

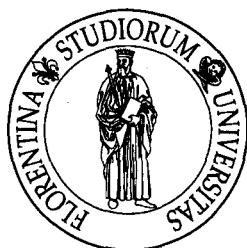
Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche

XXII ciclo

S.S.D.: CHIM/03 – Chimica Generale e Inorganica

Dipartimento di Chimica

Università degli Studi di Firenze



***Studio dell'interazione di metallo-recettori
con substrati biologici***

Tesi di

Silvia Biagini

Silvia Biagini

TUTORE

Prof. Antonio Bianchi

Antonio Bianchi



COORDINATORE

Prof. Gianni Cardini

Gianni Cardini

2007-2009

.....
*Hauve uma coisa simplesmente bela,
E que, sem ter história nem grandezas,
Em todo o caso dava uma aguarela.*

.....
De Tarde - Cesário Verde

Indice

1. Introduzione

1.1 Chimica Supramolecolare.....	1
1.2 Leganti macrociclici poliamminici contenenti unità eteroaromatiche.....	2
1.3 Interazione di metallo-recettori con substrati biologici anionici.....	7
1.4 Interazione di metallo-recettori con DNA.....	9
1.5 Obiettivi del presente lavoro di tesi.....	14
1.6 Bibliografia.....	17

2. Parte Sperimentale

2.1 Misure potenziometriche.....	21
2.2 Misure di risonanza magnetica nucleare.....	21
2.3 Spettroscopia elettronica.....	22
2.4 Spettroscopia IR.....	22
2.5 Spettrometria di massa.....	22
2.6 Diffrattometria a raggi X.....	23
2.7 Molecular Modeling.....	24
2.8 Studio termodinamico dei sistemi Dye/DNA.....	24
2.8.1. Materiali.....	24
2.8.2. Metodi.....	25
2.9 Sintesi dei leganti.....	27
2.9.1 Generalità.....	27
2.9.2 Sintesi di L6.....	27
2.9.2.1 Sintesi della 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina.....	27
2.9.2.2 Sintesi della 4,7-dialdeide-1,10 fenantrolina.....	28
2.9.2.3 Sintesi del macrociclo 1,5,20,24-tetraaza-[10]-6,19,25,38-bis-fenantrolinofano esacloroidrato (L6.6HCl).....	29
2.9.3 Sintesi di L7.....	30
2.9.3.1 Sintesi della N-{2-[Naftalen-1-ilmetil]ammino}etil}etano-1,2-diammina...30	
2.9.3.2 Sintesi della 2,9-dialdeide-1,10-fenantrolina.....	31

2.9.3.3 Sintesi di bis-(2-naftalen-2,5,8-triazanonano)-2,9-fenantrolina eptacloridrato (L7.7HCl).....	32
2.9.4 Sintesi dei leganti macrociclici L11 e L12.....	33
2.9.5 Sintesi delle ammine tosilate.....	33
2.9.6 Sintesi di L11.5HBr.....	33
2.9.7 Sintesi di L12.5HBr.....	35
2.9.8 Sintesi di L13.....	37
2.9.8.1 Sintesi del cis-dicloro-Bis(2,2'-bipiridile)-rutenio(II): Ru(bipy) ₂ Cl ₂	37
2.9.8.2 Sintesi del Bis(2,2'-bipiridile)(4,4'-(2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'- bipiridilofano)-rutenio(II) dicloruro pentacloridrato: Ru(bipy) ₂ (44'TT)Cl ₂ ·5HCl	38
2.9.9 Sintesi di L14.....	39
2.9.9.1 Sintesi dell' 1,10-fenantrolina-5,6-dione.....	39
2.9.9.2 Sintesi del dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina.....	40
2.9.9.3 Sintesi del polimero [Ru(CO) ₂ Cl ₂] _n (9).....	41
2.9.9.4 Sintesi del cis-dicarbonil-trans-dicloro (4,4'-(2,5,8,11,14-pentaaza[15])- 2,2'-bipiridilofano)rutenio(II): Ru(L12)(CO) ₂ Cl ₂	42
2.9.9.5 Sintesi del Bis(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)(4,4'-(2,5,8,11,14- pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano)rutenio(II) dibromuro pentabromidrato: Ru(dppz) ₂ (L12)Br ₂ ·5HBr (L14.5HBr).....	43
2.9.10 Sintesi di L15.....	44
2.9.10.1 Sintesi del cis-dicarbonil-trans-dicloro-(2,2'-bipiridile)-rutenio(II): Ru(bipy)(CO).....	44
2.9.10.2 Sintesi del [carbonil-dicloro-(2,2'-bipiridile)-rutenio(II)]-dimero: [Ru(bipy)COCl ₂] ₂	45
2.9.10.3 Sintesi del cis-carbonilcloro-(2,2'-bipiridile)-(dipirido[3,2-a:2',3'- c]fenazina)-rutenio(II) cloruro: Ru(bipy)(dppz)COCl ₂	46
2.9.10.4 Sintesi del (2,2'-bipiridile)-(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)-(4,4'- (2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano)-rutenio(II) dibromuro pentabromidrato: Ru(bipy)(dppz)(L12)Br ₂ ·5HBr (L15.5HBr).....	47
2.9.11 Sintesi di L16.....	48
2.9.12 Sintesi dei cristalli (14-21).....	49
2.9.13 Bibliografia.....	49

3. Discussione Sintesi

3.1 Sintesi di leganti poliamminici contenenti unità eteroaromatiche.....	51
3.2 Sintesi dei complessi L13-L15.....	52
3.2.1 Sintesi del legante dppz.....	52
3.2.2 Sintesi di Ru(bipy) ₂ (L12)Cl ₂ ·5HCl	52
3.2.3 Sintesi di Ru(dppz) ₂ (L12)Br ₂ ·5HBr	53
3.2.4 Sintesi di Ru(bipy)(dppz)(L12)Br ₂ ·5HBr.....	55
3.3 Sintesi del complesso L16.....	57
3.4 Bibliografia.....	57

4. Recettori poliammonici contenenti unità eteroaromatiche estese come chemosensori selettivi per substrati biologici anionici

4.1 Introduzione.....	59
4.2 Protonazione dei leganti	61
4.3 Coordinazione anionica in soluzione acquosa.....	64
4.4 Molecular modeling e analisi strutturale.....	72
4.5 L9 come chemosensore fluorescente per ATP.....	80
4.6 Influenza della topologia molecolare nel riconoscimento degli anioni nucleotidi.....	82
4.7 Proprietà di complessazione dello Zn(II) da parte di L11.....	83
4.8 Coordinazione di metaboliti da parte dei complessi di Zn(II) con L11.....	85
4.9 Bibliografia.....	111

5. Sintesi e studio dell'interazione con DNA di complessi di Ru(II) e Pt(II) contenenti unità eteroaromatiche estese

5.1 Introduzione.....	113
5.2 Protonazione di L13-L15 e formazione dei loro complessi con Cu(II).....	119
5.3 Interazione dei complessi di Ru(II) L13-L15 con DNA	124
5.4 Equilibri di interazione di L16 con DNA.....	144
5.5 Bibliografia.....	154

6. Recettori poliamminici contenenti l'unità biperidile o fenantrolina come chemosensori fluorescenti per ioni metallici e potenziali sistemi recettivi per il DNA

6.1 Introduzione.....	157
6.2 Protonazione di L4 e L5.....	158

6.3	Caratteristiche strutturali di complessi metallici allo stato solido.....	162
6.4	Complessazione dei metalli in soluzione acquosa.....	165
6.5	L4 e L5 come chemosensori fluorimetrici.....	169
6.6	Conclusioni.....	171
6.7	Bibliografia.....	171

7. Nuovo legante poliamminico contenente due subunità 2,9-fenantrolina come chemosensore fluorescente per lo ione Zn(II) e potenziale recettore per il DNA

7.1	Introduzione.....	173
7.2	Protonazione del legante L6.....	174
7.3	Coordinazione dello ione Zn(II) da parte di L6.....	180
7.4	Conclusioni.....	188
7.5	Bibliografia.....	189

8. Studio di un nuovo legante contenente l'unità fenantrolina e due unità naftaleniche come potenziale recettore per il DNA. Esempio di un sensore fluorescente per gli ioni Cd(II) e Zn(II). Formazione di un ecciplesso in soluzione

8.1	Introduzione.....	191
8.2	Protonazione di L7.....	193
8.3	Complessazione dei metalli.....	198
8.4	Conclusioni	209
8.5	Bibliografia.....	210

9. Sintesi e studio di un nuovo legante macrociclico contenente l'unità acridina e dei suoi complessi con Cu(II)

9.1	Introduzione.....	211
9.2	Complessazione di Cu(II) in soluzione acquosa.....	212
9.3	Struttura cristallina di $[\text{Cu}_8\text{L}_4(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_3](\text{NO}_3)_5 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$	213
9.4	Conclusioni.....	219
9.5	Bibliografia.....	220

10. Interazione di macrocicli contenenti atomi donatori misti e la subunità 1,10-fenantrolina con specifici metalli di transizione e post-transizione: riconoscimento e estrazione liquido-liquido

10.1	Introduzione.....	221
10.2	Protonazione di L1 e L2.....	223
10.3	Complessazione dei metalli.....	224
10.4	Estrazione liquido-liquido.....	228
10.5	Conclusioni.....	231
10.6	Bibliografia.....	232

11. Conclusioni

.....	233
-------	-----

Appendice	239
------------------------	-----

1. Introduzione

1.1 Chimica Supramolecolare

La chimica supramolecolare si occupa dello studio di sistemi organizzati (aggregati supramolecolari) derivanti dall'associazione di due o più specie chimiche che ha luogo grazie all'instaurarsi contemporaneo di molte interazioni deboli non covalenti (interazione ione-ione, ione-dipolo, dipolo-dipolo, legame a idrogeno, interazione catione- π , interazioni π - π stacking, forze di Van der Waals, effetto idrofobo). L'interesse verso questo tipo di aggregati è dato principalmente dal fatto che le interazioni non covalenti sono alla base di importanti processi biologici quali la formazione di complessi proteina-proteina, l'associazione antigene-anticorpo, la catalisi enzimatica, il trasporto attraverso le membrane. In tutti questi processi un recettore (*host*) coordina un'altra specie chimica, un substrato (*guest*), in modo selettivo, determinando un *riconoscimento molecolare*. Una volta avvenuta la coordinazione il recettore può effettuare una trasformazione chimica del substrato legato, come nel caso della catalisi enzimatica, oppure, se la molecola host ha caratteristiche lipofile, può trasportarlo attraverso una membrana.¹

La specificità di tutti i processi biologici ha spinto verso lo studio dei meccanismi che regolano il riconoscimento tra i componenti di un addotto supramolecolare e ha dato impulso al design di nuovi recettori con requisiti tali da dare specie altamente stabili. Per ottenere riconoscimento molecolare selettivo il recettore deve possedere due requisiti fondamentali:

1. *complementarità stereochimica* dei siti di coordinazione con il substrato: se nel recettore sono presenti molti siti di legame in grado di interagire contemporaneamente con i siti di legame del guest si potrà generare una specie termodinamicamente stabile;
2. *preorganizzazione della molecola host*: tanto minore sarà la modificazione conformazionale del recettore per adattarsi al substrato, tanto minore sarà il dispendio energetico per la formazione dell'addotto supramolecolare ovvero tanto maggiore sarà la sua stabilità.

Pertanto sistemi ottimali per la coordinazione di substrati devono dunque mostrare una ampia superficie di contatto, numerosi siti di interazione e una corretta disposizione conformazionale così da avvolgere o inglobare la specie prescelta.

1.2 Leganti macrociclici poliamminici contenenti unità eteroaromatiche

Da anni esiste un particolare interesse per lo studio delle poliammine come una classe di recettori semplici ma di notevole importanza nella chimica supramolecolare.¹ Negli ultimi decenni è stato riconosciuto che molte funzioni delle cellule procariote ed eucariote sono influenzate da composti poliamminici.² Sebbene il ruolo delle poliammine biogene negli organismi viventi non sia pienamente compreso, è noto come la loro concentrazione sia strettamente regolata: ad esempio a pH fisiologico le poliammine sono nella loro forma protonata e quindi possono interagire con acidi nucleici, proteine e fosfolipidi. E' stato dimostrato ad esempio come questi composti siano in grado di modificare la conformazione del DNA *in vitro* e *in vivo*, influenzando conseguentemente molti processi biologici, quali trascrizione e ricombinazione cellulare.³ Un notevole motivo di interesse verso lo studio delle poliammine è fornito dalla loro versatilità nel formare complessi sia con cationi sia con anioni. Queste, infatti, possono coordinare ioni di metalli di transizione e di post transizione, oppure possono formare addotti con anioni quando le stesse sono presenti in forma protonata positivamente carica. Infine i complessi metallici stessi possono funzionare da recettori per specie anioniche e, in qualche caso, possono indurre la trasformazione dando luogo

ad un processo catalitico. Nelle poliammine macrocicliche (poliazacicloalcani) vengono esaltate alcune proprietà delle semplici ammine lineari, soprattutto per quanto riguarda le capacità acido-base e di coordinazione di ioni metallici. Le poliammine cicliche, infatti, pur essendo complessivamente meno basiche delle analoghe acicliche, risultano più basiche nei primi stadi di protonazione, in quanto la struttura ciclica favorisce l'instaurarsi di legami ad idrogeno intramolecolari che contribuiscono alla stabilità delle specie a basso grado di protonazione. Un'altra conseguenza della struttura ciclica è la maggiore densità di carica che si realizza sul recettore protonato, che quindi può interagire più efficacemente con specie anioniche mediante forze elettrostatiche e legami a idrogeno. Inoltre la struttura macrociclica è estremamente disponibile alla complessazione di ioni metallici (effetto macrociclico).

Recentemente sono stati ottenuti interessanti risultati inserendo nella struttura macrociclica subunità eteroaromatiche quali 2,2'-bipiridile⁴ e 1,10-fenantrolina:⁵ queste ultime presentano infatti due atomi di azoto in grado di coordinare ioni metallici, ma, a differenza degli atomi di azoto amminici, gli atomi di azoto dei nuclei eteroaromatici hanno ibridazione sp^2 e pertanto mostrano una minore affinità per i protoni e, conseguentemente, la protonazione compete meno con la coordinazione. E' possibile dunque realizzare leganti ditopici nei quali la coordinazione di ioni metallici ai due siti coordinativi è controllata dal grado di protonazione del complesso, come accade ad esempio, nei complessi di Cu(II) e Cd(II) del legante **1**, nei quali la particolare architettura molecolare consente al metallo di poter effettuare una traslocazione controllata dal pH:⁶

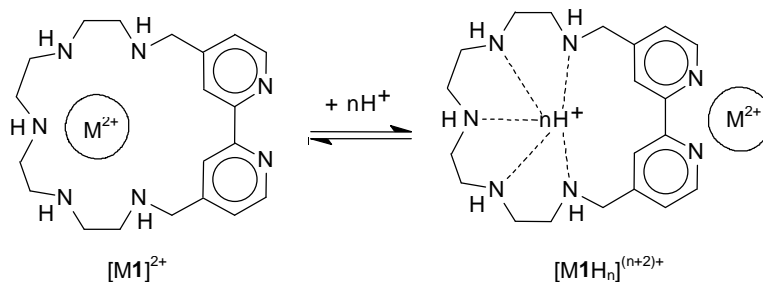


Fig. 1.1 – Schema di coordinazione del metallo ($M^{2+} = \text{Cu(II)}, \text{Cd(II)}$) al legante **1**.

La topologia molecolare del legante infatti definisce due zone distinte per la coordinazione degli ioni metallici: la cavità macrociclica e l'unità esterna del dipiridile; la protonazione del complesso $[M\mathbf{1}]^{2+}$ ($M^{2+} = \text{Cu(II)}, \text{Cd(II)}$) in cui il metallo è coordinato alla catena poliamminica, induce il catione metallico a passare da dentro a fuori la cavità del macrociclo, come schematizzati in Fig. 1.1.

Le subunità aromatiche, inoltre, conferiscono rigidità ai leganti poliamminici, impedendo che tutti gli atomi di azoto intervengano nella coordinazione dello ione metallico. La presenza di siti coordinativi non occupati dal legante primario permette la formazione di complessi ternari in seguito al legame nei siti vacanti del metallo di substrati presenti in soluzione. Il complesso può quindi comportarsi da metallo-recettore nei confronti di svariate specie esogene e, in alcuni casi, catalizzare trasformazioni chimiche dei substrati coordinati: ne è un esempio il complesso dinucleare di Zn(II) del legante **2**, capace di idrolizzare efficacemente esteri fosforici (Fig. 1.2).

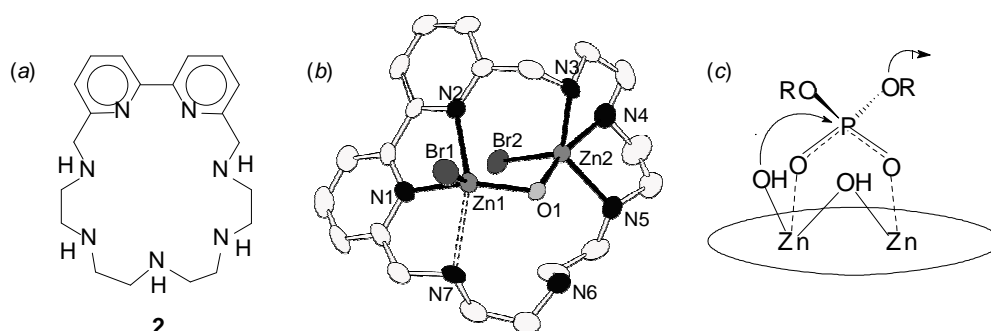


Fig. 1.2- Struttura del legante **2** (a), rappresentazione ORTEP del catione complesso $[\text{Zn}_2(\mathbf{2H})(\mu\text{-OH})\text{Br}_2]^{2+}$ (b) e modello di meccanismo proposto per l'idrolisi di esteri fosforici attivati (c).

La presenza di un'unità eteroaromatica estesa come parte integrante della struttura macrociclica determina altre interessanti proprietà. Le unità aromatiche ed eteroaromatiche impartiscono un carattere idrofobo alla molecola, permettendo ad esempio di solubilizzare ioni metallici o altri substrati carichi in solventi non acquosi o trasportarli attraverso membrane a carattere lipofilo; le potenziali applicazioni vanno dal loro impiego come agenti sequestranti per metalli tossici (Cd(II) , Pb(II) , Hg(II)), allo studio di sistemi modello nei fenomeni di trasporto attivo. Inoltre le unità aromatiche

ed eteroaromatiche introducono un ulteriore sito di riconoscimento nel recettore macrociclico: è noto infatti che le unità aromatiche di un host sono in grado di interagire con un guest mediante interazioni π - π stacking, catione- π o π -H,^{7,8} nonché per effetto idrofobo. La selettività non è quindi solo basata sulla complementarietà dimensionale tra host e guest, ma anche sulla complementarietà topologica e funzionale (elettronica). In tal modo è stato possibile realizzare il riconoscimento selettivo di molecole neutre, cationiche ed anioniche, sfruttando macrocicli poliamminici, solubili in acqua, nei quali diversi anelli aromatici definiscono cavità idrofobe.⁷⁻⁹

Un ulteriore motivo di interesse nell'inserimento di unità eteroaromatiche in strutture macrocicliche è costituito dalle proprietà fotofisiche e fotochimiche di tali unità e dei loro complessi metallici. In alcuni casi infatti le unità eteroaromatiche presentano proprietà di luminescenza (fluorescenza o fosforescenza) che vengono profondamente influenzate dalla coordinazione dello ione metallico da parte del sistema macrociclico: ciò consente al sistema di comportarsi da sensore chimico, ossia di indicare, attraverso misure spettroscopiche, la presenza di ioni metallici anche in concentrazioni particolarmente basse. Ad esempio, il legante **3**,¹⁰ costituito da un sistema macrociclico contenente un'unità fenantrolinica, a cui è stato appeso un pendaglio metilamminoantracene, è in grado di coordinare metalli di transizione (Zn(II), Cd(II), Pb(II)) nella cavità macrociclica; ad opportuni valori di pH, l'atomo di azoto del pendaglio laterale è in forma deprotonata e può completare la sfera di coordinazione dello ione metallico, determinando un ripiegamento del braccio. A seconda delle dimensioni dello ione metallico, il movimento del braccio può portare le due unità aromatiche più o meno vicine tra loro: nel caso di Zn(II), le piccole dimensioni dello ione permettono all'unità antracenica di interagire via π -stacking con il gruppo fenantrolinico, dando origine ad emissione di ecciplesso a 600 nm in seguito a irraggiamento a 418 nm (Fig. 1.3).

