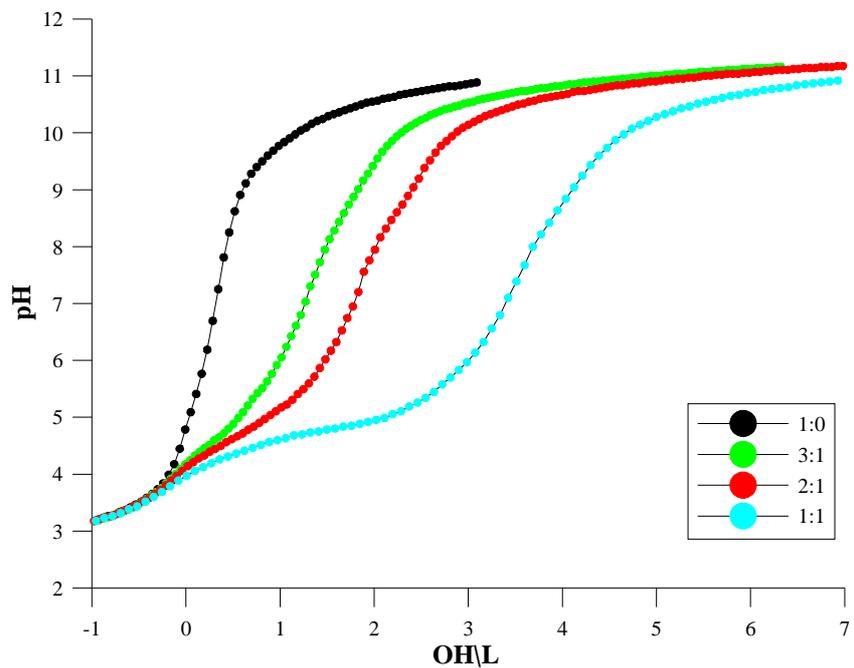
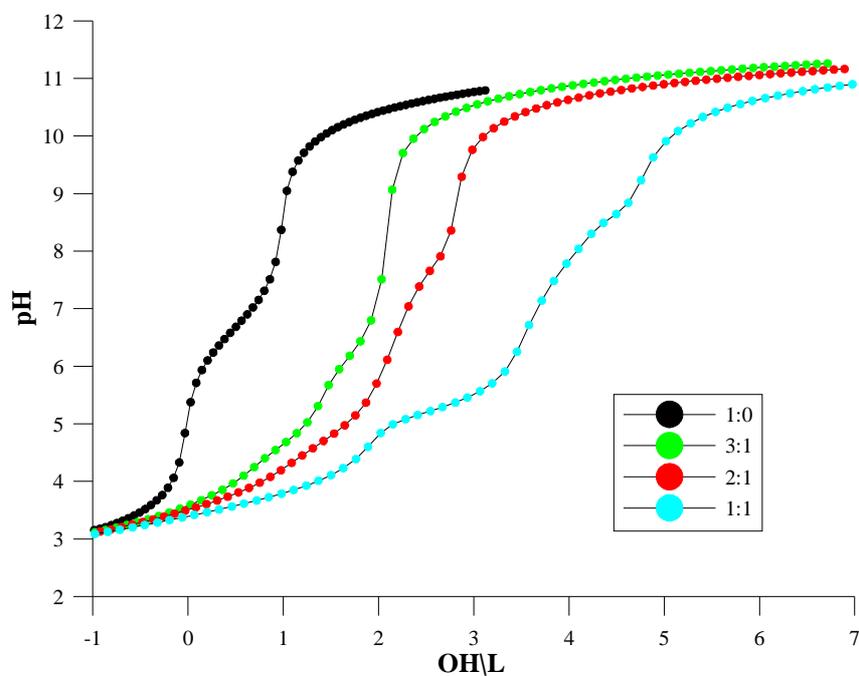


Figura 31: 4-nitro catecolo Al(III) nel rapporto molare 1:1

3.4.2 Misure potenziometriche



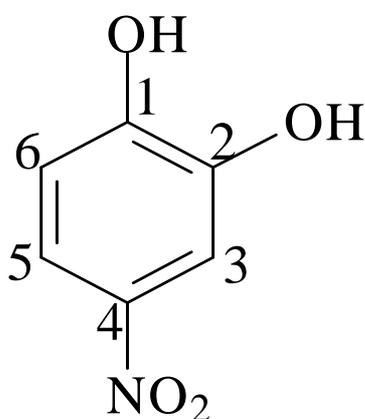
Titolazione potenziometriche del catecolo-Al(III). $[L]=6.7 \cdot 10^{-4} M$.



Titolazione potenziometriche del 4-nitro catecolo-Al(III). $[L]=6.7 \cdot 10^{-4} M$.

3.4.3 Misure NMR

Per i complessi formati dal 4-nitrocatecolo con l'alluminio(III) sono stati registrati gli spettri NMR a pH 3, 4, 5, 6. In Figura 32 è riportato lo spettro del solo legante a pH 3, dove si osservano 3 segnali: il primo segnale è un doppietto che cade tra 6.8 e 7.0 ppm ed è attribuito al protone dell'atomo di carbonio 6 che accoppia con il protone dell'atomo di carbonio 5; il secondo segnale cade a 7.6 ppm, dovuto al protone dell'atomo di carbonio 3, ed è un segnale singolo in quanto non si ha accoppiamento; infine il terzo segnale è un doppietto e cade intorno a 7.8 ppm, attribuibile al protone sull'atomo di carbonio 5 che accoppia con quello presente sull'atomo di carbonio 6 e ciò è confermato anche dalle costanti di accoppiamento $J(6,5)=J(5,6) = 8.7$ Hz,



Numerazione degli atomi del 4-nitrocatecolo

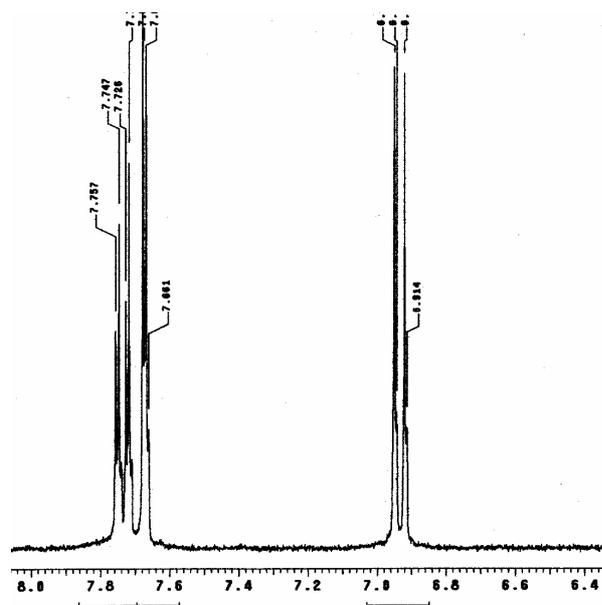


Figura 32. Spettro ¹H-NMR del 4-nitrocatecolo a pH 3

Confrontando lo spettro del legante libero con quello del complesso 4-nitrocatecolo-Al(III) 4:1 allo stesso valore di pH (pH 3), riportato in Figura 33, si osserva la comparsa di due nuovi segnali relativi al complesso 1:1 a 6.9 e 7.4 ppm.

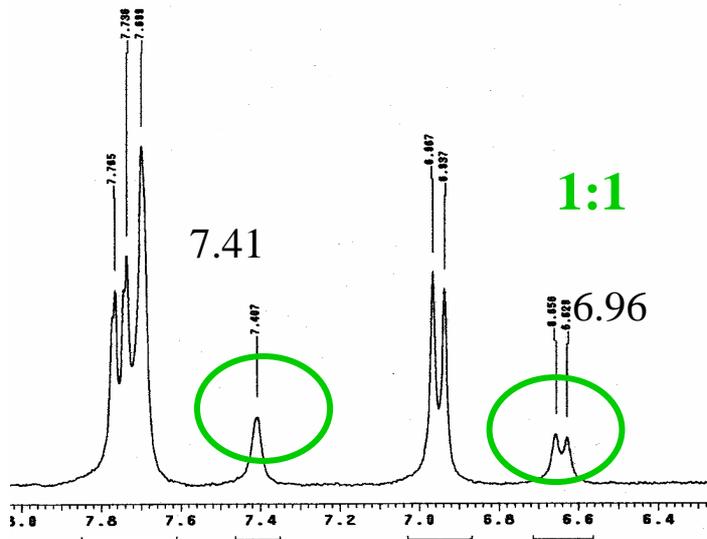


Figura 33. Spettro NMR 4-nitrocatecolo-Al(III) 4:1 a pH 3

Nello spettro della soluzione contenente il legante e il metallo in rapporto molare 2:1 a pH 5, riportato in Figura 34, si osserva l'aumento di intensità dei segnali relativi al complesso 1:1 e la comparsa di due segnali aggiuntivi a 7.26 e 6.56 ppm, attribuibili al complesso legante-metallo 2:1.

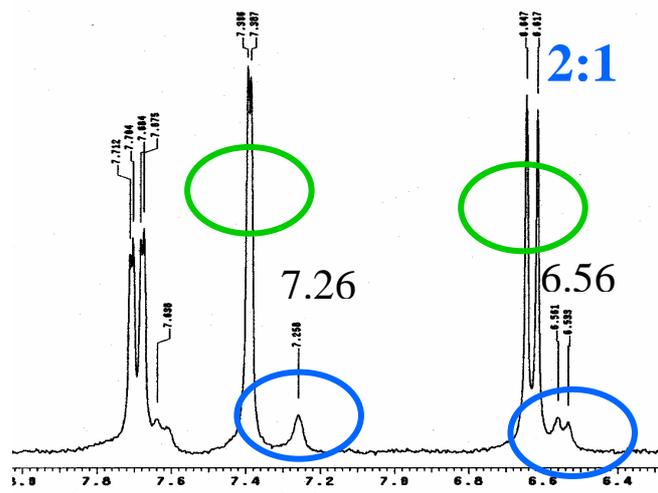


Figura 34. Spettro NMR 4-nitrocatecolo-Al(III) 2:1 a pH 5

Nel rapporto molare 1:1 registrato a $\text{pH} > 6$ sono presenti solo i due segnali del complesso 3:1, sono scomparsi i segnali relativi al 2:1 e al 1:1 (vedi Figura 35).

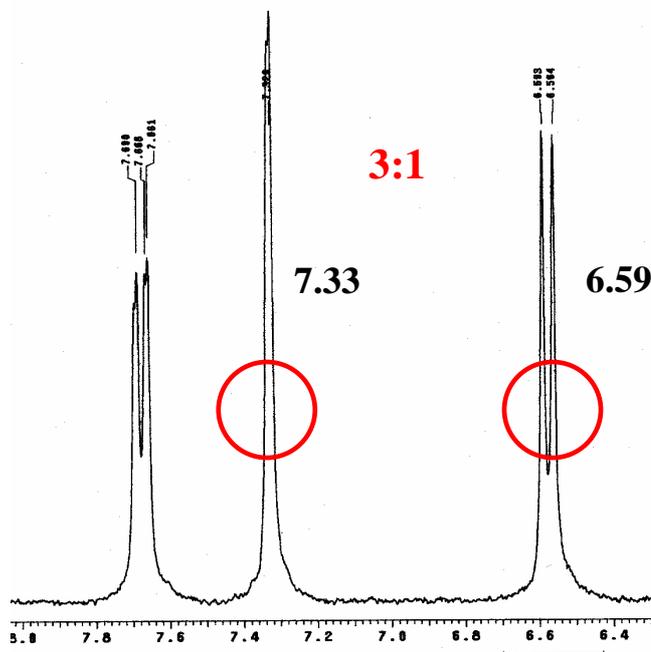


Figura 35. Spettro NMR del complesso 4-nitrocatecolo-Al(III) 1:1 a $\text{pH} 6.5$.

Per alcuni valori di pH non è stato possibile registrare gli spettri, a causa della presenza di un precipitato. Nei vari spettri si nota la formazione dei complessi 4-nitrocatecolo-Al a differenti stechiometrie a seconda del pH .

Grazie ai risultati ottenuti mediante gli spettri NMR, è stato possibile confermare i modelli ottenuti elaborando i dati potenziometrici: infatti a $\text{pH} \cong 3$ è presente il segnale relativo al rapporto molare 1:1 e i segnali del legante libero, presente in largo eccesso; all'aumentare del pH fino a $\text{pH} 5$ si ha la comparsa dei segnali relativi al rapporto molare legante-metallo 2:1, è presente contemporaneamente una certa quantità di 1:1, mentre diminuisce l'intensità del segnale del legante libero, infine per pH superiori a 6 è predominante la specie 3:1.

3.4.4 Misure fluorimetriche

Anche nel caso del sistema Catecolo-Al(III) i complessi formati non fluorescono, per cui è possibile seguire la variazione della concentrazione del legante libero.

A pH 3.6 l'altezza del picco di emissione è uguale a quella del solo legante alla stessa concentrazione. Ciò significa che a tale valore di pH non si è formato alcun complesso.

All'aumentare del pH l'emissione diminuisce con la formazione dei diversi complessi. (Figura 36).

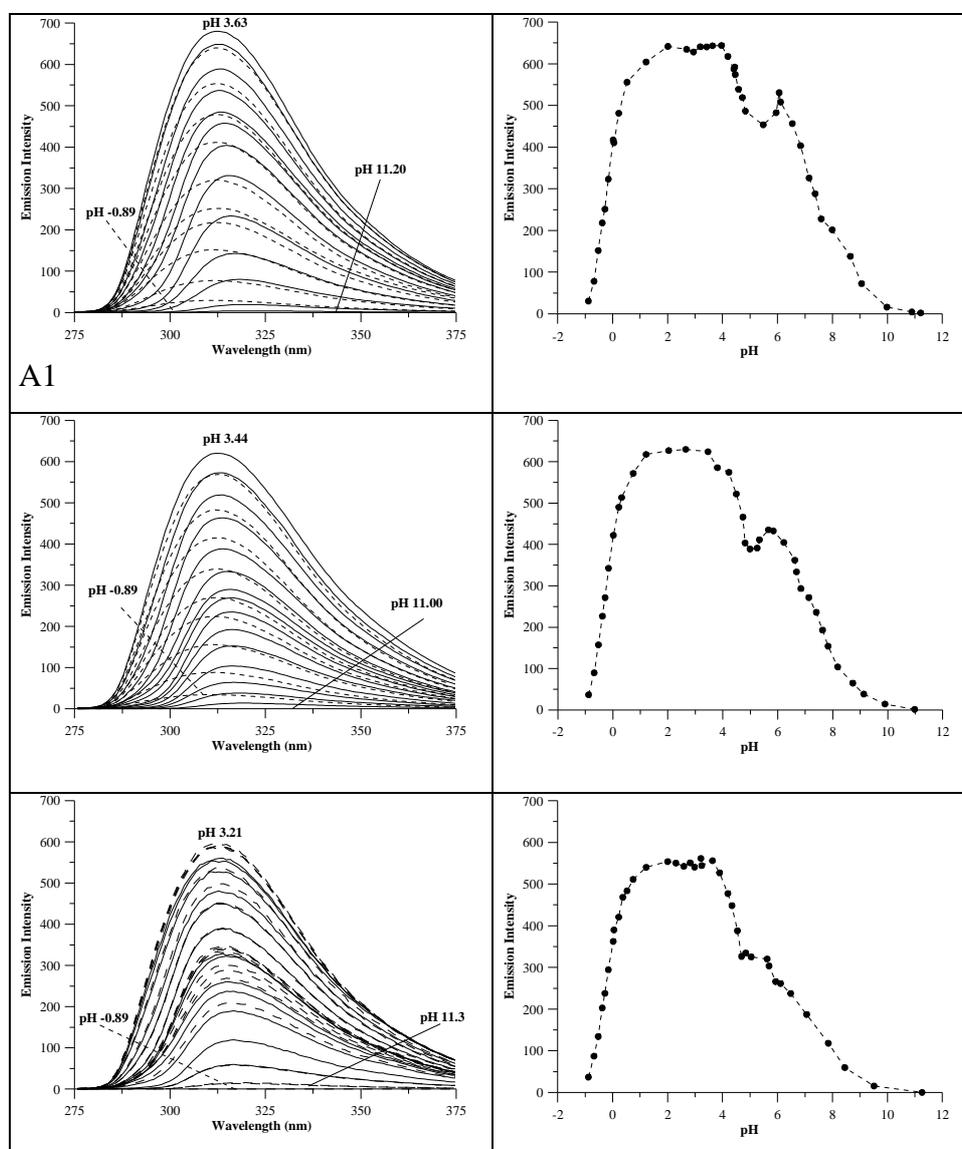


Figura 36: A Titolazioni fluorimetriche del Catecolo con l'Al(III) nei rapporti molari **A1**) 3:1, **A2**) 2:1 e **A3**) 1:1. La linea continua rappresenta la titolazione da pH 3 a pH 10, quella tratteggiata da pH 3 a pH 0.6. **B** Profilo delle intensità di emissione in funzione del pH per i rapporti molari **B1**) 3:1 **B2**) 2:1 **B3**) 1:1

Anche in questo caso è possibile sovrapporre il profilo fluorescenza-pH con le curve di distribuzione. Come esempio è riportato il caso 3:1 (vedi Figura 37).

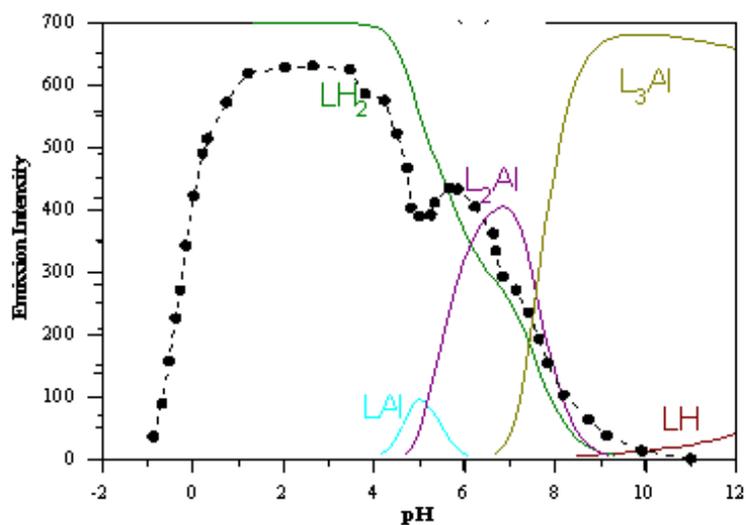


Figura 37 : Sovrapposizione del profilo di fluorescenza nel caso 3:1 con le curve di distribuzione (le altezze sono arbitrarie).

3.4.5 Modelli di complessazione

I risultati sperimentali ottenuti dagli studi potenziometrici, spettrofotometrici, NMR e fluorimetrici condotti sui complessi formati da catecolo e 4-nitrocatecolo con l'alluminio sono stati elaborati con il modello riportato nella Tabella 7.

Modello $M_qL_1H_p$	25°C, KCl 0,1M		
	Catecolo	4-nitrocatecolo	
$[AlL]^+$	16.3	13.30	
$[AlL_2]^-$	31.68	24.82	
$[AlL_3]^{-2}$	42.88	33.70	
$[Al_2(OH)_2]^{4+}$	-7.7		
$[Al(OH)]^{2+}$			-5.41
$Al(OH)_3$			-15.18
$[Al(OH)_4]^-$			-24.37
$[Al_3(OH)_4]^{5+}$			-13.69

Tabella 7.: Modello $M_qL_1H_p$ per l'Alluminio.

Si formano con entrambi i leganti complessi di uguale stechiometria 1:1, 2:1 e 3:1. Le curve di distribuzione sono riportate in Figura 38. Come precedentemente visto per il ferro, anche i complessi 4-nitrocatecolo-Al(III) si formano a pH inferiori rispetto a quelli del catecolo.

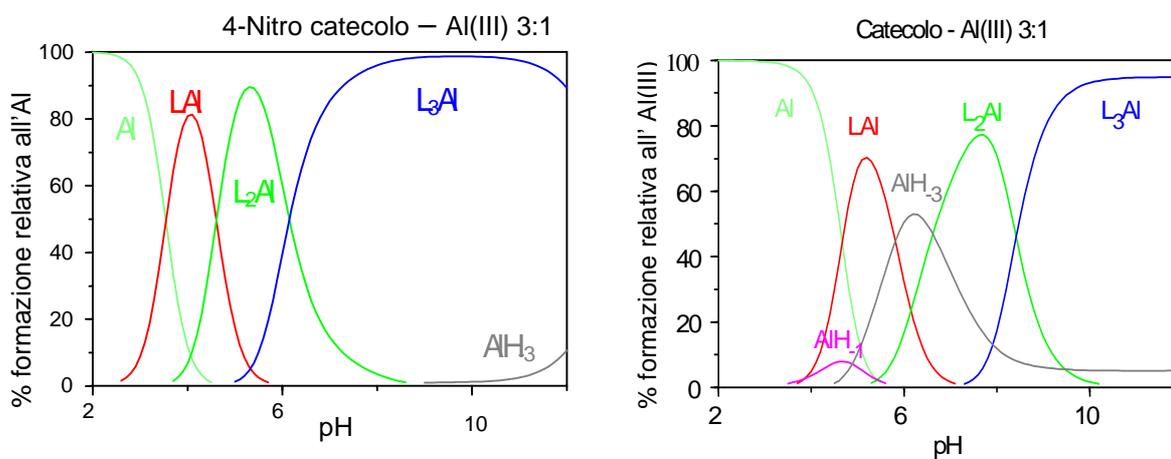


Figura 38. Curve di distribuzione per l'Al(III)

3.4.6 Quantomeccanica molecolare

Le geometrie più probabili per i diversi complessi sono state ottenute da calcoli di quantomeccanica molecolare e sono riportate in Figura 39.

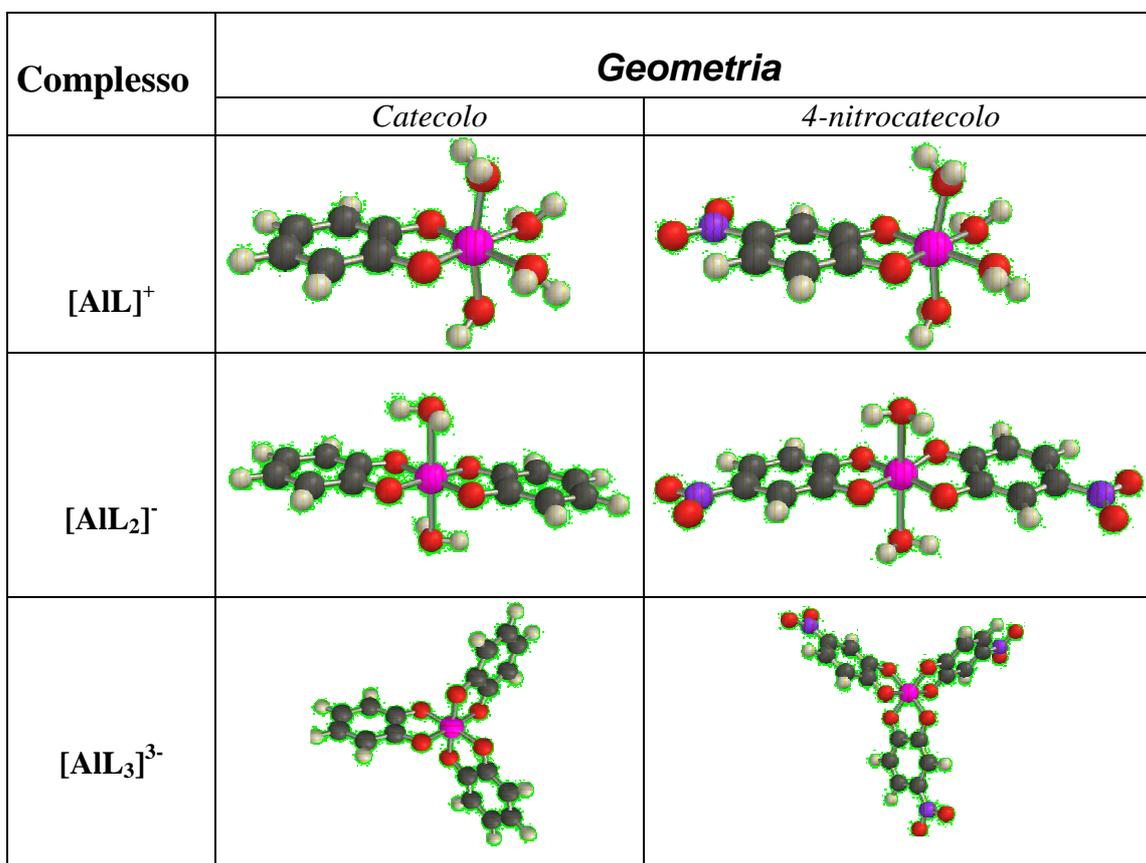


Figura 39: Geometria di coordinazione per i complessi formati da catecolo e 4-nitrocatecolo con l'Al(III)

3.5 Efficacia dei leganti

Confrontando i valori numerici delle costanti di formazione dei complessi catecolo-metallo e 4-nitrocatecolo-metallo, si potrebbe attribuire la maggiore stabilità ai complessi formati col catecolo. L'introduzione del nitro gruppo nell'anello, infatti, abbassa le costanti di formazione dei complessi, ma in realtà abbassa anche le costanti di protonazione.

Per valutare correttamente la stabilità dei complessi è opportuno dunque confrontare le curve di distribuzione per entrambi i leganti e i diagrammi di distribuzione ternari Catecolo-4nitrocatecolo-metallo, ottenuti dai singoli modelli binari Catecolo-metallo e 4-nitrocatecolo-metallo, riportati in Figura 40. A basse concentrazioni di legante si formano esclusivamente i complessi del 4-nitrocatecolo (Figura 40a) e per poter seguire la formazione anche dei complessi del catecolo si deve arrivare a concentrazioni dei due leganti e di ferro di $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$; tuttavia, i complessi del catecolo si formano in concentrazioni apprezzabili solo a pH superiori a 7 (figura 40b). Lo stesso comportamento si verifica nel caso dell'alluminio (vedi Figura 41).

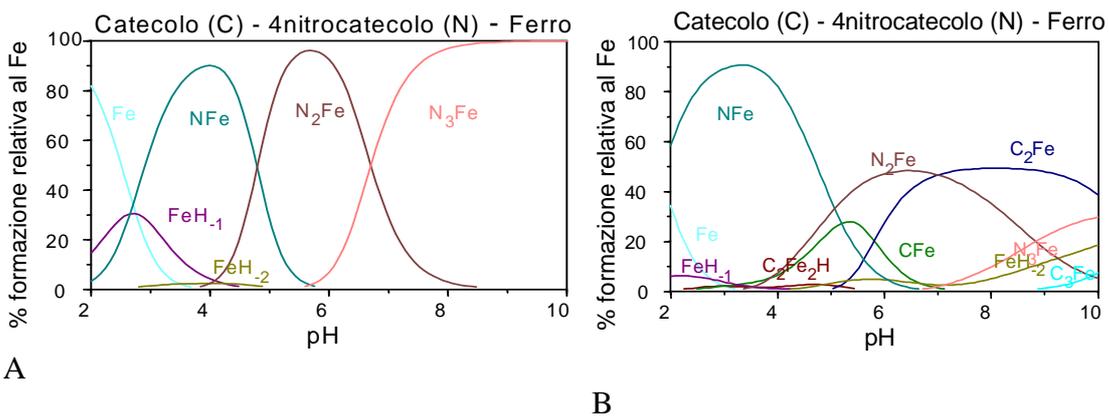


Figura 40. Diagrammi ternari per il Fe(III):
A [catecolo]=[4nitrocatecolo]= $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$, [Fe(III)]= $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$,
B [catecolo]=[4-nitrocatecolo]=[Fe(III)]= $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$

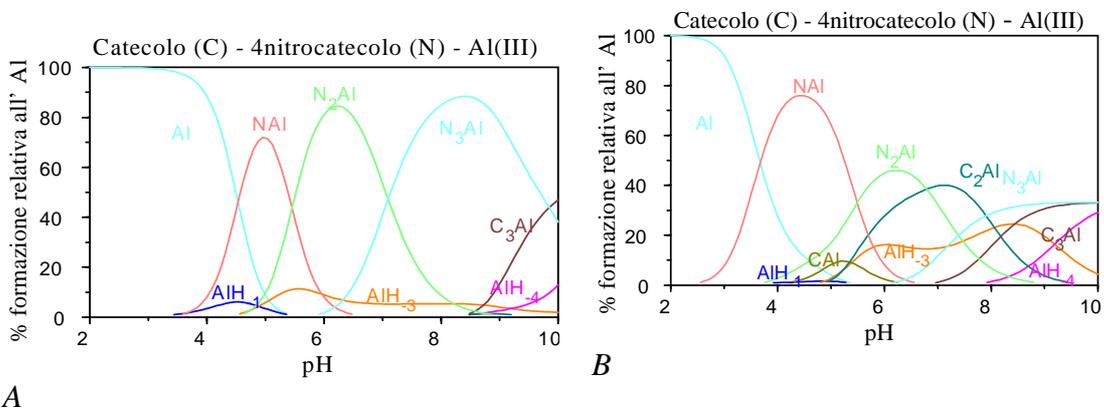


Figura 41. Diagrammi ternari per l'Al (III):
A [catecolo]=[4-nitrocatecolo]= $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$, [Al(III)]= $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$
B [catecolo]=[4-nitrocatecolo]=[Al(III)]= $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$

Per definire oggettivamente le capacità leganti del catecolo e del 4-nitrocatecolo è opportuno confrontare la concentrazione del metallo libero in presenza del legante al pH fisiologico del sangue (pH 7.4).