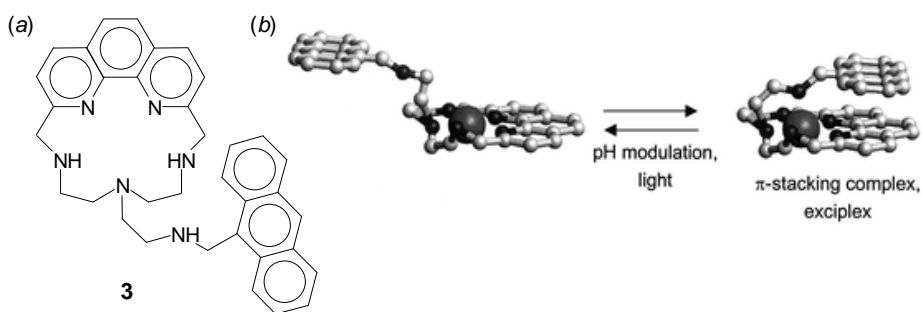


Fig. 1.3- Struttura del legante **3** (a) e formazione modulata del complesso π -stacking.

Il sistema si comporta quindi come una macchina molecolare, ovvero un dispositivo molecolare capace di realizzare movimenti meccanici modulati da stimoli esterni, quali il pH e la luce.

L'assorbimento di energia da parte dell'unità fotoattiva può anche essere seguito da processi di trasferimento elettronico o energetico, permettendone un impiego in numerosi processi fotoindotti. Un esempio è fornito dal complesso $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\mathbf{1}]^{2+}$ (bpy=2,2'-bipiridile), la cui attività fotocatalitica è illustrata dall'ossidazione di ioduro a iodio elementare promossa dall'assorbimento di radiazione a 436 nm (Fig. 1.4)¹¹.

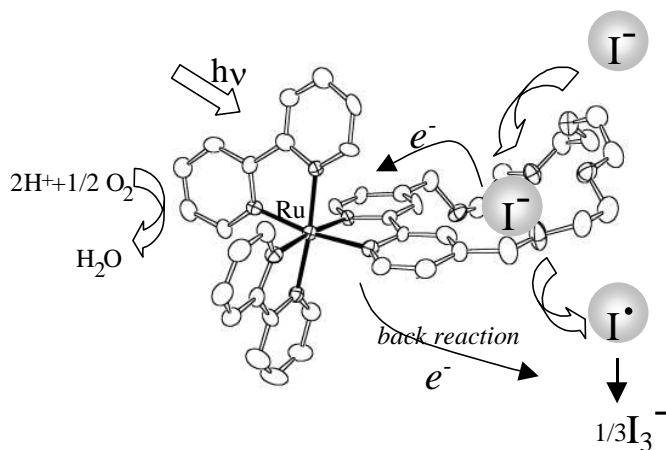


Fig. 1.4- Ciclo fotocatalitico per l'ossidazione di I^- mediata dal complesso $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\mathbf{1}]^+$.

L'eccitazione della banda MLCT del complesso $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\mathbf{1}]^{2+}$ determina un trasferimento mono-elettronico da uno ione ioduro, coordinato al macrociclo, al complesso di Ru(II), con la formazione di iodio radicale (che poi è convertito in I_3^-) e di un complesso di Ru(II) contenente un anione radicale (bpy); il ciclo catalitico è completato dall'ossidazione da parte di O_2 del gruppo biperidinico ridotto. In questo caso la cavità macrociclica agisce da

centro fotocatalitico, alloggiando il substrato che viene poi trasformato mediante trasferimento elettronico con il centro metallico.

1.3 Interazione di metallo-recettori con substrati biologici anionici

Viste le proprietà dei leganti poliamminici contenenti unità eteroaromatiche e dei loro complessi metallici, può risultare molto interessante utilizzarle per la realizzazione di metallo-recettori che siano capaci di interagire selettivamente con opportuni substrati biologici.

Recentemente sono stati sintetizzati sistemi macrociclici contenenti unità aromatiche, in grado di coordinare due ioni Zn(II) e promuovere la rottura idrolitica di ATP (Fig. 1.5).¹²

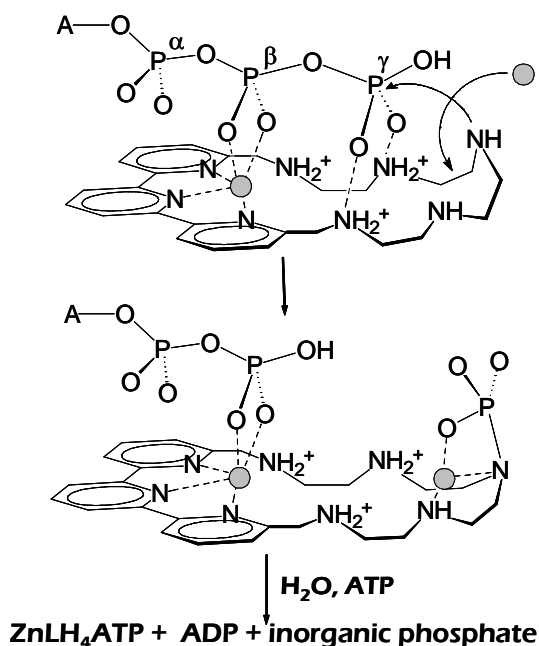


Fig. 1.5- Schema di reazione tra il complesso dinucleare del legante e ATP.

In passato, complessi mono- e polinucleari di Zn(II) sono stati utilizzati come recettori selettivi per nucleosidi. L'esempio più famoso è quello dei complessi di Zn(II) con tetraazamacrocicli, quali il 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (cyclen).¹³ Questo complesso è capace di coordinare nucleobasi, nucleosidi e loro derivati contenenti l'unità immidica CO-NH-CO, quali ad esempio timidina, uridina e AZT noto farmaco antivirale contenente un'unità uracile. La coordinazione avviene grazie alla deprotonazione, assistita dal centro metallico, dell'unità immidica (Fig. 1.6), ed è del tutto selettiva rispetto ad altri nucleosidi, quali adenosina, timidina o citidina, che non vengono coordinati.

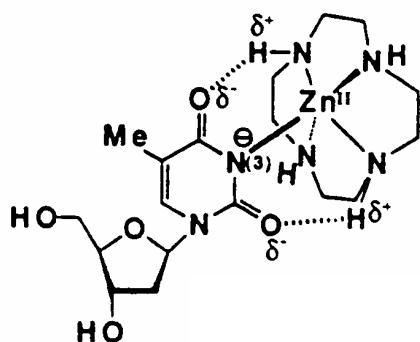


Fig. 1.6- Modo di interazione della timidina deprotonata con il complesso $[Zn(cyclen)]^{2+}$.

La coordinazione avviene attraverso la deprotonazione a pH neutro del gruppo NH e simultanea coordinazione allo ione metallico. La funzione imide deprotonata così generata, inoltre, può dar luogo a due forti legami a idrogeno tra i gruppi CO del substrato e i gruppi amminici NH del macrociclo. In pratica, l'elevata selettività nella coordinazione è realizzata grazie a un'ottima complementarità geometrica tra siti di legame del substrato (CO-N-CO) e quelli del complesso $[Zn(cyclen)]^{2+}$ (ione metallico e gruppi amminici). Di conseguenza, le altre nucleobasi, che non posseggono la funzione immidica, non vengono coordinate. Questo modo di coordinazione, in linea di principio, può essere sfruttato per la sintesi di altri complessi di Zn(II) capaci non solo di riconoscere selettivamente substrati contenenti la funzione immidica CO-NH-CO, ma anche di segnalarne la presenza tramite una variazione di una loro proprietà chimico-fisica

facilmente quantificabile e che possa essere alterata dal processo di coordinazione. L'inserimento di un'unità fluorescente all'interno di un sistema poliamminico macrociclico potrebbe portare alla realizzazione di un chemosensore di fluorescenza per nucleosidi. Condizione necessaria per ottenere questo risultato, ovviamente è che l'emissione di fluorescenza del fluoroforo utilizzato sia alterata in maniera quantificabile dal processo di coordinazione.

1.4 Interazione di metallo-recettori con DNA

Lo studio dell'interazione di piccole molecole con acidi nucleici ha assunto una rilevanza sempre crescente, non solo per gli innumerevoli effetti biologici conseguenti a tale interazione, ma anche per comprendere la specificità della loro azione e progettare quindi nuovi agenti diagnostici sempre più efficaci. La natura delle interazioni può essere di diverso tipo. Oltre a reazioni con l'acido nucleico di tipo covalente, si possono avere legami esterni essenzialmente elettrostatici¹⁴, oppure legami in cui la molecola si adagia nelle scanalature del DNA stabilizzandosi¹⁵, in funzione dell'ingombro sterico, nel *minor groove* o nel *major groove* o infine processi intercalativi¹⁶, in cui una molecola che contiene un residuo aromatico od eteroaromatico esteso si inserisce all'interno dello spazio esistente tra due coppie di basi consecutive di un acido nucleico a doppia elica.

Lerman¹⁷, per primo, nel 1961, studiando il comportamento chimico-fisico di sistemi DNA/acridina anche sulla base di studi ai raggi x, propose l'ipotesi dell'intercalazione e un modello interpretativo secondo il quale quando una molecola si intercala tra due paia di basi, essa distorce la struttura dell'acido nucleico rendendo non più reattivo il sito adiacente così che in condizioni di saturazione completa, solamente una cavità su due dell'acido nucleico viene occupata (Fig. 1.7).

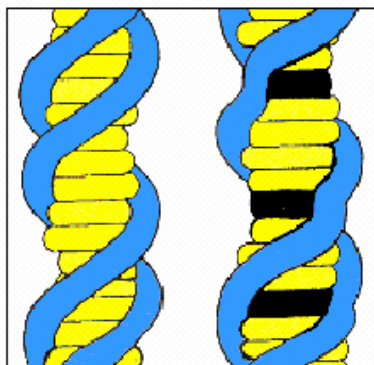


Fig 1.7- Rappresentazione degli effetti sulla struttura secondaria del DNA provocati dall'intercalazione (in nero sono rappresentate le molecole di intercalante).

In genere l'analisi delle interazioni mostra la presenza di due diversi processi di legame denominati I e II. ¹⁸ Il processo I è stato associato con il vero e proprio processo intercalativo: si tratta di una interazione forte con costante di associazione DNA/intercalante pari a 10^4 - 10^6M^{-1} . E' stato inoltre evidenziato che in seguito all'inserzione di piccole molecole, quali ad esempio la proflavina, la distanza tra due coppie di basi adiacenti passa dal valore caratteristico di 3.4 Å in assenza di intercalante al valore di 6.8 Å. Per quanto riguarda il processo II è stato riscontrato che l'affinità di legame è minore e dipendente dalla concentrazione di elettroliti aggiunti: all'aumentare della forza ionica della soluzione si ha una notevole diminuzione della costante di equilibrio del processo II, indice di una interazione elettrostatica con la catena dei gruppi fosfato carica negativamente e correlata alla autoaggregazione dell'intercalante sulla superficie esterna della doppia elica del DNA. ¹⁹ Il processo II non prevede pertanto una vera e propria intercalazione ma, tuttavia, le conseguenze biologiche di queste "interazioni esterne" sono altrettanto importanti. I due processi sono stati riscontrati inizialmente nello studio dell'interazione della proflavina con il DNA (Fig. 1.8).

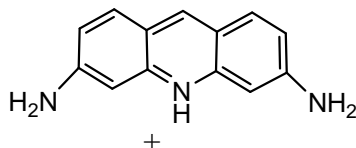


Fig. 1.8- Proflavina.

La proflavina si lega al DNA con un legame forte di tipo intercalativo e anche con un legame più debole di tipo elettrostatico. Alle misure spettroscopiche

termodinamiche che permettono di ricavare la costante di associazione del complesso intercalante/DNA e di valutare la dimensione del sito, è spesso utile affiancare misure cinetiche che consentono di stabilire se la reazione di complessazione avviene in più stadi e fare luce sul meccanismo dell'intercalazione.

Un metallo-intercalante è una molecola contenente un centro metallico capace di intercalarsi nella struttura dell'acido nucleico. Interessanti esempi di metallo-intercalanti ovvero di complessi stabili, inerti e idrofili caratterizzati da un catione metallico coordinato a un residuo eteroaromatico planare hanno trovato interessanti applicazioni come agenti di sequenziamento e/o di frammentazione degli acidi nucleici. Lippard per primo ha ideato complessi quadrati planari di Pt(II) contenenti un residuo eteroaromatico capace di intercalarsi stabilmente all'interno del DNA.²⁰

Non a caso, il cis-platino rappresenta il principale agente anticanceroso basato su un centro metallico. E' noto come la coordinazione del cis-platino porti a grosse modificazioni nella struttura del DNA (Fig. 1.9):

- la doppia elica assume una struttura piegata ad angolo (40-60°) nel punto il cisplatino si coordina
- parziale svolgimento della doppia elica
- perdita delle interazioni di stacking tra le nucleobasi, con angoli diedri di 25°-50°
- le interazioni via legame tra le nucleobasi a idrogeno sono indebolite (minore stabilità termodinamica del DNA)

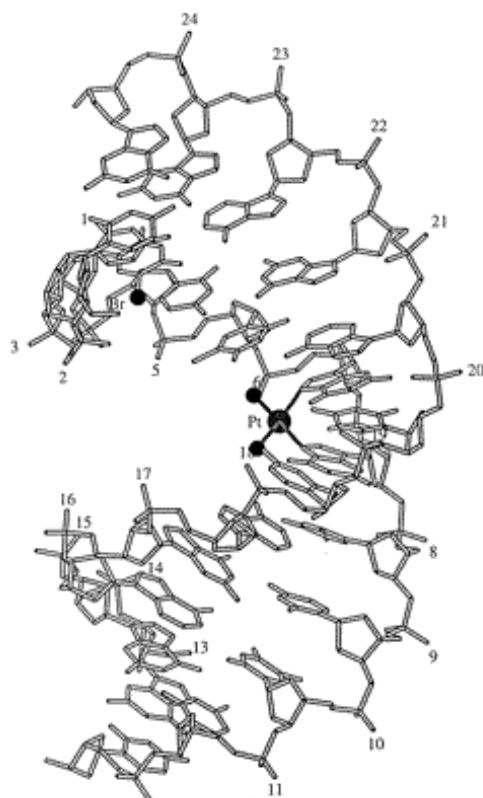


Fig. 1.9- Struttura di cis-Pt-d(CCTTCTG*G*TCTCC)•d(GGAGACCAGAGG).

Anche complessi metallici di Zn(II) e Cu(II) del neotrien (Fig. 1.10), costituiscono interessanti esempi di metallo-intercalanti planari in cui il residuo eteroaromatico fenantrolinico intercala stabilmente tra due coppie di basi dell'acido nucleico, portando i centri metallici in prossimità del DNA e provocandone la scissione attraverso un'azione idrolitica.²¹

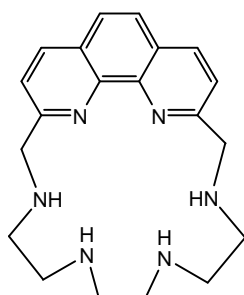


Fig. 1.10- Neotrien (2,5,8,11-tetraaza[12]-[12](2,9)[1,10]-fenantrolinofano).

Le innumerevoli potenzialità dei metallo-intercalanti hanno incentivato la progettazione di questi sistemi. Una interessante famiglia di metallo-intercalanti progettata da Lippard e collaboratori, è caratterizzata dalla

presenza di un residuo aromatico in grado di intercalarsi al DNA e funzionalizzato con una unità chelante capace di coordinare uno ione metallico: in questo caso la parte aromatica ancora la molecola al DNA e posiziona, grazie al braccio chelante, il centro metallico in prossimità della catena polinucleotidica, con la quale il metallo può interagire anche dall'esterno.²²

In altri esempi, la presenza di un sistema di ancoraggio per il DNA particolarmente esteso, come le unità eteroaromatiche dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) o 1,10-fenantrolina (phen) incrementa notevolmente le interazioni di stacking con le coppie di basi del DNA e di conseguenza anche la stabilità del complesso legante/DNA.

La presenza di un complesso stericamente ingombrato permette inoltre di orientare selettivamente il legante verso il *major groove* del DNA dove può realizzare un *photo-cleavage* della catena polinucleotidica, direttamente *in situ*, grazie ad un trasferimento di carica legante-metallo, oppure sfruttando la coniugazione con peptidi chimera, capaci di riconoscere in modo specifico sequenze di DNA, può legarsi ad esse e segnalarne la presenza grazie a opportuni fluorofori (Fig. 1.11), oppure può realizzare l'idrolisi del legame fosfodiesterico ad una determinata lunghezza dalla catena.²³

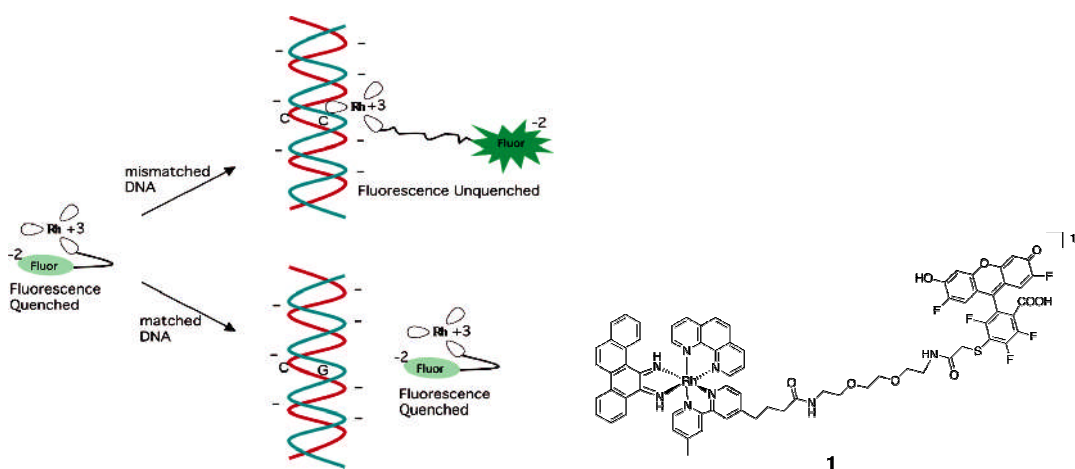


Fig. 1.11 – Esempio di design di un recettore fluorogenico specifico per mismatches.

Sebbene gli esempi di metallo-recettori sopra riportati non siano esaustivi dell'argomento, è importante sottolineare come sfruttando proprietà fotofisiche, fotochimiche e redox di questi complessi metallici innovativi sia possibile ottenere dei potenti strumenti per esplorare e riconoscere selettivamente sequenze specifiche di acidi nucleici.

1.5 Obiettivi del presente lavoro di tesi

La sintesi e il design di leganti poliamminici lineari e macrociclici altamente preorganizzati ha contribuito a incrementare la conoscenza non solo dei processi di riconoscimento molecolare, attraverso l'uso di siti di legame specifici, ma anche della trasformazione e del trasporto di un gran numero di substrati come cationi inorganici e organici, specie anioniche e molecole neutre.^{4a} E' stato visto che fattori strutturali giocano un ruolo importante nel determinare la forza e la selettività dell'interazione tra il recettore e il substrato. Sulla base di queste considerazioni, nel presente lavoro di tesi abbiamo pensato di sintetizzare leganti poliamminici macrociclici e lineari, contenenti appropriati siti di legame e/o cavità di varie dimensioni e forma con l'intento di studiarne le proprietà di interazione con il DNA. In particolare si è deciso di studiare diversi macrocicli poliazacicloalcani funzionalizzati con subunità eteroaromatiche estese come 2,2'-bipiridile, 1,10-fenantrolina, 2,6-piridina, proflavina (leganti **L1-L16** in Fig 1.12). L'inserimento di queste unità comporta la presenza di altri siti di legame per i cationi metallici e, inoltre, permette di combinare alle proprietà coordinative del macrociclo le proprietà fotofisiche e fotochimiche dei complessi di questi eterocicli quali il 2,2'-dipiridile e la 1,10-fenantrolina. Sono stati ad esempio sintetizzati leganti contenenti l'unità eteroaromatica 1,10-fenantrolina (**L1, L2, L5-L9**) per sfruttarne le proprietà fotochimiche e studiarli come chemosensori fluorimetrici nei confronti di ioni metallici e substrati anionici. Inoltre le note proprietà intercalanti dell'unità fenantrolina renderanno molto interessante lo studio delle proprietà di interazione di questi sistemi con il DNA.