Nella Tabella 8 sono riportate le concentrazioni libere del metallo, espresse come pMe^{14} , logaritmo negativo della molarità, per una concentrazione di legante pari a $1 \cdot 10^{-5}M$ e metallo $1 \cdot 10^{-6}M$; sono inoltre riportati i pMe per il Desferal e per il Deferiprone, attualmente utilizzati nella terapia chelante.

Legante	pFe	pAl
Catecolo	14.2	10.4
4-Nitrocatecolo	19.6	14.7
Desferal	26.6	19.4
Deferiprone	19.3 ¹⁵	16.4 ¹⁶

Tabella 8. Valori di pMe per i leganti.

Confrontando i pFe tra catecolo e 4-Nitrocatecolo, è evidente come la concentrazione del ferro libero è inferiore in presenza del secondo legante.

Il pFe del 4-Nitrocatecolo è inferiore a quello del Desferal ma è paragonabile a quello del Deferiprone, mostrando quindi capacità leganti molto simili.

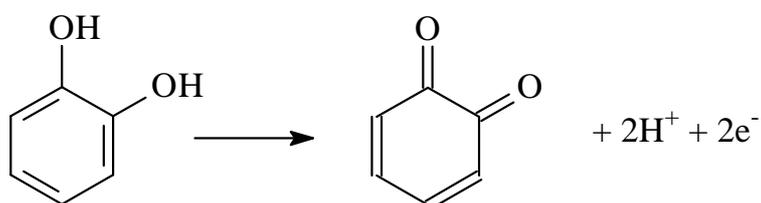
Il 4-Nitrocatecolo si rivela un legante migliore del catecolo anche nei confronti dell'alluminio, ma il pAl è nettamente inferiore a quelli del Desferal e del Deferiprone.

Il 4-Nitrocatecolo, grazie al suo valore di pFe , si presta come base nel design di nuovi chelanti. A causa del basso peso molecolare e delle ridotte dimensioni della molecola l'utilizzo del legante tal quale può non essere possibile, ma può essere utile progettare delle molecole simili all'enterobactina contenenti degli anelli nitrocatecolici.

E' attualmente in uso un medicinale chiamato nitecapone utilizzato nelle patologie di tipo cardiaco che contiene un anello nitrocatecolico.

3.6 Misure Voltammetriche

La reazione redox del catecolo riportata nello Schema 1 è stata studiata con la voltammetria ciclica ed i voltammogrammi registrati a pH 2, 5 e 12 sono riportati in Figura 42.



Schema 1: Reazione di ossidazione del Catecolo.

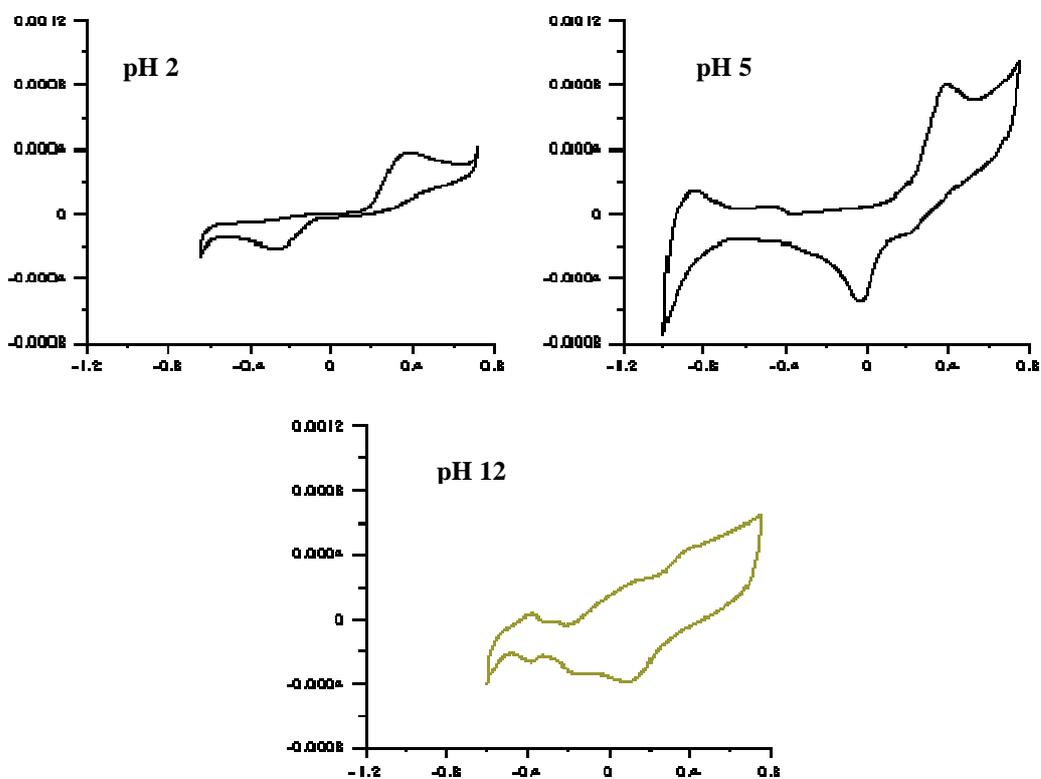


Figura 42. Misure voltammetriche del Catecolo ai pH 2, 5, 12.

A pH 2 i gruppi ossidrilici del catecolo sono protonati, mentre a pH 12 non lo sono più. Nel voltammogramma a pH 2 i picchi di ossidazione e di riduzione sono irreversibili, sono lontani e non presentano la medesima altezza. Spostandosi verso pH più alti la forma del grafico varia e la risoluzione diminuisce, sino a pH 12 in cui il segnale non dà più un'informazione significativa.

In Figura 43 è riportato il voltammogramma del Fe(III) a pH 2.

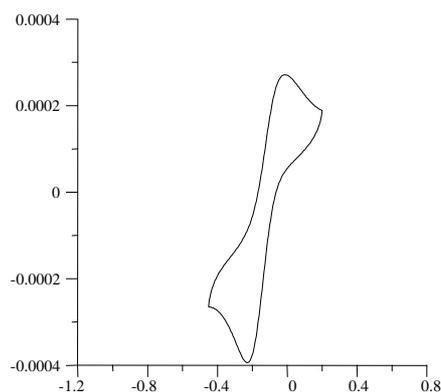
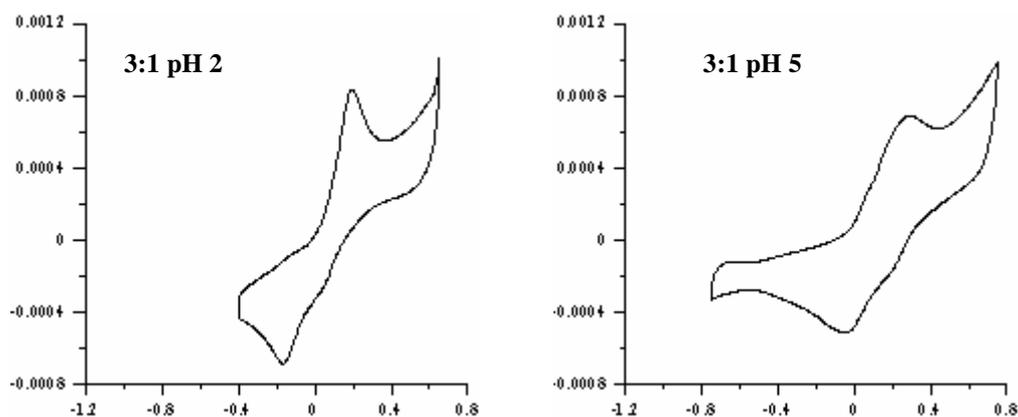


Figura 43 : Voltammogramma del Fe(III) a pH 2

In Figura 44 sono riportati i voltammogrammi del sistema Catecolo-Fe(III) nel rapporto molare 3:1 a diversi valori di pH.



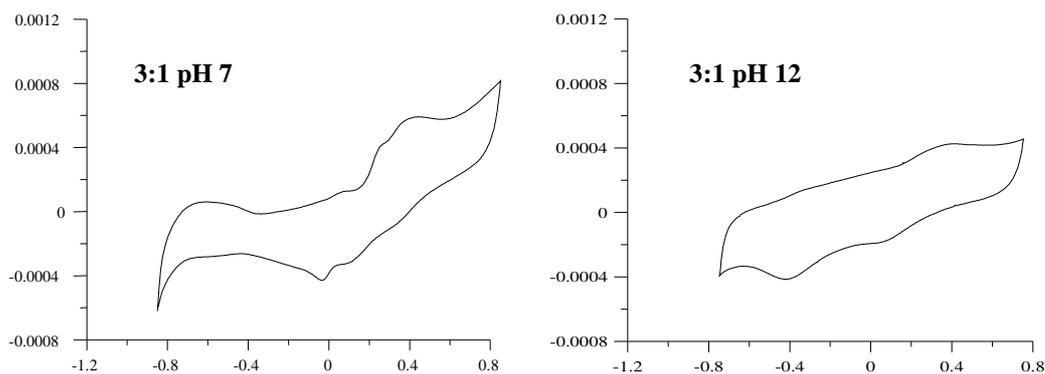
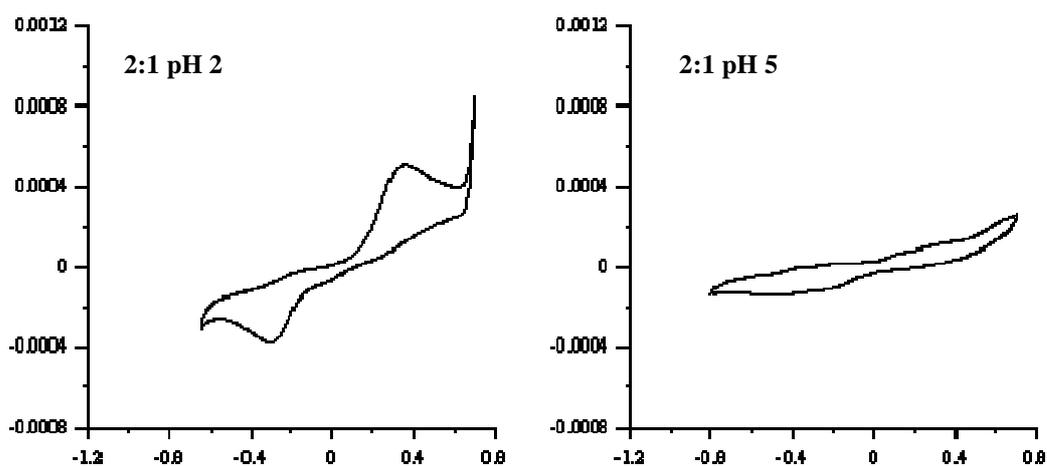


Figura 44: Voltammogrammi del complesso Catecolo-Fe(III) in rapporto 3:1 a pH 2, 5, 7, 10

Oltre al complesso Catecolo-Fe(III) in rapporto molare 3:1, è stato studiato anche il rapporto molare 2:1 agli stessi valori di pH. Osservando la Figura 45 in cui sono riportati i grafici si nota che i picchi di ossidazione e riduzione che a pH 2 sono ben distinti, già a pH 5 non sono più percepibili. A valori di pH superiori a 5, il segnale non ha più significato.

Sono tuttora in corso misure preliminari sul comportamento ossido-riduttivo del complesso 4-nitrocatecolo-Fe(III) e dei complessi formati da entrambi i leganti con l'alluminio(III).



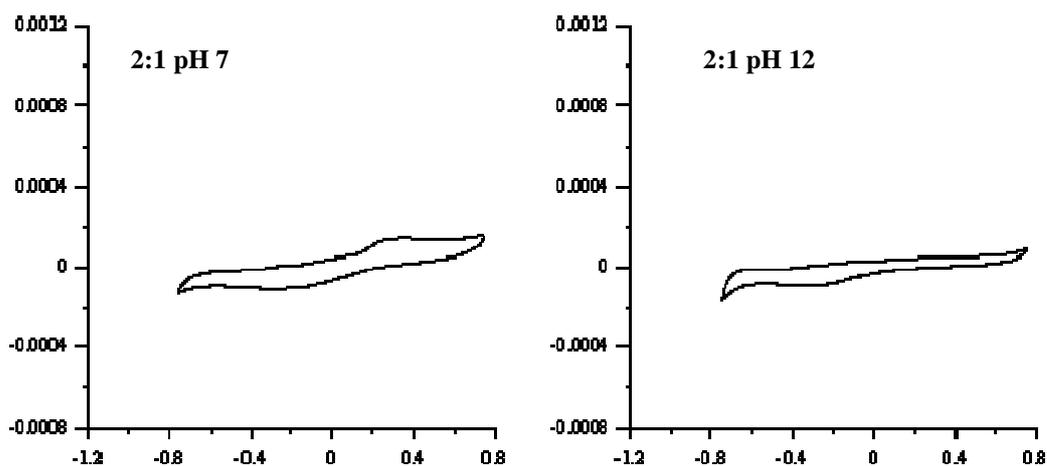


Figura 45: Voltammogrammi del complesso Catecolo-Fe(III) nel rapporto molare 2:1 a pH 2, 5, 7, 10

3.7 Riferimenti bibliografici

- ¹ Avdeef A. Sofen S.R. Bregante T.L., Raymond K.N., *J. Am. Chem. Soc.*, 5362, 1978
- ² Raymond K.N. Isied S.S., Brown L.D. Fronczek F.R., Nibert J.H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1767, 1976
- ³ Teruyuki Kawabata, Victor Schepkin, Nobuya Haramaki, Ratna S. Phadke, Lester Packer, *Biochem. Pharm.*, **51**, 1569, 1996
- ⁴ E.Mentasti, E. Pelizzetti, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2605, 1973
- ⁵ L. Stayer, "Biochemistry", W.H. Freeman, S. Francisco, Calif., 1975, pp. 796-797
- ⁶ G.C. Cotzias, M.H. Van Woert, L.M. Schiffer, *N. Engl. J. Med.*, **276**, 374 (1967)
- ⁷ J. Fermaglich, T.N. Chase, *Lancet*, **1**, 1261 (1973)
- ⁸ B.A. Stoll, *Lancet*, **1**, 431 (1973)
- ⁹ A.G. Mathew, H.A.B. Parpia, *Adv. Food Res.*, **19**, 137 (1971)
- ¹⁰ D. Nematollahi, S.N. Golabi, *J. Electroanal. Chem.*, **405**, 133 (1997)
- ¹¹ W. S. Piepoint, *Biochem. J.*, **98**, 567 (1966)
- ¹² R.A. Goyer, M.G. Cherian, *Toxicology of Metals–Biochemical Aspects*, Handb.Exp.Pharm. pag.284)
- ¹³ H⁰, *J. Am. Chem. Soc.* **54** (1932) 2721
- ¹⁴ W. R. Harris, K. N. Raymond, F. L. Weitl, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2667, (1981)
- ¹⁵ Motekaitis, Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **183** (1991) 71-80
- ¹⁶ Clarke, Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **196** (1992) 185-194

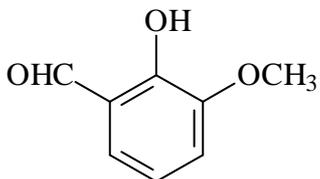
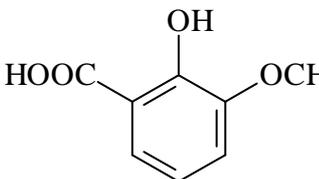
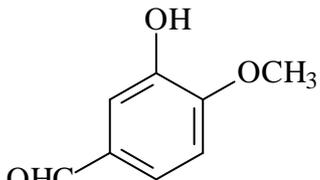
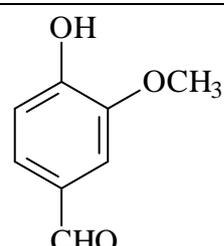
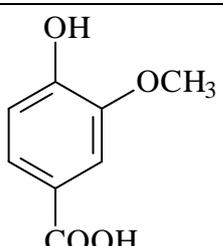
Capitolo 4

Equilibri di formazione dei complessi tra acido 3-metossi salicilico, orto vanillina e ioni Al(III) e Fe(III)

Dopo aver studiato molecole con due sostituenti ossidrilici, è sembrato interessante estendere il discorso anche a molecole che contenessero, oltre ad un gruppo ossidrilico, sostituenti come il gruppo carbossilico o carbonilico.

Nella Figura 1 sono riportati i nomi e le formule delle molecole che sono state studiate:

Figura 1. Nome e formula dei composti studiati

Nome	Formula	Nome	Formula
<i>Orto-vanillina</i>		<i>Acido 3-metossi salicilico</i>	
<i>Iso vanillina</i>		-	-
<i>Vanillina</i>		<i>Acido vanillico</i>	

4.1 Schema del lavoro

Come nei precedenti casi, lo studio degli equilibri di formazione dei complessi tra i leganti e gli ioni Al(III) e Fe(III) è stato suddiviso in due fasi principali:

- Studio dei pK di deprotonazione dei leganti alla temperatura di 25°C;
- Studio della formazione dei complessi con il Fe(III) e l'Al(III).

Lo studio dei pK di deprotonazione dei leganti e delle costanti di formazione dei complessi è stato eseguito mediante misure potenziometriche, spettrofotometriche e NMR.

Orto vanillina, iso-vanillina, vanillina, acido vanillico, acido 3-metossi salicilico, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, erano prodotti Aldrich e sono stati usati senza ulteriore purificazione.

4.2 Costanti di protonazione dei leganti

4.2.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

I pK dei leganti sono stati determinati mediante titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche, eseguite in presenza di un tampone di forza ionica 0,1M in KCl alla temperatura di 25°C.

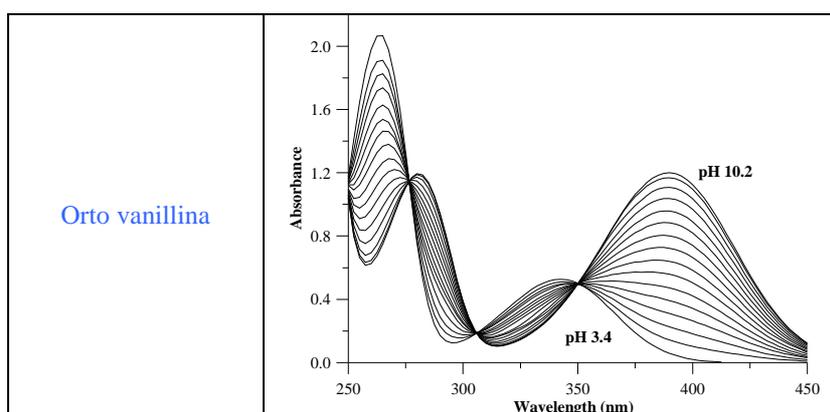
L'orto vanillina, l'iso vanillina e la vanillina sono caratterizzati da un solo pK che è stato ricavato per via potenziometrica e spettrofotometrica. Il pK della vanillina è stato determinato solo attraverso la potenziometria; essendo molto elevato il valore del coefficiente di estinzione molare, si dovevano eseguire le misure spettrofotometriche ad un concentrazione del legante di 2×10^{-4} M; le aggiunte di KOH necessarie per la titolazione erano così piccole che è stato possibile registrare solo pochi spettri. Lo spettro della vanillina ottenuto con l'aggiunta minima di KOH sperimentalmente possibile è riportato nella figura 2. L'acido vanillico presenta invece due valori di pK

ricavati per via potenziometrica e spettrofotometrica. Infine, i due pK di deprotonazione dell'acido 3-metossi salicilico cadendo uno a pH molto acido e l'altro a pH molto basico sono stati determinati solamente per via spettrale, ossia preparando una serie di soluzioni con la stessa concentrazione di legante, con una concentrazione di HCl crescente da $2.5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ a 4 M per il primo pK, e con una concentrazione crescente di KOH per il secondo pK da $4.5 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ a $1.7 \cdot 10^{-15} \text{ M}$.

Nelle tabella 2 sono riportati i valori di pK di tutti i leganti in studio seguiti dai rispettivi spettri UV-Visibile (Figura 2). Le assorbanze sono state riportate in funzione di $-\log [\text{H}^+]$ o $-\log [\text{OH}^-]$. Per concentrazioni di $[\text{H}^+] > 1 \text{ M}$, è stato calcolato il valore di H^0 proposto da Hammett¹.

Composti	pK₁ 25°C	pK₂ 25°C
Orto vanillina	7.72(1)	-
Iso vanillina	8.77(1)	-
Vanillina	7.20(1)	-
Acido 3-metossi salicilico	2.61(1)	13.74(1)
Acido vanillico	4.28(1)	9.04(1)

Tabella 2: Valori dei pK di protonazione dei leganti studiati.



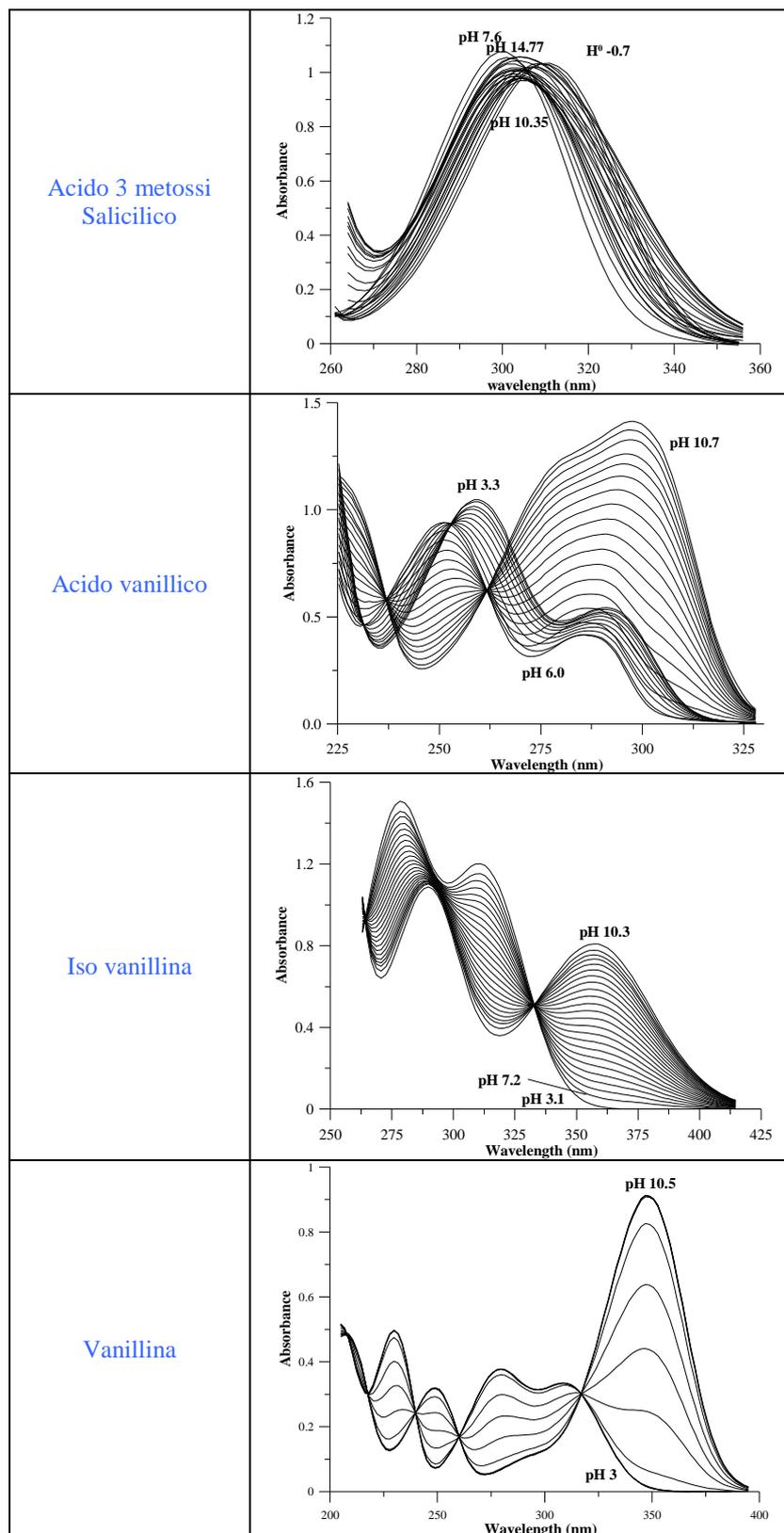
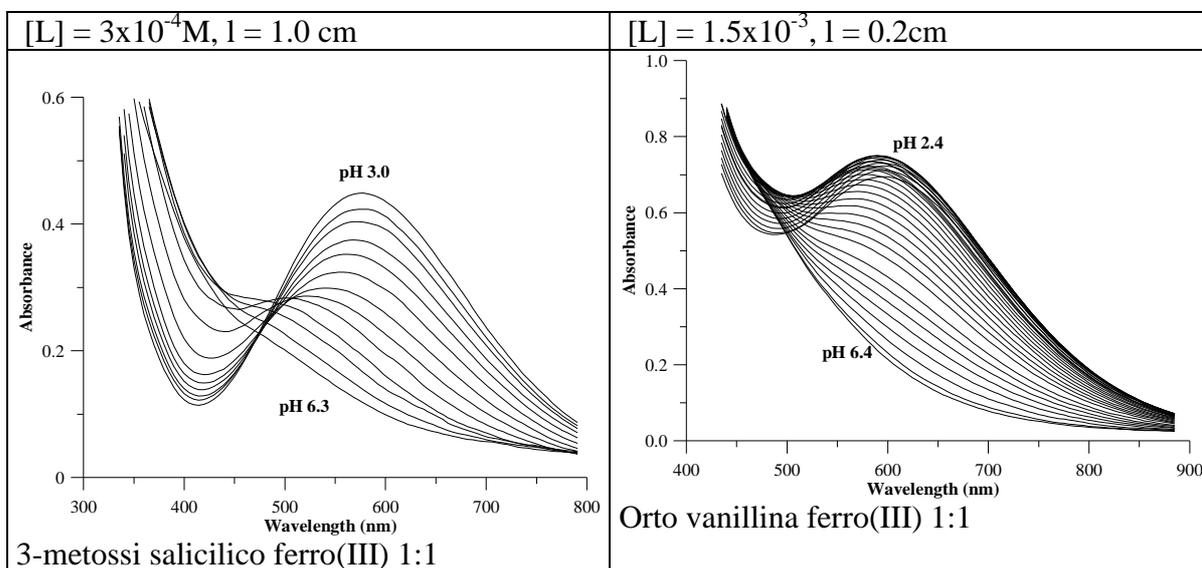


Figura 2: Titolazione spettrofotometrica dei leganti studiati.

4.3 Complessi del Ferro(III)

4.3.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

Le reazioni di complessazione tra i leganti e il Ferro(III) sono state studiate mediante titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche. Sono state preparate diverse soluzioni con rapporti molari legante-metallo 1:1, 2:1 e 3:1 mantenendo costante la concentrazione del legante. Le misure sono state effettuate a 25°C in presenza di un tampone di forza ionica 0.1M in KCl. Sono stati studiati gli equilibri di complessazione solo dell'acido 3-metossi salicilico e dell'orto-vanillina, dato che le misure preliminari sugli altri leganti hanno dimostrato che non c'erano evidenti segni di complessazione. Nella Figura 3 vengono riportati gli spettri uv-visibile dell'acido 3-metossi salicilico e dell'orto vanillina con il ferro (III) nei diversi rapporti molari studiati.