Abbiamo pensato di sintetizzare il legante **L11**, avente un' ampia cavità macrociclica in grado di coordinare due ioni Zn(II), per studiarne le proprietà coordinative nei confronti di substrati anionici di interesse biologico contenenti l'unità CO-NH-CO e investigare la selettività di coordinazione di sequenze ribonucleotidiche come UpU, sequenze esaribonucleotidiche contenenti UpU e metaboliti come Riboflavina.

Si è deciso di utilizzare l' unità eteroaromatica dppz con proprietà intercalanti, per sintetizzare una famiglia di complessi di Ru(II) e studiarne le interessanti proprietà di interazione con il DNA (**L13-L15** in Fig. 1.12). Essi recano un macrociclo poliamminico, in grado di coordinare un secondo ione (es. Cu^{2+} , che potrebbe essere capace di provocare la rottura della catena polinucleotidica). Inoltre, il complesso **L13** è in grado di agire come fotocatalizzatore nelle reazioni di ossidazione/riduzione in processi coinvolgenti specie anioniche.^{4e} La sfera di coordinazione del Ru(II) è completata da diversi residui eteroaromatici: il primo contiene due gruppi bipyridile, il secondo due dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina), il terzo un gruppo bipyridile e uno dppz. Essi hanno una emissione molto debole in acqua, poiché in questo solvente si ha legame o trasferimento di protoni verso gli atomi di azoto della fenazina,²⁴ ma la loro luminescenza viene ripristinata a seguito di interazione con il DNA, perché le molecole di acqua che circondano il dppz vengono rilasciate a seguito dell'intercalazione, dando luogo ad un effetto light-switching.

Inoltre abbiamo pensato di sintetizzare un nuovo complesso contenente una unità proflavina, dalle note proprietà intercalanti,¹⁷ separata da un braccio spaziatore da un complesso di Pt(II) (**L16** in Fig. 1.12). L'intento è stato quello di studiare la combinazione di due effetti in una molecola bifunzionale: la capacità intercalativa dell'unità proflavina e l'attività dell'unità dietilammino-cloro-platino.

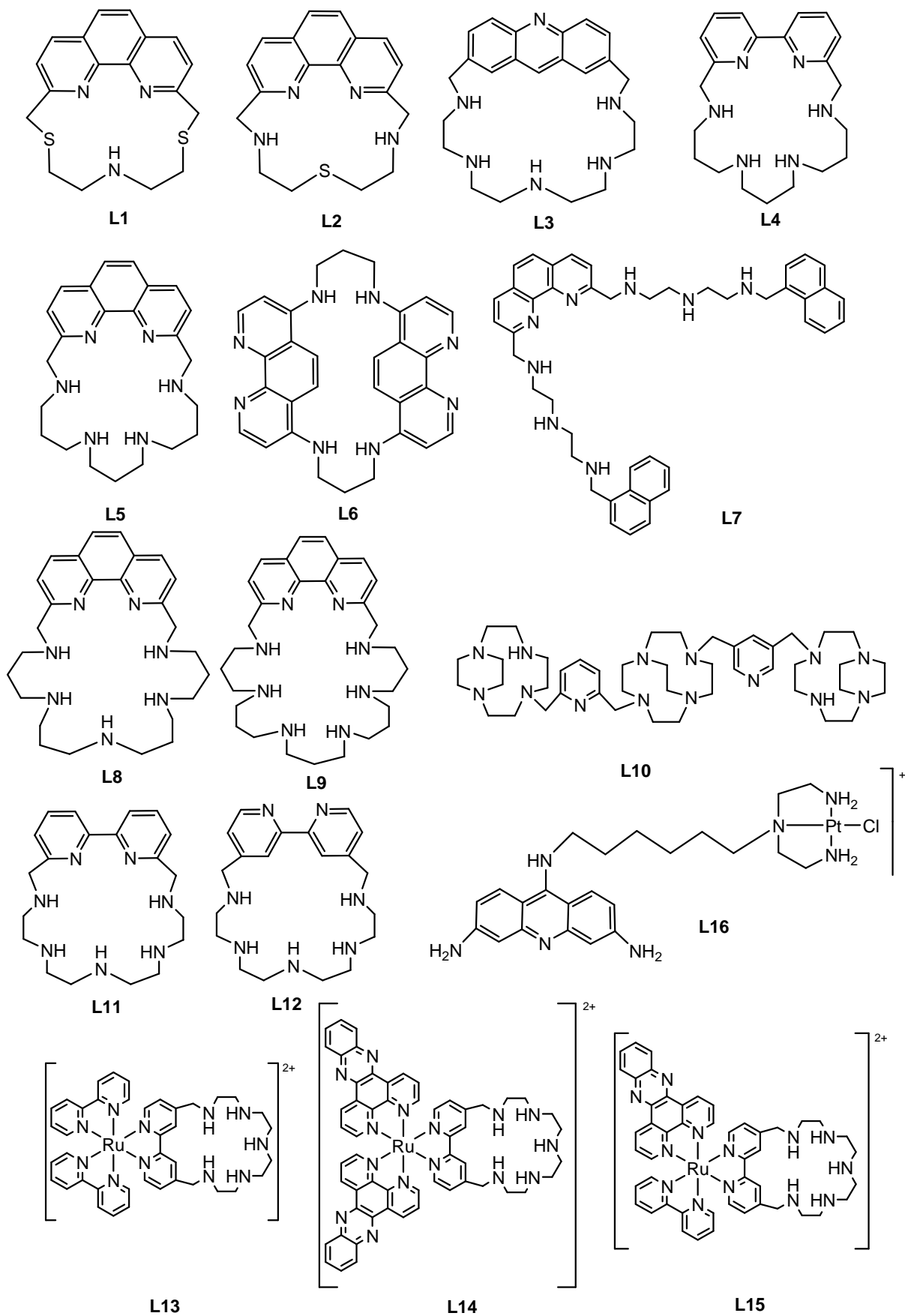


Fig. 1.12- Schema dei leganti sintetizzati e studiati.

1.6 Bibliografia

1. (a) Lehn, J.-M. *Accounts Chem. Res.* **1978**, 11, 4. (b) Lehn, J.-M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89. (c) Lehn, J.-M., *Science* **1985**, 227, 849. (d) Hosseini, M.W. in *Bioorganic Chemistry Frontiers*, Dugas, H.; Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1993**, Vol3, p. 69. (e) Lehn, J.-M. *Pure Appl. Chem.* 1979, 51, 979. (f) Lehn, J.-M. in *Design and Synthesis of Organic Molecules Based on Molecular Recognition*. Van Binst, G.; Ed. Springer, Berlin, **1986**. (g) Sutherland, I.O. *Chem. Soc. Rev.* **1986**, 15, 63. (h) Hayward, R.C. *Chem Soc. Rev.* **1983**, 12, 285.
2. Cohen, S.S. *A guide to the polyamines*; Oxford University Press: Oxford, **1998**.
3. Pegg, A.E. *Cancer Res.* **1988**, 48, 759.
4. (a) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Ciattini, S.; Giorgi, C.; Masotti, A.; Paoletti, P.; Valtancoli, B.; Navon, N.; Meyerstein, D. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 2383-2391. (b) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Masotti, A.; Valtancoli, B.; Roque, A.; Pina, F. *Chem. Commun.* **2000**, 561-562. (c) Bencini, A.; Bianchi, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Masotti, A.; Paoletti, P. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7686-7689. (d) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Berni, E.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Valtancoli, B.; Lodeiro, C.; Roque, A.; Pina, F. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 6172-6179. (e) Lodeiro, C.; Parola, A.J.; Pina, F.; Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Masotti, A.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 2968-2975.
5. (a) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 941-948. (b) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 393-400. (c) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Valtancoli, B.; Bernardo, M.A.; Pina, F. *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 3806-3813. (d) Bazzicalupi, C.; Beconcini, A.; Bencini, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Masotti, A.; Valtancoli, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 1675-1682. (e) Bencini, A.; Bernardo, M.A.; Bianchi, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Pina, F.; Valtancoli, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1911-1918.
6. Arranz, P.; Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Ciattini, S.; Fornasari, P.; Giorgi, C.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 6383-6389.
7. (a) Usashima, K.; Soga, T.; Koga, K. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 5311-5314. (b) Vögtle, F.; Müller, W.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, 23, 712-714. (c) Kumar, A.; Mageswaran, S.; Sutherland, I.O. *Tetrahedron* **1986**, 42, 3291-3302. (d) Vögtle, F.; Müller, W.M.; Werner, V.; Losensky, H.-W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, 26, 901-903. (e) Jazwinski, J.; Lehn, J.M.; Méric, R.; Vigneron, J.-P.; Cesario, M.; Guilhen,

J.; Pascard, C. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 3489-3492. (f) Pratt, J.A.E.; Sutherland, I.O.; Newton, R.F. *J. Chem. Soc., Perkin 1* **1988**, 13-22. (g) Pietraszkiewicz, M.; Gasiorowski, R. *Chem. Ber.* **1990**, 123, 405-406. (h) Menif, R.; Reibenpies, J.; Martell, A.E. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 3446-3454. (i) Fabrizzi, L.; Pallavicini, P.; Parodi, L.; Perotti, A.; Taglietti, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2439-2441. (j) Fernández-Saiz, M.; Schneider, H.-J.; Sartorius, J.; Wilson, W.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4739-4745. (k) Lai, Y.-H.; Ma, L.; Mok, K.F. *Tetrahedron* **1996**, 52, 4673-4678.

8. (a) Drew, M.G.B.; Felix, V.; McKee, V.; Morgan, G.; Nelson, J. *Supramol. Chem.* **1995**, 5, 281-287. (b) Inokuchi, F.; Miyahara, Y.; Inazu, T.; Shinkai, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1364-1366. (c) Dougherty, D.A. *Science* **1996**, 271, 163-168. (d) Kikuchi, Y.; Aoyama, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, 69, 217-220. (e) Allen, F.H.; Howard, J.A.K.; Hoy, V.J.; Desiraju, G.R.; Readdy, D.S.; Wilson, C.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4081-4089.

9. (a) Muratami, Y. *Top. Curr. Chem.* **1983**, 115, 107-155. (b) Tabushi, I.; Yamamura, K. *Top. Curr. Chem.* **1983**, 113, 145-182. (c) Murakami, Y. *Inclusion Phenomena and Molecular Recognition*; Atwood, J.Ed., Plenum Press: New York, 1990; pp 107-117.

10. Bencini, A.; Bianchi, A.; Lodeiro, C.; Masotti, A.; Parola, A.J.; Pina, F.; de Melo, J.S.; Valtancoli, B. *Chem. Comm.* **2000**, 1639-1640.

11. Lodeiro, C.; Pina, F.; Parola, A.J.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Bazzicalupi, C.; Ciattini, S.; Giorgi, C.; Masotti, A.; Valtancoli, B.; Seixas de Melo, J. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 6813-6819.

12. Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Danesi, A.; Faggi, E.; Giorgi, C.; Lodeiro, C.; Oliveira, E.; Pina, F.; Valtancoli, B. *Inorg. Chim. Acta.* **2008**, 3410-3419.

13. Mitsuhiro S., Kimura E. and Motoo S., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6730-6737.

14. Carrier A.; Le Ber P.; Auclair C.; *Biochemistry*, **1990**, 29(25), 6002-6009.

15. Nguyen S.; Hamelberg D.; Bailly C.; Colson P.; Stanek J.; Brun R.; Niedle S.; Wilson W. D.; *Biophys. J.* **2004**, 86(2), 1028-1041.

16. Matsuzawa Y.; Minagawa K.; Yoshikawa K.; Matsumoto M.; Doi M.; *Nucleic Acids Symposium Series*, **1991**, 25, 131-132.

17. Lerman L.S. *J. Mol. Biol* **1961**, 3, 18-30.

18. Blake, A.; Peacocke, A.R. *Biopolymers*. 1969, 6, 1225-1253.

19. Porumb, H.; *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 1978, 34(3), 175-195.

- 20.** Janette, K.W.; Lippard, S.J. ; Vassiliades, G.A.; Bauer, W.R.; *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, 71, 3839.
- 21.** Biver, T.; Secco, F.; Tinè, M.R.; Venturini, M. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 33-40.
- 22.** (a) Lippard S., *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 211-217, (b) Hiort, C.P.; Lincoln, B. Nordèn, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3448-3454, (c) Arounaguirri S., D. Easwaramoorthy, A. Ashokkumar, Aparna Dattagupta and G.M. Bhaskar, *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **2000**, 112, 1-17.
- 23.** Zeglis, B.M.; Barton, J.K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5654-5655.
- 24.** (a) B. Gholamkhash, K. Koike, N. Negishi, H. Hori, K. Takeuchi, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 756-765. (b) R.B. Nair, B.M. Cullum, C.J. Murphy, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 962. (c) C. Turro, S.H. Bossmann, Y. Jenkins, J.K. Barton, N.J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9026-9032

2. Parte Sperimentale

2.1. Misure potenziometriche

Le costanti di equilibrio per le reazioni di protonazione e di complessazione dei leganti **L1-L14** sono state determinate attraverso misure pH-metriche in soluzioni degassate di NMe_4Cl 0.1 mol dm^{-1} a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$, impiegando la strumentazione e la procedura già descritte in letteratura.¹ Le costanti di protonazione di ATP e ADP sono state ottenute dalla Ref. 2. Un elettrodo combinato a vetro è stato tarato mediante titolazioni acido-base con soluzioni a titolo noto di HCl e NMe_4OH decarbonate e determinando il punto equivalente con il metodo di Gran;³ tale metodo permette anche di determinare il potenziale standard E^0 di cella e il prodotto ionico dell'acqua ($\text{pK}_w=13.83(1)$ a 298.1 K in NMe_4Cl 0.1 mol dm^{-3}). In generale per le misure sono state impiegate soluzioni $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ dei leganti. Nelle misure di complessazione il rapporto molare metallo-legante è stato variato da 0.5 a 1.8 per accertarsi della formazione delle specie con stechiometria 1:2. Per ogni sistema sono state eseguite almeno tre diverse titolazioni (ognuna con circa 100 punti sperimentali) nell'intervallo di pH 2.5-11 e i relativi dati sono stati successivamente elaborati con il programma di calcolo HYPERQUAD⁴ per calcolare le costanti di equilibrio globali.

2.2. Misure di risonanza magnetica nucleare

Caratterizzazione spettroscopica dei prodotti. Gli spettri NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Varian Gemini a 300.07 MHz (^1H), 75.46 MHz (^{13}C) e 121.46 MHz (^{31}P) e con uno spettrometro Bruker FT-NMR Avance III 400 MHz in D_2O , CDCl_3 , DMSO-d_6 , MeOD. Negli spettri ^1H NMR la posizione dei picchi è riportata relativamente al TMS (CDCl_3) o all'HOD a 4.79 ppm

(D₂O), mentre il diossano è stato usato come standard di riferimento negli spettri ¹³C NMR ($\delta = 67.2$ ppm) in soluzione di D₂O; i chemical shift dei segnali ³¹P NMR sono relativi ad una soluzione di H₃PO₄ all'85% impiegata come riferimento esterno.

Titolazioni ¹H e ³¹P NMR. Per aggiustare il pD delle soluzioni dei leganti o dei loro complessi con metalli e anioni sono state fatte piccole aggiunte di soluzioni NaOD o DCl. I valori di pH sono stati calcolati dai relativi valori di pD (misurati con un pH-metro Metrohm 713) utilizzando la seguente espressione⁵:

$$\text{pH} = \text{pD} - 0.40$$

2.3. Spettroscopia elettronica

Gli spettri di assorbimento UV-Vis sono stati registrati con uno spettrofotometro Shimadzu UV-2101PC con una cella da 1 cm di spessore e termostattizzata a 298.1 ± 0.1 K con termostato Haake mod. FE 2. Il pH delle soluzioni è stato variato tramite aggiunte di piccoli volumi di soluzioni di HCl o NaOH 0.1 M e 0.01 M ed è stato misurato mediante un pH-metro Metrohm 713. Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati registrati mediante uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS-55 a 298.1 ± 0.1 K. Per la registrazione degli spettri presso il gruppo del Prof. Fernando Pina dell'Università di Lisbona è stato impiegato uno spettrofluorimetro Horiba-Jobin Yvon-Spex Fluorog 3.22 equipaggiato con un bagno termostatico ThermoNeslab RTE7.

2.4. Spettroscopia IR

Gli spettri IR sono stati registrati utilizzando uno strumento Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR.

2.5. Spettrometria di massa

Gli spettri di massa per la caratterizzazione di leganti e complessi sono stati registrati impiegando uno strumento ESI-TOF Mass TSQ 700 FINNIGAN.

2.6. Diffrazione a raggi X

Le analisi diffrattometriche relative ai cristalli singoli di $[\text{Cu}_8\mathbf{L3}(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{NO}_3)_3]\cdot(\text{NO}_3)_5\cdot 32\text{H}_2\text{O}$ (**14**) sono state condotte a temperatura ambiente con un diffrattometro equipaggiato con detector CCD (Bruker) e radiazione $\text{Cu}_{K\alpha}$. Nel caso dei cristalli singoli (**15**)-(**20**) è stato utilizzato un diffrattometro Oxford Diffraction Xcalibur3 equipaggiato con detector CCD e una radiazione $\text{Mo}_{K\alpha}$. Le raccolte sono state effettuate a temperatura ambiente. Nel caso del cristallo $[(\text{H}_6\mathbf{L9})_2\text{TTP}_2(\text{H}_2\text{O})]_2\text{Br}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (**21**) la raccolta è stata effettuata a 150K. I dati raccolti per tutti i composti sono stati corretti per il fenomeno di Lorentz-polarizzazione. L'assorbimento è stato corretto usando un metodo empirico. Le strutture sono state risolte usando i metodi diretti del programma SIR2004⁶ (SIR97 per (**14**)) e raffinate contro F^2 usando SHELXL-97⁷ (SHELXH per (**14**)).

I dati cristallografici relativi alle strutture risolte sono elencati in Tabella 2.1.

Tabella 2.1 – Dati cristallografici relativi ai composti $[\text{Cu}_8\mathbf{L3}(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{NO}_3)_3]\cdot(\text{NO}_3)_5\cdot 32\text{H}_2\text{O}$ (**14**), $[(\text{H}_{4.5}\mathbf{L5})(\text{H}_2\text{O})_{0.5}\text{Cl}_{0.5}][\text{ClO}_4]_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**15**), $[\text{Cu}(\mathbf{HL4})(\text{ClO}_4)][\text{ClO}_4]_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**16**), $[\text{Zn}(\mathbf{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (**17**), $[\text{Cd}(\mathbf{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (**18**), $[\text{Pb}(\text{H}_2\mathbf{L4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_3\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**19**), $[\text{Pb}(\mathbf{HL3})\text{Br}][\text{PF}_6]_{1.5}[\text{NO}_3]_{0.5}\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**20**), $[(\text{H}_6\mathbf{L9})_2\text{TTP}_2(\text{H}_2\text{O})]_2\text{Br}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (**21**).

	14	15	16	17	18	19	20	21
gruppo spaziale	P2 ₁ /a	P $\bar{1}$	P $\bar{1}$	P $\bar{1}$	P $\bar{1}$	P2 ₁ /a	P _{cca}	P1
a (Å)	19.647(1)	7.540(5)	8.335(1)	8.262(3)	8.503(3)	14.161(1)	32.219(2)	13.1824(8)
b (Å)	28.417(2)	12.277(2)	13.020(2)	13.446(4)	13.253(4)	11.3706(8)	13.5409(6)	14.2832(9)
c (Å)	26.741(1)	19.118(7)	15.066(2)	13.537(4)	13.794(3)	20.586(2)	13.0922(7)	17.092(1)
α (°)	90	83.97(1)	73.93(1)	101.51(2)	101.6(2)	90	90	91.782(5)
β (°)	96.067(5)	79.31(2)	78.90(1)	100.12(3)	102.7(3)	97.520(7)	90	109.531(5)
γ (°)	90	84.28(1)	84.34(1)	101.09(2)	102.4(3)	90	90	115.968(6)
V(Å ³)	14846(1)	1724(1)	1539(9)	1409.8(8)	1429.8(7)	3286.2(5)	3286.2(5)	2666.3(3)

2.7. Molecular Modeling

Sono stati studiati i seguenti sistemi: addotti formati dalle basi degli acidi nucleici ATP⁴⁻, CTP⁴⁻, TTP⁴⁻, GTP⁴⁻ con la specie esaprotonata del legante **L9** (ad es. [H₆**L9**ATP]²⁺), le specie **L6**, [H₂**L6**]²⁺ [H₄**L6**]⁴⁺, [ZnH₂**L6**], [Zn₂**L6**(OH)₂] per il legante **L6** e le specie [Zn**L7**]²⁺ e [Cd**L7**]²⁺ per il legante **L7**. Le conformazioni di tutte le specie sono state individuate utilizzando metodi di ricerca conformazionale (simulated annealing).