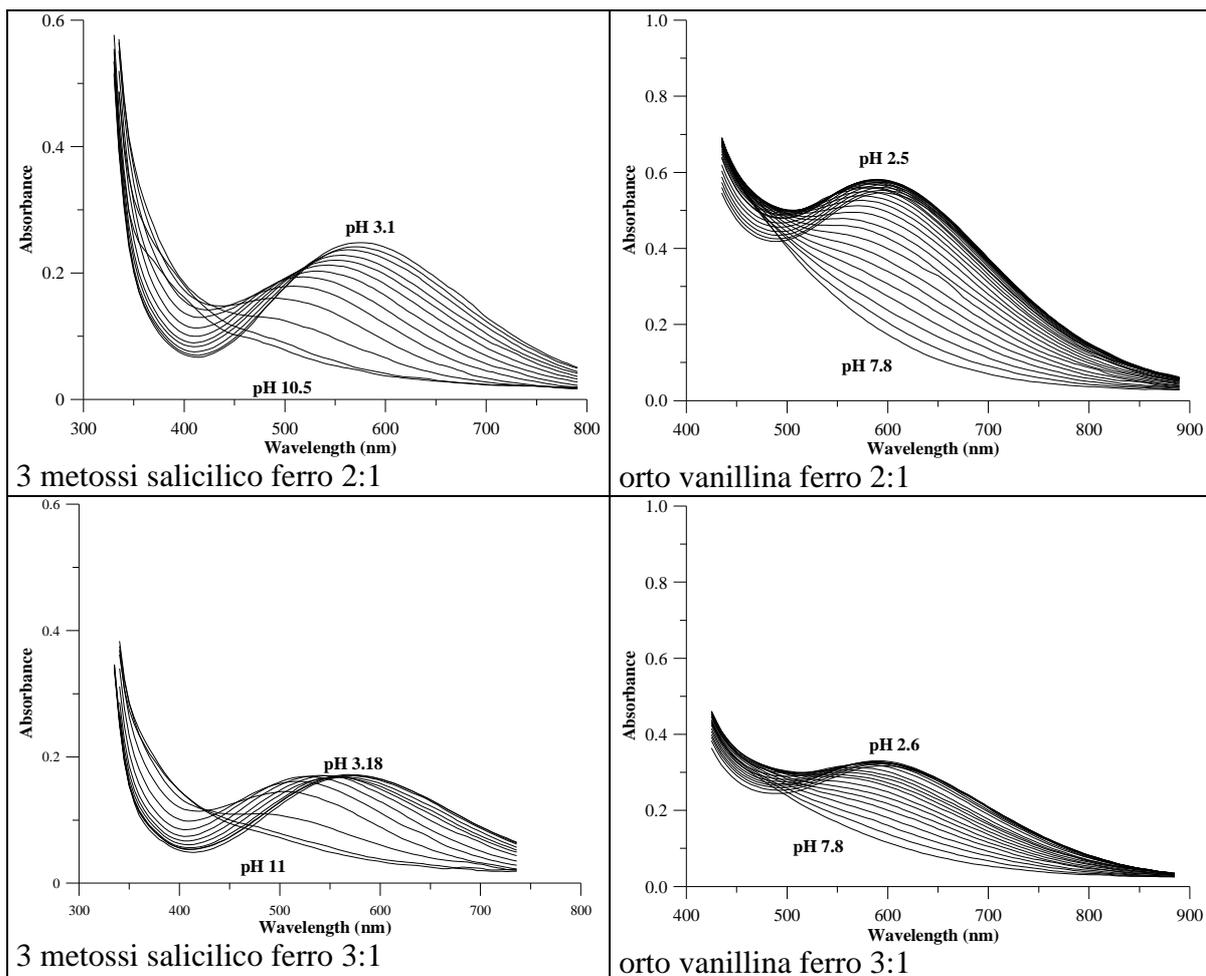


Figura 3: Titolazione spettrofotometrica dell'acido 3 metossi salicilico e dell'orto-vanillina con il Fe(III) nei rapporti molari 1:1, 2:1 e 3:1.

Osservando gli spettri dell'acido 3 metossi-salicilico con il Fe(III) si nota che già a pH 3 si forma un complesso; infatti, è presente una banda intorno a 550 nm la cui intensità diminuisce all'aumentare del pH. Dai dati potenziometrici ho attribuito questa banda alla formazione del complesso 1:1.

Per quanto riguarda l'orto vanillina anche in questo caso già a pH 3 si nota una banda intorno a 650 nm caratteristica della formazione del complesso 2:1. In entrambi i leganti dopo pH 6 si osserva la precipitazione degli idrossidi di ferro.

4.3.2 Modelli di complessazione

L'elaborazione dei dati potenziometrici e spettrofotometrici ha permesso di elaborare per i sistemi 3-metossi salicilico-Fe(III) e orto vanillina i modelli riportati in Tabella 3.

Modello $M_qL_1H_p$	25°C, KCl 0,1M	
	3-metossi salicilico	Orto-vanillina
$[FeL]^+$	16.44	-
$[FeL_2]^-$	28.86	-
$[Fe_2L_4]^{2+}$	-	37.8
$[Fe_2L_4(OH)]^+$	-	33.6

Tabella 3: Modello $M_qL_1H_p$ per il sistema Legante- Ferro

Nel caso del 3-metossi salicilico-Fe(III) a pH molto acidi si nota un complesso già formato la cui stechiometria può essere proposta dai dati potenziometrici come $[FeL]^+$. A pH maggiori di 3 si forma un complesso di stechiometria 1:2. Dopo pH 6 inizia la precipitazione degli idrossidi di ferro.

L'orto vanillina forma complessi di tipo polimerico di stechiometria L/M 4:2 a partire da $pH \sim 2$. Le curve di distribuzione per i due leganti sono riportate nella Figura 4.

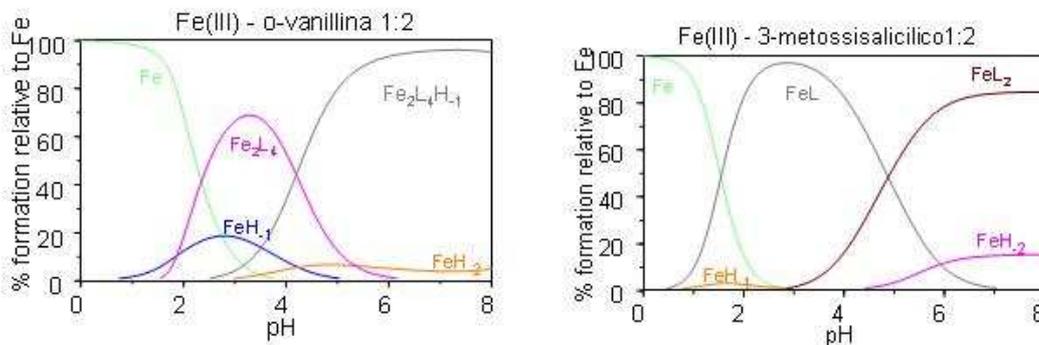


Figura 4.: Curve di distribuzione dei leganti 3 metossi salicilico e orto vanillina col Ferro.

La formazione dei complessi che si formano a pH 2 è stata seguita mediante una titolazione acida in batch, ossia misurando l'assorbanza di una serie di soluzioni contenenti la stessa concentrazione di metallo e legante ma aventi una concentrazione di acido crescente da $2.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ a 0.4 M. Di seguito (Figura 5) vengono riportati gli spettri Uv-visibile della titolazione acida del 3-metossi salicilico col ferro nel rapporto 1:1 e dell'orto vanillina col ferro nel rapporto 2:1. Tale rapporto è stato scelto perché a pH acido si forma il complesso di stechiometria 2:1 per l'orto-vanillina e il complesso 1:1 per l'acido 3-metossi salicilico.

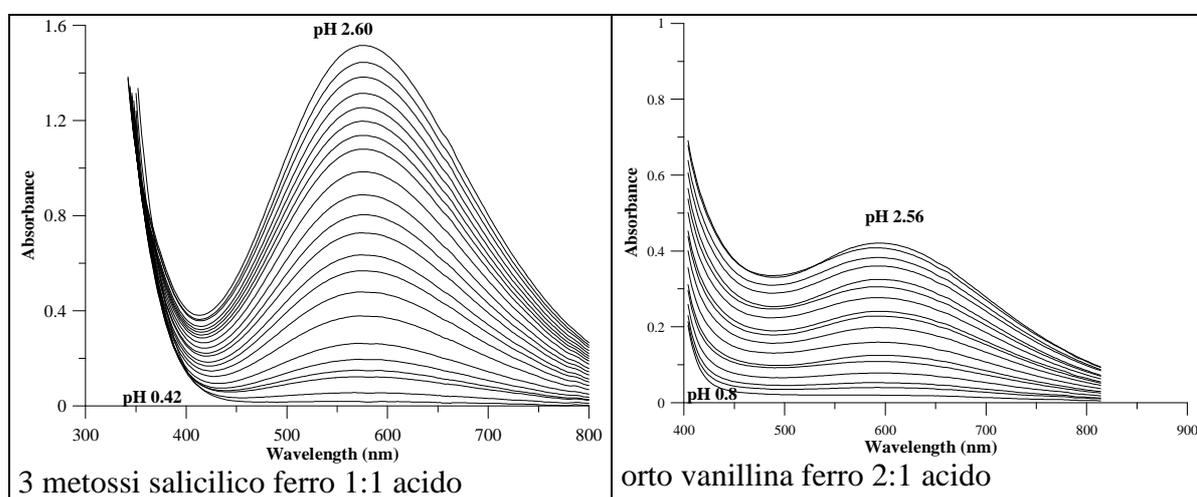


Figura 5: Titolazioni spettrofotometriche acide dell'acido 3 metossi salicilico/Fe(III) 1:1 e dell'orto vanillina/Fe(III) 2:1.

Per meglio comprendere la stechiometria dei complessi che si formano a pH acidi e per controllare che non si formassero complessi di altra stechiometria, abbiamo effettuato anche il Job Plot del sistema acido 3 metossi salicilico-Fe(III) a pH 2.64 e del sistema orto vanillina Fe(III) a pH 2.2 riportati rispettivamente nelle figure 6 e 7.

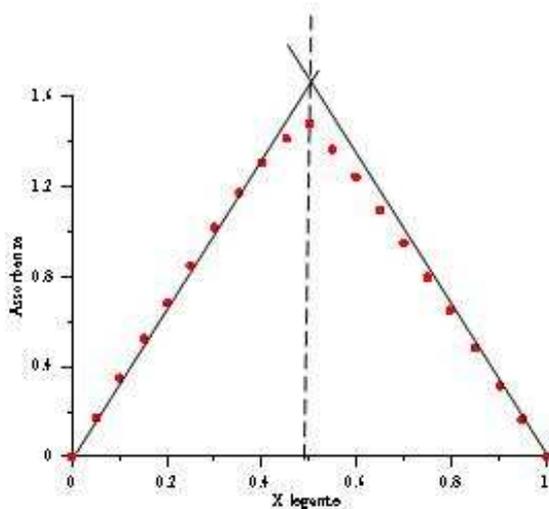


Figura 6: Job Plot dell'acido 3 metossi salicilico\Fe(III).
 $[L]=6 \times 10^{-3} \text{M}$, $[\text{Fe}]= 6 \times 10^{-3} \text{M}$, $\lambda= 596 \text{ nm}$

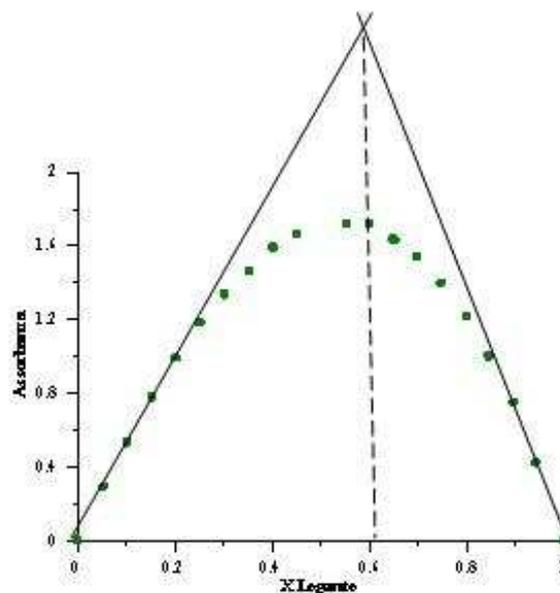


Figura 7: Job Plot dell'orto vanillina\Fe(III)
 $[L]=2 \times 10^{-3} \text{M}$, $[\text{Fe}]= 2 \times 10^{-3} \text{M}$, $\lambda= 580 \text{ nm}$

I dati ottenuti hanno confermato il modello di speciazione proposto; notiamo, infatti, che l'acido 3-metossi salicilico a pH 2.64 forma un complesso di stechiometria 1:1 mentre l'orto vanillina a pH 2.2 un complesso di stechiometria 2:1.

4.3.3 Quantomeccanica molecolare

Attraverso i calcoli di meccanica molecolare è stata prevista la geometria di coordinazione più stabile per i diversi complessi. In Figura 8 sono riportate le geometrie calcolate per i complessi $[\text{FeL}]^+$ e $[\text{FeL}_2]^+$ formati dall'acido 3 metossi salicilico e per il complesso $[\text{Fe}_2\text{L}_4]^{2+}$ dell'orto vanillina con il ferro.

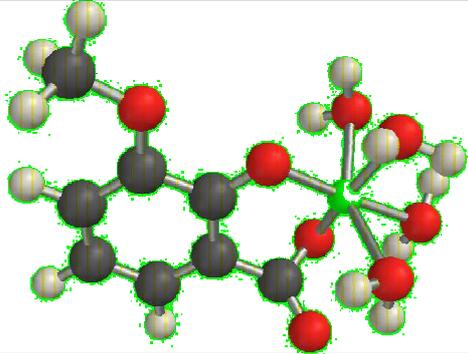
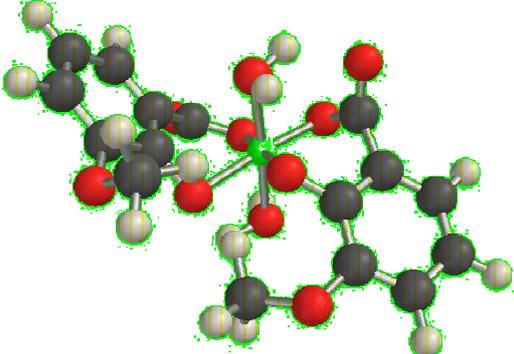
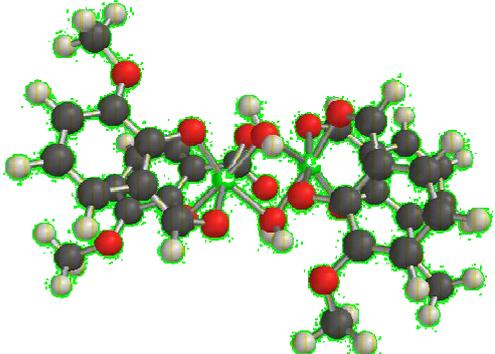
Complesso	Geometrie	
	<i>Acido 3 metossi salicilico</i>	<i>Orto-vanillina</i>
[FeL] ⁺		-
[FeL ₂] ⁻		-
[Fe ₂ L ₄] ²⁺	-	

Figura 8: Geometrie di coordinazione calcolate col programma SPARTAN per i complessi formati da acido 3 metossi salicilico e orto vanillina col Fe(III).

4.4 Complessi dell'Alluminio(III)

I complessi formati dall'alluminio(III) sono stati studiati sia potenziometricamente che mediante misure NMR; le misure spettrofotometriche non sono state effettuate in quanto non si osservano variazioni spettrali significative durante la titolazione.

4.4.1 Misure NMR

Acido 3-metossi salicilico \Alluminio

Per i complessi formati dall'acido 3-metossi salicilico con l'alluminio(III) sono stati registrati gli spettri NMR a pH 1, 3, e 5. In Figura 9 è riportato lo spettro del solo legante a pH 3 dove si osservano 4 segnali: il primo segnale cade a 3.9 ppm ed è attribuito al protone D, è un segnale singolo in quanto non si ha accoppiamento; il secondo segnale cade a 7 ppm, dovuto al protone A, è un tripletto in quanto si ha accoppiamento con i protoni B e C; il terzo segnale cade a 7.3 ppm, è un doppietto attribuibile al protone B che accoppia con quello A; il quarto segnale cade 7.5 ppm, dovuto al protone C che accoppia con quello A.

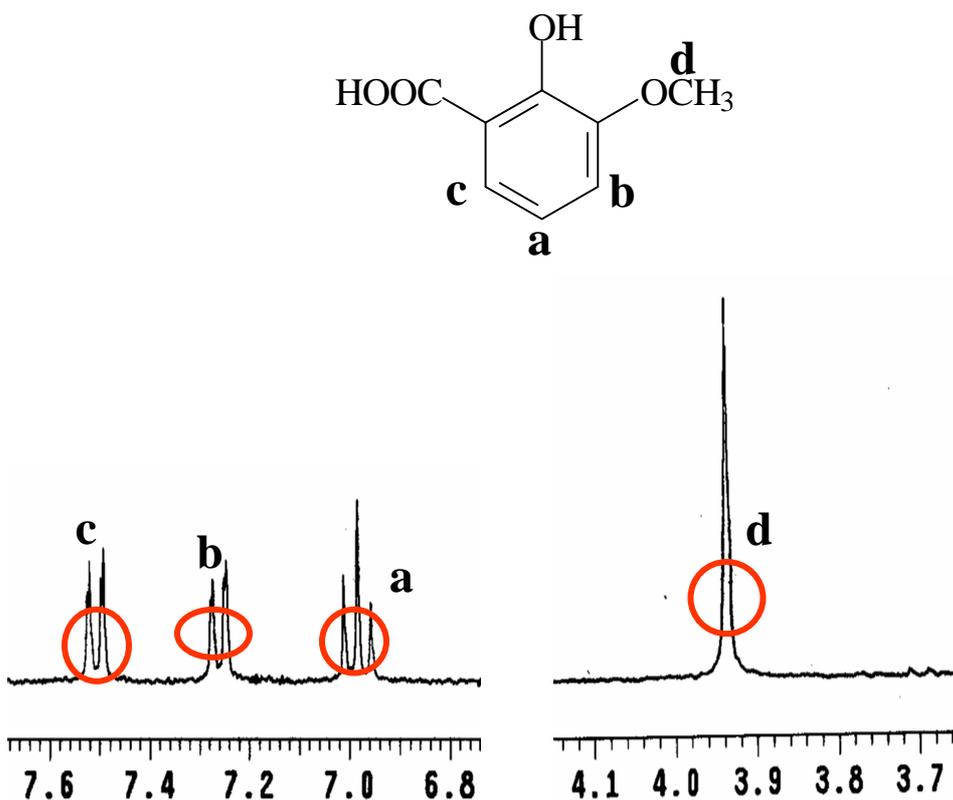


Figura 9: Spettro ¹H-NMR dell'acido 3-metossi salicilico a pH 3

Confrontando lo spettro del legante libero con quelli dei complessi dell'acido 3-metossi salicilico-Al(III) 3:1, 2:1 e 1:1 allo stesso valore di pH (pH 3), riportati rispettivamente nelle Figure 10, 11 e 12, si osserva la comparsa di due nuovi segnali (in blu) relativi al complesso 1:1 a 7.2, 6.8 e 3.8 ppm.

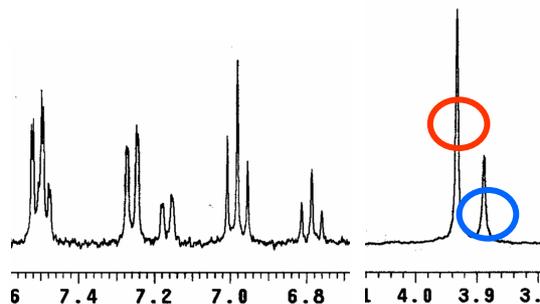


Figura 10: Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'acido 3-metossi salicilico Al 3:1 a pH 3

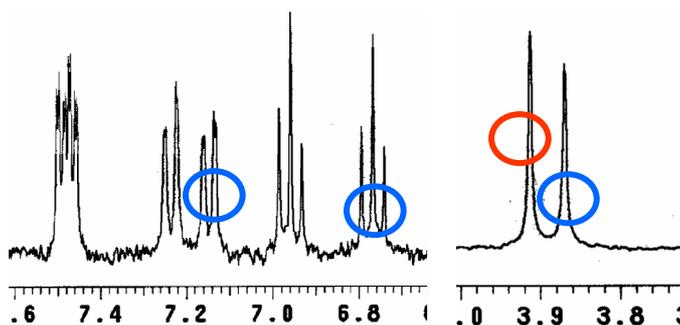


Figura 11: Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'acido 3-metossi salicilico Al 2:1 a pH 3

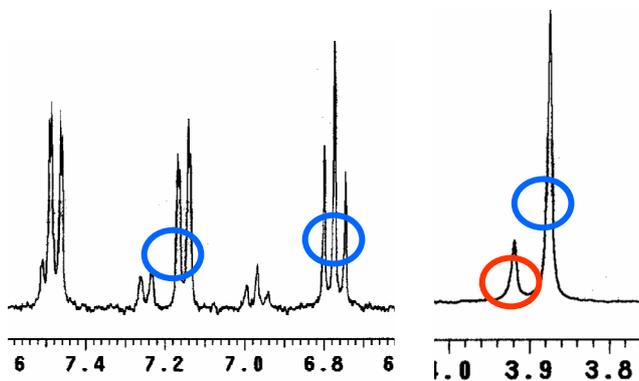


Figura 12: Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'acido 3-metossi salicilico Al 1:1 a pH 3

Nello spettro della soluzione contenente il legante e il metallo in rapporto molare 2:1 a pH 5, riportato in Figura 13, si osserva l'aumento di intensità dei segnali relativi al complesso 1:1 e la comparsa di segnali aggiuntivi, attribuibili al complesso legante-metallo 2:1(in verde).

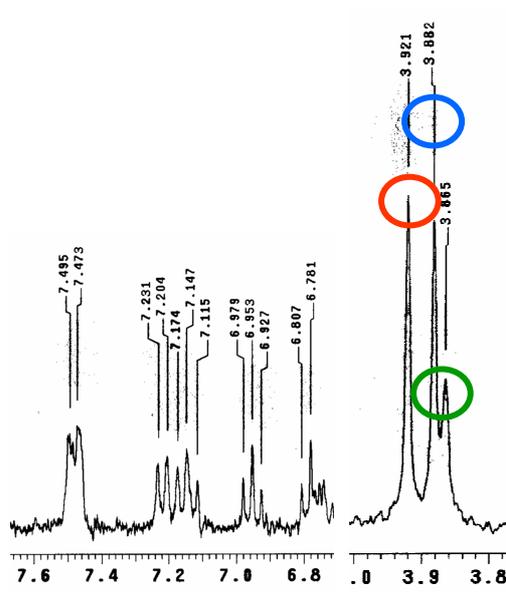


Figura 13: Spettro NMR dell'acido 3-metossi salicilico-Al(III) 2:1 a pH 5

Grazie ai risultati ottenuti mediante gli spettri NMR, è stato possibile confermare i modelli ottenuti elaborando i dati potenziometrici: infatti a $\text{pH} \cong 3$ è già presente il segnale relativo al rapporto molare 1:1 e i segnali del legante libero; a pH 5 si ha la comparsa dei segnali relativi al rapporto molare legante-metallo 2:1, è presente contemporaneamente una certa quantità di 1:1, mentre diminuisce l'intensità del segnale del legante libero.

Orto vanillina\Alluminio

Per i complessi formati dall'orto vanillina con l'alluminio(III) sono stati registrati gli spettri NMR a pH 3, 4 e 5. In Figura 14 è riportato lo spettro del solo legante a pH 3.

Si osservano 4 segnali, il primo a 7.2 ppm, il secondo a 7.4 ppm, il terzo a 8.9 ppm e il quarto a 10 ppm .

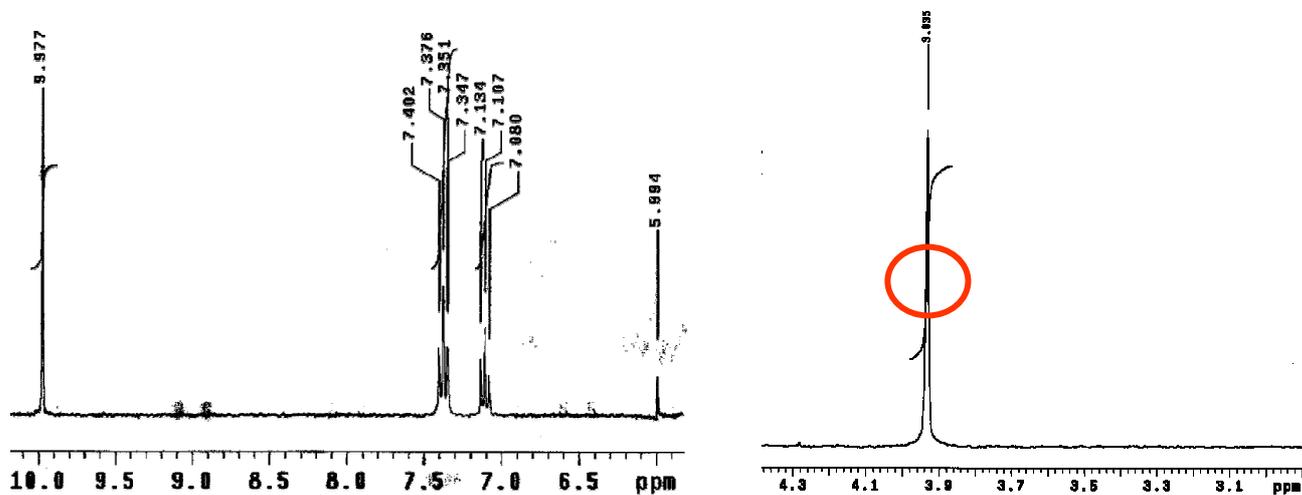


Figura 14: Spettro ¹H-NMR dell'orto vanillina a pH 3

Nello spettro della soluzione contenente il legante e il metallo in rapporto molare 1:1 a pH 3, riportato in Figura 15, si osserva a 3.9 ppm un nuovo segnale dovuto al complesso (in blu).

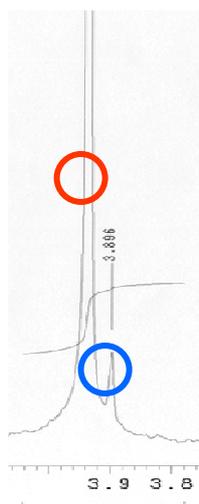


Figura 15: Spettro ¹H-NMR dell'orto vanillina /Al nel rapporto 1:1 a pH 3

Anche nello spettro della soluzione contenente il legante e il metallo nel rapporto molare 3:1, 2:1 e 1:1 a pH 4, si osserva la presenza del segnale relativo al complesso con intensità differenti (Figura 16).

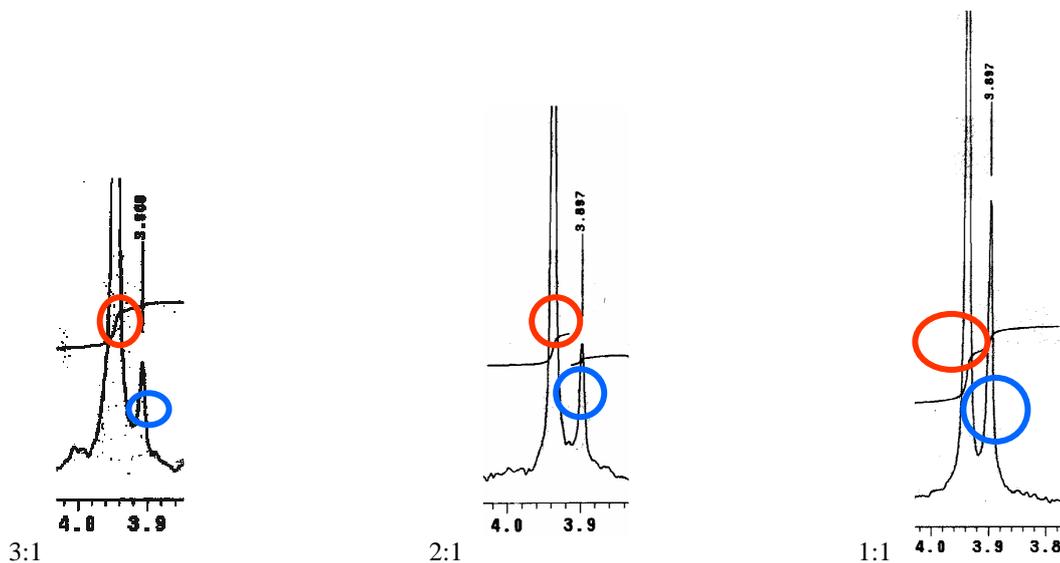


Figura 16: Spettro NMR dell'orto vanillina-Al(III) 3:1, 2:1 e 1:1 a pH 4

A pH 5 è presente ancora il segnale dovuto al complesso ma la sua intensità diminuisce fino a scomparire nel rapporto molare 1:1 a causa della precipitazione di idrossidi di alluminio (Figura 17).

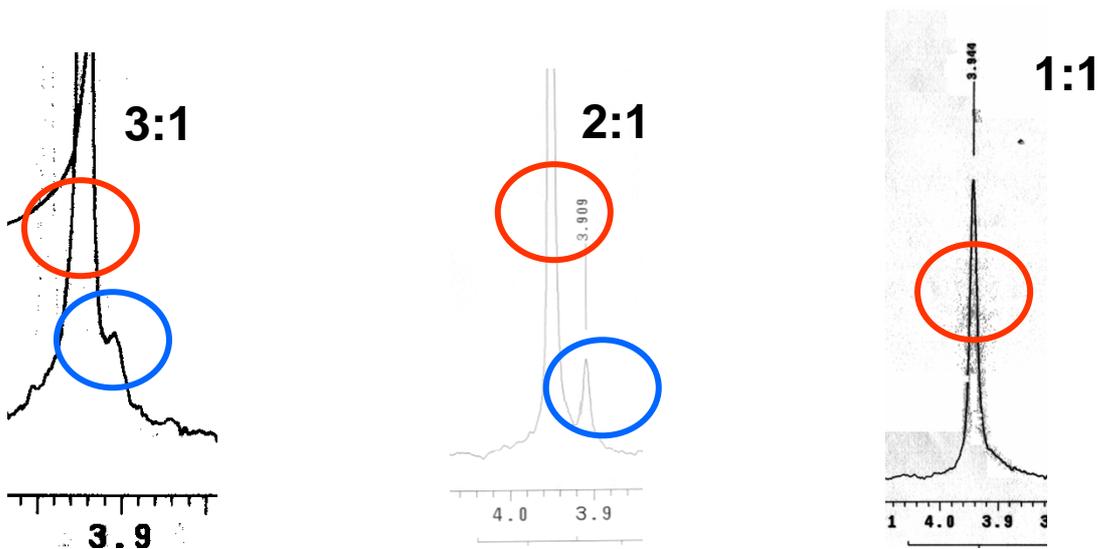


Figura 17: Spettro NMR dell'orto vanillina-Al(III) 3:1, 2:1 e 1:1 a pH 5

Anche questi dati hanno confermato il modello di complessazione proposto dall'analisi dei dati potenziometrici.