Nel caso degli addotti formati dal legante **L9** tutti i calcoli sono stati effettuati con il forcefield AMBER3 implementato nel programma Hyperchem 7.51⁸ utilizzando una simulazione implicita del solvente (costante dielettrica variabile). Nel caso della ammina libera e delle forme di e tetraprotonata del legante **L6** la ricerca conformazionale è stata effettuata con simulazione implicita del solvente tramite simulated annealing usando il programma Macromodel 7.5.⁹ Questa stessa procedura, seguita da ottimizzazione a livello di teoria DFT/B3LYP con set di base LACVP**, che utilizza un potenziale di core per i metalli, è stata utilizzata nel caso delle specie [ZnH₂**L6**], [Zn₂**L6**(OH)₂], [Zn**L7**]²⁺ e [Cd**L7**]²⁺. I calcoli DFT sono stati effettuati usando il software Jaguar,⁹ con simulazione del solvente effettuata utilizzando il metodo di Poisson-Boltzmann.¹⁰

2.8. Studio termodinamico dei sistemi Dye/DNA

L'interazione dei complessi **L13**, **L14**, **L15**, **L16**, di seguito definiti anche come coloranti (dye), con il DNA è stato effettuato presso il gruppo di ricerca del Prof. Fernando Secco dell'Università di Pisa. Inoltre, per i complessi **L14** e **L15**, lo studio è stato condotto anche in presenza del complesso con Cu²⁺ nel quale lo ione rame è coordinato nella cavità macrociclica del legante.

2.8.1. Materiali

Il DNA utilizzato, di tipo *Calf-Thymus* (CT-DNA), è un prodotto commerciale di Pharmacia venduto sotto forma di sale sodico liofilizzato. Le soluzioni stock del polinucleotide sono state preparate sciogliendo il sale in acqua e

sottoponendo il campione ad un processo di sonicazione e successivamente ad elettroforesi su gel al fine di determinare la lunghezza media dei frammenti di CT-DNA ottenuti. I campioni di soluzione stock sono stati conservati a -20 °C fino al momento del loro impiego; da questo momento in poi sono stati mantenuti a 4 °C.

Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua purificata tramite un sistema Milli-Q della Millipore. Le soluzioni di lavoro sono state ottenute diluendo un volume noto di soluzione stock con NaCl 0.1 M e tamponate a pH = 7 con tampone cacodilato di sodio [NaCac = (CH₃)₂AsOONa] 0.01 M. Le soluzioni stock di NaCl, e Cacodilato sodico sono state preparate a partire dai prodotti commerciali di grado analitico, senza ulteriori purificazioni.

Il titolo delle soluzioni di DNA, prodotte a partire dalla soluzione stock, è stato determinato spettrofotometricamente tramite misure di assorbanza condotte a 260 nm, con forza ionica I = 0,11 M, pH = 7 e utilizzando come valore del coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 13200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; in questo modo la molarità ottenuta risulta espressa in moli di paia di basi (bp) per litro^{a,b}.

2.8.2. Metodi

Trattamento del DNA: sonicazione ed elettroforesi su gel di agarosio.

La sonicazione del CT-DNA è stata effettuata con uno strumento MSE-Sonyprep. Sono stati eseguiti 7 cicli di sonicazione di 10 s con intervallo di

a) La concentrazione degli acidi nucleici, o in generale dei polinucleotidi in doppia elica viene generalmente espressa in moli di paia di basi (bp) per litro. Questa è la convenzione adottata anche in questo lavoro.

b) Il coefficiente di estinzione molare del DNA viene determinato nel seguente modo: Il certificato relativo al campione usato attesta che 50 µg/mL di DNA hanno assorbanza pari a 1 in cella da 1 cm e a $\lambda = 260 \text{ nm}$. Secondo la legge di Lambert e Beer, si ha che $\epsilon = 1/C$ quando il cammino ottico è di 1 cm. C è la concentrazione di DNA espressa in unità monomeriche per litro. Il peso molecolare medio del DNA utilizzato comunemente in letteratura è 330, calcolato come media pesata delle quattro unità monomeriche presenti nel DNA. Pertanto $C = 50/(1000 \times 330)$ e $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (in singole basi). Il valore da utilizzare per ϵ nella determinazione del titolo in bp è quindi doppio, cioè pari a $13200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

20 s tra uno e l'altro e con ampiezza di 14 micron introducendo la sonda direttamente nel recipiente contenente il campione. Questa procedura ha permesso di spezzare il DNA in frammenti più corti, la cui lunghezza è stata determinata per mezzo di elettroforesi su gel di agarosio. Corse elettroforetiche ripetute indicano che i frammenti del DNA sonicato hanno una lunghezza media di circa 700 paia di basi (bp).

Misure di pH

Le misure di pH sono state eseguite con un pH-metro Metrohm 713 usando un microelettrodo a vetro Metrohm combinato, calibrato in precedenza con opportune soluzioni tampone. Tutte le soluzioni sono state portate a pH = 7 mediante piccole aggiunte di acido (HCl) o base (NaOH) 1 M.

Misure spettrofotometriche

Le misure spettrofotometriche sono state eseguite con uno spettrofotometro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 35 a doppio raggio. Le soluzioni erano contenute in celle di quarzo con cammino ottico di 1 cm, munite di tappo a tenuta e termostatate a 298.0 K (precisione ± 0.1 K). Le titolazioni sono state condotte aggiungendo direttamente nella cella spettrofotometrica volumi crescenti di titolante (a concentrazione, forza ionica e pH noti) ad un volume noto di titolando, anch'esso a concentrazione nota e nelle stesse condizioni sperimentali. Le aggiunte sono state eseguite con una microsiringa Hamilton azionata da una microvite Mitutoyo (tale sistema nel suo complesso ha una precisione di 0.166 μ L), che consente di aggiungere quantità molto piccole di titolante (8.3 μ L per giro di vite).

Misure spettrofluorimetriche

Le misure di fluorescenza sono state eseguite mediante uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS55, dotato di lampada allo Xenon e lettura digitale fino al millesimo d'intensità di fluorescenza.

Le soluzioni erano contenute in una microcella da fluorescenza in quarzo, con cammino ottico di 1 cm, munita di tappo a tenuta e termostatata a 298.0 K (precisione ± 0.1 K). Anche in questo caso le titolazioni sono state eseguite aggiungendo il titolante con lo stesso sistema descritto per le titolazioni spettrofotometriche.

2.9. Sintesi dei leganti

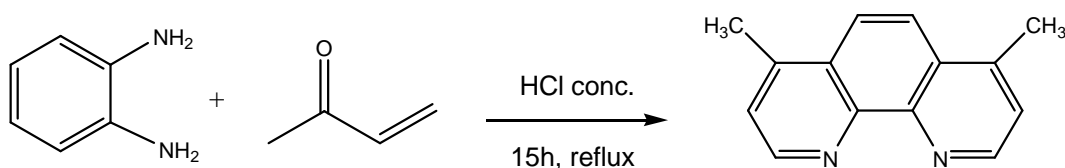
2.9.1. Generalità

Per le cromatografie analitiche TLC sono stati usati fogli di allumina neutra 60 F₅₂₄ su plastica Merck e fogli di gel di silice 60 F₅₂₄ su plastica Merck. Per le cromatografie su colonna è stata impiegata allumina neutra Fluka (gravimetrica, 0.05-0.15 mm, secondo la scala di attività di Brockmann). Per la rivelazione è stata impiegata una lampada UV ($\lambda=254\text{nm}$). I solventi e i reagenti sono stati impiegati senza ulteriore purificazione. L'acetonitrile anidro è stato ottenuto trattando il solvente commerciale con setacci molecolari 4 Å attivati per prolungato riscaldamento in stufa a 120°. Le analisi elementari sono state eseguite impiegando un analizzatore elementare Carlo Erba Analyzer 1106.

Per la sintesi dei leganti **L1-L5** e **L8-L9** si rimanda agli articoli riportati in appendice.

2.9.2. Sintesi di L6

2.9.2.1. Sintesi della 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina



Procedimento:

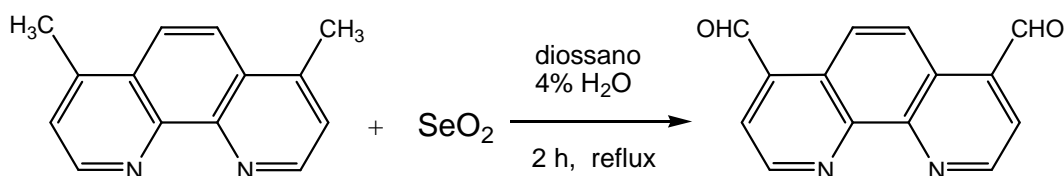
In un pallone da 1l a tre colli munito di refrigerante e imbuto da 100 ml si sciolgono 26 gr (240mmol) di o-fenilendiammina (FW:108.14) in 250 ml di HCl conc. a riflusso sotto agitazione. Una volta disciolto si aggiungono 100 ml (1.23 mol) di metil-vinil-chetone (FW: 70.1) con imbuto sgocciolatore in un

tempo di circa una ora.¹¹ Durante l'aggiunta la soluzione passa da un colore marrone chiaro a nero. La soluzione è lasciata a riflusso sotto agitazione a 80° per 24 h. Successivamente la soluzione è portata a temperatura ambiente e si osserva la formazione di un solido dall'aspetto gelatinoso. Si aggiungono 170 ml di acqua demineralizzata e si procede con tre estrazioni con cloroformio (450 ml di cloroformio per estrazione). Alla fase acquosa si addiziona ammoniaca fino a raggiungere un pH=10. Si fanno tre estrazioni con cloroformio (600 ml di cloroformio per estrazione). La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ per 30 minuti e successivamente portata a secco al rotavapor. Il residuo ha un aspetto oleoso e viene essiccato in stufa una notte a 35°C. Per la sua purificazione si fa reagire con HCl gassoso e per ottenere maggiore precipitato si tiene la soluzione in congelatore per 30 minuti. Dopo aver filtrato il prodotto, si scioglie nella minor quantità possibile di H₂O e si aggiunge NaOH per deprotonare l'ammina. Si ottiene un precipitato che viene filtrato, sospeso con etere etilico per eliminare l'acqua e di nuovo filtrato. Il prodotto è essiccato in stufa a 35°C. Il prodotto viene purificato per cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come fase mobile AcOEt:MeOH 5:1 v/v, rivelatore UV λ=254 nm). Si ottengono 8.38 gr. di prodotto (40.23 mmol). Resa: 17%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300.0MHz): δ (ppm) 8.99 (d, 2H), 7.97 (s, 2H), 7.42 (d, 2H), 2.75 (s, 6H)

Analisi elementare per C₁₄H₁₂N₂ (FW:208.26) : Calcolata C= 80.74%, H= 5.80% N%=13.45%. Trovata: C= 80.91%, H= 5.97%, N= 13.6%.

2.9.2.2. Sintesi della 4,7-dialdeide-1,10 fenantrolina



Procedimento:

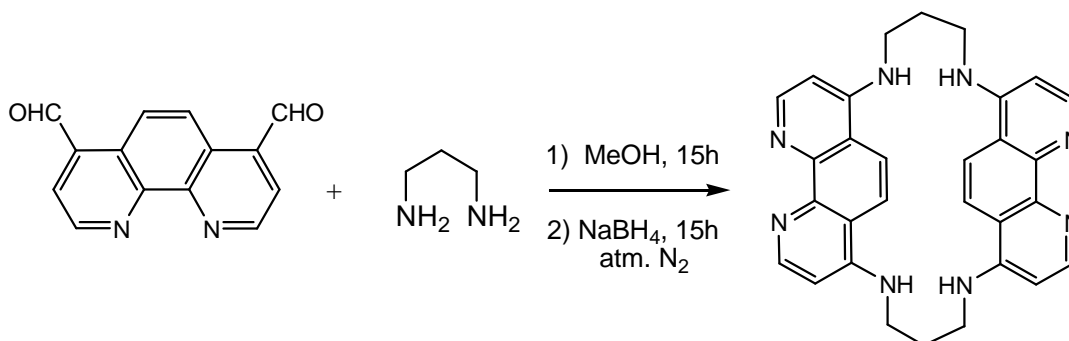
In un pallone da 0.5l si sciolgono 2.76 gr di 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina (13.26mmol) in una miscela di 1,4-diossano:acqua (96:4, v:v) scaldando leggermente. Si aggiungono sotto agitazione 7.36 gr di SeO₂ (66.34mmol FW: 110.96) e si lascia a riflusso per 2h. Dopo si filtra a caldo su celite e il

prodotto precipita nel liquido filtrato via via che si raffredda. Si ottiene un solido color rosa pallido. Il prodotto è purificato con una doppia ricristallizzazione da THF, filtrato e essiccato in stufa a 35°C. Si ottengono 4.14 gr di prodotto (17.55 mmol; FW:236.23)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 10.70 (s, 2H), 9.47 (d, 2H), 9.13 (s, 2H), 8.29 (d, 2H)

Analisi elementare per C₁₄H₈N₂O₂ (FW:236.23) : Calcolata C= 71.18%, H= 3.41% N%=11.85%. Trovata: C= 71.30%, H= 3.50%, N= 11.97%.

2.9.2.3. Sintesi del macrociclo 1,5,20,24-tetraaza-[10]-6,19,25,38-bis-fenantrolinofano esacloridrato (L6·6HCl)



Procedimento:

Si sciolgono separatamente 713.8 µl di 1,3-propanodiammina (8.48 mmol; FW: 74.12) in 70 ml di MeOH anidro e 2 gr de 4,7-dialdeide-1,10-fenantrolina (8.48 mmol; FW: 236) in 48 ml de MeOH anidro . Si vanno ad aggiungere contemporaneamente con due imbutoi sgocciolatori a 50 ml di MeOH anidro sotto agitazione e nell'arco di tempo di 1h. Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 15h. Successivamente si pone il pallone di reazione in congelatore e dopo circa 20 minuti si osserva la precipitazione del prodotto di condensazione ottenendo 1.40 gr (2,54 mmol; FW:548). Si procede quindi alla riduzione da immina a ammina. Si scioglie la immina in 50 ml di MeOH sotto atmosfera di N₂ e si aggiungono 1.44 gr di NaBH₄ (38.32 mmol; FW: 37.8) in costante agitazione e in bagno di ghiaccio. Successivamente si lascia sotto agitazione per 15h a 50°C. Si porta a secco al rotavapor, si aggiungono 70 ml di H₂O e si effettuano tre estrazioni con 50 ml di cloroformio, diclorometano e acetato di etile rispettivamente. La fase organica viene portata a secco. Il residuo viene sciolto con etanolo e sotto

agitazione si aggiunge una soluzione etanolica di acido cloridrico per ottenere la precipitazione del sale cloridrato del prodotto. Si filtra su Buckner e il solido viene seccato in stufa sotto vuoto a 35 °C. Il prodotto viene purificato ricristallizzandolo da etanolo - acqua. La sospensione è filtrata su Buckner e il solido seccato in stufa sotto vuoto a 35°C fino a peso costante ottenendo 980 mg di prodotto (1.15 mmol, FW:847.53). Resa: 13.6%

¹H-NMR (D₂O, 300MHz, pH=2.00): δ (ppm) 9.15 (d, 4H), 8.46 (s, 4H), 8.13 (d, 4H), 4.97 (s, 8H), 3.28(m, 8H), 2.34 (m,4H).

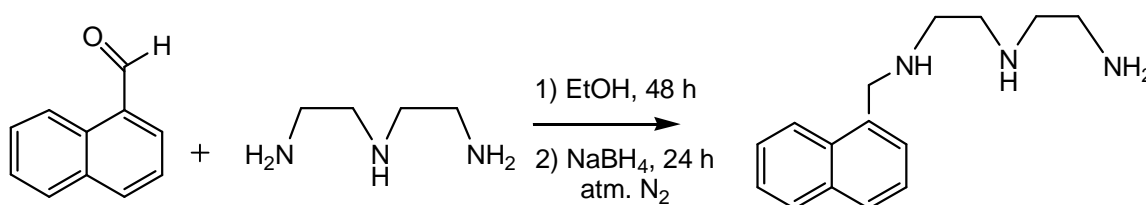
¹³C-NMR (D₂O, 75.4MHz, pH=2.00): δ (ppm) 154.7 (4C), 150.2 (4C), 145.1 (4C), 127.1 (4C), 123.3 (4C), 112.8 (4C), 49.4 (4C), 33.3 (4C).

Analisi elementare per C₃₄H₅₄N₈Cl₆O₆ (FW:847.53) : Calcolata C= 46.40%, H= 6.13% N%=12.73%. Trovata: C= 46.63%, H= 5.83%, N= 13.68%.

MS (*m/z*): 279 ([M+2H]²⁺), 557.40 ([M+H]⁺)

2.9.3. Sintesi di L7

2.9.3.1. Sintesi della N-{2-[Naftalen-1-ilmetil]ammino}etil}etano-1,2-diammina



Procedimento:

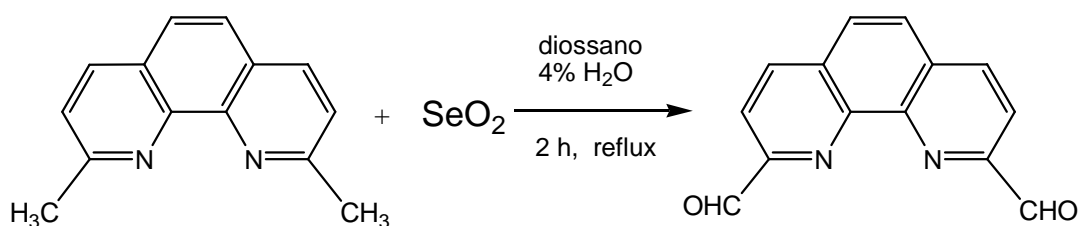
In un pallone a tre colli da 500 mL, munito di un tappo e di tappo a CaCl₂, si introducono, sotto agitazione magnetica e in atmosfera di N₂, 150 mL di etanolo, 6.20 gr di dietilentriammina (60 mmol; FW 103.17) e 1.88 gr di 1-naftaldeide (12 mmol; FW:156.18).¹² La miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 48 h. In bagno di ghiaccio, si aggiungono 2.50 gr di e si mantiene sotto agitazione ad una temperatura di 50 °C per altre 24 h. Si rimuove il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene trattato con acqua (50 mL) e l'ammina funzionalizzata è estratta ripetutamente con diclorometano (3 x 100 mL). Si recupera la fase organica e

si secca su Na₂SO₄. Si elimina il solvente a pressione ridotta per ottenere l'ammina libera. L'ammina viene purificata mediante sua precipitazione sottoforma di cloridrato. Il solido ottenuto è filtrato su Buckner e seccato in stufa a circa 34 °C sotto vuoto.

L'ammina libera viene ottenuta portando a pH fortemente alcalino (>12) una soluzione del cloridrato precedentemente ottenuto ed estraendola con diclorometano (2 x 150 mL) e cloroformio (1 x 150 mL) e trasferita in un pallone da 500 mL. Si elimina il solvente a pressione ridotta. Sono stati ottenuti 2.54 gr (10.45 mmol) di prodotto. Resa: 87%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz): δ (ppm) 8.15 (d, 1H), 7.87 (d, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.47 (m, 4H), 4.27(s, 2H), 2.87 (d,2H), 2.77 (dd,4H), 2.64(d,2H).

2.9.3.2. Sintesi della 2,9-dialdeide-1,10-fenantrolina



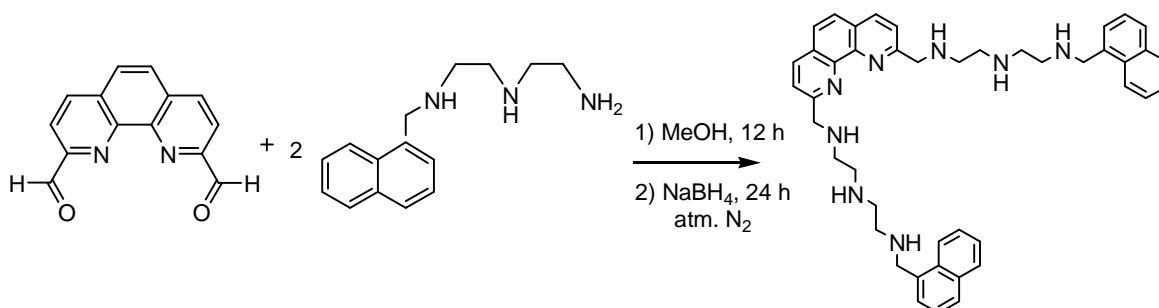
Procedimento:

In un pallone da 2 l a tre colli munito di agitatore meccanico e refrigerante a bolle, si introducono 750 mL di diossano, 30 mL di acqua, 12.50 g di neocuproina idrato (60 mmol; FW:208.27) e 31.25 gr di diossido di selenio (2.82 mol; FW:110.96) . Si mantiene a riflusso per circa 2 h. La miscela viene filtrata su Buckner su celite in modo da separare il selenio metallico formatosi. Il solido viene lavato con diossano bollente. La beuta contenente il liquido filtrato viene posta in bagno di ghiaccio. Si separa un precipitato giallo che viene a sua volta filtrato su Buckner. Il solido è seccato in stufa sotto vuoto a 30°C. Si ottengono 10.91 gr (46.22 mmol) di prodotto. Resa: 77%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 10.35 (d, 2H), 8.76 (d, 2H), 8.29 (d, 2H), 8.25 (s, 2H).