4.4.2 Modelli di complessazione

I risultati sperimentali ottenuti dagli studi potenziometrici e NMR condotti sui complessi formati da acido 3-metossi salicilico e orto vanillina con l'alluminio sono stati elaborati con il modello riportato nella Tabella 4.

Modello $M_qL_1H_p$	25°C, KCl 0,1M							
	Acido 3 metossi salicilico	Orto vanillina						
$[AlL]^+$	14.0	-						
$[AlL_2]^-$	25.6	-						
$[AlL_2(OH)]^{-2}$	19.5	-						
$[AlL_2(OH)_2]^{-3}$	11.2	-						
$Al_xL_2(OH)_4$	-	Bassa stabilità						
$[Al_2(OH)_2]^{4+}$	-7.7							
$[Al(OH)]^{2+}$			-5.41					
$Al(OH)_3$					-15.18			
$[Al(OH)_4]^-$							-24.37	
$[Al_3(OH)_4]^{5+}$								

Tabella 4: Modello $M_qL_1H_p$ per l'Alluminio.

L'acido 3-metossi salicilico forma complessi di stechiometria $L \setminus M$ 1:1 e 2:1 con diversi gradi di deprotonazione. Dopo pH 6 inizia la precipitazione degli idrossidi di alluminio.

L'orto vanillina invece forma presumibilmente complessi di tipo polimerico di bassissima stabilità del tipo $Al_xL_2(OH)_4$.

Le curve di distribuzione per l'acido 3-metossi salicilico sono riportate nella Figura 18.

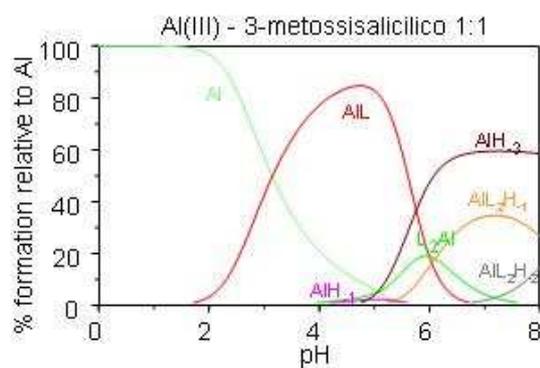


Figura 18: Curve di distribuzione per l'Al(III)

4.4.3 Quantomeccanica molecolare

Le geometrie più probabili per i diversi complessi sono state ottenute da calcoli di quantomeccanica molecolare e sono riportate in Figura 19.

Complesso	Geometria	
	3-metossi salicilico	Orto-vanillina
$[AIL]^+$		-
$[AIL_2]^-$		-

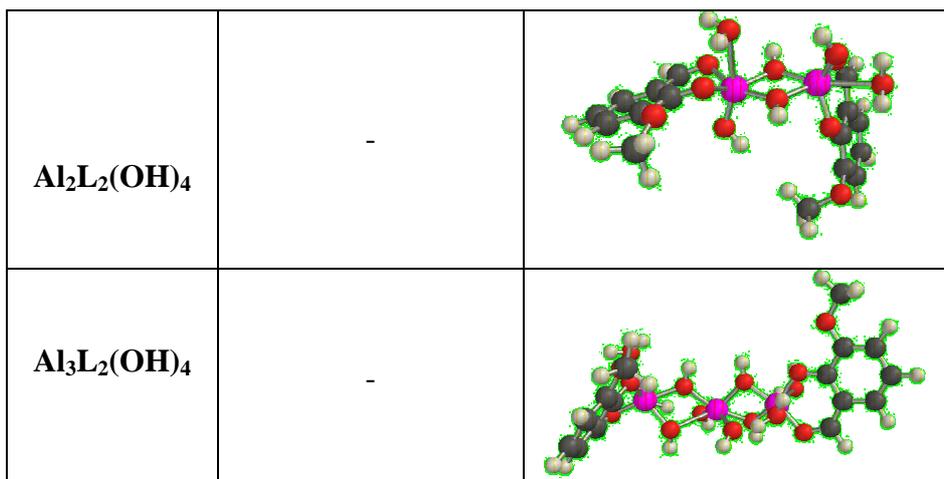


Figura 19: Geometria di coordinazione per i complessi formati da 3 metossi salicilico e orto vanillina con l'Al(III)

4.5 Efficacia dei leganti

Per valutare oggettivamente e confrontare l'efficacia di questi leganti è opportuno calcolare il valore di pM definito come il logaritmo negativo della concentrazione del metallo libero, per una concentrazione di legante pari a $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ e metallo $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$ a pH 7.4 (pH fisiologico del sangue); nella tabella 5 sono inoltre riportati i pM^2 per il Desferal e per il Deferiprone, attualmente utilizzati nella terapia chelante e quelle del catecolo e del 4-nitro-catecolo.

Legante	pFe	pAl
Acido 3-metossi salicilico	12.0	10.1
Orto vanillina	12.5	-
Catecolo	14.2	10.4
4-Nitrocatecolo	19.6	14.7
Desferal	26.6	19.4
Deferiprone	19.3^3	16.4^4

Tabella 5: Valori di pM calcolati per i vari sistemi.

Confrontando i valori di pM notiamo che i complessi dell'orto vanillina e dell'acido 3-metossi salicilico con il Fe(III) sono più stabili rispetto a quelli con l'Al(III). Tuttavia questi leganti hanno una capacità complessante minore rispetto al catecolo e al 4 nitrocatecolo in quanto presentano un valore di pM più basso e non sono competitivi rispetto a quelli attualmente utilizzati nella terapia chelante dei metalli essendo i valori di pM calcolati notevolmente inferiori rispetto a quelli del desferal e del deferiprone.

4.6 Riferimenti Bibliografici

¹ Hammett, Deyrup, *J. Am. Chem. Soc.*, 54, 2721 (1932)

² W. R. Harris, K. N. Raymond, F. L. Weitl, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2667, (1981)

³ Motekaitis, Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **183** (1991) 71-80

⁴ Clarke, Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **196** (1992) 185-194

Capitolo 5

Equilibri di formazione dei complessi di alcuni leganti

catecol-bifosfonici con lo ione Fe(III)

I leganti bifosfonati sono stati oggetto di numerosi studi per la loro considerevole efficacia nel chelare vari ioni metallici come Ca(II), Mg(II), Fe(II), Fe(III), Cu(II) e Al(III).^{1, 2, 3, 4}

D'altra parte, anche i leganti catecolici sono stati studiati intensamente per la loro alta affinità per i metalli nel loro stato di ossidazione più alto, come per esempio il Fe(III) e alcuni attinidi come l'uranio(IV) e il torio(IV).^{5, 6, 7, 8, 9, 10}

Per queste ragioni, leganti contenenti sia il gruppo catecolico che quello bifosfonico potrebbero presentare verso diversi ioni metallici una capacità chelante anche maggiore. A tal proposito viene presentato uno studio potenziometrico e spettrofotometrico sugli equilibri di complessazione tra il Fe(III) e alcuni leganti catecol-bifosfonici sintetizzati nel laboratorio di Drug Research, Institute of Materia Medica, Shanghai Institute¹¹.

5.1 Schema del lavoro

Lo studio degli equilibri di formazione dei complessi tra i leganti catecol-bifosfonici con lo ione Fe(III) è stato suddiviso in due fasi principali:

- Studio dei pK di protonazione dei leganti alla temperatura di 25°C;
- Studio della formazione dei complessi dei leganti catecol-bifosfonici con il Fe(III).

Lo studio dei pK di protonazione dei leganti e delle costanti di formazione dei complessi con il Fe(III) è stato eseguito mediante misure potenziometriche e

spettrofotometriche. Nella tabella 1 viene riportato uno schema dei leganti che sono stati studiati. Come si può notare sono state determinate le costanti di protonazione di tutti i leganti e le costanti di formazione dei complessi ad eccezione di quelle con i leganti 3 e 4 che richiedono ancora ulteriori studi.

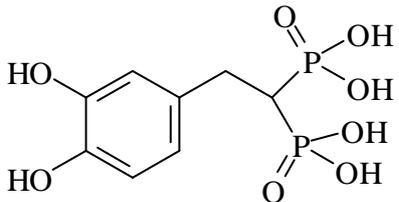
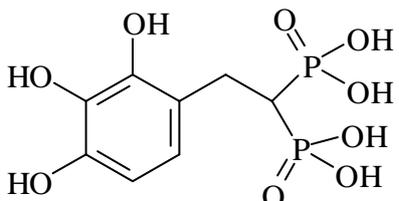
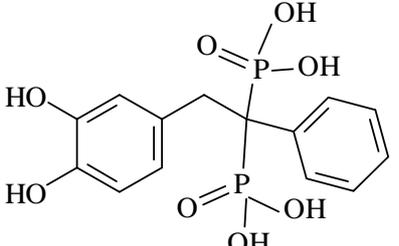
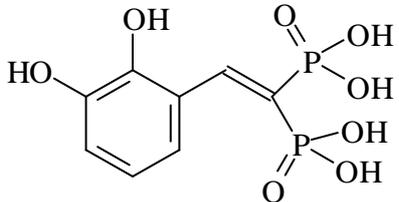
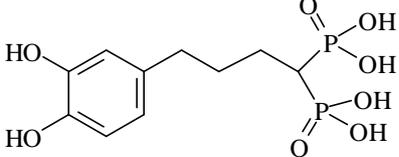
Leganti	Costanti di protonazione dei leganti	Costanti di formazione dei complessi
<p style="text-align: center;">1</p> 	×	×
<p style="text-align: center;">2</p> 	×	×
<p style="text-align: center;">3</p> 	×	-
<p style="text-align: center;">4</p> 	×	-
<p style="text-align: center;">5</p> 	×	×

Tabella 1: Leganti studiati

Per poter verificare come varia la capacità complessante di un legante in funzione della posizione e dal tipo di sostituenti, abbiamo preso in considerazione leganti che si differenziano per il numero e la posizione dei gruppi –OH sull’anello, per la lunghezza della catena alifatica e per i sostituenti presenti nell’atomo di carbonio legato ai gruppi bifosfonati.

5.2 Costanti di protonazione dei leganti

5.2.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

I pK dei leganti sono stati determinati mediante titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche, eseguite in presenza di un tampone di forza ionica 0,1M in NaCl alla temperatura di 25°C.

Di tutte le costanti di deprotonazione solo quella relativa alla prima deprotonazione del gruppo catecolico (pK 9) è stata determinata con misure spettrofotometriche. Il secondo gruppo fenolico, infatti, perde il protone a $\text{pH} > 13$ e quindi la sua costante non è determinabile in maniera accurata né potenziometricamente né con misure spettrofotometriche per la facile ossidazione dei gruppi catecolici a pH elevati. Le costanti di deprotonazione relative ai gruppi fosfonici, che per la maggior parte non comportano variazioni spettrali, sono state determinate per via potenziometrica.

Nelle figure 1, 2, 3 e 4 vengono riportate le titolazioni spettrofotometriche dei leganti riportati in tabella 1, registrate utilizzando un cammino ottico di 1 cm.

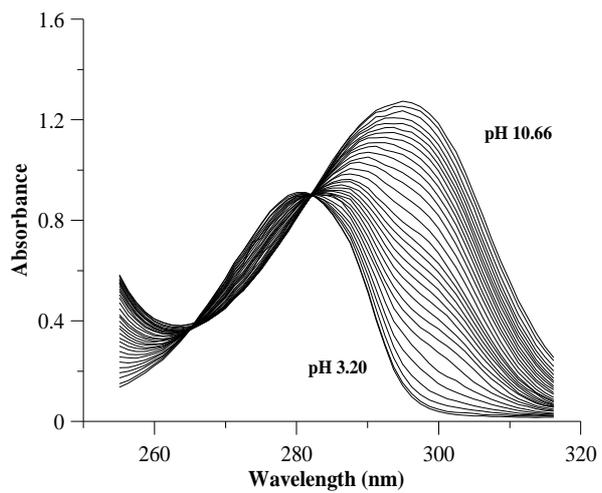


Figura 1: Titolazione spettrofotometrica del legante 1

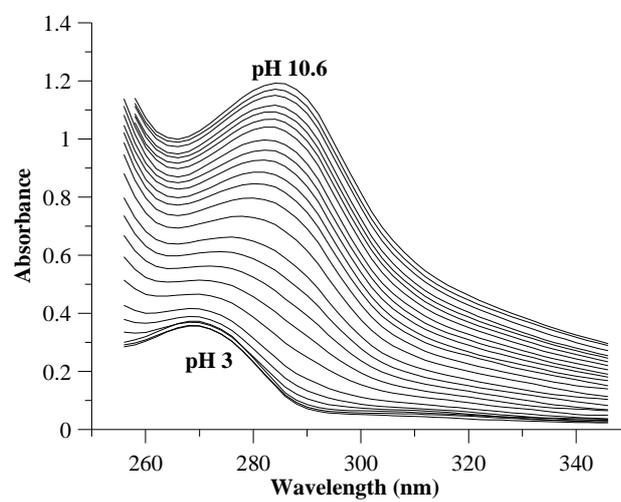


Figura 2: Titolazione spettrofotometrica del legante 2

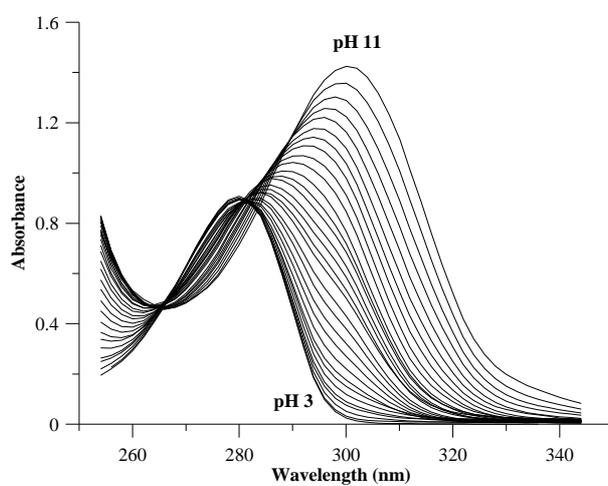


Figura 3: Titolazione spettrofotometrica del legante 3

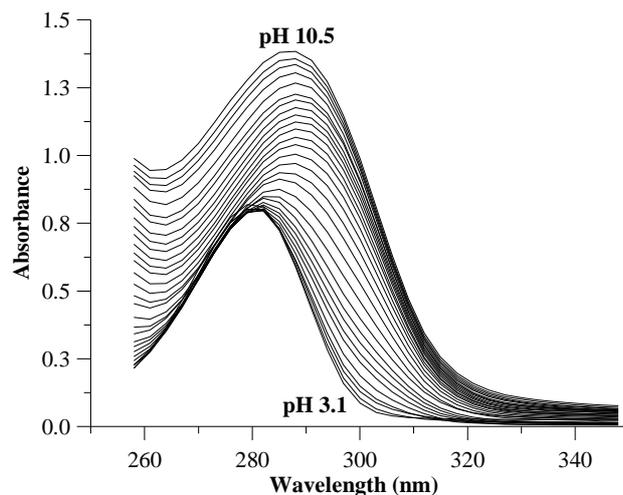


Figura 4: Titolazione spettrofotometrica del legante 5

Sovrapponendo gli spettri UV-Visibile del legante 1 (riportato in blu), con quelli del catecolo (in nero), da pH 6 a pH 11 (figura 5) notiamo che il legante 1 ha una forma spettrale simile a quella dello spettro del catecolo, si nota solamente un leggero redshift dovuto alla maggiore complessità della struttura del legante. Si possono trarre le stesse osservazioni dallo studio degli spettri dei leganti 2, 3 e 5. L'evolving factor analysis mostra per i quattro leganti la formazione di due sole specie assorbenti; nelle figure 6 e 7 sono riportati per esempio i grafici ottenuti dall'evolving factor analysis per il legante 1 e per il legante 2. Si deduce, quindi, che per questi leganti l'unica deprotonazione accompagnata da una significativa variazione spettrale è quella di uno dei gruppi -OH dell'anello.

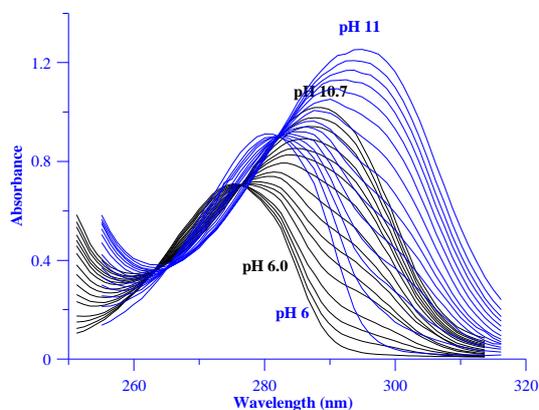


Figura 5: sovrapposizione dello spettro UV-Visibile del legante 1 e del catecolo

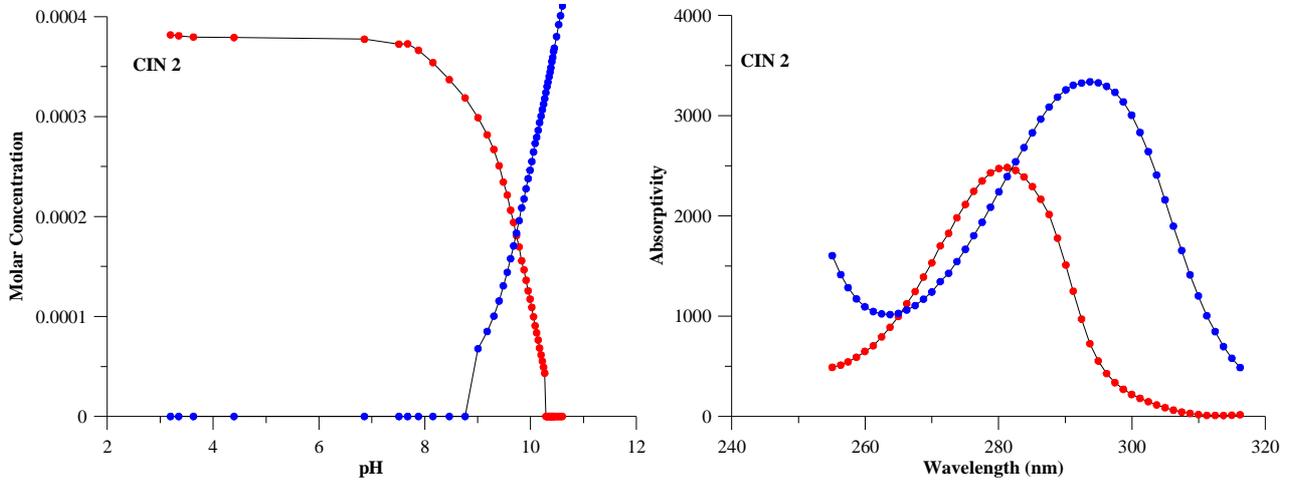


Figura 6: Evolving Factor Analysis del legante 1

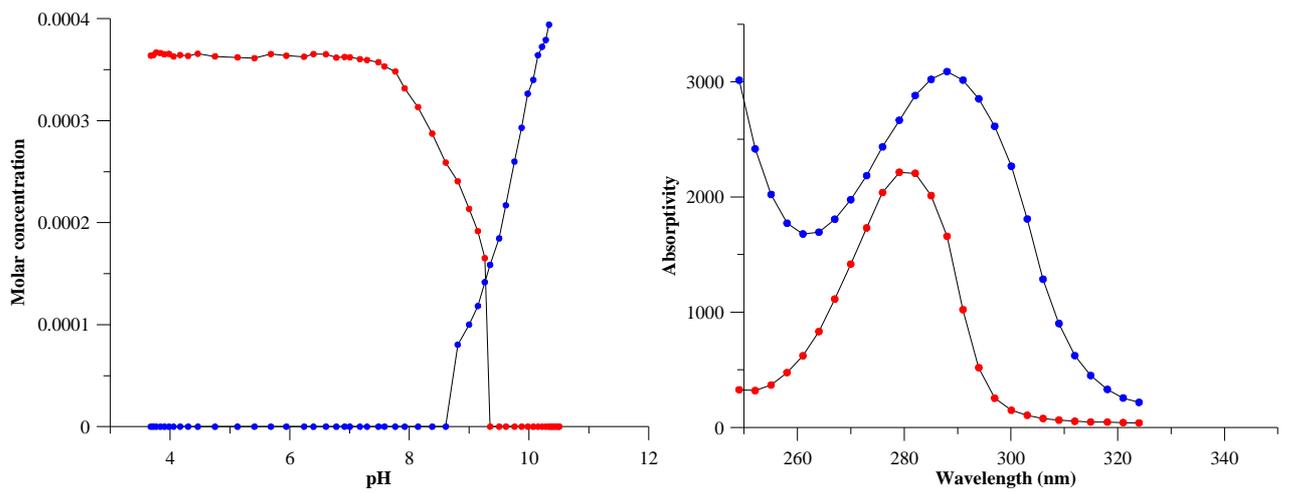


Figura 7: Evolving Factor Analysis del legante 2

Il legante 4 (figura 8), invece, presenta una forma spettrale diversa rispetto a quella degli altri quattro leganti; infatti, è presente una banda intorno a 320 nm da pH 4 a pH 7.6 dovuta alla deprotonazione di un gruppo bifosfonico ed un'altra banda a pH maggiori dovuta invece alla deprotonazione di uno dei gruppi -OH dell'anello.

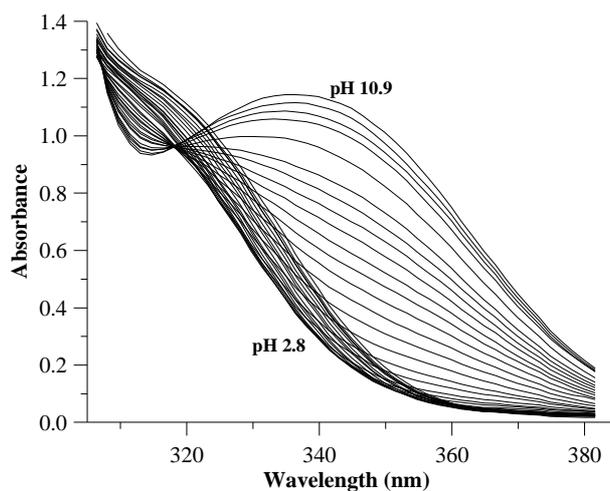


Figura 8: Titolazione spettrofotometrica del legante 4

Sovrapponendo il grafico di distribuzione, ottenuto dai dati potenziometrici con le bande UV-Visibile decomposte (figura 9), si nota che è possibile seguire spettralmente la scomparsa della specie H_4L e la formazione di quella H_3L (deprotonazione di un gruppo bifosfonico) mentre a valori più alti di pH si osserva la formazione della specie H_2L (deprotonazione di un gruppo catecolico).

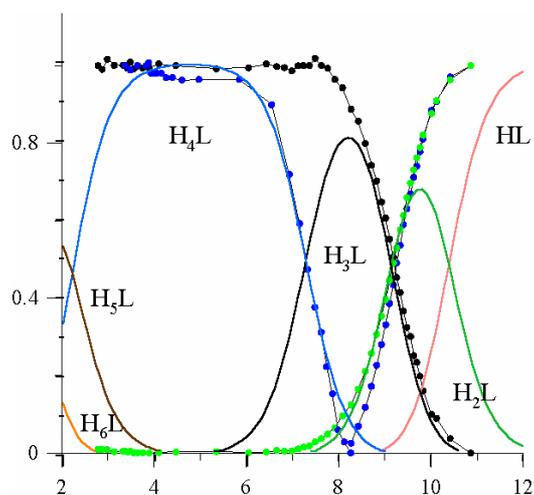


Figura 9: Grafico di distribuzione sovrapposto alle bande decomposte del legante 4

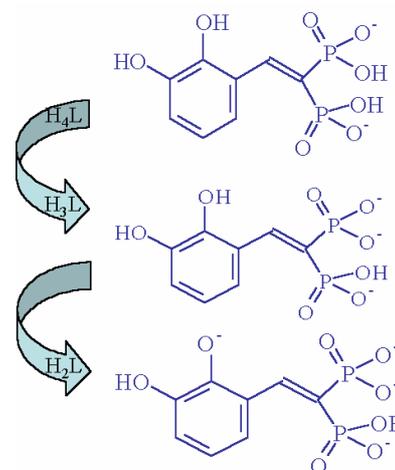
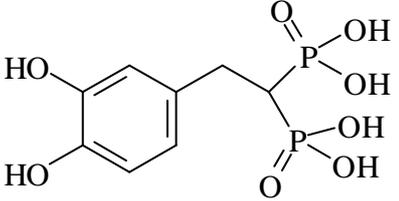
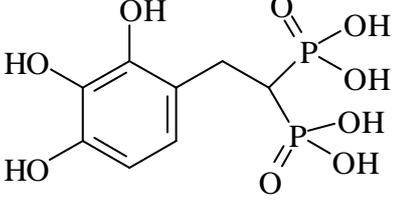
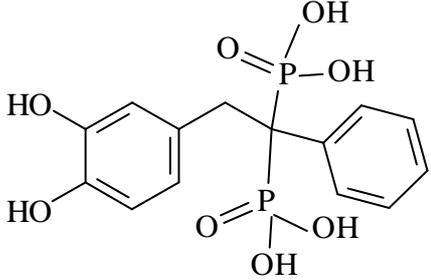
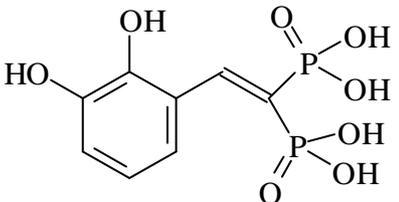
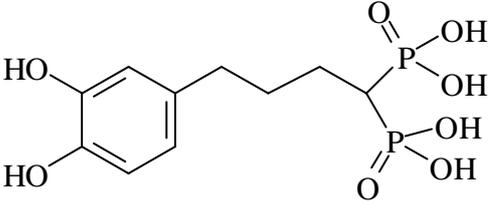


Figura 10: ipotesi di sequenza di deprotonazione del legante 4

I valori di pK ricavati per tutti i 5 leganti sono riportati nella tabella 2; possiamo notare che i valori dei pK di deprotonazione dei primi gruppi fosfonici cadono a valori di pH molto bassi; inoltre, il primo gruppo catecolico si deprotona prima dell'ultimo gruppo bifosfonico e il secondo gruppo catecolico si deprotona a pH maggiore di 13 per tutti i leganti. I valori di pK con l'asterisco sono quelli che sono stati ricavati spettrofotometricamente.

Tabella 2: Costanti di protonazione dei leganti catecol-bifosfonici.

	Fosfonati				catecoli	
	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄	pK _a	pK _b
 <p>1</p>	0.66	2.94	6.91	11.15	9.94*	>13
 <p>2</p>	1.4	1.76	6.40	11.4	10.04*	>13
 <p>3</p>	0.40	3.32	8.03	10.68	9.94*	>13
 <p>4</p>	1.40	2.20	7.28	10.39*	9.14*	>13
 <p>5</p>	0.62	3.03	7.00	10.66	9.81*	>13

5.3 Complessi del Ferro(III)

5.3.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

Le reazioni di complessazione tra i leganti e il Ferro(III) sono state studiate mediante titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche. Sono state preparate diverse soluzioni aventi rapporti molari legante-metallo 1:1, 2:1 e 3:1 con concentrazione costante di legante. Le misure sono state effettuate a 25°C in presenza di un tampone di forza ionica 0.1M in NaCl.(Figure 11 e 12).

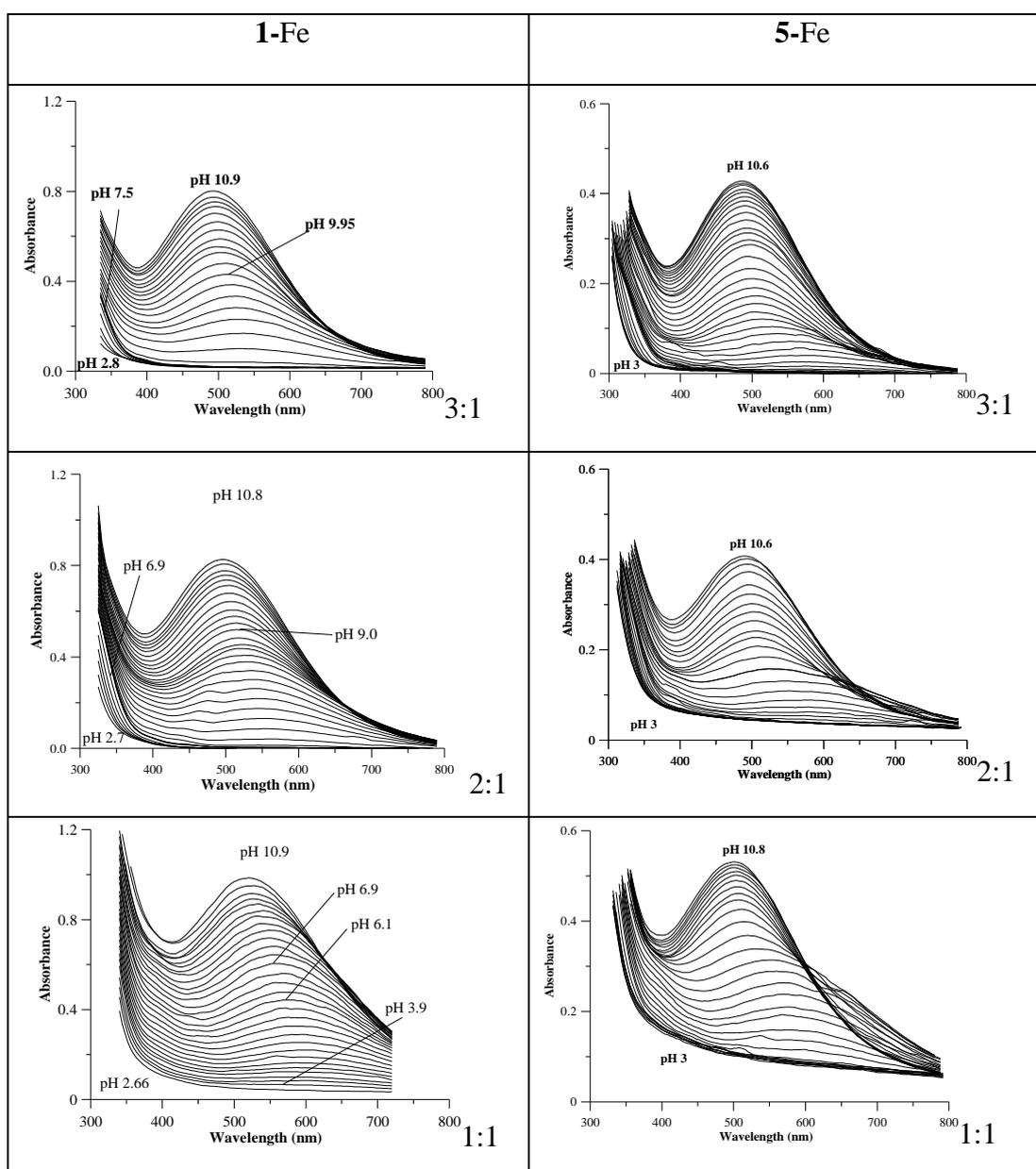


Figura 11: titolazioni spettrofotometriche dei leganti 1 e 2 con il Fe(III) a diversi rapporti molari

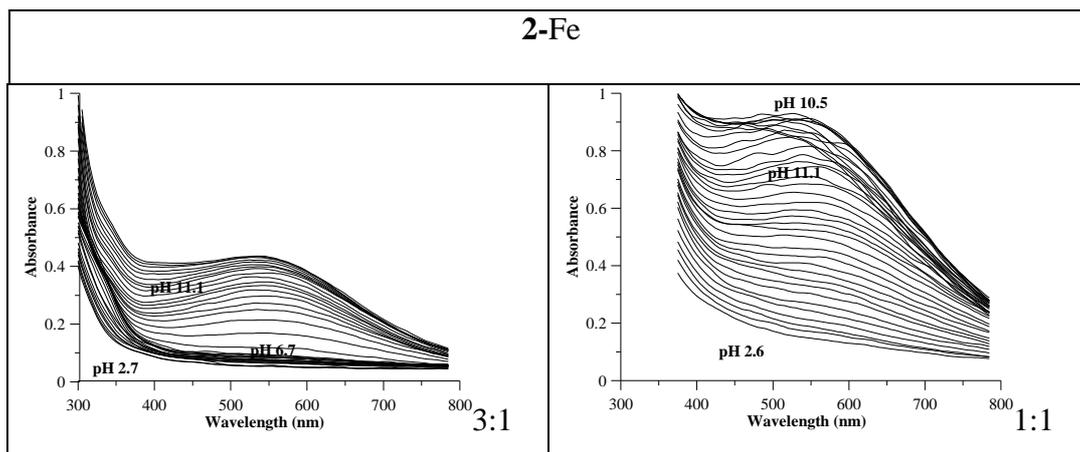


Figura 12: titolazione spettrofotometrica del legante 2 con il Fe(III) nei rapporti molari 3:1 e 1:1.

Osservando gli spettri UV-Visibile del legante 1, 2 e 5 nei diversi rapporti molari si nota come le forme spettrali siano molto simili; per il legante 1, nel rapporto molare L\M 1:1, si ha formazione di precipitato a pH basici, messa in evidenza dalla perdita di risoluzione dello spettro.

Sovrapponendo gli spettri della soluzione L\M 2:1 e 3:1, per esempio del legante 1 (in verde), con gli spettri del catecolo (in rosso) (figura 13), si nota che in questi ultimi a pH acidi è presente una banda a 700 nm e un'altra a 550 nm che indicano che il gruppo catecolico coordina il ferro già a bassi valori di pH; per il legante 1, invece, la coordinazione del gruppo catecolico interviene a valori di pH basici, infatti solo dopo pH 8 è visibile una banda che si sovrappone a quella del catecolo a questo pH. In definitiva dunque il gruppo catecolico coordina il ferro a pH maggiori di 8, mentre a pH acidi il ferro è coordinato solo dal gruppo bifosfonico.

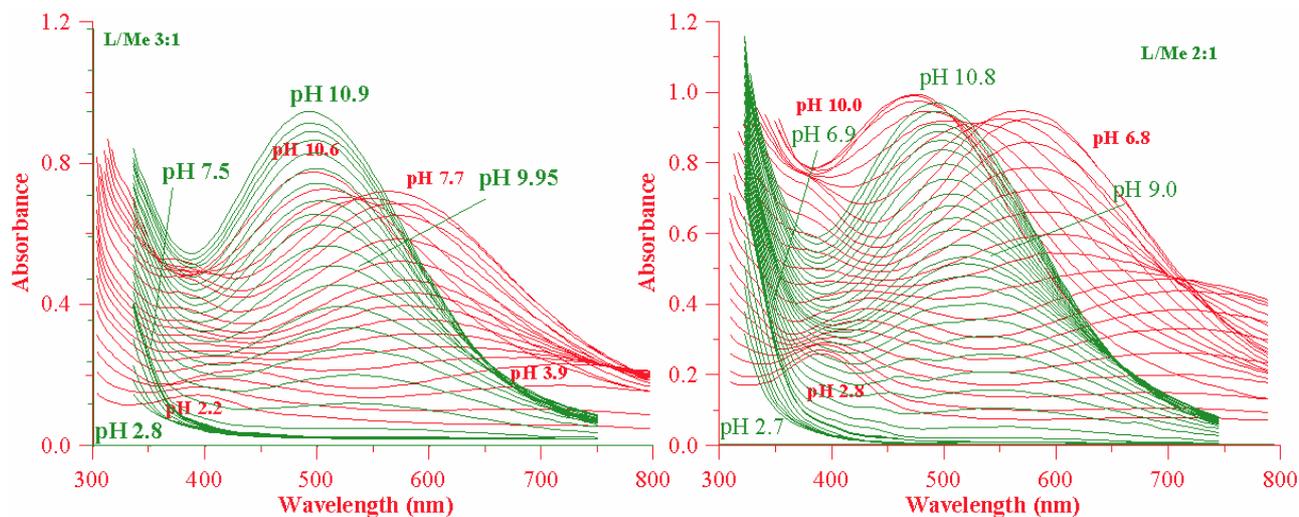


Figura 13: titolazione spettrofotometrica del catecolo (rosso) sovrapposte a quelle del legante 1 (verde).

5.4 Modelli di complessazione

L'elaborazione dei dati potenziometrici e spettrofotometrici ha permesso di elaborare per i sistemi legante 1\2\5-Fe(III) i modelli riportati in Tabella.3

Modello $M_qL_pH_r$	25°C, NaCl 0,1M		
	1	5	2
$[Fe_2L_2H_4]$	69.4(1)	79.53(6)	69.4(1)
$[Fe_2L_2H_3]$	66.73(4)	74.26(5)	66.28(6)
$[Fe_2L_2H_2]$	62.86(3)	67.78(6)	62.29(4)
$[Fe_2L_2H]$	57.87(2)	60.46(6)	57.33(3)
Fe_2L_2	51.38(2)	52.52(6)	51.05(4)
$[Fe_2L_2(OH)]$	43.34(3)	43.70(6)	43.37(4)
$[FeL_2H_6]$	69.13(7)	73.61(6)	-
FeL_2H_5	65.79(6)	-	-
FeL_2H_4	61.77(4)	-	-
FeL_2H_3	56.60(2)	-	-
$[Fe(OH)]^{+2}$	-2.75 -6.99 -10.65		
$[Fe(OH)_2]^+$			
$Fe(OH)_3$			

Tabella 3: costanti di formazione dei complessi dei leganti 1, 2 e 5 con il Fe(III)

Sia nel legante 1 che nel 5 sono presenti le specie 1:1 e 2:1 variamente deprotonate, mentre nel legante 2 il modello prevede solamente la specie 2:2 variamente deprotonata. Qualunque tentativo di introdurre forzatamente la specie 2:1 nel modello non ha migliorato il fitting. Le curve di distribuzione dei tre leganti con il ferro nei tre diversi rapporti molari sono riportati nella Figure 14, 15 e 16.

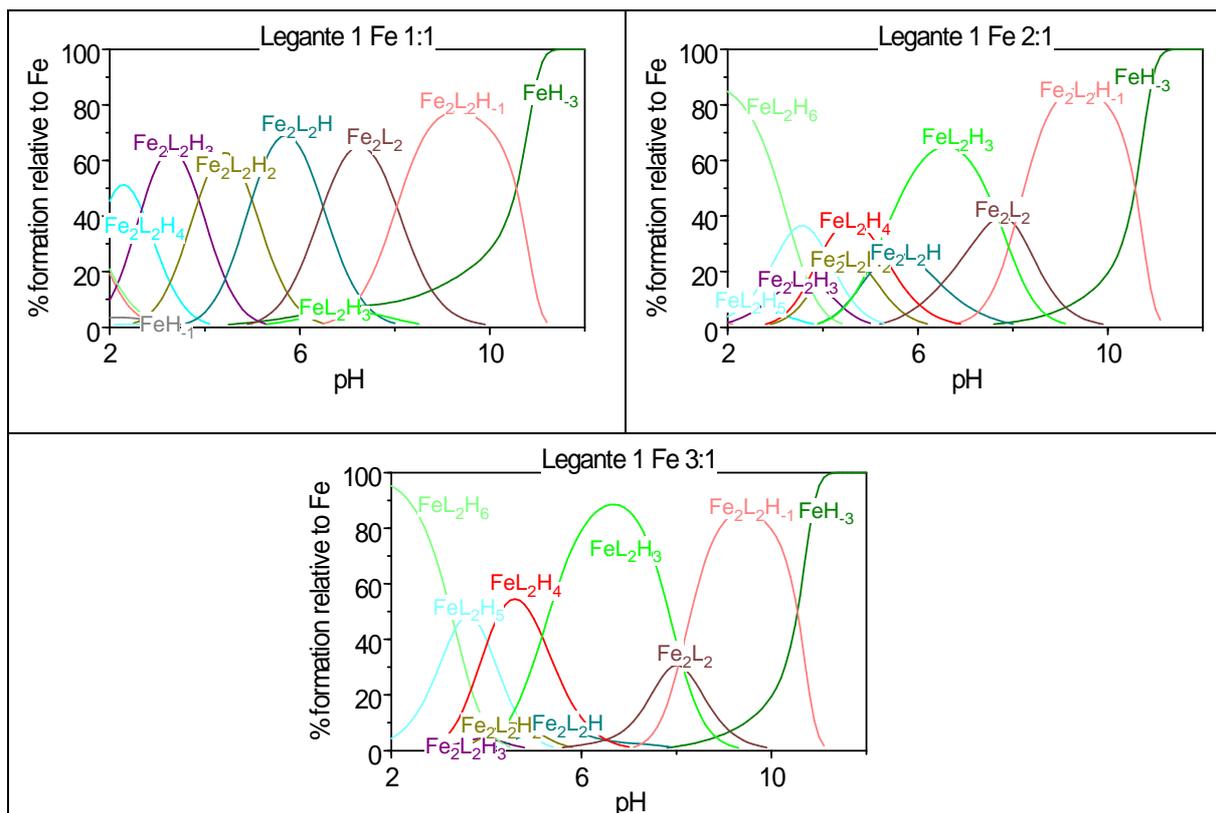


Figura 14: curve di distribuzione del legante 1 con il Fe(II) a diversi rapporti molari

Nel diagramma di distribuzione del legante 1 col ferro nel rapporto molare 2:1 e 3:1 sono presenti a basso pH le specie L/M 2:1 e a pH maggiore le specie 2:2; nel caso invece del diagramma del legante 1 col ferro nel rapporto molare 1:1 sono predominanti le specie 2:2 in tutto il range di pH. Le stesse osservazioni sono valide anche per il legante 5; mentre per i diagrammi di distribuzione del legante 2 si nota la formazione dei complessi 2:2 variamente deprotonati a partire da pH 2.

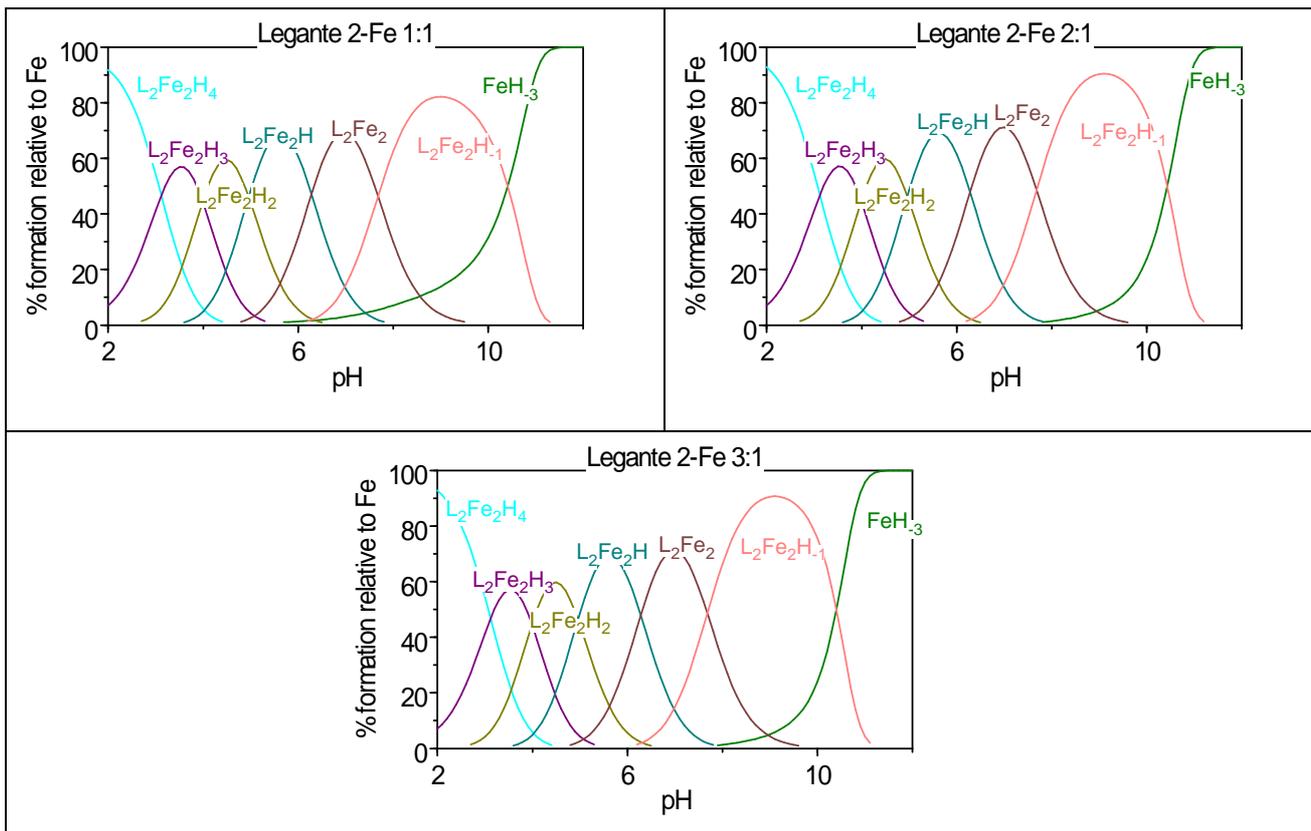


Figura 15: curve di distribuzione del legante 2 con il Fe(II) a diversi rapporti molar

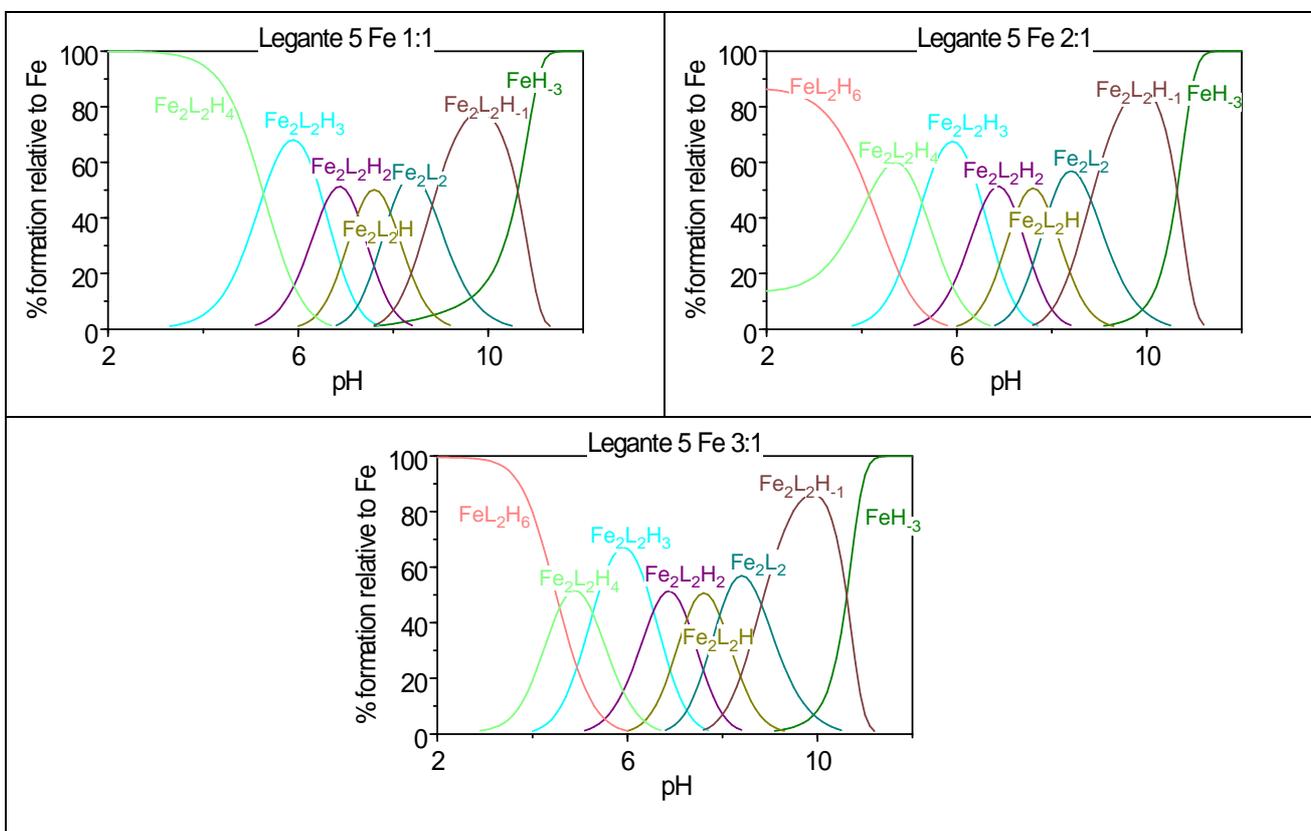


Figura 16: curve di distribuzione del legante 5 con il Fe(II) a diversi rapporti molar

Per meglio comprendere il meccanismo di complessazione di questi leganti con il ferro, è utile osservare il diagramma ipotetico di distribuzione ternario catecolo-bifosfonato-ferro, ottenuto dai singoli modelli binari Catecolo-ferro e bifosfonato-ferro, riportato in Figura 17, dove si nota come il gruppo bifosfonato coordini il ferro a pH acidi e che solo a valori di pH > 8 compaiano delle specie in cui il ferro è coordinato dal gruppo catecolico.

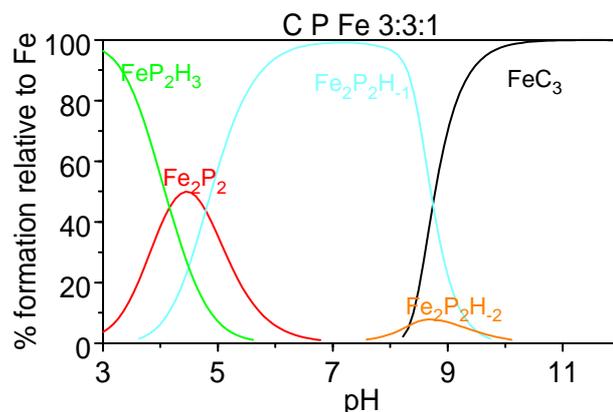


Figura 17: diagramma di distribuzione ternario del sistema catecolo-bifosfonato-Fe(III)

Dalla sovrapposizione del diagramma di distribuzione del legante 1 con il Fe(III) nel rapporto 3:1 con il profilo delle bande decomposte (Fig.18) si nota che le specie che si formano a pH acidi ($[\text{FeL}_2\text{H}_6]^+$, $[\text{FeL}_2\text{H}_5]^{-2}$, $[\text{FeL}_2\text{H}_4]^{-3}$, $[\text{FeL}_2\text{H}_3]^{-4}$), non assorbono e che l'assorbimento appare in concomitanza con la formazione della specie Fe_2L_2 dopo pH 7.

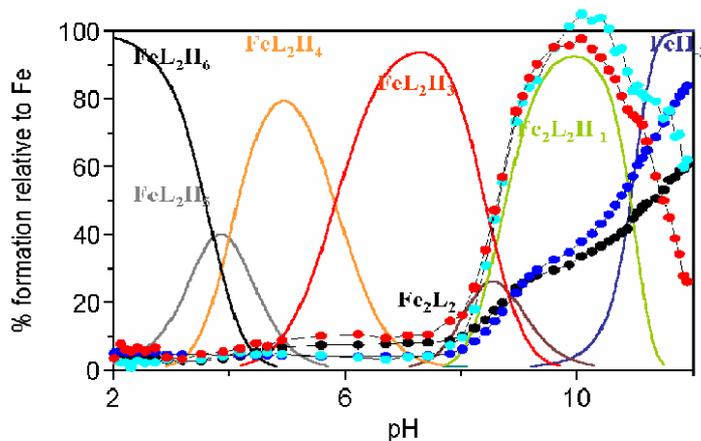


Figura 18: diagramma di distribuzione del legante 1-Fe(III) nel rapporto 3:1 sovrapposto alle bande decomposte

Dato che solamente il gruppo catecolico di questi leganti, intervenendo nella coordinazione del ferro, dà luogo a variazioni spettrali apprezzabili, se ne deduce che nei complessi $[\text{FeL}_2\text{H}_6]^-$, $[\text{FeL}_2\text{H}_5]^{2-}$, $[\text{FeL}_2\text{H}_4]^{3-}$ e $[\text{FeL}_2\text{H}_3]^{4-}$, che non assorbono, il gruppo catecolico non è coinvolto nella coordinazione del ferro e un'ipotesi di coordinazione per questi leganti può essere quella in cui il ferro è coordinato dai gruppi fosfonici delle due molecole di legante come mostrato in figura 19.

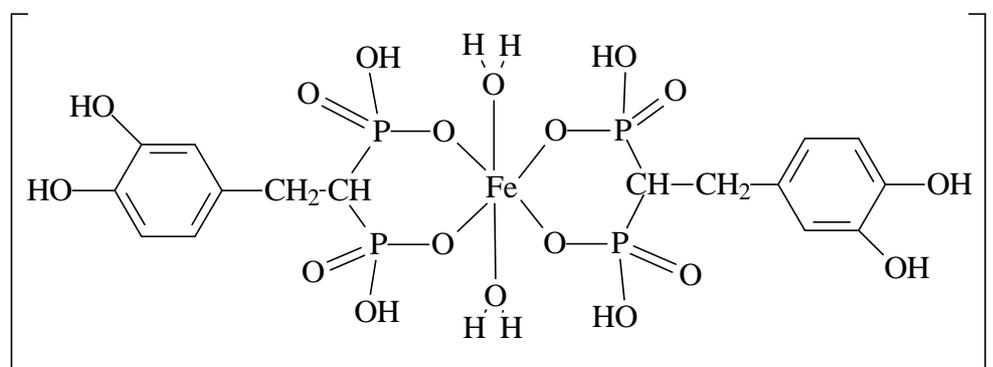


Figura 19

Dalla sovrapposizione del diagramma di distribuzione del legante 1 con il ferro nel rapporto 1:1 con le bande decomposte (Figura 20), si nota che le specie $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_4]$, $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_3]$, $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2-}$ che si formano tra pH 2 e 5 non assorbono e che vi è un assorbimento in concomitanza con la formazione della specie $\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}$ intorno a pH 5.

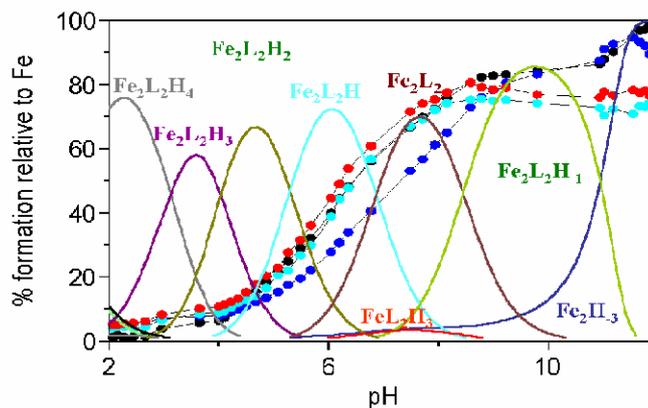


Figura 20: diagramma di distribuzione del legante 1-Fe(III) nel rapporto 1:1 sovrapposto alle bande decomposte

Nei complessi $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_4]$, $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_3]^-$, $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2-}$ il catecolo non è dunque coinvolto nella coordinazione e l'ipotesi strutturale più probabile vede i due atomi di ferro, a ponte tra due molecole d'acqua, coordinati dai gruppi fosfonati delle due molecole di legante come mostrato in figura 21.

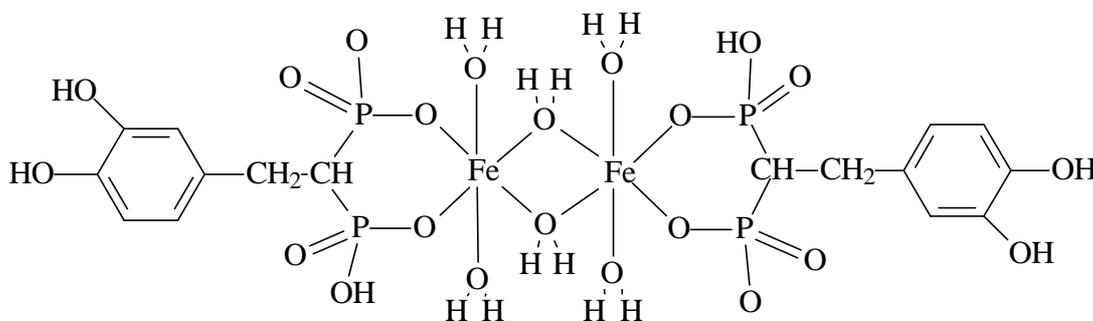


Figura 21

Al contrario, nelle specie $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}]^{-3}$, $[\text{Fe}_2\text{L}_2]^{-4}$ e $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_1]^{-5}$ che assorbono, il gruppo catecolico è ora coinvolto nella coordinazione. Nella figura 22 vengono riportate le ipotesi di coordinazione delle specie $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}]^{-3}$, $[\text{Fe}_2\text{L}_2]^{-4}$.