Analisi elementare per C₁₄H₈N₂O₂ (FW:236.23) : Calcolata C= 71.18%, H= 3.41% N%=11.85%. Trovata: C= 71.25%, H= 3.49%, N= 11.91%

2.9.3.3. Sintesi di bis-(2-naftalen-2,5,8-triazanonano)-2,9-fenantrolina eptacloridrato (L7·7HCl)



Procedimento:

Nel pallone da 500 mL contenente la N-(2-[Naftalen-1-ilmetil]ammino)etil)etano-1,2-diammina (2.54 gr, 10.45 mmol) si aggiungono, sotto agitazione magnetica, 200 mL di metanolo anidrificato su setacci molecolari. Una volta disciolta completamente l'ammina si introducono lentamente 1.23 gr di 2,9-dialdeide-1,10-fenantrolina (5.21 mmol; FW: 236.23). La miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente 12 h. In bagno di ghiaccio si aggiungono, sotto agitazione 3.94 gr di NaBH₄ (1.04 mol; FW: 37.8). La sospensione è lasciata per 24 h sotto agitazione a temperatura ambiente. Il contenuto del pallone viene filtrato su Buckner per eliminare una leggera sospensione che si è formata nel corso della riduzione. Il filtrato viene trattato con acqua ed estratto ripetutamente con diclorometano (2 x 100 mL) e cloroformio (1 x 100 mL). Una volta recuperata, la fase organica è seccata su Na₂SO₄. Si elimina il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene trattato con etanolo e sotto agitazione si aggiunge una soluzione etanolica di acido cloridrico per ottenere la precipitazione del cloridrato. Si filtra su Buckner e il solido viene seccato in stufa sotto vuoto a 35 °C. Il prodotto viene purificato ricristallizzandolo da etanolo - acqua. La sospensione è filtrata su Buckner e il solido seccato in stufa sotto vuoto a 35°C fino a peso costante.

Si ottengono 1.47 gr (1.50 mmol; FW:978.24) di prodotto. Resa: 28.8%.

¹H-NMR (D₂O, pH < 2, 400 MHz): δ (ppm): 8.50 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 7.93 (s, 2H), 7.90 (d, *J*= 8.6 Hz, 2H), 7.82 (t, *J*= 8.6 Hz, 4H), 7.78 (d, *J*= 8.6 Hz, 2H),

7.51-7.47 (m, 4H), 7.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.37 (dd, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H), 4.63 (s, 8H), 3.53-3.43 (m, 16H).

^{13}C -NMR (D_2O , pH < 2, 75.4 MHz): δ (ppm): 150.9, 143.2, 139.8, 134.8, 133.5, 130.7, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 127.5, 126.7, 125.9, 125.5, 123.6, 122.4, 52.0, 48.6, 43.8, 43.7, 43.4, 43.2.

Analisi elementare per $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{Cl}_7\text{N}_8\text{O}_4$ (FW:978.247): Calcolata: C= 53.81% H= 6.26% N= 11.41%. Trovata: C= 53.69% H= 6.61% N= 11.59 %

MS (m/z): 691.40 ($[\text{M}+\text{H}^+]$), 346.20 ($[\text{M}+2\text{H}^+]/2$).

2.9.4. Sintesi dei leganti macrociclici L11 e L12

2.9.5. Sintesi delle ammine tosilate

La poliammina tosilata impegata 1,4,7,10,13-pentatosil-1,4,7,10,13-pentaazatridecano (**2**)¹³ è stata preparata come precedentemente descritto in letteratura.

2.9.6. Sintesi di L11·5HBr

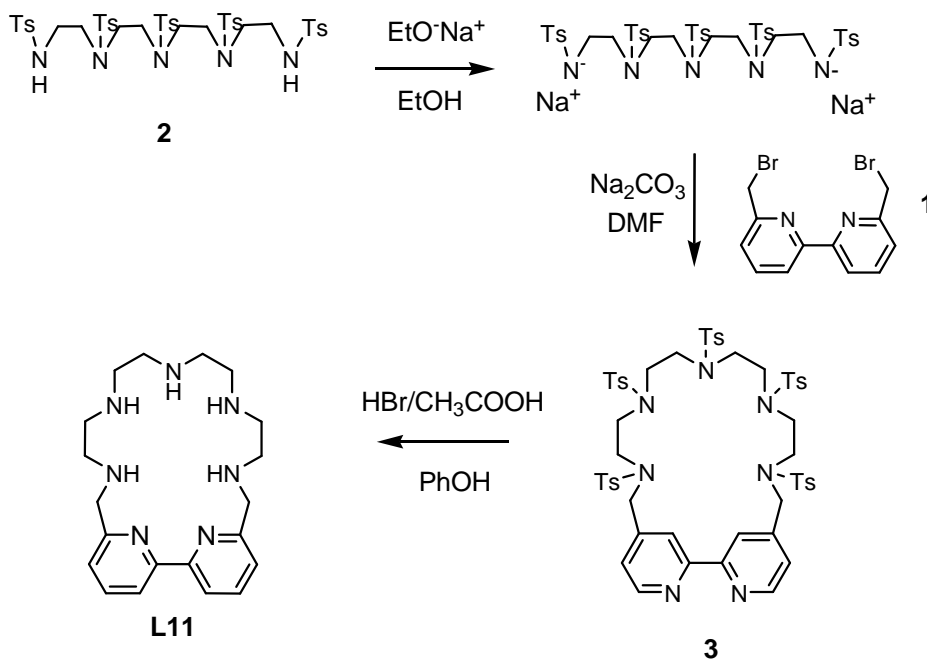


Fig 2.1- Schema di sintesi del legante L11.

Procedimento:

2,5,8,11,14-pentatosil-2,5,8,11,14-pentaaza[15]-[15](2,2)[1,15]-bipiridilofano (**3**). Si prepara una soluzione di sodio etanolato introducendo 2.62 gr di sodio (0.11 mol) in scaglie in 100 ml di etanolo assoluto. Essa viene aggiunta ad una sospensione di 9.6 gr di **2** (0.01 mol) in 400 ml di etanolo assoluto. La soluzione viene reflussata per 20 min e poi il solvente viene rimosso a pressione ridotta. Il solido così ottenuto viene sciolto in 500 ml di DMF e vengono aggiunti 6 gr di Na₂CO₃ (0.057 mol). A questa sospensione, mantenuta a riflusso a 110°C si aggiungono 3.42 gr di **1** sciolto in 150 ml di DMF mediante imbuto sgocciolatore in un tempo di 4 h. Al termine dell'aggiunta la soluzione viene mantenuta a 110°C per altre 2 h. Alla fine si riporta a temperatura ambiente, si filtra il solido e si concentra a secco ottenendo un solido che viene lavato più volte con etanolo per rimuovere tutta la DMF. Il prodotto grezzo viene purificato tramite cromatografia su allumina neutra eluendo con una miscela CH₂:Cl₂:acetato di etile (100:3), (R_f=0.6). Si ottengono 3.46 gr di prodotto. Resa: 30.3%.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm): 7.96 (d, 2H), 7.77 (d, 4H), 7.72 (d, 2H), 7.61 (d, 4H), 7.33 (m, 14H), 4.37 (s, 4H), 3.29 (m, 4H), 3.17 (m, 4H), 2.92 (m, 4H), 2.85 (m, 4H), 2.44 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 2.38 (s, 3H).

¹³C-NMR (CDCl₃ 75.4 MHz): δ (ppm): 155.6, 155, 143.5, 143.2, 138.3, 135.5, 135.3, 134.4, 130.4, 127.6, 127.3, 123.9, 120.1, 54.7, 49.5, 49.0, 48.4, 47.1, 21.3.

Analisi elementare per C₅₅H₆₁N₇O₁₀S₅ (FW:1140.43): Calcolata: C= 57.93% H= 5.39% N= 8.60%. Trovata: C= 57.90% H= 5.37% N= 8.58 %

2,5,8,11,14-pentaaza[15]-[15](2,2)[1,15]-bipiridilofano pentabromoidrato (**L11**·5HBr). Il macrociclo tosilato **3** (2.28 gr, 2 mmol) e 27 gr di fenolo (0.28 mol) sono disciolti in Hbr/CH₃COOH 33% (210 ml). La miscela di reazione viene mantenuta a riflusso e sotto agitazione per 22 h fino alla formazione di un precipitato. Il solido risultante viene filtrato e lavato più volte con CH₂Cl₂. Il prodotto viene ricristallizzato da etanolo/acqua ottenendo il prodotto come pentabromoidrato. Si ottengono 1.05 gr di prodotto. Resa: 61.4%.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , pH =11, 300 MHz): δ (ppm): 8.36 (dd, 2H), 8.31 (dd, 2H), 7.82 (dd, 2H), 4.77 (s, 4H), 3.73 (t, 4H), 3.72 (t, 4H), 3.54 (t, 4H), 3.52 (t, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , pH =11, 75.4 MHz): δ (ppm): 153.9, 150.9, 142.8, 127.1, 125.1, 52.2, 45.5, 45.1, 44.9, 44.7.

Analisi elementare per $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{Br}_5$ (FW:846.13): Calcolata: C= 31.03% H= 4.69% N= 12.67%. Trovata: C= 31.3% H= 4.7% N= 12.8 %

MS (m/z): 371 ($[\text{M}+\text{H}^+]$).

2.9.7. Sintesi di **L12**·5HBr

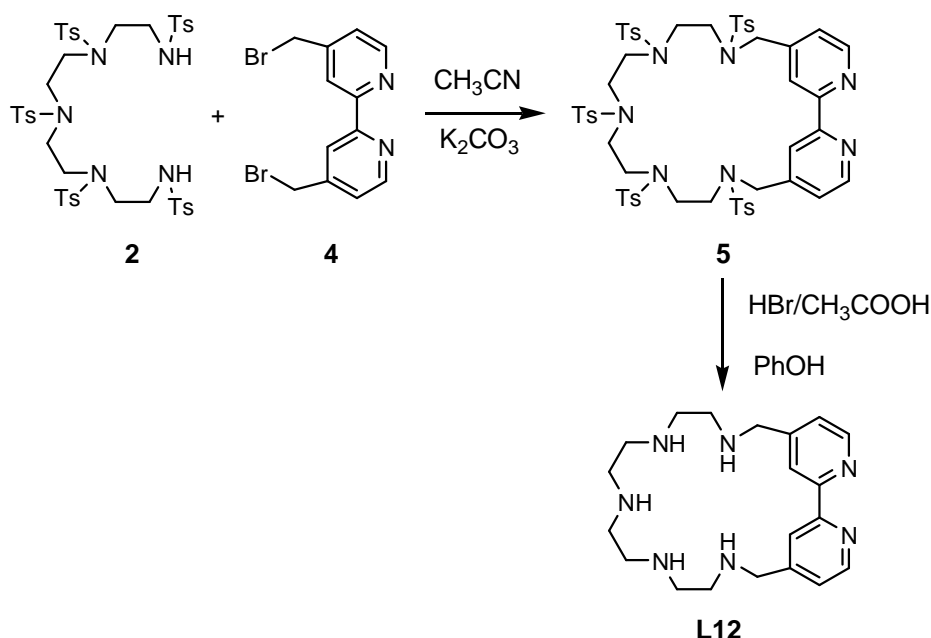


Fig. 2.2 – Schema di sintesi del legante **L12**.

Procedimento:

4,4'-(2,5,8,11,14-pentatosil-2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano (**5**). In un pallone a tre colli da 1 l munito di imbuto sgocciolatore isobaro da 300 ml collegato ad una linea di azoto, agitatore meccanico, refrigerante a bolle e tappo a CaCl_2 , sono posti 6.03 gr di **2**¹⁴ (6.41 mmol), 141 ml di CH_3CN anidro e 16.2 gr di K_2CO_3 (117 mmol). Sotto agitazione si porta il solvente a riflusso (90 °C) e si aggiunge, nell'arco di 3 ore, una soluzione di **4** (2.62 gr, 7.66 mmol) in CH_3CN (235 mL), preparata a parte in beuta da 500 mL munita di tappo a CaCl_2 . Finite le aggiunte si mantiene il solvente a riflusso per altre 5 ore. La fine della reazione è stabilita via TLC (allumina; eluente CHCl_3 ; UV

$\lambda=254$ nm). Quando si nota la scomparsa delle macchie relative al bromuro e all'ammina, si arresta il riscaldamento e la soluzione è filtrata e rotavaporata a secchezza. Si solubilizza il solido ottenuto (7.26 g) nella minima quantità di cloroformio e si aggiunge etanolo fino alla comparsa di un'opalescenza. L'evaporazione dei solventi favorisce la precipitazione di un gel biancastro, che contiene prevalentemente due macchie in TLC (allumina; eluente CHCl_3 ; rivelatore lampada UV a 254 nm) dovute alla presenza sia del prodotto di ciclizzazione 1:1, sia di quello 2:2. Eliminato il gel per filtrazione sottovuoto, si opera una seconda ricristallizzazione nelle solite condizioni, che porta ad un solido bianco contenente come prodotto maggiore il ciclo 1:1. La purificazione finale avviene per ricristallizzazione da toluene e si ottengono 5.12 gr di prodotto. Resa: 70 %.

Rf-(**5**) = 0.64; Rf-(**2**) = 0.47; Rf-(**4**) = 0.95.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 2.35 (s, 3H), 2.40 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 2.88 (m, 4H), 2.90 (m, 4H), 3.15 (m, 4H), 3.31 (m, 4H), 4.42 (s, 4H), 7.38 (m, 14H), 7.67 (d, 4H), 7.74 (d, 2H), 7.81 (d, 4H), 7.99 (d, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 22.3, 47.9, 48.9, 49.4, 49.7, 55.4, 121.1, 124.7, 128.1, 128.6, 131.4, 135.4, 136.4, 137.5, 138.8, 145.2, 146.5, 156.0, 157.6.

Analisi elementare per $\text{C}_{55}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{S}_5\text{O}_{10}$. Calcolato: C = 58.0%, H = 5.39%, N = 8.60%. Trovato: C = 57.7%, H = 5.40%, N = 8.55%.

4,4'-(2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano pentabromoidrato (**L12**·5HBr). Il composto è sintetizzato a partire da 2,00 gr di **5** (1.75 mmol), seguendo la procedura riportata per L11, ottenendo L12 come pentabromoidrato. Ottenuti 0.673 g. Resa: 43.1 %.

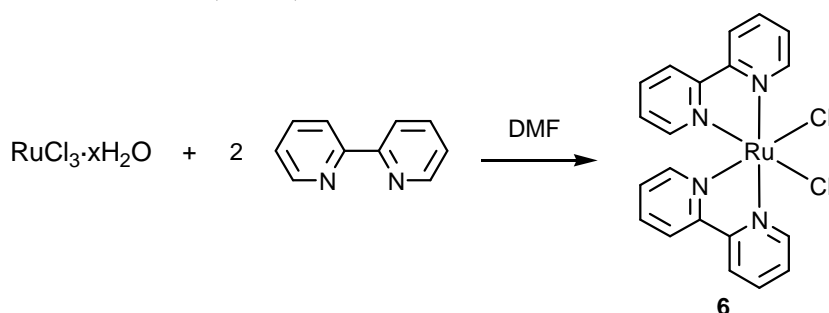
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O ; pH = 4, 300 MHz) δ (ppm): 2.24 (m, 4H), 2.37 (m, 4H), 3.36 (t, 4H), 3.61 (t, 4H), 4.76 (s, 4H), 7.88 (d, 2H), 8.06 (s, 2H), 8.59 (d, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O ; pH = 4, 75.4 MHz) δ (ppm): 44.4, 44.6, 46.1, 53.3, 124.5, 128.3, 130.1, 140.2, 145.3, 152.3.

Analisi elementare per $C_{20}H_{31}N_7 \cdot 5HBr \cdot 6.4H_2O$ (FW:889.37). Calcolato: C = 27.01%, H = 5.53%, N = 11.02%. Trovato: C = 27.10%, H = 5.39%, N = 10.98%.

2.9.8. Sintesi di L13

2.9.8.1. Sintesi del *cis*-dicloro-Bis(2,2'-bipiridile)-rutenio(II): $Ru(bipy)_2Cl_2$



Procedimento:

In un pallone a due colli da 50 mL, munito di refrigerante a bolle e collegato ad una linea di azoto, vengono introdotti il bipyridile (0.906 gr, 5.80 mmol), il tricloruro di rutenio idrato (0.604 gr, 2.91 mmol) e 24 ml di DMF.¹⁵ La soluzione viene tenuta a riflusso sotto agitazione magnetica per 7 h, quindi raffreddata a temperatura ambiente. Viene allontanata la maggior parte del solvente per distillazione a bassa pressione e successivamente, per aggiunta di 35 mL di acetone si osserva la formazione di un solido. La sospensione viene tenuta in freezer per la notte. Il solido che si ottiene è filtrato su setto poroso, lavando più volte con acqua (4 x 10 ml). Il solido viene trasferito in una pera da 250 ml (munita di refrigerante a bolle), aiutandosi con etanolo caldo (circa 30 ml). Si aggiungono altri 30 ml di acqua e si tiene il solvente a riflusso per 1 h sotto agitazione. Si filtra ed alla soluzione si aggiungono lentamente (la reazione è esotermica) 11.6 gr (273 mmol) di LiCl. Si mantiene l'agitazione per 1 ora a temperatura ambiente, dopodiché si riduce il volume a circa 1/4 a bassa pressione, si aggiungono altri 30 ml di acqua e si ripete l'operazione fino alla metà del volume per allontanare tutto l'etanolo. Il contenitore viene quindi messo in frigo fino al giorno seguente. Il solido è

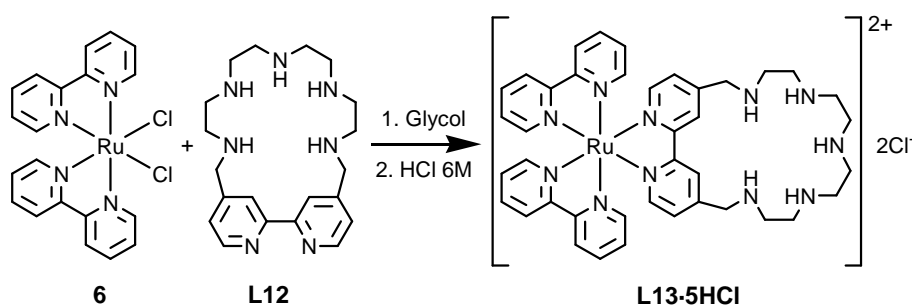
filtrato lavando abbondantemente con acqua (circa 100 ml) e poi con etere etilico (5-6 ml). Infine si pone il prodotto filtrato in essiccatore, sottovuoto, con KOH. Si ottengono 0.480 gr

Resa: 31.3 %.

Analisi elementare per $\text{RuC}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Cl}_2 \cdot 2.4\text{H}_2\text{O}$ (FW:527.58). Calcolato: C = 45.53%, H = 3.97%, N = 10.62%. Trovato: C = 44.32%, H = 3.71%, N = 10.91%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ (ppm): 10.0 (d,2H), 8.68 (d,2H), 8.53 (d,2H), 8.11 (t, 2H), 7.81 (t, 2H), 7.72 (t, 2H), 7.55 (d, 2H), 7.14 (t, 2H).