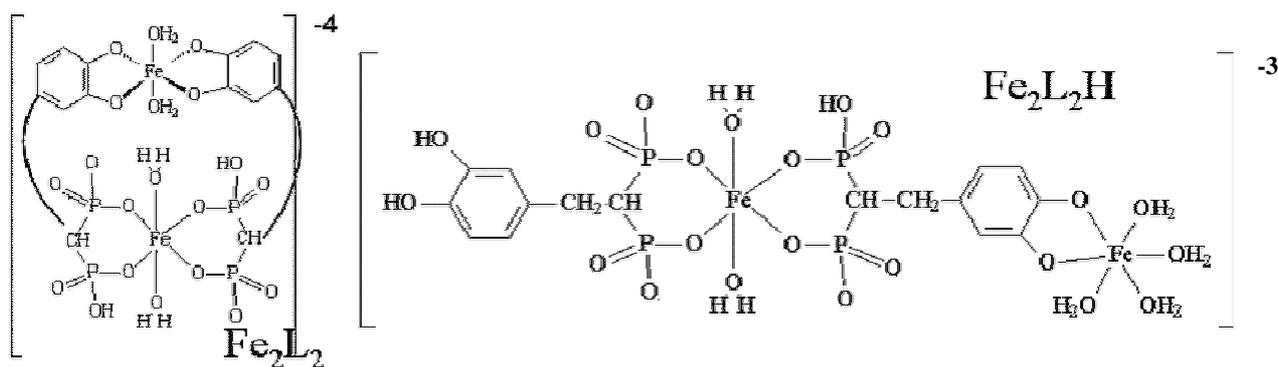


Figura 22

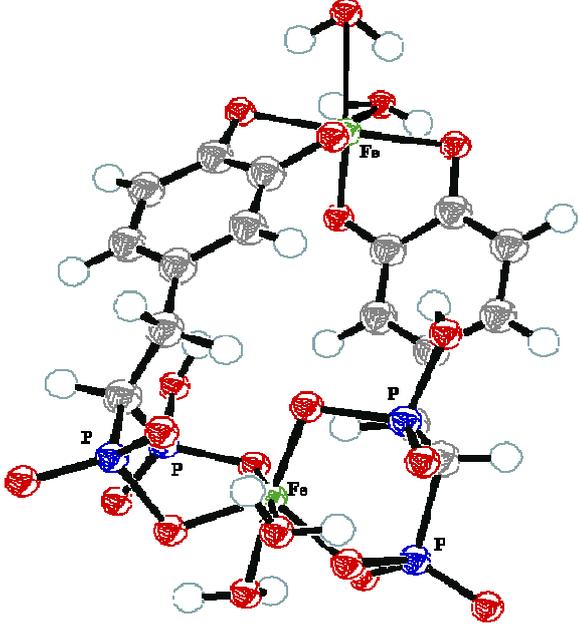
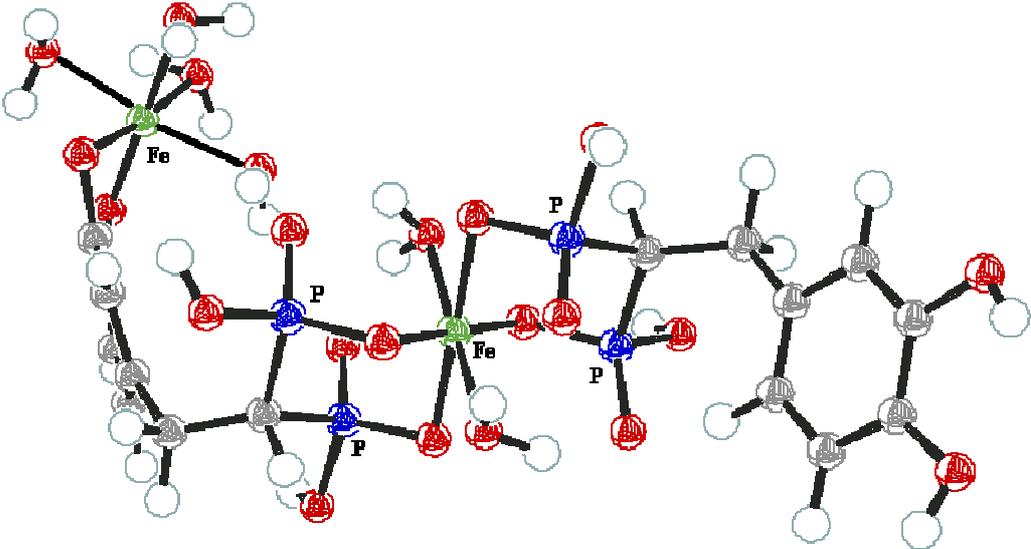
L'ipotesi di coordinazione per la specie $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}]^{-3}$ vede un ferro coordinato dai gruppi bifosfonati delle due molecole di legante e l'altro ferro coordinato dal gruppo catecolico di una molecola di legante. Questa specie può essere considerata come precursore del complesso $[\text{Fe}_2\text{L}_2]^{4-}$, laddove vengano deprotonati anche i gruppi catecolici dell'altra molecola di legante; la coordinazione della specie $[\text{Fe}_2\text{L}_2]^{4-}$, infatti, vede un ferro coordinato dai gruppi bifosfonati e l'altro ferro coordinato dai gruppi catecolici delle due molecole di legante.

5.5 Calcoli di quantomeccanica molecolare

Attraverso i calcoli di meccanica molecolare è stata prevista la geometria di coordinazione più stabile per i diversi complessi.

Per tutte le specie sono state studiate tutte le geometrie per le diverse specie e poi sono state scelte quelle che presentavano la forma più plausibile e l'energia più bassa.

Nella tabella 4 sono riportate le geometrie calcolate per i complessi $[\text{Fe}_2\text{L}_2]^{4-}$, $[\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_4]$ e $[\text{FeL}_2\text{H}_6]^-$.

Complesso	Geometria
$[\text{Fe}_2\text{L}_2]^{-4}$	
$\text{Fe}_2\text{L}_2\text{H}_4$	

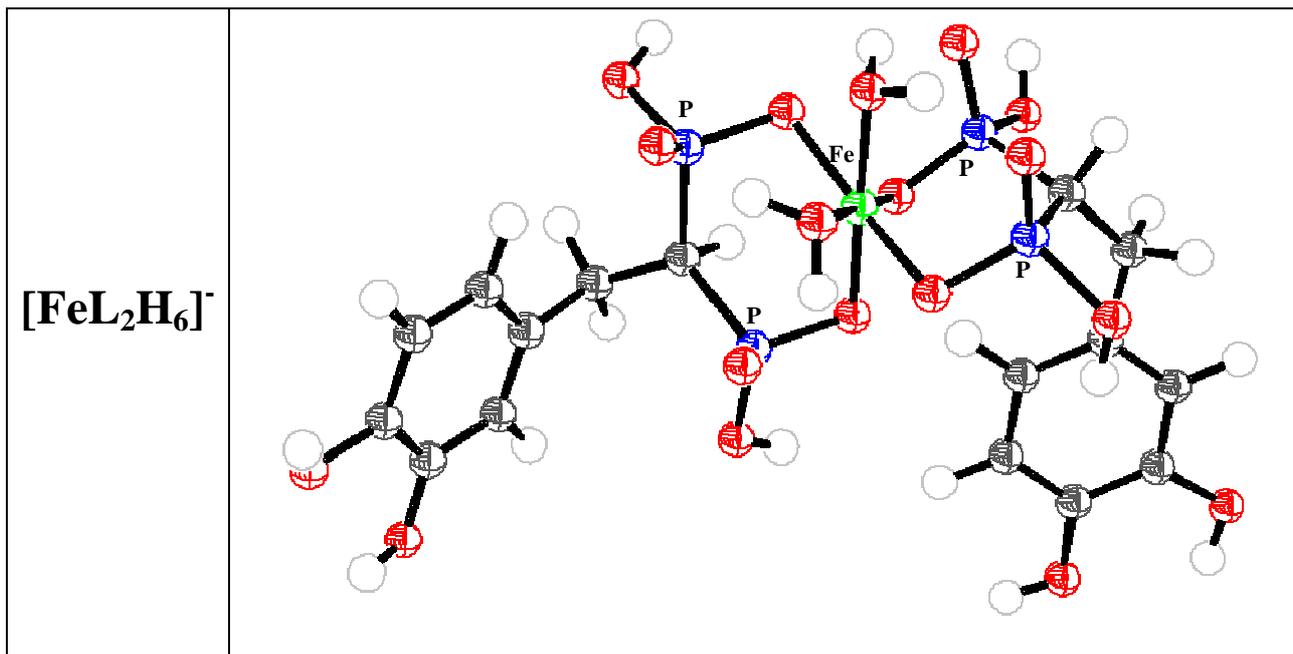


Tabella 4: geometrie calcolate per i diversi complessi

5.6 Efficacia dei leganti

Per definire oggettivamente le capacità chelanti dei leganti 1, 2 e 5 per il ferro è opportuno confrontare la concentrazione del metallo libero in presenza del legante al pH fisiologico del sangue (pH 7.4).

Nella Tabella 5 sono riportate le concentrazioni libere del metallo, espresse come pMe, logaritmo negativo della molarità, per una concentrazione di legante pari a $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ e metallo $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$ dei leganti 1, 2 e 5 e di alcuni leganti bifosfonati studiati in precedenza¹².

Legante	pFe	Legante	pFe	Legante	pFe
 1	17.9	A 	20.5	D 	17.9
 2	17.2	B 	19.8	-	
 5	17.2	C 	18.9		

Tabella 5: Valori di pM

Confrontando il valore di pFe del legante **1** con quello del legante **2** notiamo che l'introduzione di un ulteriore gruppo -OH nell'anello diminuisce il valore di pFe del legante **2** e quindi la sua capacità chelante. Questo è dovuto probabilmente all'aumentato ingombro sterico. Come si può notare dal valore inferiore di pFe del legante **5** anche l'allungamento della catena che unisce il gruppo bifosfonato al gruppo catecolico provoca un abbassamento del pFe rispetto al legante **1**.

Il legante bifosfonato semplice (**A**) ha un valore di pFe di 20.5. Questo valore è maggiore rispetto a quello degli altri leganti bifosfonati in cui l'atomo di carbonio centrale è sostituito. Infatti notiamo una diminuzione del valore di pFe (19.8) nel legante (**B**) in cui l'atomo di carbonio centrale è sostituito da un gruppo fenile,

probabilmente a causa dell'effetto induttivo e mesomero di tale sostituente. Come si può notare dal legante (C) che ha un valore di pFe di 18.9, anche l'allungamento della catena non migliora il valore di pFe. Infine notiamo che la capacità chelante del legante (D) in cui anche un atomo di fosforo porta un sostituente, in particolare il gruppo – OCH₃ che ha un forte effetto mesomero, è minore rispetto quello degli altri leganti e confrontabile con quello dei leganti catecol-bifosfonici.

Confrontando i valori di pM di tutti i leganti risulta che l'introduzione dell'anello catecolico in una molecola, contenente già un gruppo bifosfonato, influenza negativamente il valore di pFe e quindi i leganti 1, 2 e 5 presentano una capacità complessante per il Fe(III) inferiore rispetto ai leganti A, B, C e D. In realtà, osservando il diagramma di distribuzione (Figura 23) ottenuto per una concentrazione di legante **1** 1·10⁻⁵M ed una concentrazione di metallo di 1·10⁻⁶M in assenza di idrossidi (non presenti nel sangue a pH 7.4) si nota che le specie in cui il Fe è coordinato anche dal gruppo catecolico sono presenti significativamente solo dopo pH 7.4, valore di pH a cui si determina il pFe. In queste condizioni è evidente dunque che la presenza del gruppo catecolico risulti ininfluente ai fini del calcolo del pFe.

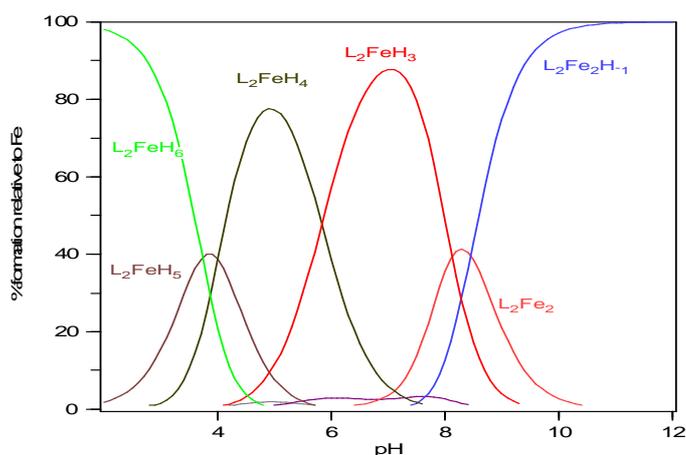


Figura 23: Diagramma di distribuzione [L]= 10⁻⁵M; [Fe(III)]=10⁻⁶M

5.7 Riferimenti bibliografici

- ¹ Jung, A; Bisaz, S.; Fleish, H., *Calcif Tissue Res.* 11, 269-280 (1973)
- ² Boduszek, B.; Dyba, M.; Bojczuk, M.J.; Kiss, T.; Kozlowski, H. *J.Chem. Soc., Dalton Trans*, 973-976 (1997)
- ³ Gummienna-Kontecka, E.; Jezierska, J.; Lecouvey, M.; Leroux, Y.; Kozlowski, H. *J. Inorg. Biochem.*, 89, 13-17, (2002)
- ⁴ Gummienna-Kontecka, E.; Silvagni, R.; Lipinski, R.; Lecouvey, M.; Marincola, F. C.; Crisponi, G.; Nurchi, V.M.; Leroux, Y.; Kozlowski, H.; *H. Inorg.Chim. Acta*, 339, 111-118 (2002)
- ⁵ Rastetter, W.H.; Erickson, T.J.; Venuti, M. C. *J Org Chem*, 46, 3579-3590 (1981)
- ⁶ Bergeron, R.J.; Kline, S.J.; Stolorich, N.J.; McGovern, K.A.; Burton, P.S. *J Org Chem.*, 46, 4524-4529 (1981)
- ⁷ Bergeron, R.J.; Stolorich, N.J.; Kline, S.J.; *J Org Chem.*, 48, 3432-3439 (1983)
- ⁸ Pu, Y.; Lowe, C.; Sailer, M.; Vederas, J. C. *J Org Chem*, 59, 3642-3655 (1994)
- ⁹ Sofen, S.R.; Abu-Dari, K.; Freyberg, D.P.; Raymond, K.N. *J Am Chem Soc*, 100, 7882-7887 (1978)
- ¹⁰ Sofen, S.R.; Cooper, S.R.; Raymond, K.N. *Inorg Chem*, 18, 1611-1616 (1979)
- ¹¹ H. Ding, G. Xu, J. Wang, Y. Zhang, X. Wu and Y. Xie, *Heteroatom Chemistry*, **15**(7), 549-555 (2004)
- ¹² Crisponi et al. *Inorg.Chim.Acta*, 339, 111 (2002)

Capitolo 6

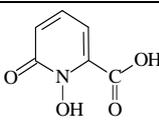
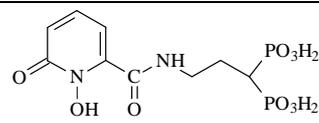
Equilibri di formazione dei complessi tra il Fe(III) ed una serie di nuovi leganti contenenti un gruppo bifosfonato ed un gruppo idrossipiridinone.

In questo lavoro sono presentate le proprietà di coordinazione verso il Fe(III) di leganti contenenti sia un gruppo bifosfonato che un idrossi-piridinone. I risultati potenziometrici e spettrofotometrici hanno permesso di stabilire che solamente il gruppo piridinone interviene nella coordinazione del Fe(III). L'alto ingombro sterico, infatti, previene la possibilità che entrambi i gruppi possano chelare lo stesso ione metallico. I calcoli di quantomeccanica molecolare confermano le previsioni permettendo così di determinare la lunghezza minima della catena di connessione dei due gruppi per ottenere una conformazione stabile del complesso, nella quale il Fe(III) è coordinato sia dal piridinone che dal bifosfonato.

6.1 Costanti di protonazione dei leganti

I leganti studiati, riportati in figura 1, sono stati preparati secondo la procedura riportata in letteratura^{1,2}.

Figura 1. Leganti, simboli e formule.

1	2
	
Acido 1-idrossi-6-osso-1,6-diidro-2-piridincarbossilico	Acido 3-[(1-idrossi-6-osso-1,6-diidro-2-piridinil)carbonil] ammino}-1-fosfonopropilfosfonico

Formattato	... [1]
Eliminato: Studio	... [2]
Formattato	... [3]
Eliminato: tra	...
Formattato	... [4]
Eliminato: idrossipiridinico	...
Eliminato: ¶	...
Eliminato: o	...
Eliminato: piridinico	...
Eliminato: ferro	...
Eliminato: ferro	...
Eliminato: 6.1 Introduz	... [5]
Eliminato:	...
Eliminato: , discusse	... [6]
Eliminato:	...
Eliminato: , mentre i lega	... [7]
Formattato	... [8]
Eliminato: 2	...
Formattato	... [9]
Eliminato: Parte sperimentale	...
Formattato	... [10]
Formattato: Italiano (Italia)	...
Formattato	... [11]
Eliminato: 6.2.1 Reagenti¶	...
Formattato	... [12]
Eliminato: letteratura ¹¹	...
Eliminato: ¹³	...
Formattato	... [13]
Formattato	... [14]
Formattato	... [15]
Formattato: Centrato	...
Eliminato: hydroxy	...
Eliminato: oxo	...
Eliminato: dihydro	...
Eliminato: hydroxy	...
Eliminato: oxo	...
Eliminato: dihydro	...
Eliminato: pyridinyl	...
Eliminato: carbonyl	...
Eliminato: phosphonop	... [16]
Eliminato: acid	...
Eliminato: pyridinecarb	... [17]
Formattato	... [18]
Formattato	... [19]

Per valutare meglio le costanti di formazione dei sistemi 1-Fe(III), 2-Fe(III) e 1-Al(III) sono state studiate potenziometricamente soluzioni aventi rapporti molari M/L 1:1, 1:2 e 1:3 ad una concentrazione costante di legante di 10^{-3} M. Le costanti di formazione acide e dei complessi sono state calcolate con il programma PSEQUAD³. La concentrazione del legante era 2.0×10^{-4} mol dm⁻³ in tutte le titolazioni.

Le titolazioni, eccetto quelle del sistema 1-Al(III), sono state seguite sia potenziometricamente che spettrofotometricamente. Le titolazioni del solo legante sono state registrate nel range spettrale 250-400 nm, mentre quelle dei complessi con il Fe(III) nel range 350-600 nm. Le costanti di formazione e gli spettri di assorbività sono stati calcolati con il programma SPECFIT⁴.

6.1.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

Gli equilibri di protonazione del legante 1, usato per la sintesi del legante misto riportato come legante 2, sono stati studiati potenziometricamente e spettrofotometricamente.

Le costanti di deprotonazione, riportate in tabella 1, mostrano un'acidità considerevole per il gruppo carbossilico (pK 2.00), e un pK 7.41 per il gruppo -NOH.

L'ultimo valore è circa 1.6 unità più alto di quello riportato in letteratura (pK 5.8) per l'1-idrossi-2(1H)-piridinone⁵ e questo può essere spiegato in termini di legami idrogeno intramolecolari che stabilizzano l'anione LH⁻ come negli acidi salicilici sostituiti. Nei fenoli sostituiti, infatti, mettendo in grafico i valori di pK del gruppo fenolico con quelli degli analoghi acidi salicilici, si osserva un andamento lineare con una retta di regressione:

$$pK_{\text{fenolo}} = 0.99 pK_{\text{salicilato}} + 3.1$$

Eliminato: ¶
6.2.2 Misure potenziometriche¶
Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Non Corsivo

Eliminato: PSEQUAD¹⁶

Eliminato: ¶

Eliminato: 6.2.3 Misure spettrofotometriche e potenziometriche¶

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Non Corsivo

Eliminato: ferro

Eliminato: SPECFIT²⁰

Eliminato: ¶

Eliminato: 6.2.5 Calcoli quantomeccanici¶

¶
I calcoli sono stati effettuati con il programma "Spartan 02" per Linux⁴⁵. La geometria dei ... [20]

Formattato ... [21]

Formattato ... [22]

Eliminato: .

Eliminato: ; le geometri ... [23]

Formattato ... [24]

Formattato ... [25]

Formattato ... [26]

Formattato ... [27]

Eliminato: 6.2.4 Misure ... [28]

Formattato ... [29]

Eliminato: .

Eliminato: il diametro ... [30]

Eliminato: Risultati e ... [31]

Formattato ... [32]

Formattato ... [33]

Eliminato: dell'acido 1- ... [34]

Eliminato:)

Eliminato: dell'acido 3- ... [35]

Eliminato: a

Eliminato: il

Formattato

Eliminato: o

Eliminato: u

Eliminato: hydroxy

Eliminato: piridinone³²

Eliminato: n

Formattato ... [36]

Formattato ... [37]

(coefficiente di correlazione $R= 0.98$ calcolato su 9 punti con un range di pK dei fenoli da 4.0 a 9.3). La pendenza praticamente unitaria implica che l'aumento di 3.1 nel pK dei fenoli può essere attribuito solo all'effetto del legame idrogeno, indipendentemente dai sostituenti. La differenza più bassa di pK trovata tra il composto **1** e l'1-idrossi-2(1H)-piridinone può essere giustificata attraverso legami idrogeni intramolecolari tra il gruppo -NOH e il gruppo carbossilico che stabilizza anche l'1-idrossi-2(1H)-piridinone.

Tabella 1. Costanti di protonazione del legante **1** e valori di letteratura per l'1-idrossi-2(1H)-piridinone.

Legante	Acido 1-idrossi-6-ossido-1,6-diidro-2-piridincarbossilico		1-idrossi-2(1H)-piridinone ⁵	
	log β	logK	log β	logK
LH	7.41(2)	7.41	5.86	5.86
LH ₂	9.41(1)	2.00	7.06	1.20

Le 5 costanti di protonazione del legante **2** sono state calcolate da titolazioni potenziometriche: quattro vanno attribuite al gruppo fosfato e una al gruppo -NOH. I loro valori sono riportati in tabella 2. Sulla base delle variazioni spettrali osservate durante la titolazione potenziometrica e spettrofotometrica del legante, possiamo attribuire il valore 5.46 alla protonazione del gruppo -NOH. Gli spettri raccolti da pH 4.0 a pH 6.5 (Figura 2 A) mostrano infatti una considerevole variazione spettrale nel range 260 ÷ 400 nm come nel composto **1** (Figura 2 B) e negli altri piridinoni.

Tabella 2. Costanti di protonazione del legante **2**.

Specie	log β	logK
LH ⁴⁻	9.66	9.66
LH ₂ ³⁻	16.93	7.27
LH ₃ ²⁻	22.39	5.46
LH ₄ ⁻	24.78	2.39
LH ₅	~25.78	~1

Eliminato: ¶

Eliminato: d

Eliminato: hydroxy

Eliminato: pyridinone

Eliminato: hydroxy

Eliminato: pyridinone

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato: hydroxy

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato: pyridinone

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato: 1-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyridinecarboxylic acid

Formattato: Non Apice / Pedice

Eliminato: hydroxy

Eliminato: pyridinone³²

Tabella formattata

Eliminato: ,

Eliminato: 4

Eliminato: possono essere

Eliminato: solo

Eliminato: figura

Eliminato: sulla

Eliminato: 1

Eliminato: 1

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Centrato

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Allineato a sinistra

Formattato ... [38]

Formattato ... [39]

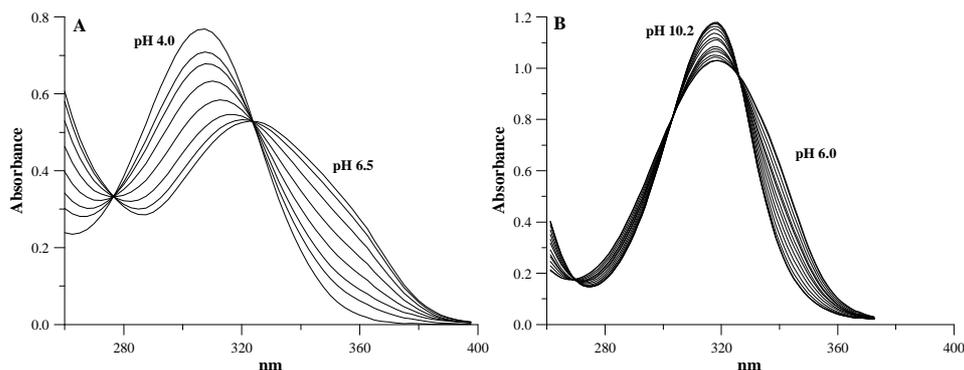
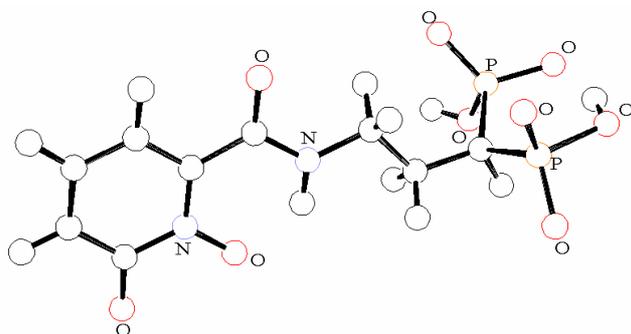


Figura 2 Spettri raccolti durante le titolazioni spettrofotometriche di (A) legante 2 (pH 4.0 ÷ 6.5) e (B) del legante 1 (pH 6.0 ÷ 10.2).

Il valore di 5.46 della deprotonazione del gruppo $-\text{NOH}$ (più basso non solo di quello del legante 1 ma anche dell'1-idrossi-2(1H)-piridinone, anche se parte da una molecola carica 2-), può essere giustificata dalla stabilità delle specie LH_2^{3-} dovuta al legame idrogeno (1.81\AA) tra il gruppo $-\text{NO}^-$ e il gruppo $-\text{NH}$ nella catena laterale, che si può osservare nella struttura dello schema 1 relativa all'isomero con la più bassa entalpia di formazione.



Schema 1. Struttura ottenuta da SPARTAN'02⁶ con metodi semi-empirici usando in set di base PM3. L'entalpia di formazione era -719.578 Kcal/mol rispetto a -360.820 per la struttura con l'energia più bassa senza il legame idrogeno NO-NH.

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Centrato, Rientro: Sinistro: 0 cm, Prima riga: 0 cm

Eliminato: 1

Eliminato: .

Eliminato: ligante

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato: ,

Eliminato:

Eliminato: hydroxy

Eliminato: y

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato: usanso

Eliminato: l'entalpia

Eliminato:

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

6.2 Complessi del Fe(III) e dell'Al(III) con il legante 1

6.2.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

La formazione dei complessi del Fe(III) del legante 1 è stata studiata potenziometricamente e spettrofotometricamente. Gli spettri sono stati raccolti titolando una soluzione contenente il Fe(III) ed il legante nel range di pH $-0.2 \div 2.6$ con acido cloridrico e nel range $2.6 \div 10.4$ con KOH. Anche nello studio della formazione dei complessi del Fe(III) con il legante 2 gli spettri sono stati registrati nel range di pH $-0.2 \div 2.6$ durante la titolazione acida e tra $2.6 \div 10.6$ durante la titolazione basica. I dati analizzati con l'Evolving Factor Analysis⁴ mostrano tre specie differenti attribuibili ai complessi FeL, FeL₂ and FeL₃ i cui spettri in ϵ sono riportati in figura 2 per il legante 1 e in figura 6 per il legante 2.

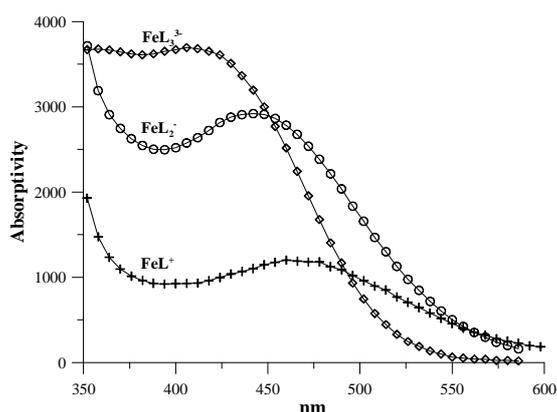


Figura 2: spettri di assorbività delle tre specie ottenute dall'EFA per il sistema Fe(III)-1, attribuite ai complessi FeL⁺, FeL₂ and FeL₃.

La costante di formazione per la specie FeL nel legante 1 è stata stimata dalla titolazione acida attraverso il metodo dei minimi quadrati col programma SPECFIT. Tenendo fisso questo valore, le costanti di formazione per i complessi FeL₂ e FeL₃ sono

Eliminato: ¶

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Grassetto

Eliminato: 6.4

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt

Formattato: Giustificato, Nessun elenco puntato o numerato, Tabulazioni: 1.31 cm, Tabulazione elenco

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Giustificato

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt

Eliminato: ¶

¶
¶
¶
¶
¶
¶
¶

Studio degli equilibri della formazione dei complessi tra Fe(III) e Al(III) con l'acido 1-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyridinecarboxylic acid (1)¶

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Non Corsivo

Eliminato: ¶

Eliminato: ferro(III)

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Grassetto

Eliminato: cloridrico

Eliminato: ferro(III)

Eliminato: ,

Eliminato: Analysis²⁰

Eliminato: di assorbività

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Centrato

Formattato ... [40]

Formattato ... [41]

Formattato ... [42]

Formattato ... [43]

state determinate dai dati potenziometrici con il programma PSEQUAD. I valori delle costanti insieme a quelli del 1-idrossi-2(1H)-piridinone sono riportati in tabella 3.

Tabella 3. costanti di formazione dei complessi del Fe(III) log β

	<u>1</u>	1-idrossi-2(1H)-piridinone ⁵	
FeL	10.51(3)	¹⁷ 10.61	¹⁰ 10.3
FeL ₂	19.90(4)	20.11	19.3
FeL ₃	26.96(4)	27.11	26.9
pFe	16.6	17.6	17.4

Il legante 1 potrebbe coordinare il Fe(III) attraverso il gruppo -NO₂ e carbossilico, come nel 1-idrossi-2(1H)-piridinone, o come nel salicilato attraverso il gruppo -NO₂ e carbossilato. I picchi, centrati a 470, 445 e 410 nm sono simili a quelli del complesso FeL a 470 nm ($\epsilon = 1750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), del FeL₂ at 447 nm ($\epsilon = 3120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e del FeL₃ at 412 nm ($\epsilon = 4310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), riportati da Scarrow¹⁰ per l' 1-idrossi-2(1H)-piridinone o a 468 nm ($\epsilon = 1390 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 445 nm ($\epsilon = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 408 ($\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) riportati da Li⁷. Ogawa⁸, al contrario, riporta per i complessi del salicilato una banda a 520 nm per il FeL che si sposta a 470 nm per la specie FeL₂. Dai dati spettrali e in accordo con i valori delle costanti di stabilità della letteratura, possiamo assumere che il legante 1 coordina il Fe(III) attraverso il gruppo -NO₂ e il gruppo carbossilico. Il valore di pFe di 16.6, calcolato dai dati della tabella 3, è più basso del pFe dell'1-idrossi-2(1H)-piridinone a causa dell'alto valore della costante di deprotonazione del gruppo -NOH.