2.9.8.2. Sintesi del Bis(2,2'-bipiridile)(4,4'-(2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano)-rutenio(II) dicloruro pentacloridrato: $\text{Ru}(\text{bipy})_2(44'\text{TT})\text{Cl}_2 \cdot 5\text{HCl}$



Procedimento:

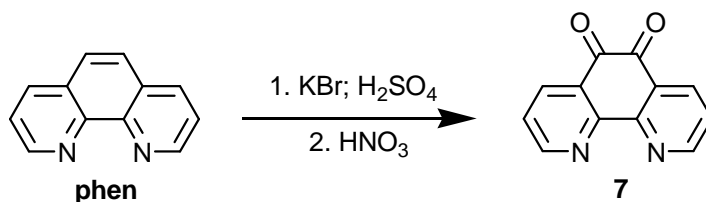
In una provetta da microonde si solubilizzano, con l'aiuto di un sonicatore, 22.53 mg (0.04269 mmol) di **6** e 40.06 mg (0.04199 mmol) di **L12** in glicol etilenico (1.6 ml)¹⁶. Nella provetta, munita di ancorina magnetica, viene inserita in un microonde da 300 W. Si porta il solvente a circa 160 °C per 7 minuti utilizzando una potenza di 60 W. Si osserva un cambio di colore da violetto ad arancione scuro. Il solvente viene rimosso per distillazione a bassa pressione ed il residuo disciolto nella minima quantità di HCl 6 M. Si opera nuovamente una distillazione a bassa pressione. Il solido rosso-arancio così ottenuto è quindi lavato ripetutamente con acetone ed infine sospeso in etere etilico, da cui è filtrato su setto poroso con cicli di vuoto/azoto. Il prodotto è conservato in essiccatore con KOH. Si ottengono 38.8 mg. Resa: 58.33 %.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , $\text{pD} < 2$, 400 MHz) δ (ppm): 8.58 (s, 2H), 8.29 (d, 4H), 7.81 (m, 4H), 7.67 (d, 2H), 7.55 (2d, 4H), 7.15 (m, 6H), 4.38 (m, 4H), 3.54 (m, 16H).

Analisi elementare per $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{N}_{11}\text{Cl}_7\text{Ru}$: Calcolato: C%=46.37, H%=5.06, N%=14.87 Trovato: C%=46.44, H%=5.12, N%=14.98.

2.9.9. Sintesi di L14

2.9.9.1. Sintesi dell' 1,10-fenantrolina-5,6-dione



Procedimento:

In un pallone a tre colli da 250 ml munito di: imbuto sgocciolatore isobaro da 100 ml, agitatore meccanico, refrigerante a bolle e tappo a CaCl_2 , si pongono 102.5 ml di H_2SO_4 concentrato.¹⁷ Si porta la temperatura del liquido a circa -80 °C per mezzo di un bagno di etanolo/ azoto liquido e si aggiungono 5.08 gr di o-fenantrolina (25.7 mmol). Sempre a bassa temperatura, si introducono, sotto forte agitazione, 31.0 gr (261 mmol, circa 10 equivalenti) di KBr. Utilizzando un bagno acqua/ghiaccio, si riporta la temperatura a 0 °C e si aggiungono, nell'arco di un'ora, 56 ml di HNO_3 concentrato. Dopo la soluzione viene portata a 90 °C per 3 ore ed infine a 160 °C per 60 min allo scopo di allontanare i vapori bruni ed ottenere una soluzione gialla limpida. La soluzione è lasciata raffreddare a temperatura ambiente, poi versata in un bagno d'acqua distillata/ghiaccio (circa 600ml) sotto agitazione meccanica ed in seguito lasciata riposare per la notte. Si porta il pH a 6-7 con una soluzione satura di Na_2CO_3 . Si trasferisce la soluzione in imbuto separatore da 2 l e si estrae con CH_2Cl_2 (3 x 200 ml). La organica viene anidrificata con Na_2SO_4 , ed il solvente allontanato per distillazione a bassa pressione. Il solido ottenuto è ulteriormente essiccato sottovuoto ed in seguito ricristallizzato da metanolo. Il prodotto si presenta sotto forma di aghi di colore giallo, la purezza è controllata via TLC (allumina; eluente acetato di etile: CH_2Cl_2 = 5:1 v/v; UV $\lambda=254$ nm). Si sono ottenuti 4.01 gr di prodotto. Resa: 74 %.

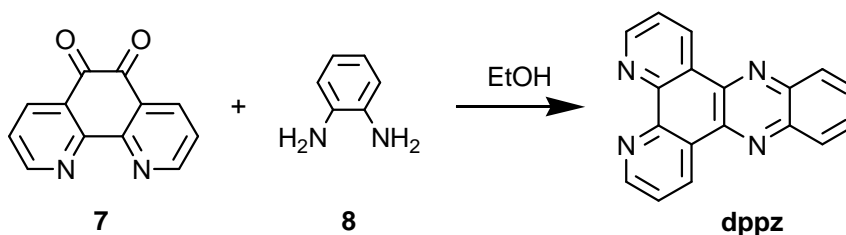
Rf-(**7**) = 0.23; Rf-phen = 0.30.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 9.13(d, 2H), 8.52(d, 2H), 7.60(dd, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , , 75.4 MHz) δ (ppm): 156.46, 137.46, 125.76 (relativi ai C legati ad H).

Analisi elementare per $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$. Calcolato (%): C = 68.57%, H = 2.88%, N = 13.33%. Trovato (%): C = 66.94%, H = 2.65%, N = 13.06%.

2.9.9.2. Sintesi del dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina



Procedimento:

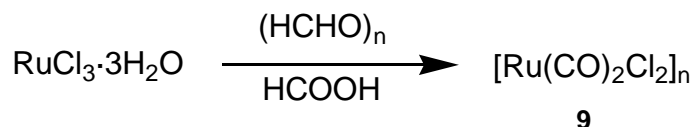
In una pera da 1 l, munita di refrigerante a bolle, si introducono 4.01 gr di **7** (19.1 mmol) e 4.02 gr (37.2 mmol) di 1,2-diammino-benzene (**8**) e 400 ml di etanolo.¹⁸ Sotto agitazione magnetica si porta il solvente a riflusso per 5 min. Successivamente si raffredda a temperatura ambiente e poi in bagno acqua/ghiaccio. Si ottiene un precipitato che è filtrato su buckner, e ricristallizzato da acqua/etanolo. Precipita un solido giallo sotto forma di aghi, che viene filtrato sottovuoto ed seccato ulteriormente in stufa a 30 °C per almeno 24 h. La purezza è controllata via TLC (allumina; eluente CHCl_3 :etere di petrolio = 4:1 v/v; UV $\lambda=254$ nm) e l'assenza di **8** in eccesso è confermata via $^1\text{H-NMR}$. Si ottengono 3.0 gr di prodotto. Resa: 53 %.

Rf-dppz = 0.58; Rf-(**5**) = 0.47; Rf-(**6**) = 0.24.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 9.65(d,2H). 9.27(d,2H), 8.35 (d,2H) 7.91(d,2H) 7.80(d,2H).

Analisi elementare per $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.9\text{H}_2\text{O}$. Calcolato per $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.9\text{H}_2\text{O}$: C=72.42%, H=3.98%, N=18.77%. Trovato: C=73.8%, H=3.94%, N=18.41%.

2.9.9.3. Sintesi del polimero $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$ (9)



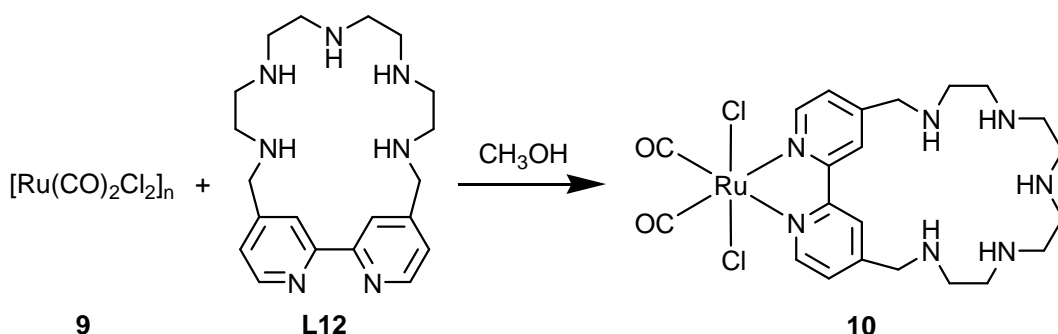
Procedimento:

In un pallone a due colli da 50 ml, munito di refrigerante a bolle e collegato ad una linea di azoto, si introduce una soluzione di 0.500 gr di $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1.91 mmol) in 17 ml di acido formico al 90 %, che viene degasata per 30 minuti.¹⁹ Si aggiungono 0.203 gr di paraformaldeide (6.67 mmol) e, sotto agitazione, si porta il solvente a riflusso. Mantenendo l'atmosfera d'azoto, si osserva una variazione del colore della soluzione da marrone-arancione scuro a verde fino a verde petrolio, per poi regredire ad una tonalità di verde più chiara. A questo punto s'interrompe il flusso di gas inerte lasciando entrare aria nel sistema, mentre riscaldamento ed agitazione sono mantenuti fino al viraggio della soluzione a giallo chiaro. Il liquido è raffreddato a temperatura ambiente e conservato in frigo a 4 °C per una notte, per consentire la completa conversione in polimero. Il solvente è allontanato per distillazione a bassa pressione. Il residuo è tritato in esano, filtrato sottovuoto, e seccato in stufa a 40°C. Si ottengono 0.350 gr di prodotto. Resa: 69.4 %.

IR (Nujol): ν_{CO} a 2074 cm^{-1} [ν_{CO} 2138 cm^{-1} per la presenza anche del dimero $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$, come impurezza].

Analisi elementare per $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Ru}$. Calcolato: C = 9.10%, H = 1.53%. Trovato: C = 8.89%, H = 1.40%.

2.9.9.4. Sintesi del cis-dicarbonil-trans-dicloro(4,4'-(2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano)rutenio(II): Ru(L12)(CO)₂Cl₂



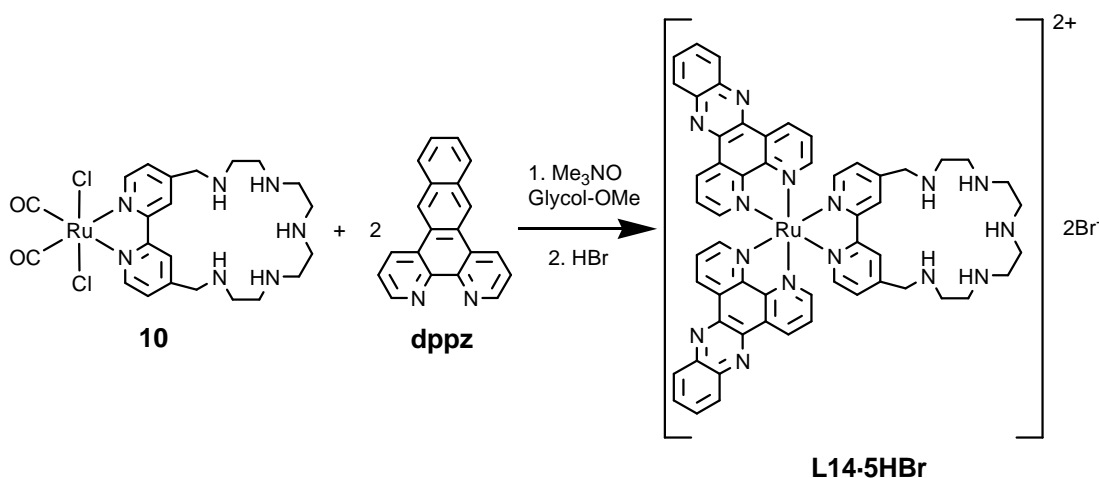
Procedimento:

In un pallone a due colli da 50 ml, munito di refrigerante a bolle, tappo a CaCl₂ e collegato ad una linea d'azoto, s'introducono 54.88 mg (0.2030 mmol) di **9**, 169.7 mg di **L12** (0.1830 mmol), 3.5 ml di MeOH (è possibile aggiungere qualche goccia d'acqua per favorire la solubilizzazione del legante) e, sotto agitazione, si porta il solvente a riflusso.¹⁵ Si elimina il solvente per distillazione a bassa pressione. Il residuo è seccato in stufa, sottovuoto per 20 min, poi sospeso in etanolo (che scioglie il polimero, ma non il prodotto), filtrato su buckner e posto nuovamente in stufa a 40 °C con KOH. Si ottengono 182 mg di prodotto sotto forma di **10**·5HBr·11H₂O. Resa: 87.4 %.

¹H-NMR (D₂O, pH=2, 300 MHz) δ (ppm): 9.35 (d, 2H), 9.01 (s, 2H), 7.89 (d, 2H) 4.73 (s, 4H), 3.76 (m, 8H), 3.63 (m, 8H).

Analisi elementare per C₂₂H₅₈Br₅Cl₂N₇O₁₃Ru. Calcolata: C=22.02%; H=4.87%; N=8.17%. Trovata: C=22.1%; H=4.8%; N=8.2%.

2.9.9.5. Sintesi del Bis(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)(4,4'-(2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano)rutenio(II) dibromuro pentabromidrato: Ru(dppz)₂(L12)Br₂·5HBr (L14·5HBr)



Procedimento:

In un pallone a due colli da 50 mL, munito di refrigerante a bolle, tappo a CaCl₂ e collegato ad una linea di azoto, si introducono 10 ml di 2-metossietanolo e si deossigena facendolo bollire per almeno 20 minuti gorgogliando N₂.²⁰ Si introducono 118.4 mg di dppz (0.4064 mmol), 175.9 mg di **10** (0.1545 mmol) e 98.09 mg di trimetilammina-N-ossido (0.8826 mmol) Sotto agitazione magnetica, si porta la soluzione a riflusso per 3 ore. La soluzione vira in colore da arancione chiaro e rosso scuro. Il solvente viene allontanato per distillazione a pressione ridotta ed il residuo sospeso in acetone, filtrato sottovuoto (lavando abbondantemente con acetone) e seccato in stufa a 40 °C con KOH. Il solido è risolubilizzato nella minima quantità di acqua, la soluzione portata a pH = 1.5-2 con HBr. Aggiungendo acetone e lasciando in atmosfera di acetone si ottiene la precipitazione di una polvere rossa scura. Si ottengono 131 mg di prodotto in forma **L14**Br₂·5HBr·10.4H₂O. Resa: 47.3 %.

¹H NMR (D₂O, pH = 2, 400 MHz,) δ (ppm) = 8.8 (d, 4H), 8.6 (d, 2H), 8.53 (s, 2H), 8.07 (dd, 4H), 8.0 (d, 4H), 7.67 (dd, 4H), 7.3 (t, 4H), 7.15 (d, 2H), 4.6 (m, 4H), 3.5 (m, 16H).

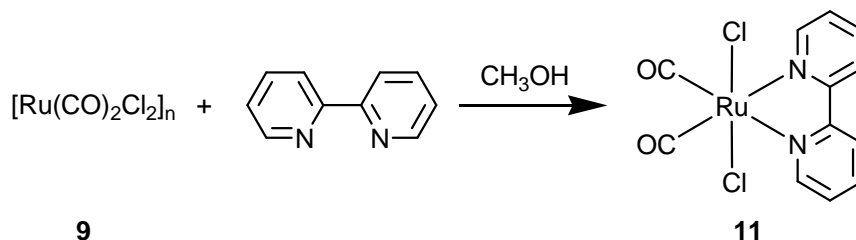
¹³C NMR (D₂O, pH =2, 400 MHz,) δ (ppm) = 157.6, 153.1, 150.0, 149.6, 141.6, 138.7, 133.8, 129.8, 128.0, 127.4, 125.7, 49.5, 46.6, 45.0, 44.0.

Analisi elementare per $C_{56}H_{81.8}Br_7N_{15}O_{10.4}Ru$. Calcolata: C=37.64%; H=4.33%; N=11.76%. Trovata: C=37.8%; H=4.3%; N=11.7 %.

ESI-MS: $m/z = 1035.00$ ($[C_{57}H_{51}N_{15}Ru]^+$), 517.00 ($[C_{57}H_{51}N_{15}Ru]^{2+}$).

2.9.10. Sintesi di L15

2.9.10.1. Sintesi del cis-dicarbonil-trans-dicloro-(2,2'-bipiridile)-rutenio(II): Ru(bipy)(CO)



Procedimento:

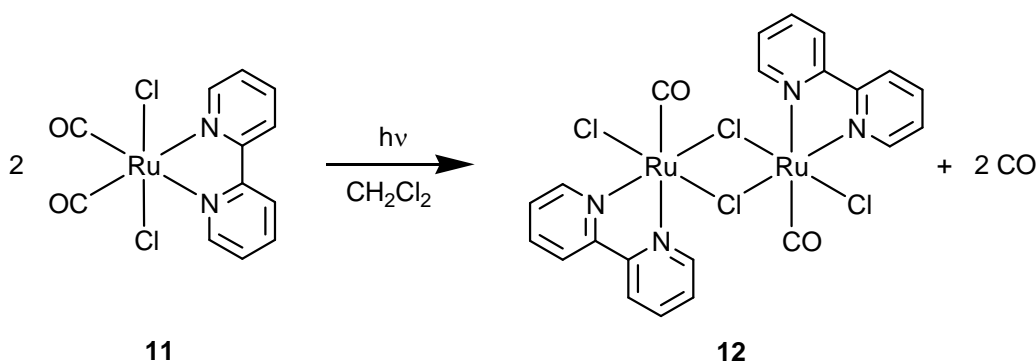
In un pallone a due colli da 50 ml, munito di refrigerante a bolle, tappo a $CaCl_2$ e collegato ad una linea di azoto, si introducono 393 mg (2.52 mmol) di bipyridile e 4 ml di MeOH.¹⁵ Una volta solubilizzato il solido (o almeno i due terzi), si fa gorgogliare azoto nella soluzione per 30 min. Quindi si aggiungono 453 mg (1.68 mmol) di **9** e, sotto agitazione, si porta a riflusso per 45 minuti. Dopo 15 minuti si aggiungono altri 6 mL di metanolo, per facilitare la sospensione del prodotto, che precipita nell'ambiente di reazione. Dopo aver lasciato raffreddare a temperatura ambiente e, successivamente in bagno a ghiaccio, il solido è filtrato sottovuoto e poi ricristallizzato da metanolo caldo. Per lento raffreddamento del solvente precipitano dei fiocchi di colore giallo chiaro, che sono filtrati sottovuoto. Il solido è seccato in stufa a 40 °C. La purezza del prodotto viene controllata via TLC (silice; eluente acetonitrile; ; UV $\lambda=254$ nm). Si ottengono 370 mg di prodotto. Resa: 57.3 %.

Rf-(**11**) = 0.86; Rf-(bipy) = 0.70.

1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) ; δ (ppm): 9.21 (d, 2H), 8.77 (d, 2H), 8.35 (dd, 2H), 7.83 (dd, 1H).

Analisi elementare per $C_{12}H_8N_2O_2Cl_2Ru$. Calcolato: C = 37.5%, H = 2.10%, N = 7.29%. Trovato: C = 37.8%, H = 2.30%, N = 7.28%.

2.9.10.2. Sintesi del [carbonil-dicloro-(2,2'-bipiridile)-rutenio(II)]-dimero: [Ru(bipy)COCl₂]₂



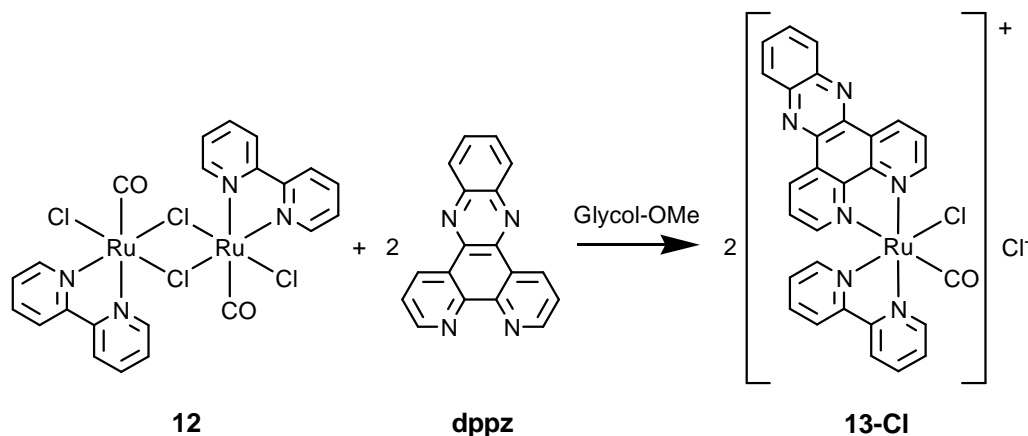
Procedimento:

360 mg (0.937 mmol) di **11** sono solubilizzati a caldo in 25 ml di CH₂Cl₂, la soluzione (eventualmente filtrata su celite) è posta, sotto agitazione magnetica, in una beuta da 100 ml, munita di refrigerante a bolle tappato (il sistema è chiuso per evitare l'evaporazione del solvente ed, allo stesso tempo, il refrigerante viene riempito di acqua, perché il liquido subisce un leggero riscaldamento).¹⁹ Il contenitore di reazione è illuminato per 48 ore con una lampada alogena da 80 W, posta alla distanza di 25 cm. Nel corso dei due giorni precipita un solido arancione, il quale è filtrato sottovuoto, lavando accuratamente con etanolo, e seccato in stufa a 70 °C. Si ottengono 240 mg.

Resa: 67.9 %.

Analisi elementare per C₂₂H₁₆N₄O₂Cl₄ Ru₂·0.5CH₂Cl₂. Calcolato: C%= 35.80, H%=2.27, N%=7.42. Trovato: C%=36.26%, H%=2.42%, N%=7.33%.

2.9.10.3. Sintesi del cis-carbonilcloro-(2,2'-bipiridile)-(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)-rutenio(II) cloruro: Ru(bipy)(dppz)COCl₂



Procedimento:

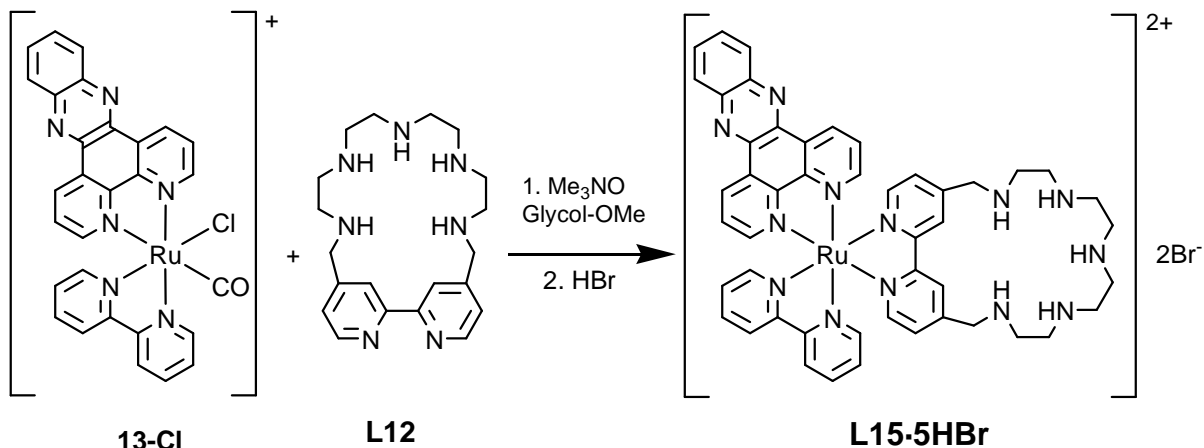
In un pallone a due colli da 50 mL, munito di refrigerante a bolle, tappo a CaCl₂ e collegato ad una linea di azoto, si introducono 10 ml di 2-metossietanolo e si porta ad ebollizione per almeno 20 minuti gorgogliando N₂. Si sospendono nel solvente 104 mg (0.14 mmol) di **12** sotto agitazione.²⁰ Dopo 30 minuti si aggiungono 108 mg (0.37 mmol) di dppz. La risultante miscela viene mantenuta a riflusso per 2h al buio. La lenta formazione del complesso si manifesta con la trasformazione della sospensione arancione in una soluzione giallo-arancione. Il solvente è rimosso per distillazione a bassa pressione ed il residuo è seccato in stufa a 40 °C. Il solido viene sospeso in 20 mL di acqua bidistillata e la sospensione ottenuta è sonicata per 10 minuti, raffreddata a 4 °C e filtrata per eliminare il residuo solido. La soluzione è successivamente rotavaporata a secco ed essiccata sotto vuoto a 40°C. Si ottengono 53 mg di prodotto. Resa: 54 %.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ (ppm): 9.83 (t, 2H), 9.74 (d, 1H), 9.56 (d, 1H), 8.94 (d, 1H), 8.76 (d, 1H), 8.52 (m, 3H), 8.36 (m, 1H), 8.18 (m, 2H), 8.07 (m, 4H) 7.79 (d, 1H), 7.34 (t, 1H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz,) δ = 206.8, 158.0, 157.3, 153.1, 142.7, 140.8, 139.9, 136.3, 135.1, 133.1, 130.0, 128.7, 128.5, 128.0, 125.3, 124.9.

Analisi elementare per C₂₉H₁₈N₆OCl₂Ru·3.6H₂O: Calcolato (%): C%=49.52, H%=3.61, N%=11.95. Trovato: C=49.9%, H=3.3%, N%=11.9.

2.9.10.4. Sintesi del (2,2'-bipiridile)-(dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina)-(4,4'-(2,5,8,11,14-pentaaza[15])-2,2'-bipiridilofano)-rutenio(II) dibromuro pentabromidrato: Ru(bipy)(dppz)(L12)Br₂·5HBr (L15·5HBr)



Procedimento:

In un pallone a due colli da 50 ml, munito di refrigerante a bolle, tappo a CaCl₂ e collegato ad una linea di azoto, si introducono 10 ml di 2-metossietanolo e si fanno bollire per almeno 20 minuti gorgogliando N₂.²⁰ Si introducono 97.4 mg di **L12** (0.11 mmol), 86.1 mg di **13-Cl** (0.12 mmol) e 35.63 mg di trimetilammina-N-ossido (0.33 mmol). La soluzione è mantenuta a riflusso per 3h al buio. La soluzione vira in colore da arancione chiaro e rosso scuro. Il solvente è rimosso per distillazione a bassa pressione ed il solido è lavato più volte con acetone per eliminare **13-Cl** non reagito. L'assenza di legante è verificata via TLC (allumina; eluente CH₃CN:H₂O:KNO₃[soluz.sat.]=10:3:1 v/v; UV λ=254 nm): Rf(**L15**) = 0.72; Rf(**L12**) = 0.28. Il solido così ottenuto è ricristallizzato utilizzando la minore quantità possibile di acqua acida (HBr 1 M) ed aggiungendo lentamente acetone. Si ottengono 37 mg di prodotto. Resa: 22%.

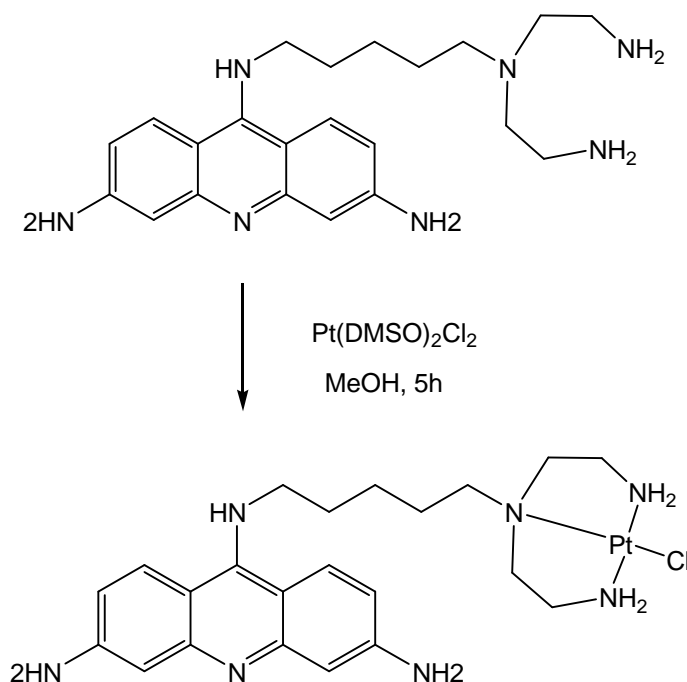
¹H NMR (400 MHz, D₂O pH = 2) δ = 8.8 (d, 2H), 8.65 (m, 4H), 8.25 (m, 4H), 8.10 (d, 2H), 8.0 (d, 2H), 7.80 (m, 4H), 7.50 (dd, 2H), 7.20 (d, 2H), 7.10 (dd, 2H), 4.6 (m, 4H), 3.5 (m, 16H).

¹³C NMR (400 MHz, D₂O pH = 2) δ = 157.7, 157.0, 153.6, 152.0, 150.3, 142.4, 141.3, 140.2, 133.8, 130.4, 128.9, 128.0, 127.3, 125.0, 124.3, 49.5, 47.0, 45.3, 44.2.

Analisi elementare per $C_{48}H_{64}Br_7N_{13}O_5Ru$: Calcolato: C%=36.87, H%=4.12, N%=11.64. Trovato: C=37.5%, H=4.26%, N%=11.70.

ESI-MS: $m/z = 454.66$ ($[C_{48}H_{49}N_{13}Ru]^{2+}$), 303.44 ($[C_{48}H_{49}N_{13}Ru]^{3+}$).

2.9.11. Sintesi di L16



Procedimento:

$Pt(DMSO)_2Cl_2$ è stato sintetizzato con procedimento che si trova in letteratura.²¹ Per la sintesi di **L16** è stata opportunamente modificata la procedura sintetica riportata in letteratura.²² Ad una sospensione a riflusso di $Pt(DMSO)_2Cl_2$ (18.82mg, 0.0445mmol) in 4 ml di MeOH si aggiungono nell'arco di 1h 0.95 equivalenti di legante proflavinico (17.32mg, 0.0423mmol) in forma di ammina libera sciolto in 2 ml di MeOH. Dopo si lascia a riflusso per altre 4h. La sospensione risultante è lasciata riposare per una notte a temperatura ambiente. Successivamente l'eccesso di $Pt(DMSO)_2Cl_2$ è stato rimosso per centrifugazione. Le acque madri portate a secco al rotavapor sono riprese con metanolo e ripetutamente filtrate per rimuovere eventuali residui di Pt. Portando di nuovo a secco le acque madri si ottengono 10mg di un solido arancio scuro. Resa: 26%.

^1H NMR (D_2O pH = 2, 400 MHz) δ = 7.64 (d, 2H), 6.63 (d, 2H), 6.25 (s, 2H), 3.55-3.12 (m, 8H), 1.62-1.24 (m, 8H).

^{13}C -NMR (D_2O ; pH = 2, 75.4 MHz) δ (ppm): 160.0, 147.7, 143.5, 124.4, 123.1, 110.7, 108.0, 46, 45.8, 35.2, 32.1, 30.1, 27.8, 27.0, 26.7.

Analisi elementare per $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{S}_3\text{O}_3 \text{PtCl}_2$ (FW:909.96). Calcolato: C%= 38.27, H%= 10.77, N%= 5.87. Trovato: C%=38.9, H%= 10.75, N%= 5.87.

ESI-MS: m/z = 639.27 ($[\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{PtCl}]^+$), 319.63 ($[\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{PtCl}]^{2+}$).

2.9.12. Sintesi dei cristalli (14-21)

I perclorati di leganti organici e dei loro complessi metallici sono potenzialmente esplosivi e devono quindi essere trattati con particolare attenzione

La sintesi dei cristalli (14-21) è riportata negli articoli in appendice.

2.9.13. Bibliografia

1. Bianchi, A.; Bogni, L.; Dapporto, P.; Micheloni, M.; Paoletti, P. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1201-1207.
2. Bencini, A.; Bianchi, A.; Garcia España, E.; Scott, E.C.; Morales, L.; Wang, B.; Deffo, T.; Takusagawa, F.; Mertes, M.P.; Paletti, P. *Bioorg. Chem.* **1992**, *20*, 8-29.
3. (a) Gran, G. *Analyst (London)* **1952**, *77*, 61-663. (b) Rossetti, F.J.; Rossetti, H. *J. Chem. Educ.* **1965**, *42*, 375-378.
4. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.
5. Covington, A.K.; Paabo, M.; Robinson, R.A.; Bates, R.G. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700.
6. Altomare, A.; Burla, M.C.; Camalli, M.; Cascarano, G.L.; Giacovazzo, C.; Gagliardi, A.; Moliterni, A.G.G.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 115-119.
7. Sheldrick, G.M., *SHELX-97*, Göttingen, **1997**.

8. Hyperchem β 1 release 7.51 for Windows MM System, Hypercube, Inc. Gainesville, FL, 2002.
9. Schrodinger L.L. C. New York
10. Cortis, M.C.; Friesner, R.A. J.; *Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1591-1608.
11. Butt, G.; Topson, R.D. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1981**, *18*(3), 641.
12. Seixas de Melo, J.; Teresa Albeda, M.; Díaz, P.; García España, E.; Lodeiro, C.; Alves, S.; Lima, J.C.; Pina, F.; Soriano, C.; *J Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 991-998.
13. Bencini, A.; Bianchi, A.; García España, E.; Giusti, M.; Micheloni, M.; Paoletti, P. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 681-686.
14. Kaes, C.; Hosseini M.W.; De Cian, A.; Fisher, J.; *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 4389.
15. (a) Lay P. A.; Sargeson A. M.; Taube H.; *Inorganic Synthesis*, **1986**, *78*, 291; (b) Sullivan B. P.; Salmon D. J.; Meyer T. J.; *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 3334.
16. Lodeiro C.; Pina F.; Parola A. J.; Bencini A.; Bianchi A.; Bazzicalupi C.; Ciattini S.; Giorgi C.; Masotti A.; Valtancoli B.; Seixas de Melo J.; *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6813-6819
17. (a) Calderazzo F.; Marchetti F.; Pampaloni G.; Passarelli V.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 4389-4396; (b) Yamada M.; Tanaka Y.; Yashimoto Y.; Kuroda S.; Shima I.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 1006
18. Dickeson J. E.; Summers L. A.; *Aust. J. Chem.* **1970**, *23*, 1023-1027.
19. Anderson P. A.; Deacon G. B.; Haarmann K. H.; Keene F. R.; Meyer T. J.; Reitsma D. A.; Skelton B. W.; Strouse G. F.; Thomas N. C.; Treadway J. A.; White A. H.; *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6145-6157/14.
20. Deacon G. B.; Kepter C. M.; Sahely N.; Skelton B. W.; Spiccia L.; Thomas N. C.; White A. H.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 275-277.
21. Price J.H.; Williamson, A.N.; Schramm, R.F.; Wayland, B.B. *Inorg Chem*, **1972**, *11*, *6*, 1280-1284.
22. Annibale, A.; Brandolisio, M.; Pitteri, B. *Polyhedron* **1995**, *14*, *3* 451-453.

3. Discussione Sintesi

3.1. Sintesi di leganti poliamminici contenenti unità eteroaromatiche

Per la sintesi dei leganti **L6** e **L7** è stata seguita la procedura classica di condensazione tra una ammina e una aldeide, in particolare la dialdeide della fenantrolina opportunamente funzionalizzata (in posizione 4,7 per **L6** e in posizione 2,9 per **L7**). Per la sintesi del legante **L11** è stata seguita la procedura riportata in letteratura da Richman e Atkins¹ che prevede la sintesi di una ammina alifatica N-tosilata, la preparazione del sale sodico corrispondente, la ciclizzazione di quest'ultimo con un opportuno segmento che può essere un alogenuro alchilico o acrilico, come nel nostro caso. Per la sintesi di **L12**, a differenza di quanto proposto da Richman e Atkins, non è prevista l'attivazione del nucleofilo attraverso la trasformazione della poliammina N-tosilata nel corrispondente sale sodico. La ciclizzazione² è stata condotta in ambiente anidro ed in condizione di elevata diluizione (per lenta aggiunta di uno dei reagenti), al fine di ridurre la formazione di prodotti con stechiometria superiore a 1:1. Il solvente usato è acetonitrile anidro. La presenza del carbonato di potassio è necessaria per neutralizzare l'acido bromidrico, che si svolge nella reazione, e promuovere l'attacco nucleofilo, deprotonando il gruppo amminico terminale monotosilato. Il macrociclo ottenuto è purificato mediante due ricristallizzazioni successive: la prima da cloroformio/etanolo e la seconda da toluene. È stato visto che questo è il metodo più efficiente per la separazione del prodotto di ciclizzazione 1:1 dal prodotto 2:2, che si forma in minore percentuale.

Il bromuro 4,4'-bis(bromometil)-2,2'-bipiridile è utilizzato in eccesso rispetto all'ammina perché, in queste condizioni di reazione, subisce una parziale

degradazione. La detosilazione è stata eseguita con fenolo in una miscela di HBr:CH₃COOH 1:3, seguendo una metodologia standard per questo tipo di composti.³ Il prodotto, ottenuto come bromidrato, viene ricristallizzato da soluzione di etanolo/acqua per aggiunta di qualche goccia di HBr concentrato.

3.2. Sintesi dei complessi L13-L15

3.2.1. Sintesi del legante dppz

L'1,10-fenantrolina-5,6-dione è stato sintetizzato variando leggermente la procedura descritta da Calderazzo e collaboratori⁶ che modifica una metodica precedente di Yamada e collaboratori.⁷ Il punto critico della reazione è la temperatura a cui avviene la miscelazione dei solidi (fenantrolina e KBr) con l'acido solforico. L'operazione deve avvenire a bassa temperatura per evitare la formazione di sottoprodotti indesiderati. La procedura prevede di raffreddare l'acido con azoto liquido, ma è stato riscontrato che lavorando con un bagno alcol/azoto liquido (-80 °C) si ottengono lo stesso buoni risultati. L'aggiunta di HNO₃ concentrato avviene a 0 °C nell'arco di un'ora, la soluzione viene portata a 90 °C per 3 ore ed infine, a differenza di quanto riportato da Calderazzo e collaboratori,⁶ è fondamentale alzare la temperatura a 160 °C per 60 minuti allo scopo di portare la reazione a completezza. La successiva reazione di condensazione tra l'1,10-fenantrolina-5,6-dione e l'o-fenilendiammina⁸ risulta rapida e con alte rese in etanolo. La ricristallizzazione da etanolo/acqua ha lo scopo di eliminare l'o-fenilendiammina in eccesso.

3.2.2. Sintesi di Ru(bipy)₂(L12)Cl₂·5HCl

La strategia di ottenimento del complesso Ru(bipy)₂(L12)Cl₂·5HCl (L13·5HCl) prevede la sintesi dell'intermedio cis-Ru(bipy)₂Cl₂ (**6**) ed il successivo attacco del legante L12 come riportatato in letteratura,⁹ (Fig. 3.1).

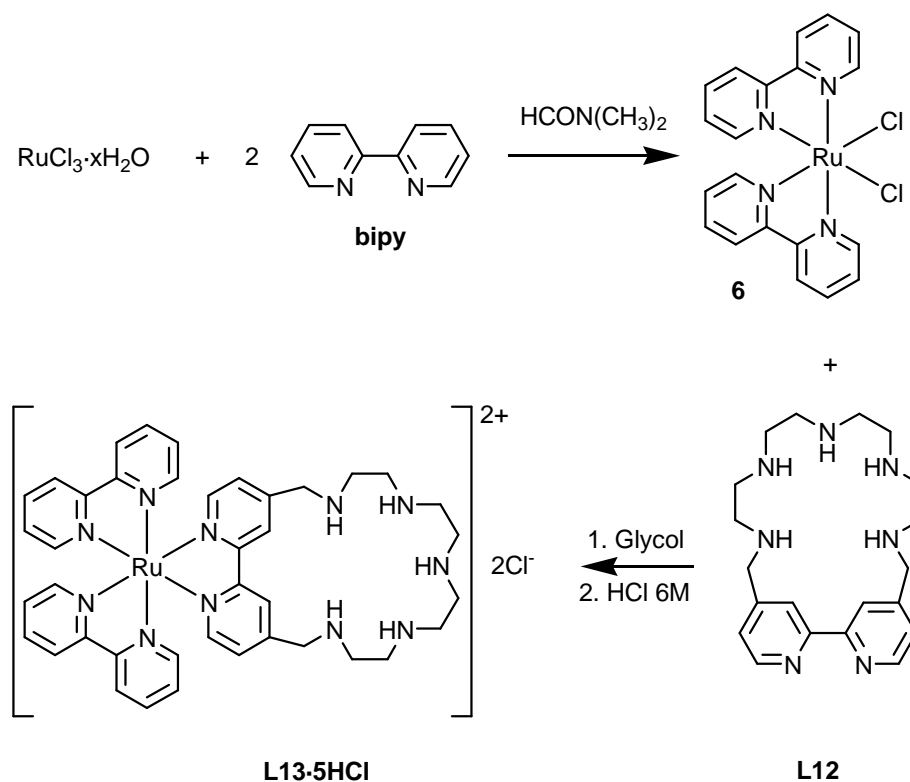


Fig. 3.1- Schema di sintesi.