Per confermare il modello di coordinazione proposto, è stato fatto uno studio potenziometrico e NMR sul sistema legante 1-Al(III). I dati potenziometrici ottenuti sono stati fittati con il modello e con le costanti di stabilità riportati nella tabella 4.

Eliminato: hydroxy

Eliminato: pyridinone

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Centrato

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Apice

Formattato: Apice

Eliminato:

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto, Apice

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Pedice

Eliminato: s

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Non Apice / Pedice

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Centrato

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

Tabella 4. Costanti di formazione dei complessi dell'Al(III) con il legante 1

Specie	1	1-idrossi-2(1H)-piridinone ⁷
AlL	10.06(6)	8.16
AlL ₂	17.63(4)	15.54
AlL ₃	23.36(4)	21.59
pAl	13.4	12.2

6.3.2 Misure NMR

Negli spettri ¹H NMR del legante 1 a pH 1, dove esiste solamente la specie LH₂ si possono notare tre gruppi di segnali differenti. (Figura 3).

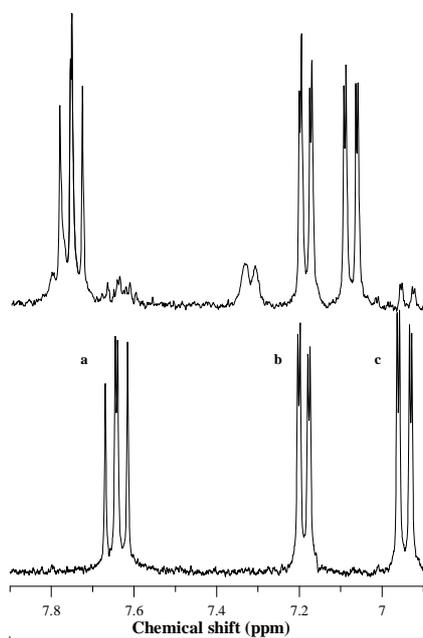


Figura 3. Spettri ¹H NMR a pH 1 del Ligand 1, puro (sotto) e della soluzione, Al/L 1:1 (sopra).

Dall'analisi degli spettri NMR, sulla base della molteplicità dei segnali, solo il quadrupletto (a) a campi bassi (7.6 ppm) può essere attribuito univocamente a H4. A pH 5, la perdita del protone carbossilico produce un moderato shift a campi alti di tutti i tre gruppi di segnali (figura 4).

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Interlinea doppia

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia), Pedice

Formattato: Italiano (Italia)

Codice campo modificato

Formattato: Francese (Francia)

Formattato ... [44]

Formattato ... [45]

Formattato ... [46]

Formattato ... [47]

Formattato ... [48]

Formattato: Centrato

Eliminato: e

Formattato ... [49]

Formattato ... [50]

Formattato ... [51]

Formattato ... [52]

Formattato ... [53]

Formattato ... [54]

Formattato ... [55]

Formattato ... [56]

Formattato ... [57]

Formattato ... [58]

Formattato ... [59]

Formattato ... [60]

Eliminato: .

Formattato ... [61]

Formattato ... [62]

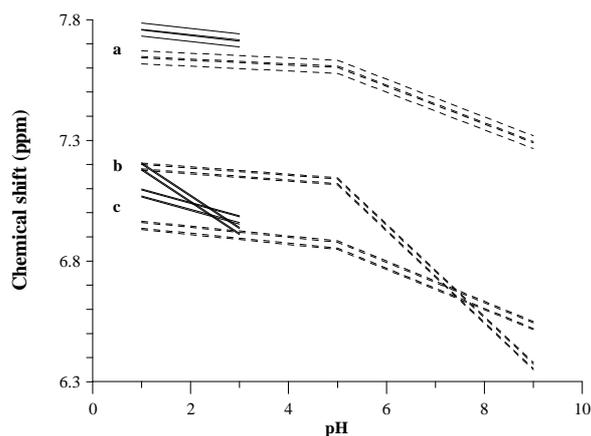
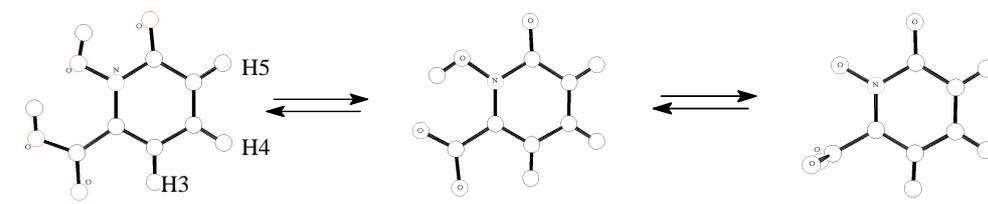


Figura 4 grafico del ^1H chemical shifts in funzione del pH del legante **1** (linea tratteggiata) e del complesso del legante **1** con l' Al(III) nel rapporto molare 1:1 (linea continua).

A pH 9, dopo la deprotonazione del gruppo $-\text{NOH}$, è evidente un'ulteriore shift a campi alti che è più marcato per il segnale c. In accordo con lo schema 2, la deprotonazione del gruppo $-\text{COOH}$ non esercita una variazione apprezzabile di chemical shift sui tre segnali, in quanto il suo effetto è ripartito tra i tre protoni.



Schema 2. Equilibrio di deprotonazione del legante **1**. Strutture ottenute con SPARTAN'02 con metodi semi-empirici usando i set di base AM1/SN2.

Il secondo protone che viene perso è l' H3 , e perciò il segnale b, può essere attribuito ad esso. Lo spettro del legante **1** a pH 1 in presenza di una concentrazione equimolare di Al(III) , presenta segnali separati del legante complessato e di quello libero (figura 3 parte superiore e figura 4); i segnali del protone H5 e di quello H4 nella forma complessata, si trovano a campi più bassi rispetto ai segnali del legante libero, mentre il segnale del protone H3 rimane invariato. Questo può essere spiegato assumendo che

Formattato: Centrato

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Centrato

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto, Italiano (Italia)

Eliminato: .

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato:

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato ... [63]

Formattato ... [64]

Formattato ... [65]

Formattato ... [66]

Formattato ... [67]

Formattato ... [68]

l'Al(III) venga coordinato dal gruppo carbonilico e dal gruppo -NO₂, essendo il gruppo carbossilico ancora protonato. A pH 3, la stessa soluzione Al/L 1:1 mostra uno shift a campi alti di tutti i segnali; questo spostamento è più marcato per il segnale del protone H3. Questo è in linea con le osservazioni precedenti del legante libero: infatti la perdita del protone del gruppo -COOH, non essendo più possibile che si instaurino legami idrogeno intramolecolari, esercita i suoi effetti in maniera maggiore sul protone H3. Nello stesso spettro, è presente una terza serie di segnali, non visibili a differenti valori di pH e a differenti rapporti molari, che potrebbe essere attribuita ad una piccola percentuale di legante coordinato dal gruppo carbossilico.

Gli spettri delle soluzioni aventi rapporti molari Al(III)/L 1:2 e 1:3, a pH 4 e a pH 6 rispettivamente (dove, in accordo con le curve di distribuzione, esisterebbero perlopiù le specie AlL₂ e AlL₃ completamente formate), non presentano nessun segnale del legante libero, ma sono difficili da interpretare per l'elevata sovrapposizione dei segnali dei protoni H3 e H5. Non si nota nessuna differenza rilevante per quanto riguarda invece il complesso 1:1. L'informazione essenziale ricavata dallo studio NMR del sistema Al(III)-legante 1 è l'esistenza significativa di una specie protonata 1:1(AlLH), che non era stato possibile determinare con la potenziometria e che potrebbe essere realistico pensare possa esistere anche nei complessi del Fe(III).

6.3 Studio degli equilibri della formazione dei complessi tra Fe(III) e il legante 2

6.3.1 Misure potenziometriche e spettrofotometriche

Le tre specie ricavate con l'Evolving Factor Analysis per il sistema Fe(III)-legante 2 sono state attribuite ai complessi FeL, FeL₂ e FeL₃. Dall'unione dell'analisi dei dati

Formattato: Apice

Eliminato: ,

Eliminato: salicilico

Eliminato: ,

Formattato: Pedice

Formattato: Pedice

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Formattato: Struttura + Livello:2 + Stile numerazione: 1, 2, 3, ... + Comincia da:3 + Allineamento: A sinistra + Allinea a: 0 cm + Tabulazione dopo: 0.63 cm + Rientra di: 0.63 cm

Eliminato: 6.

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt

Eliminato: 5

Eliminato:

Formattato: Interlinea doppia

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Non Grassetto, Non Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Pedice

Formattato: Pedice

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

potenziometrici e spettrofotometrici, sono state stimate le costanti di formazione dei complessi 1:1, 2:1 e 3:1 a vari gradi di protonazione che sono riportate in tabella 5.

Tabella 5. Costanti di formazione del Fe(III) con il legante 2

Specie	Log β	Log K
FeLH ₂	29.83	
FeL ₂ H ₄	53.70	
FeL ₃ H ₅	72.56	
FeL ₃ H ₃	58.42	7.07
FeL ₃ H	40.70	8.86
pFe	19.3	

Le curve di distribuzione calcolate sulla base di queste costanti, sono riportate in figura 5, sovrapposte a quelle ottenute con l'EFA. È chiaro che, i complessi FeL₃ variamente deprotonati non possono essere differenziati dal solo punto di vista spettrale.

Gli spettri in ϵ riportati in figura 6 assomigliano a quelli dei complessi del legante 1 con il Fe(III) (figura 2). Da questa osservazione e dal fatto che la formazione dei composti FeL₃ implica che il legante 2 si comporti come un legante bidentato, è possibile dedurre che il legante 2 coordini il Fe(III) solamente attraverso il gruppo piridinone.

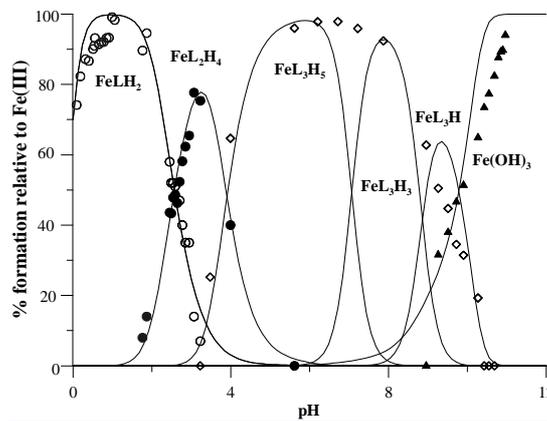


Figura 5. Curve di distribuzione per il sistema Fe(III)-2, calcolato con le costanti della tabella 2 e 5, con sovrapposte le curve di distribuzione ottenute dall'EFA in una scala arbitraria.

Eliminato: ¶
¶

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Centrato

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto, Non Corsivo

Formattato: Interlinea doppia

Formattato: Pedice

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Pedice

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Centrato

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto, Non Corsivo

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Sporgente: 1.59 cm, Interlinea singola

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato: .

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

Il valore di pFe di 19.3 del composto **2** è tre ordini di grandezza maggiore di quello del legante **1** e due ordini di grandezza più grande di quello del 1-idrossi-2(1H)-piridinone. Questo può essere spiegato sia per il valore più basso della costante di ionizzazione sia per la stabilizzazione dovuta alle interazioni della catena laterale carica con le molecole del solvente.

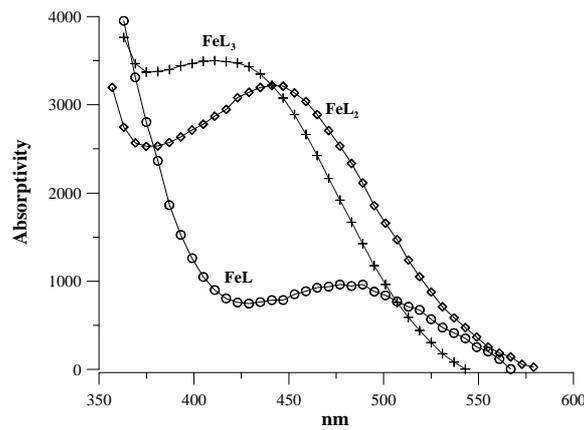


Figura 6 Spettri di assorbività delle tre specie ottenute dall'EFA per il sistema Fe(III)-2. Attribuiti ai complessi FeL , FeL_2 and FeL_3 a differenti gradi di protonazione.

Il diagramma di distribuzione in Figura 7 mostra che sotto pH 8 l'1-idrossi-2-piridinone è un legante molto più efficace dell'acido bifosfonico.

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Prima riga: 0 cm

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Rientro: Sinistro: 0.32 cm, Prima riga: 0 cm, Interlinea doppia

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Eliminato: .

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Interlinea doppia

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

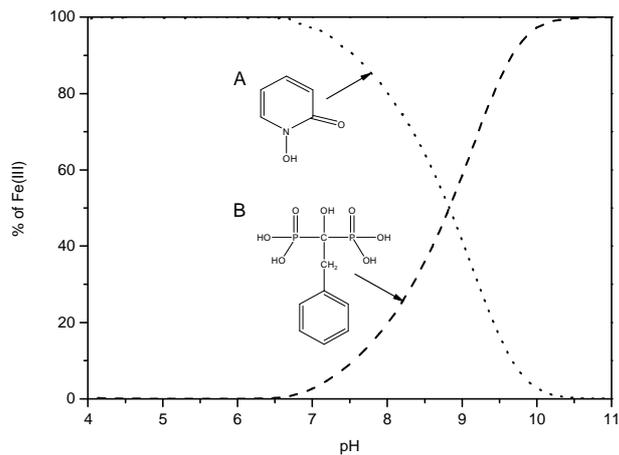


Figura 7. Profili di distribuzione delle frazioni complessate di Fe(III) in presenza dei leganti 1-idrossi-2-piridinone³² (A) (linea con puntini) acido 1-benzil-1-idrossimetilene-1,1-bifosfonico⁷ (B) (linea tratteggiata). Il rapporto molare Fe(III):A:B era 1:3:3.

6.3.2 Calcoli di quantomeccanica molecolare

Per confermare le deduzioni spettroscopiche e per ottenere informazioni strutturali, sono state calcolate con SPARTAN'02 le strutture aventi la più bassa entalpia. Prendiamo in considerazione tutti i possibili isomeri di ogni complesso del Fe(III) riportati in tabella 5, legati sia dal gruppo piridinone che da quello fosfato. Nel caso della specie $FeLH_2$, l'isomero più stabile sembra essere quello nel quale il Fe(III) è coordinato dal gruppo carbonilico e $-NOH$, e da quattro molecole d'acqua che formano legame idrogeno con i gruppi fosfati terminali (struttura A nello schema 3).

Lo stesso genere di coordinazione si trova per la specie FeL_2H_4 (struttura B in Schema 3) e nei complessi FeL_3 variamente deprotonati (struttura C nello Schema 3). Si deve notare, che nella specie FeL_2H_4 , come in quella FeL_2H_2 , le molecole del legante sono

Formattato: Centrato, Interlinea doppia

Eliminato: .

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto

Eliminato:

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato ... [69]

Formattato ... [70]

Formattato ... [71]

Formattato ... [72]

Formattato ... [73]

Formattato ... [74]

Formattato: Interlinea doppia

Formattato ... [75]

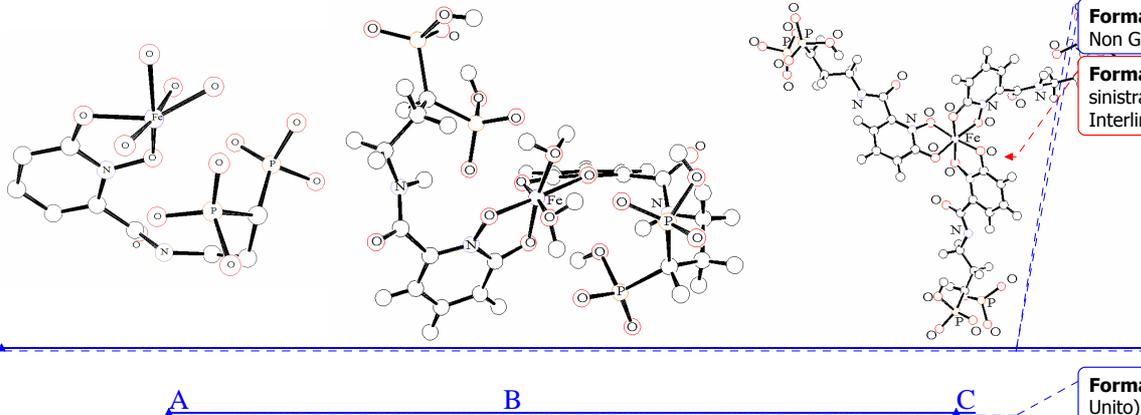
Formattato ... [76]

Formattato: Pedice

Formattato ... [77]

Formattato ... [78]

stabilizzate in una conformazione piegata per il legame idrogeno dei gruppi fosfato con il Fe(III) coordinato da molecole d'acqua. Nei complessi FeL_3H_n i fosfati terminali si trovano lontano dal Fe(III) per disperdere la loro carica negativa.



Schema 3. Strutture con l'entalpia più bassa, di $FeLH_2$ (A), FeL_2H_4 (B) and FeL_3H (C).

La severa torsione, dovuta alla breve lunghezza della catena di connessione dei due gruppi (2 atomi di carbonio), impedisce la coordinazione del Fe(III) da entrambi i gruppi piridinone e fosfato e rende evidente che è necessaria una catena più lunga per questo genere di coordinazione. Si è calcolato perciò la più bassa entalpia per gli isomeri $FeLH_2$, $FeLH$ e FeL dove il Fe(III) è coordinato dal gruppo piridinone (come nello schema 4 A) o sia dal gruppo piridinone che da quello fosfato (Schema 4 B), per leganti ipotetici aventi nella catena 3 o 4 atomi di carbonio.

Formattato: Alzato 25 pt

Formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: Allineato a sinistra, Destro -2.46 cm, Interlinea doppia

Formattato: Inglese (Regno Unito)

Formattato: Inglese (Regno Unito)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Italiano (Italia)

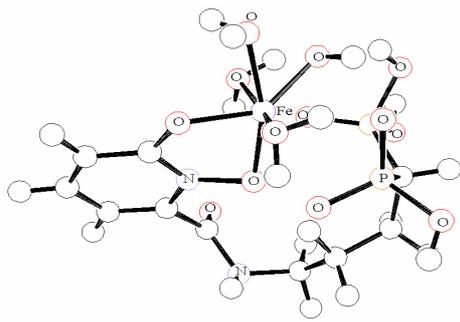
Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

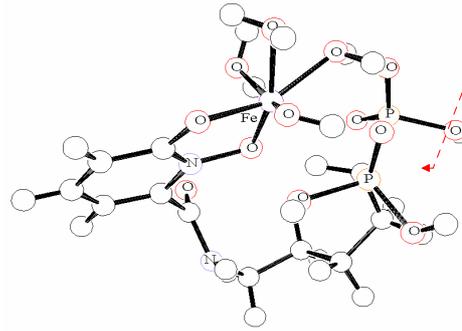
Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Prima riga: 0 cm, Interlinea doppia

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

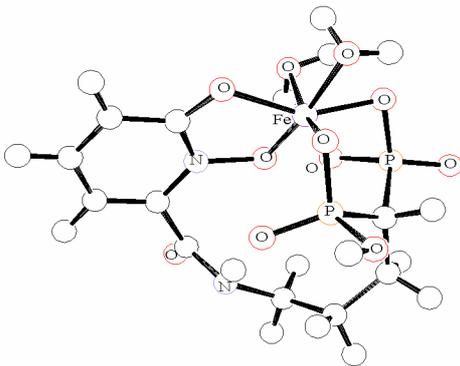
Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm



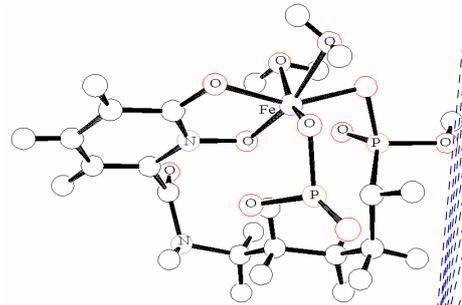
A



AI



B



B1

Schema 4. Strutture aventi l'entalpia più bassa dei complessi FeL_3 , coordinati solamente dal piridinone (A), e dei complessi FeL_3 , coordinati sia dal piridinone che dal gruppo fosfato (B). La catena di connessione è costituita da 3 gruppi $-CH_2$ nei leganti di sinistra e da 4 nei leganti di destra.

I valori di entalpia per i complessi in cui il $Fe(III)$ è coordinato solo dal piridinone (A) o sia dal piridinone che dal fosfato (B), non permettono di fare una considerazione chiara, a causa del contributo marcato a queste entalpie di vari fosfati protonati e delle molecole d'acqua di coordinazione. Tuttavia, dallo schema 4, è evidente che il gruppo fosfato nella struttura A (come mostrato nello schema 3), stabilizza il complesso attraverso i legami idrogeno con le molecole d'acqua coordinate, ma quando la catena di connessione è più lunga (tre o quattro gruppi $-CH_2$) i gruppi fosfati possono facilmente coordinare il $Fe(III)$ con la struttura non distorta B. Perciò l'aggiunta di un gruppo $-CH_2$

Formattato: Destro -1.51 cm

Formattato: Inglese (Regno Unito)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia), Non Apice / Pedice

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Prima riga: 0 cm

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Prima riga: 0 cm, Interlinea doppia

Formattato: Pedice

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

nel legante 1 utilizzato in questo lavoro darebbe luogo ad un efficace legante tetradentato.

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

La complessazione dell'Al(III) è stata studiata anche per il legante 2 con misure potenziometriche e NMR. Il modello di complessazione, calcolato potenziometricamente, e riportato nella tabella 6, appare simile a quello riportato per il Fe(III).

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Eliminato: ,

Tabella 6 Costanti di formazione dell'Al(III) con il legante 2

Specie	Log β	Log K
AlH ₂	35.5	
Al ₂ H ₄	55.9	
Al ₃ H ₅	70.4	
Al ₃ H ₃	56.5	6.95
Al ₃ H	38.4	9.05
pAl	19.3	

Eliminato: .

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Prima riga: 0 cm, Interlinea doppia

6.3.3 Misure NMR

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt

I segnali ¹H NMR del piridinone, appaiono simili a quelli presentati per il composto 1 con l'analogia dipendenza dal pH (figura 8), eccetto per il protone H3 che mostra uno shift a campi bassi con il pH, in linea con la formazione del legame idrogeno mostrato nello Schema 1 tra i gruppi -NO⁻ e -NH nella catena laterale, dopo la deprotonazione del gruppo -NOH. Si osservano anche un tripletto a circa 3.7 ppm dovuto al CH₂ vicino al gruppo NH e un multipletto a circa 2.2 ppm dovuto al secondo CH₂ e al CH.

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Pedice

Formattato: Pedice

Queste ultime bande non sono prese in considerazione durante la complessazione dell'Al(III) in quanto la sovrapposizione dei segnali rende difficoltosa la loro interpretazione.

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

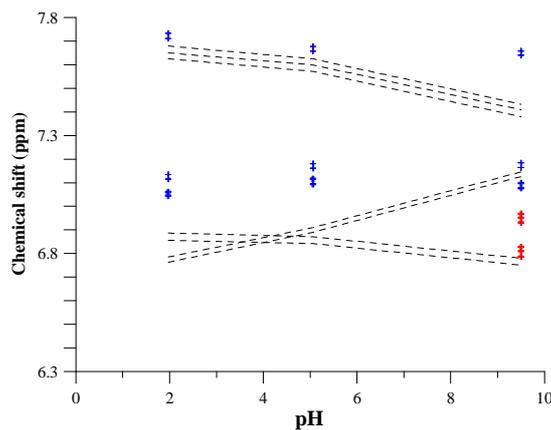


Figura 8. Chemical shifts degli spettri ^1H NMR in funzione del pH del solo legante **2** (tratteggio) e del legante **2** complessato in soluzioni 1:3 Al/L (0.01 M) (punti).

Gli spettri delle soluzioni Al-legante **2** presentano segnali separati per la forma libera o complessata del legante, i segnali della forma complessata si trovano sempre a campi più bassi rispetto a quelli del legante libero. Si possono osservare 2 forme differenti di complessi; una ha l'intensità del segnale molto bassa; la più intensa è stata assegnata al complesso AlL_2 sulla base della sua intensità doppia rispetto al segnale del legante libero e quella di intensità più bassa è stata attribuita al complesso AlL , in accordo con il grafico di distribuzione ottenuto dai dati della tabella 6. Gli spettri ottenuti a pH 5, confermano la formazione completa della specie AlL_3 , con un chemical shift debolmente differente da quelli del AlL_2 (figura 8); dev'essere rimarcato che in questa situazione di scambio lento, le forme di differenti rapporti molari Al/L danno segnali separati, mentre quelli con lo stesso rapporto molare ma con un differente grado di protonazione danno solo un set di segnali aventi chemical shift variabile. Gli spettri ottenuti a pH 9, presentano insieme ai segnali di AlL_3 , quelli del legante puro e nuovi segnali a campi alti rispetto a quelli dell' AlL_3 ; la presenza dei segnali del legante puro è dovuta alla diminuzione della disponibilità di Al(III) per la complessazione a causa della

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Non Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto, Inglese (Regno Unito)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Inglese (Regno Unito)

Eliminato: .

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Prima riga: 0 cm, Interlinea doppia

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Eliminato: .

Formattato: Pedice

Eliminato: .

Formattato: Pedice

Formattato: Pedice

Formattato: Pedice

Formattato: Pedice

Eliminato:

Formattato: Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Formattato: Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

formazione degli idrossidi, mentre le altre bande sono state assegnate ad una percentuale di legante coordinato dal gruppo bifosfonato; questa coordinazione ha un effetto limitato sul protone H5 del piridinone, mentre produce uno shift notevole a campi alti del segnale dell'H3 presumibilmente in quanto ora non è più possibile nel legante complessato il legame idrogeno tra i gruppi -NO⁻ e -NH.

6.4 Riferimenti Bibliografici

- ¹ [T. Bailly, R. Burgada, T. Prange, M. Lecouvey, *Tetrahedron Letters*, **44**, 189-192\(2003\).](#)
- ² [T. Bailly, R. Burgada, *CR Acad. Sci. Ser. II*, **1**, 241-245\(1998\).](#)
- ³ [L. Zekany and I. Nagypal, in D.J. Legget \(ed\) *Computational methods for the determination of formation constants*, Plenum Press, New York 1985, Ch.8](#)
- ⁴ [H. Gampp, M. Maeder, Ch.J. Meyer and A.D. Zuberbuhler, *Talanta*, **32**, 1333 \(1985\); *ibid.*, **33**, 943 \(1986\); *Anal. Chim. Acta*, **193**, 287 \(1987\)](#)
- ⁵ [Y. Li and A. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **214**, 103 \(1993\)](#)
- ⁶ [SPARTAN'02 for LINUX, Wavefunction, Inc.](#)
- ⁷ [Y. Li and A. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **214**, 103 \(1993\)](#)
- ⁸ [K. Ogawa, N. Tobe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **39**, 223-27\(1966\)](#)

Eliminato: ¶
¶
¶

Eliminato: 6

Eliminato:

Formattato: Tipo di carattere: 14 pt, Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Interlinea doppia

Formattato: Spagnolo (Spagna - Ordinamento alfabetico moderno)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Spagnolo (Spagna - Ordinamento alfabetico moderno)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Spagnolo (Spagna - Ordinamento alfabetico moderno)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Normale, Interlinea doppia

Formattato: Giustificato, Interlinea doppia

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Interlinea doppia

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Italiano (Italia)

Formattato: Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, Sporgente 1.59 cm

Formattato ... [79]

Formattato ... [80]

Pagina 1: [1] Formattato	Miriam	27/11/2006 18.59.00
---------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 18 pt

Pagina 1: [2] Eliminato	Crisponi	29/11/2006 17.40.00
--------------------------------	-----------------	----------------------------

Studio potenziometrico e spettrofotometrico degli equilibri

Pagina 1: [3] Formattato	Miriam	27/11/2006 18.59.00
---------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 16 pt

Pagina 1: [4] Formattato	Miriam	27/11/2006 18.59.00
---------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 16 pt

Pagina 1: [5] Eliminato	Crisponi	04/12/2006 15.35.00
--------------------------------	-----------------	----------------------------

6.1 Introduzione

La terapia chelante è necessaria per raggiungere una condizione bilanciata di ferro¹ nell'organismo dei pazienti con la β -thalassaemia, che richiedendo una periodica trasfusione di sangue per prevenire l'anemia², sono affetti da un sovraccarico di ferro. I problemi che i due farmaci attualmente utilizzati nella terapia clinica, desferal e deferiprone sono stati ampiamente discussi^{3, 4, 5} e questo rende necessario e urgente la ricerca di nuove molecole che abbiano una capacità chelante efficace.

Le caratteristiche di un chelante ideale del ferro

Pagina 1: [6] Eliminato	Crisponi	04/12/2006 15.35.00
--------------------------------	-----------------	----------------------------

, discusse estesamente in letteratura, sono riassunte in un recente lavoro di Hider⁶. In questo studio i leganti bifosfonati sono presentati come chelanti molto promettenti nei quali il sistema di legante P-C-P ha una bassa tossicità, alta termostabilità ed è anche resistente alla degradazione enzimatica⁷. Nonostante i loro limiti di assorbimento, causati dall'alta idrofilicità, i valori di pM dei bifosfonati sono confrontabili con quelli del deferiprone. Con lo scopo di aumentare le capacità chelanti dei bifosfonati, proponiamo la strategia di coniugarli con altri gruppi aventi un'efficace capacità chelante. L'1-hydroxy-2-pyridinone, che può essere considerato come un acido idrossamico ciclico, appartiene alla classe dei leganti hard bidentati. Come tali, essi sono capaci di complessare ioni metallici hard come il Fe(III) attraverso due atomi di ossigeno portando a un legante a 5 membri molto stabile^{8, 9, 10}. I composti misti aventi sia un gruppo bifosfonato che uno idrossipiridinico sono stati sintetizzati a Parigi dal gruppo di Lecouvey¹¹

, mentre i leganti catecol bifosfonati sono stati sintetizzati a Shangai da Ding e collaboratori¹². In questo lavoro sono presentati studi potenziometrici e spettrofotometrici degli equilibri tra il Fe(III) con dei leganti contenenti sia un gruppo bifosfonato che uno idrossi-piridinoico e calcoli di quantomeccanica molecolare per valutare gli effetti della lunghezza della catena nelle proprietà coordinanti. I risultati ottenuti per i leganti misti sono confrontati con i semplici leganti idrossipiridinoici.

¹ J. B. Poster, *British Journal of Haematology*, **115**, 239-252 (2001)

² C. Hershko, *British Journal of Haematology*, **101**, 399-406 (1998)

³ G. Crisponi, V.M.Nurchi, R. Silvagni and G. Faa, *Polyhedron*, **18**, 3219-3226 (1999)

⁴ G. Faa and G. Crisponi, *Coordination Chemistry Reviews*, **184**, 2-21 (1999)

⁵ Z. D. Liu and R. C. Hider, *Coordination Chemistry Reviews*, **232**, 151-171 (2002)

⁶ R. C. Hider and Z. D. Liu, *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 1051-1064(2003).

⁷ E. Gumienna-Kontecka, R. Silvagni, R. Lipinski, M. Lecouvey, F. Cesare Marincola, G. Crisponi, V.M. Nurchi, Y. Leroux and H. Kozlowski, *Inorganica Chimica Acta*, **339**, 111-118 (2002)

⁸ R. J. P. Williams, *Coord. Chem. Rev.*, **228**, 93-96 (2002)

⁹ A. Santos, *Coord. Chem. Rev.*, **228**, 187-203 (2002)

¹⁰ R.C. Scarrow, P.E. Riley, K.Abu-Dari, D.L. White and K.N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **24**, 954-967 (1985)

¹¹ T. Bailly, R. Burgada, T. Prange, M. Lecouvey, *Tetrahedron Letters*, **44**, 189-192(2003).

¹² H. Ding, G. Xu, J. Wang, Y. Zg, X. Wu and Y. Xie, *Heteroatom Chemistry*, **15**(7), 549-555 (2004)

Tipo di carattere: 14 pt, Italiano (Italia)

Tipo di carattere: 14 pt, Italiano (Italia)

Tipo di carattere: 14 pt

Tipo di carattere: 14 pt, Italiano (Italia)

Pagina 1: [12] Formattato	Crisponi	29/11/2006 15.58.00
Tipo di carattere: 14 pt, Non Corsivo, Italiano (Italia)		
Pagina 1: [13] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.07.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 1: [14] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.07.00
Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto		
Pagina 1: [15] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.07.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 1: [16] Eliminato	Crisponi	04/12/2006 15.42.00
phosphonopropylphosphonic		
Pagina 1: [17] Eliminato	Crisponi	04/12/2006 15.41.00
pyridinecarboxylic acid		
Pagina 1: [18] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine		
Pagina 1: [19] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm		
Pagina 2: [20] Eliminato	Crisponi	29/11/2006 16.06.00

6.2.5 Calcoli quantomeccanici

I calcoli sono stati effettuati con il programma “Spartan 02” per Linux⁴⁵. La geometria dei leganti è stata ottimizzata utilizzando metodi “ab initio” con un set di base 3-21G^{*46}

Pagina 2: [21] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.10.00
Tipo di carattere: 14 pt		
Pagina 2: [22] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.10.00
Tipo di carattere: Non Grassetto		
Pagina 2: [23] Eliminato	Crisponi	29/11/2006 16.06.00
; le geometrie dei complessi sono state affinate con metodi semi-empirici ⁴⁷ , con un set di base AM1 ⁴⁸ , AM1/SM2 ^{49,50} e PM3 ⁵¹ . Per ogni molecola sono stati determinati i calori di formazione, le cariche atomiche, elettrostatiche ^{52,53} , naturale ⁵⁴ e di Mulliken ⁵⁵ , sono state ricostruite le superfici di densità elettronica e sono stati determinati gli orbitali HOMO e LUMO.		
Pagina 2: [24] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.11.00
Tipo di carattere: Non Grassetto		
Pagina 2: [25] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.11.00
Tipo di carattere: Non Grassetto		
Pagina 2: [26] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.11.00
Tipo di carattere: Non Grassetto		

6.3

Pagina 2: [27] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.11.00
----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 14 pt

Pagina 2: [28] Eliminato	Crisponi	29/11/2006 16.00.00
---------------------------------	-----------------	----------------------------

6.2.4 Misure NMR per l'Al(III)

Gli spettri ¹H NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian VXR-300 a 299.93 MHz;

Pagina 2: [29] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.09.00
----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 14 pt, Non Corsivo

Pagina 2: [30] Eliminato	Crisponi	29/11/2006 16.00.00
---------------------------------	-----------------	----------------------------

il diametro della provetta contenente il campione era di 5 mm e si è operato ad una temperatura di 25°C.

Gli spettri ¹H-NMR sono stati registrati utilizzando D₂O come solvente e gli spostamenti o chemical shifts sono stati riferiti al segnale del solvente residuo (4.8 ppm).

Pagina 2: [31] Eliminato	Crisponi	29/11/2006 16.06.00
---------------------------------	-----------------	----------------------------

Risultati e discussione

6.3.1 Equilibri di protonazione

Pagina 2: [32] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.11.00
----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 14 pt

Pagina 2: [33] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.12.00
----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 14 pt, Non Corsivo

Pagina 2: [34] Eliminato	Crisponi	04/12/2006 15.43.00
---------------------------------	-----------------	----------------------------

dell'acido 1-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyridinecarboxylic (

Pagina 2: [35] Eliminato	Crisponi	04/12/2006 15.43.00
---------------------------------	-----------------	----------------------------

dell'acido $3-\{[(1\text{-hydroxy-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyridinyl)carbonyl]amino\}-1\text{-phosphono}$ propylphosphonic, il

Pagina 1: [36] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Pagina 1: [37] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

Pagina 1: [38] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Pagina 1: [39] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

Pagina 5: [40] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.31.00
----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt

Pagina 5: [41] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.31.00
----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt

Pagina 1: [42] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine		
Pagina 1: [43] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm		
Pagina 7: [44] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [45] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)		
Pagina 7: [46] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [47] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)		
Pagina 7: [48] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [49] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [50] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Grassetto		
Pagina 7: [51] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [52] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)		
Pagina 7: [53] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Apice		
Pagina 7: [54] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [55] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)		
Pagina 7: [56] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [57] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [58] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)		
Pagina 7: [59] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 7: [60] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.34.00
Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)		
Pagina 1: [61] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine		
Pagina 1: [62] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm		
Pagina 8: [63] Formattato	Crisponi	29/11/2006 16.33.00
Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)		
Pagina 8: [64] Formattato	Crisponi	29/11/2006 16.33.00
Tipo di carattere: 10 pt		
Pagina 8: [65] Formattato	Crisponi	15/11/2006 10.46.00

Tipo di carattere: Grassetto

Pagina 8: [66] Formattato	Crisponi	15/11/2006 10.46.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Tipo di carattere: Non Grassetto

Pagina 1: [67] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Pagina 1: [68] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

Pagina 12: [69] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.40.00
-----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt

Pagina 12: [70] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.40.00
-----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Pagina 12: [71] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.40.00
-----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt

Pagina 12: [72] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.40.00
-----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Pagina 12: [73] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.40.00
-----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt

Pagina 12: [74] Formattato	Miriam	27/11/2006 19.40.00
-----------------------------------	---------------	----------------------------

Tipo di carattere: 10 pt, Italiano (Italia)

Pagina 12: [75] Formattato	Crisponi	29/11/2006 16.23.00
-----------------------------------	-----------------	----------------------------

Tipo di carattere: 14 pt

Pagina 12: [76] Formattato	Crisponi	29/11/2006 16.23.00
-----------------------------------	-----------------	----------------------------

Tipo di carattere: 14 pt

Pagina 1: [77] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Pagina 1: [78] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

Pagina 1: [79] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Posizione: Orizzontale: Esterno, Rispetto a: Margine

Pagina 1: [80] Formattato	Crisponi	12/12/2006 11.30.00
----------------------------------	-----------------	----------------------------

Rientro: Prima riga: 0.63 cm, Destro 0.63 cm

⁴⁵ SPARTAN'02 for LINUX, Wavefunction, Inc

⁴⁶ C. C. J. Roothan, *Rev. Mod. Phys.*, **23**, 69 (1951); G. G. Hall, *Proc. Roy. Soc. (London)*, A205, 541 (1951)

⁴⁷ J. A. Pople and D.A. Beveridge, *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, New York, 1970

⁴⁸ M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy and J. J. P. Stewart, *J. Amer. Chem. Soc.*, **107**, 3908 (1985)

^{49,50} C. C. Chambers, G. D. Hawkins, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Chem. Phys.*, **100**, 16385 (1996)

C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *Structure and Reactivity in Aqueous Solution*, ACS Symposium Series, no. 568, American Chemical Society, Washington, D.C., 1994

⁵¹ J. J. P. Stewart, *J. Computational Chem.*, **10**, 209 (1989)

^{52,53} L. E. Chirlian and M. Francl, *J. Computational Chem.*, **8**, 894 (1987)

C. M. Breneman and K. B. Wiberg, *J. Computational Chem.*, **11**, 361 (1990)

⁵⁴ A. E. Reed, R. B. Weinstock and F. Weinhold, *J. Chem. Phys.*, **83**, 735 (1985)

⁵⁵ R. S. Mulliken, *J. Chem. Phys.*, **23**, 1833, 1841, 2338, 2343 (1955)

³² Y. Li and A. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, **214**, 103 (1993)

Appendice

Reagenti

Strumentazione

Preparazione delle soluzioni

Reagenti

- ✓ H₂O bidistillata disareata
- ✓ HCl Aldrich 0.1 N
- ✓ HCl Aldrich 37%
- ✓ KOH Aldrich pellets
- ✓ KCl 99.99% Aldrich
- ✓ KCl 3M
- ✓ Standard Fe per assorbimento atomico Exaxol Italia 1005 ppm
- ✓ Standard Al per assorbimento atomico Analyticals Carlo Erba 1mg/mL
- ✓ HNO₃ Aldrich 65%
- ✓ Catecolo C₆H₆O₂ Aldrich 99%
- ✓ 4-nitrocatecolo O₂NC₆H₃-1,2-(OH)₂ Aldrich 97%
- ✓ FeCl₃•6H₂O Aldrich 97%
- ✓ Al(NO₂)₃•9H₂O Aldrich RPE/ACS 99%
- ✓ D₂O Isotec Inc. 99.9% atomi di D
- ✓ KSCN Carlo Erba 99%
- ✓ DCl Aldrich 99.9% atomi di deuterio
- ✓ NaOD Aldrich 99.9% atomi di deuterio
- ✓ Vanillina C₈H₈O₃ Fluka >98%
- ✓ Acido vanillico C₈H₈O₄ Aldrich 97%
- ✓ Orto vanillina C₈H₈O₃ Aldrich 99%
- ✓ Iso vanillina Aldrich 99%
- ✓ Acido 3-metossi salicilico Aldrich 97%

- ✓ Leganti catecol-bifosfonici sintetizzati nel laboratory of drug research di Shanghai.
- ✓ Leganti piridinon-bifosfonici sintetizzati a Parigi da Lecouvey e collaboratori.

Strumentazione

- ◆ Titolatore automatico 665 Dosimat Metrohm
- ◆ Spettrofotometro UV-Visibile Cary 50 Probe Varian
- ◆ Spettrofotometro UV-Visibile a serie di diodi Hewlett Packard 8452 A
- ◆ Spettrofotometro di Fluorescenza Cary Eclipse Varian
- ◆ Potenzziostato-Galvanostato PG Stat 30 Autolab
- ◆ Fibre Ottiche in torlon cammino ottico 0.2-1 cm
- ◆ Bilancia Mettler AE 240 (± 0.00001 g)
- ◆ Bilancia Sartorius Basic (± 0.0001 g)
- ◆ Stufa Memmert
- ◆ Stufa Heraeus Instruments Valutherm
- ◆ Bagno ad ultrasuoni Sonorex Super Bandelin RK 102 H
- ◆ Termostato Hetofrig

Preparazione delle soluzioni

1. Soluzione di titolante

Il titolante utilizzato è una soluzione di KOH o NaOH 0,1 M preparata sciogliendo a caldo KOH\NaOH solida in H₂O bidistillata fatta precedentemente bollire per circa due ore per ottenere una soluzione il più possibile priva di CO₂.

La soluzione viene raffreddata sotto flusso di argon e sigillata con del parafilm. La determinazione della concentrazione avviene per via potenziometrica usando come titolante una soluzione di HCl standard volumetrico.

2. Mezzo ionico

Il mezzo ionico scelto per lo studio degli equilibri in soluzione può influenzare gli equilibri stessi date le proprietà complessanti degli anioni che costituiscono tali composti.

Nel caso del Fe(III) viene evitato l'uso dell'anione ClO_4^- , pur essendo quello dotato della minor capacità complessante rispetto a cloruri e nitrati, perché comporta problemi di tipo tecnico con l'elettrodo a vetro combinato: gli ioni ClO_4^- , infatti, attraversano il setto ceramico che garantisce il contatto elettrico tra analita e soluzione interna di KCl 3M e precipitano sotto forma di KClO_4 . Il perclorato di potassio solido ostruisce i pori del setto poroso provocando una risposta instabile dell'elettrodo. Le soluzioni di NO_3^- vengono ugualmente evitate nello studio spettrofotometrico dei sistemi relativi al Fe(III) data la presenza nello spettro corrispondente di un massimo di assorbimento a 310 nm, che cade dunque nella regione spettrale di interesse.

L'anione scelto nel caso del Fe(III) e anche dell'Al(III) è dunque il cloruro, sottoforma di KCl in concentrazione 0,1M.

Il cloruro di potassio viene tenuto in stufa alla temperatura di 105°C per 24 ore. Viene poi sciolto in acqua bidistillata, fatta bollire precedentemente. Il cloruro di potassio ha peso molecolare 74.551; pertanto, per preparare 1L di soluzione 1M si pesano 74.551g di sostanza.

3. Soluzione madre di Fe(III)

La soluzione di Fe(III) è stata preparata a partire da Cloruro di Ferro esaidrato $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, puro al 97% e di peso molecolare 270,30. Per preparare 250 mL di soluzione ~ 0.01M sono stati pesati 0.69665g che sono stati disciolti e portati a volume con HCl a titolo noto. La soluzione finale ha un pH di circa 2. La concentrazione di ferro è stata poi titolata col metodo complessometrico.

3.1 Fe/Desferal

La formazione del complesso Fe-Desferal può essere utilizzata vantaggiosamente per la determinazione spettrofotometrica del ferro(III). Il desferal forma con il ferro(III) un

complesso 1:1 esacoordinato con geometria ottaedrica (figura1). Il complesso ha un'intensa colorazione arancio bruna e lo spettro presenta una banda con un valore di ϵ di circa $2700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 428 nm.

I tre gruppi idrossamici del legante coordinano il Fe(III) formando un complesso a stechiometria 1:1, esacoordinato con geometria ottaedrica, dalla colorazione giallo-bruna.

L'intenso assorbimento alla suddetta lunghezza d'onda ($\epsilon > 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$), l'esistenza in un ampio range di pH,

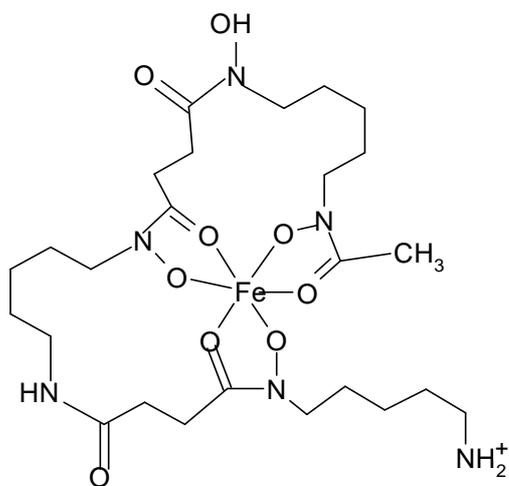


Figura 1: Complesso Fe(III)-Desferal

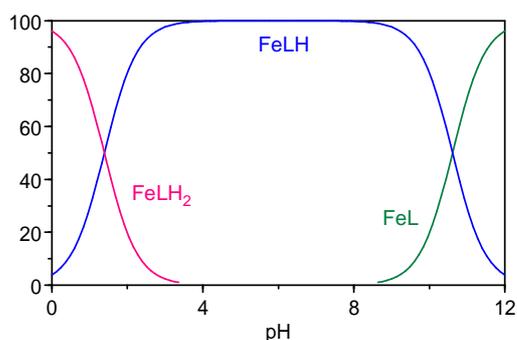


Figura 2: Diagramma di distribuzione del sistema Fe(III)-Desferal (rapporto 1:1,7)

come risulta dal diagramma di distribuzione¹ riportato in figura 2, e l'equilibrio di formazione rapido e completo sono requisiti fondamentali affinché la determinazione spettrofotometrica rappresenti una metodica precisa ed accurata.

La soluzione del legante deve essere presente in eccesso in modo da garantire che tutto il ferro presente sia complessato. Si è usato un rapporto molare Fe:desferal 1:1.7 nello standard più concentrato in ferro. La soluzione di desferal $7.6 \cdot 10^{-3}$ M è stata ottenuta sciogliendo 500 mg di deferoxamina mesilato (p.m. 656.16 g/mol) in 100 mL di acqua bidistillata.

Le soluzioni standard sono state preparate aggiungendo quantità variabili di Fe(III) da una soluzione per ICP (la cui concentrazione di Fe(III) era 1005 mg/l in HNO₃ al 2%, $d=1.015$ g/mL) a 2.5 mL della soluzione madre di Desferal, quindi diluendo in matraccio a 25 mL (tabella 1).

Si sono analizzati 5 campioni prelevando un'aliquota della soluzione madre di ferro(III), aggiungendo 2.5 mL di legante e diluendo a 25 mL (tabella 2).

E' stata misurata l'assorbanza a 428 nm per gli standard ed è stata costruita la curva di calibrazione riportata in figura 3.

¹E.Farkas, E.A. Enyedy, H. Csoka, Polyedron, 18, (1999), 2391-2398

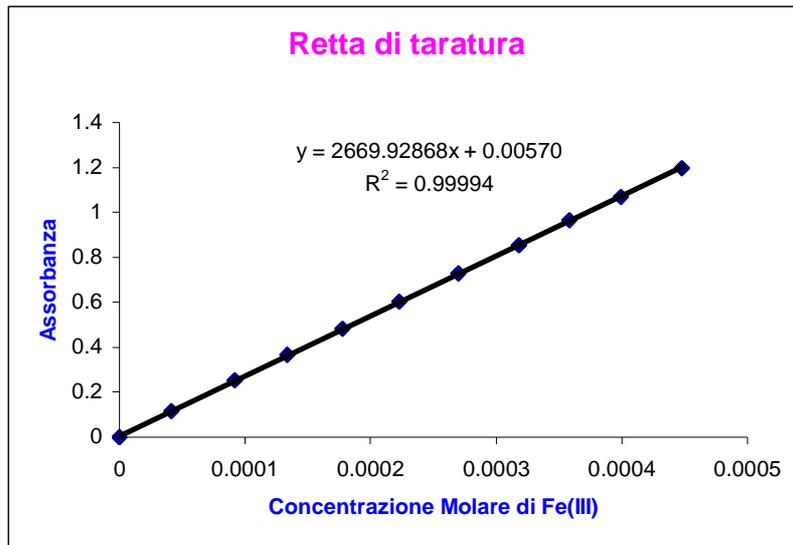


Figura 3: Retta di taratura Fe-desferal

Sono state quindi misurate le assorbanze dei 5 campioni e, tenendo conto delle diverse diluizioni, è stata ricavata la concentrazione del ferro nella soluzione.

La retta di taratura è stata realizzata misurando con uno spettrofotometro a serie di diodi modello HP 8452. Tutte le misure sono state effettuate con una cuvetta da 1 cm.

Tabella 1: soluzioni standard usate per la retta di taratura

Standard	mL Fe(III)	mL Desferal	A _{428 nm}	[Fe]
1	0.058	2.5	0.11554	4.45*10 ⁻⁵
2	0.1280	2.5	0.25258	8.9*10 ⁻⁵
3	0.1869	2.5	0.36586	1.335*10 ⁻⁵
4	0.2478	2.5	0.48164	1.78*10 ⁻⁴
5	0.3113	2.5	0.60195	2.225*10 ⁻⁴
6	0.3766	2.5	0.72731	2.67*10 ⁻⁴
7	0.444	2.5	0.85441	3.115*10 ⁻⁴
8	0.5002	2.5	0.96548	3.56*10 ⁻⁴
9	0.5577	2.5	1.06948	4.005*10 ⁻⁴
10	0.6253	2.5	1.19707	4.45*10 ⁻⁴

L'equazione della retta di calibrazione ($R^2=0.9999$) ricavata alla $\lambda_{\max}=428$ nm mostra una pendenza pari a 2669,9. Questo valore rappresenta il coefficiente di estinzione molare ϵ del complesso ferro/desferal alla lunghezza d'onda di 428 nm.

Da questo valore, mediante la relazione $A=\epsilon cl$ (con $l=1\text{cm}$), si ricavano le concentrazioni dei cinque campioni preparati a partire dalla soluzione madre di ferro.

Tabella 2: soluzioni dei 5 campioni preparati dalla soluzione madre.

Campione	mL Fe(III)	mL Desferal	$A_{428\text{ nm}}$	[Fe]
1	0.654 mL	2.5	0.729935	$2.67 \cdot 10^{-4}$
2	0.654 mL	2.5	0.726212	$2.67 \cdot 10^{-4}$
3	0.654 mL	2.5	0.724289	$2.67 \cdot 10^{-4}$
4	0.654 mL	2.5	0.731186	$2.67 \cdot 10^{-4}$
5	0.654 mL	2.5	0.740646	$2.67 \cdot 10^{-4}$

La concentrazione di quest'ultima può così essere espressa come valore medio delle cinque determinazioni (Tabella 2) e si associa ad essa un errore pari alla deviazione standard delle cinque misure: $[\text{Fe(III)}]=(0.0100 \pm 0.0001)\text{mol/L}$.

3.2 Fe/KSCN

Il tiocianato forma con il ferro un complesso che presenta un'intensa colorazione rosso bruno. Si ha sviluppo di colore anche per un rapporto Fe-SCN pari a 1:2 tuttavia in questi rapporti si ha la formazione di più di un complesso a diversi rapporti molar Fe-SCN.

Per questa ragione, la soluzione del legante deve essere in forte eccesso in modo da facilitare la formazione di un unico complesso in particolare quello 1:3 che presenta una banda a 478 nm. Si è usato un rapporto molare Fe-SCN pari a 1:100 per lo standard più concentrato in ferro.

Sono state lette le assorbanze a 478 nm di soluzioni standard preparate aggiungendo un'aliquota della soluzione madre di Fe(III) ottenuta da una soluzione per ICP (la cui concentrazione di Fe(III) era 1005 mg/l in HNO₃ al 2%), a 3 mL di una soluzione di KSCN 0.84 M, quindi diluendo in matraccio a 25 mL (tabella 3). La retta di calibrazione ottenuta è riportata in figura 4.

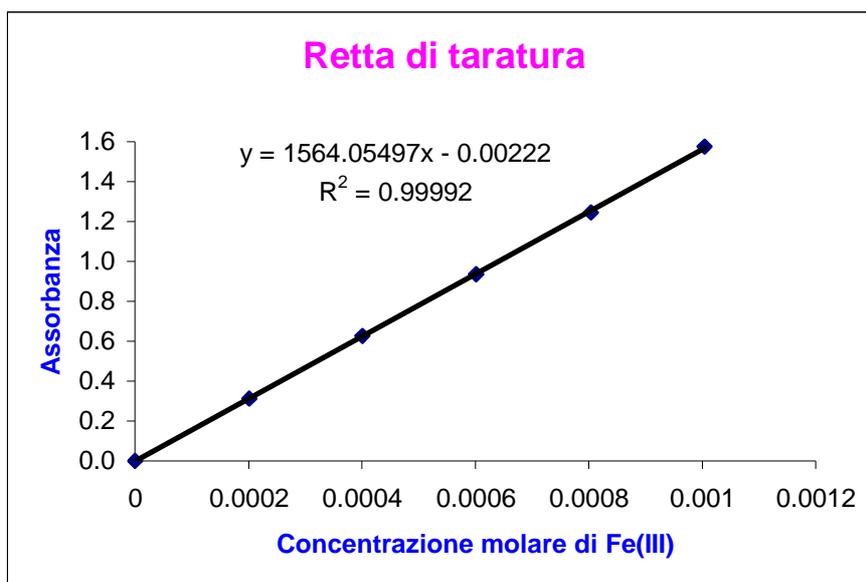


Figura 4: Retta di taratura Fe-SCN

Tutte le misure sono state effettuate mediante una cuvetta da 0.2cm.

Tabella 3: soluzioni standard usate per la retta di taratura

Standard	mL Fe(III)	ML SCN	mL HCl	A _{478 nm}	[Fe]M
1	2	3	2.4	0.3125	0.0002
2	4	3	2.4	0.6265	0.0004
3	6	3	2.4	0.9369	0.0006
4	8	3	2.4	1.2462	0.0008
5	10	3	2.4	1.5751	0.001

Si sono analizzati due campioni a diversa concentrazione prelevando rispettivamente 1.25 e 1.75 mL di ferro dalla soluzione madre (ottenuta sciogliendo 1.39323g di FeCl_3 in 500 mL di HCl 0.0102 M), aggiungendo 3 mL di legante e diluendo a 25 mL.

Sia agli standard che ai campioni (prima di portare a volume) sono stati aggiunti 2.4 mL di HCl 0.1030 M (infatti la soluzione in esame ha una concentrazione di acido pari a 0.01 M) (tabella 4).

Campione	mL di Fe	ML SCN	ML HCl	$A_{478\text{nm}}$	[Fe]M
1	1.25	3	2.4	0.79900	0.0005
2	1.75	3	2.4	1.1270	0.0007

Tabella 4: soluzioni dei 5 campioni preparati dalla soluzione madre.

Dai valori di assorbanza ottenuti dalle soluzioni incognite e tenendo conto delle diverse diluizioni si ricava la concentrazione della soluzione di Fe(III) . La concentrazione ricavata è: $[\text{Fe(III)}] = (0.0102 \pm 0.0001) \text{ mol/L}$.

4. Soluzione madre di Al(III)

La soluzione madre di Al(III) è stata preparata sciogliendo 0.9474 g di $\text{Al(NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (PM 375.15 g/mol) in 250 mL di HNO_3 0.0099M (concentrazione determinata potenziometricamente).

La metodica utilizzata prevede la reazione di complessazione dell' Al(III) con il legante EDTA e la successiva retrotitolazione dell'EDTA in eccesso con una soluzione standard di Mg(II) .

Si preparano quattro campioni trasferendo in una beuta 25 mL della soluzione madre di Al(III) e aggiungendo 10 mL di EDTA standard 0.0500 M. Si porta la soluzione ottenuta a un volume di circa 100 mL, si aggiungono alcune gocce di NH_3 al 15% circa

fino a percepirne l'odore e raggiungere così un pH compreso tra 7 e 8 e si porta all'ebollizione per qualche minuto per garantire la completa complessazione del metallo. Si raffredda fino a temperatura ambiente e si porta nuovamente il pH al valore 7-8. Si aggiungono 50 mg di miscela solida omogenea nero eriocromo T/ KNO_3 all'1% in indicatore e si titola l'eccesso di EDTA con una soluzione standard di Mg(II) 0.0680 M fino al viraggio dal blu al violetto. La soluzione standard di Mg(II) si prepara sciogliendo 2.033 g di $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p.m. 203.31 g/mol) in 200 mL di H_2O bidistillata e titolata con EDTA standard 0.0500 M fino al viraggio dell'indicatore NET dal violetto all'azzurro.

L'attendibilità del metodo è confermata verificando la concentrazione di alluminio di una soluzione standard di Al(III) ottenuta per diluizione da uno standard per AA.

5. Soluzioni dei leganti

Le soluzioni dei leganti sono state preparate giornalmente per pesata e disciolti in acqua bidistillata di fresco e disaerata con argon per 30 minuti. Il titolo è stato determinato potenziometricamente.

Quando si è reso necessario la stabilità del legante è stata verificata prima di ogni titolazione misurandone l'assorbanza nella zona UV.

5.1 Purificazione del catecolo

Il catecolo è stato disciolto a 50°C in toluene, la soluzione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e filtrata con un gooch. La sostanza così cristallizzata è stata conservata al buio in essicatore.