3.2.3. Sintesi di $\text{Ru}(\text{dppz})_2(\text{L12})\text{Br}_2 \cdot 5\text{HBr}$

In accordo con la letteratura,¹⁰ inizialmente, la strategia di ottenimento prevedeva, come per il complesso precedente, la reazione tra il tricloruro di rutenio(III) idrato ed il dppz, adattando la procedura già utilizzata per l'analogo con il bipyridile (**6**). Però il prodotto intermedio $\text{Ru}(\text{dppz})_2\text{Cl}_2$, si è rivelato scarsamente solubile sia in solventi organici che in acqua, impedendo la reazione successiva con il legante **L12**. Perciò è stata adottata una strategia sintetica nuova che si basa sulla sintesi del polimero di rutenio, $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$, con cui si è fatto reagire il legante **L12** in metanolo, ottenendo l'intermedio $\text{Ru}(\text{L12})(\text{CO})_2\text{Cl}_2$ (**11** in Fig. 3.2) che, per reazione in 2-metossi-etanolo con dppz in eccesso, fornisce il prodotto desiderato **L14·5HBr**.

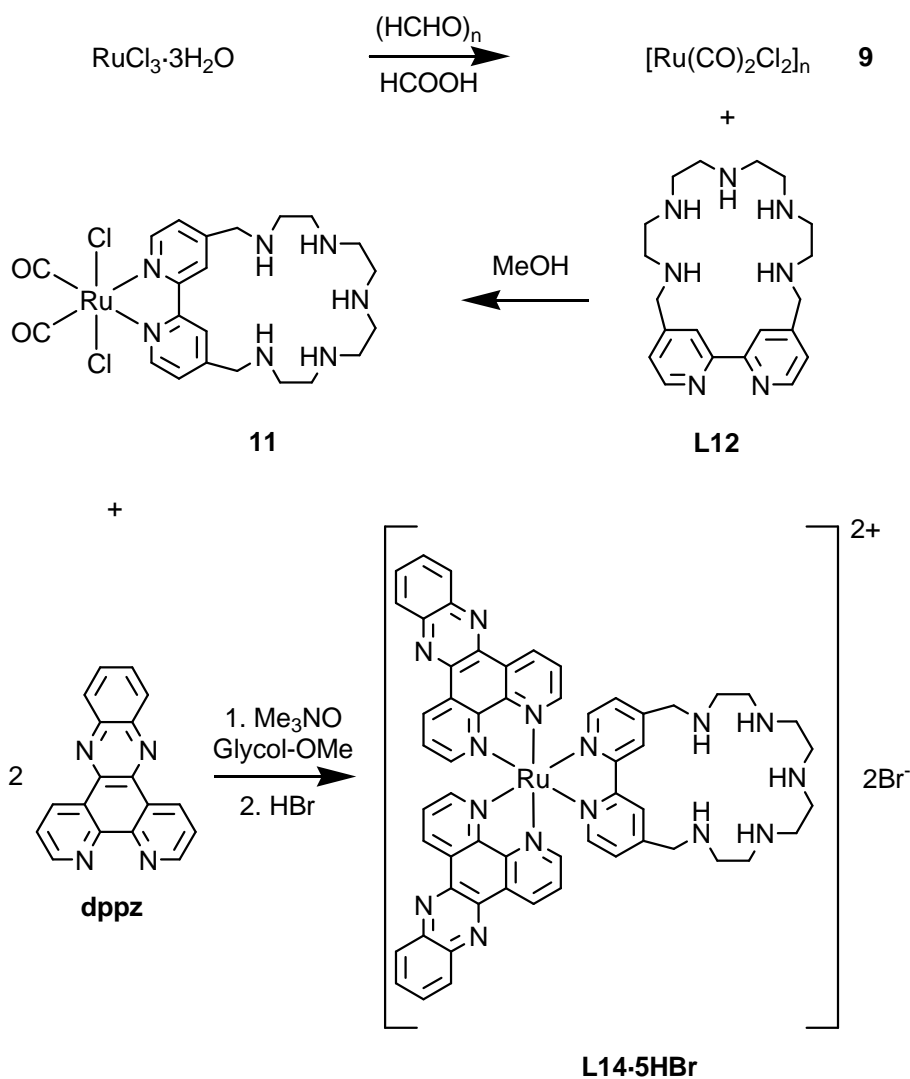


Fig. 3.2- Schema di sintesi di **L14·5HBr**.

La sintesi descritta¹¹ per il polimero **9** è formalmente considerata come una decarbonilazione dell'acido formico ad opera di RuCl_3 . La reazione è promossa dall'aggiunta di paraformaldeide quale riducente iniziale del Ru(III) a Ru(II). Il composto **11** è ottenuto per reazione del polimero con il legante **L12** in metanolo, adattando la procedura proposta da Nickita e collaboratori¹² alle esigenze operative. Occorre aggiungere acqua per favorire la solubilizzazione del legante **L12**. È consigliabile lavorare in eccesso di polimero per semplificare la successiva purificazione del prodotto. Infatti sia **11** che il legante sono solubili in acqua, mentre **9** presenta un'affinità per solventi meno polari come acetone ed etanolo. È stato visto che la reazione fornisce il prodotto desiderato con una resa accettabile (47%) solo se il legante **L12** è fornito come bromidrato. La strada alternativa utilizzando l'ammina libera di **L12** non ha dato il prodotto desiderato. Molto

probabilmente la presenza di gruppi amminici alifatici protonati nel bromidrato protegge questi gruppi da una possibile reazione con il Ru(II) favorendo la reazione dell'unità bipyridile non protonata con il metallo. Per controllare se il legante **L12** ha reagito completamente, dopo 3 h di riflusso si effettua un prelievo e un controllo via $^1\text{H-NMR}$ in D_2O . Come si può notare (Fig. 3.3) il protone H1 dell'unità bipyridilica di **L12** subisce uno spostamento a frequenze di risonanza minori quando si lega al rutenio.

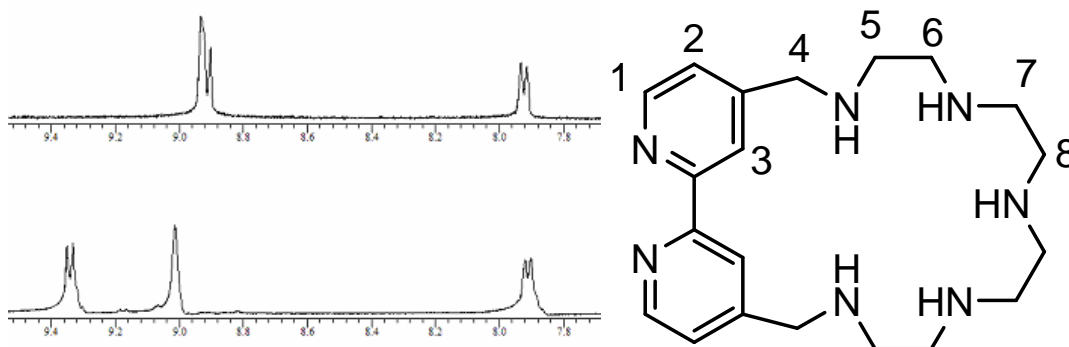


Fig. 3.3: Spettri $^1\text{H-NMR}$ a confronto; **L12** non coordinato (a) e coordinato (b) al rutenio, $\text{pH} < 2$.

La successiva aggiunta del dppz all'intermedio **11**, avviene in 2-metossietanolo (da preferirsi al glicol etilenico in quanto più facile da allontanare per distillazione a bassa pressione) ed in presenza di un eccesso di trimetilenammina-N-ossido, che agisce come agente decarbonilante.¹¹ Tipicamente si considera che la decarbonilazione avvenga per trasferimento, da parte del Me_3NO , dell'atomo di ossigeno al carbonio del CO. Il prodotto **L14·5HBr** è stato precipitato da una sua soluzione acquosa concentrata (usando la minima quantità di acqua per solubilizzarlo), acidificata a $\text{pH} < 2$ con HBr, per aggiunta di acetone. Il lavaggio con diverse aliquote di acetone è importante per eliminare l'eccesso di Me_3NO e la trimetilammina che si forma nell'ambiente di reazione.

3.2.4. Sintesi di $\text{Ru}(\text{bipy})(\text{dppz})(\text{L12})\text{Br}_2 \cdot 5\text{HBr}$

Per la sintesi di questo complesso è stata adottata una procedura simile alla precedente, basata sull'uso del polimero $[\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}_2]_n$. In questo caso, il

polimero è stato usato per inserire il bipyridile come primo legante ottenendo $\text{Ru}(\text{bpy})(\text{CO})_2\text{Cl}_2$ (Fig.3.4).

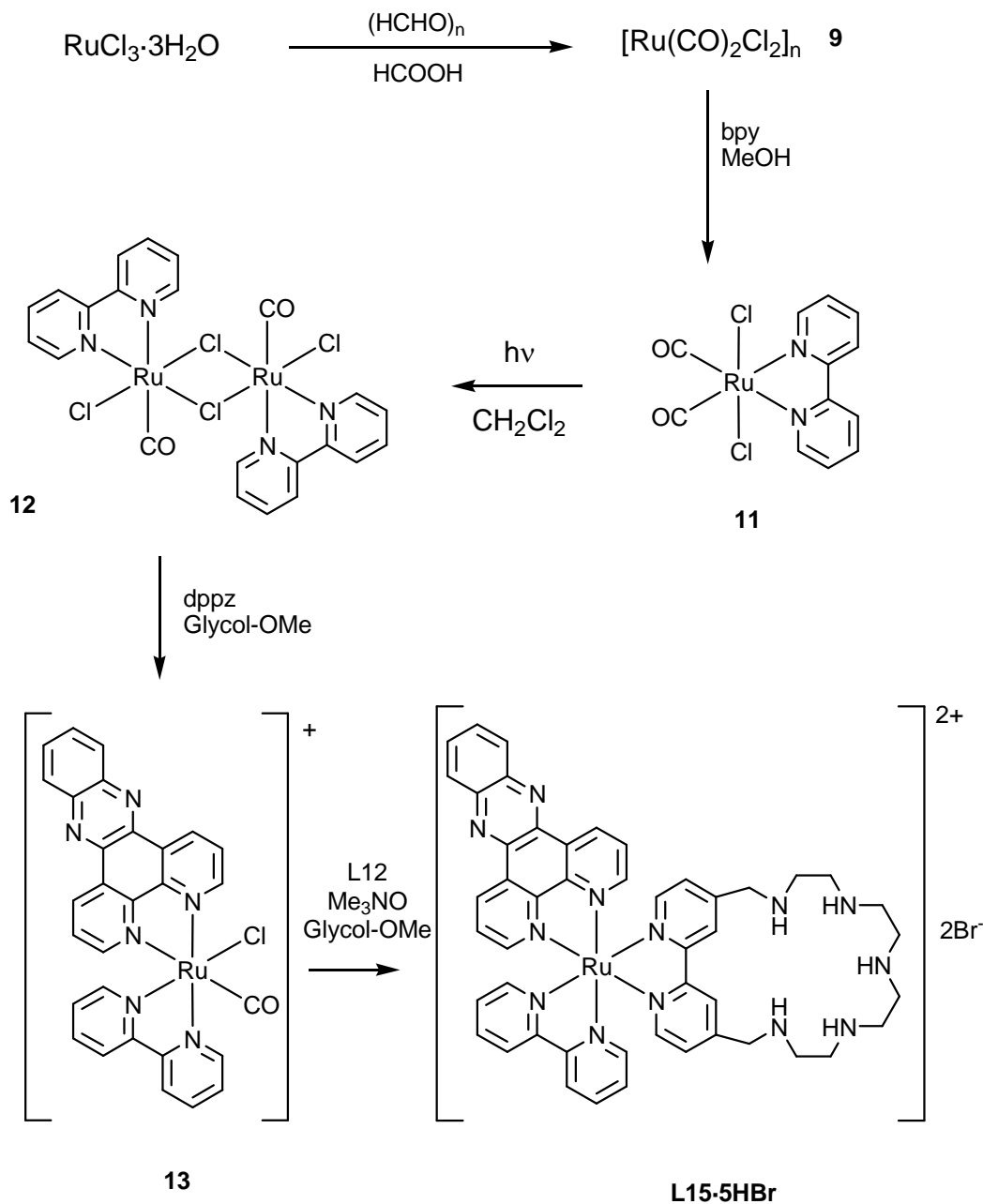


Fig. 3.4: Schema sintetico di **L16-5HBr**.

Il composto **11** è convertito nel dimero $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{CO})\text{Cl}_2]_2$ (**12**) attraverso irraggiamento di una soluzione del monomero in CH_2Cl_2 e successiva rimozione del solvente.¹¹ Aggiungendo dppz a una soluzione a riflusso di **12** in 2-metossietanolo si ottiene il composto **13** con buona resa (54%). Per favorire la formazione di questo composto si è usato un leggero eccesso di dppz perché può essere facilmente rimosso estraendo **13** in acqua. La successiva addizione del legante **L12** richiede l'utilizzo di Me_3NO come agente

decarbonilante. E' stata anche provata la procedura sintetica aggiungendo il legante **L12** al dimero **12**, ma la resa della reazione è troppo bassa. E' interessante notare che i composti dimeri come **12** si formano a seguito di irraggiamento di diversi complessi di tipo $\text{Ru}(\text{pp})(\text{CO})_2\text{Cl}_2$ contenenti leganti bidentati (pp).¹³ Questo tipo di reazione può avvenire anche per composti del tipo **11**, se esposti alla luce durante la sintesi di **L14·5HBr**. Comunque la possibile formazione del dimero di **11** non influenza la reazione con dppz a dare **L14·5HBr**.

3.3. Sintesi del complesso L16

$\text{Pt}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2$ è stato sintetizzato seguendo un procedimento riportato in letteratura.⁴ Per la sintesi di **L16** è stata opportunamente modificata la procedura sintetica descritta in letteratura¹³ per la preparazione di $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$. Il work-up di reazione è stato adattato alle esigenze di solubilità del prodotto finale.

3.4. Bibliografia

1. Richman J. E.; Atkins T. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268
2. Lodeiro C.; Parola A. J.; Pina F.; Bazzicalupi C.; Bencini A.; Bianchi A.; Giorgi C.; Masotti A.; Valtancoli B.; *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2968-2975
3. Cormarmond J.; Plumierè P.; Lehn J. M.; Agnus Y.; Lois R.; Weiss R.; Kahn O.; Badaran J. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6330-6340.
4. Price J.H.; Williamson, A.N.; Schramm, R.F.; Wayland, B.B. *Inorg Chem*, **1972**, *11*, 6, 1280-1284.
5. Annibale, A.; Brandolisio, M.; Pitteri, B. *Polyhedron* **1995**, *14*, 3 451-453.
6. Calderazzo F.; Marchetti F.; Pampaloni G.; Passarelli V.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 4389-4396.

7. Yamada M.; Tanaka Y.; Yashimoto Y.; Kuroda S.; Shimao I.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 1006.
8. Dickeson J. E.; Summers L. A.; *Aust. J. Chem.* **1970**, *23*, 1023-1027.
9. Lodeiro C.; Pina F.; Parola A. J.; Bencini A.; Bianchi A.; Bazzicalupi C.; Ciattini S.; Giorgi C.; Masotti A.; Valtancoli B.; Seixas de Melo J.; *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6813-6819
10. P.A. Lay, A.M. Sargeson, H. Taube, *Inorg. Synth.* *24* (1986) 291-299. B.P. Sullivan, D.J. Salmon, T.J. Meyer, *Inorg. Chem.* *17* (1978) 3334-3341
11. Anderson P. A.; Deacon G. B.; Haarmann K. H.; Keene F. R.; Meyer T. J.; Reitsma D. A.; Skelton B. W.; Strouse G. F.; Thomas N. C.; Treadway J. A.; White A. H.; *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6145-6157.
12. Nickita N.; Belousoff M. J.; Bhatt A. I.; Bond A. M.; Deacon G. B.; Gasser G.; Spiccia L.; *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 8638-8651.
13. G.B. Deacon, C.M. Kepter, N. Sahely, B.W. Skelton, L. Spiccia, N.C. Thomas, A.H. White, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 275-277.

4. Recettori poliammonici contenenti unità eteroaromatiche estese come chemosensori selettivi per substrati biologici anionici.¹

4.1 Introduzione

La chimica di coordinazione anionica sta riscuotendo sempre maggiore interesse perché in molti processi biologici naturali sono coinvolti un gran numero di substrati e di cofattori carichi negativamente. Processi quali trasporto di membrana, sintesi del DNA, processi di trasferimento elettronico sono in genere regolati da proteine che legano appropriati anioni nucleotidici e fosfati inorganici ospitandoli nei propri siti attivi.² Il legame di questi anioni è regolato da diverse interazioni non covalenti di tipo carica-carica, carica-dipolo, legame a idrogeno, effetto idrofobo e interazioni di stacking. Per questo la sintesi di recettori capaci di legare anioni fosfato in soluzione acquosa rappresenta un possibile approccio per analizzare le interazioni deboli che regolano i processi di riconoscimento nei sistemi biologici. Il recettore potrà ad esempio contenere gruppi ammonio carichi positivamente per interagire con i gruppi fosfato anionici e siti di legame per interagire attraverso legami a idrogeno o π -stacking con le nucleobasi. Inserendo inoltre subunità con caratteristiche fluorescenti si può non solo legare i substrati, ma anche segnalarne la presenza con cambiamenti significativi delle proprietà di emissione. Per questo motivo sono stati sintetizzati i leganti **L8**, **L9**, **L10** e **L11**. I primi due contengono rispettivamente una catena pentaamminica e una esaamminica legate in posizione 2,9 alla 1,10-fenantrolina. **L10** è un tris-macrociclo contenente tre unità cyclen (cyclen=1,4,7,10-tetraazacyclododecano) rinforzato con due ponti 2,6-

piridinbis(metilene). **L11** contiene una catena pentaamminica legata al 2,2'-bipiridile (Fig. 4.1).

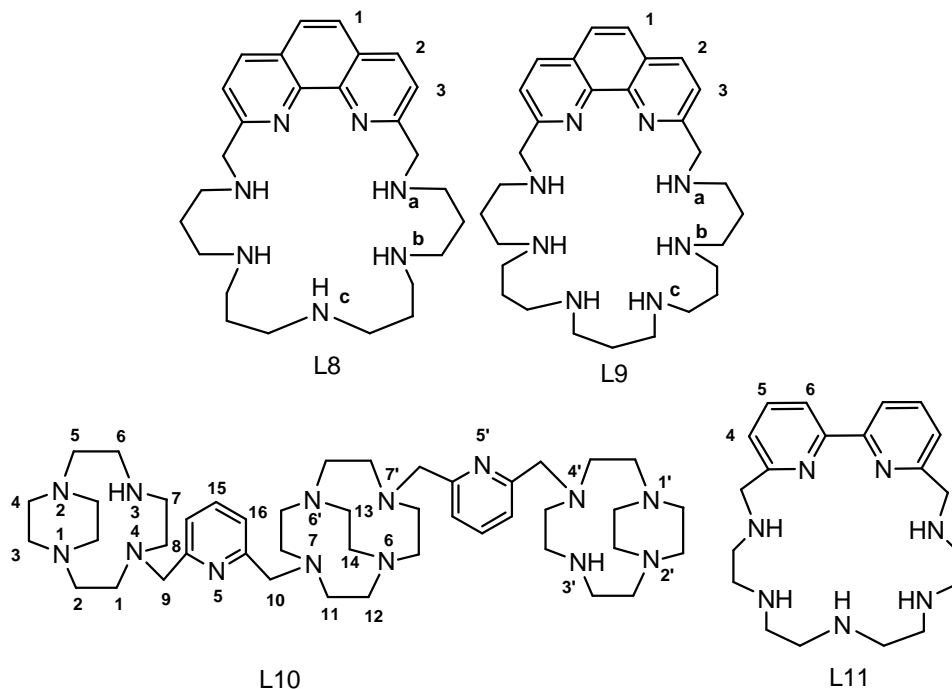


Fig. 4.1- Rappresentazione dei leganti **L8**, **L9**, **L10** e **L11**.

Le specie protonate di questi recettori sono caratterizzate da cavità più o meno ampie e cariche positivamente, dove possono essere ospitati gli ioni inorganici fosfato e le catene fosfato dei nucleotidi. Subunità aromatiche, anche estese, sono spesso introdotte nei leganti con proprietà recettrici.³ Infatti le unità come 2,2'-dipiridile e la 1,10-fenantrolina con i loro atomi di azoto eteroaromatici possono contribuire a legare specie cationiche e, contemporaneamente, possono fornire un ottimo sito di legame per la coordinazione di anioni nucleotidi o nucleobasi, attraverso interazioni di stacking e effetto idrofobo. Anche la meno estesa unità piridina può dare interazioni di stacking e idrofobe, con le unità aromatiche dei substrati. Sono state così studiate le proprietà coordinative di **L8** e **L9** nei confronti degli anioni trifosfato ATP, GTP, TTP e CTP: sono state messe a confronto le capacità coordinative dei due leganti e dei leganti nei confronti dei diversi nucleotidi. Si sono studiate le interazioni di **L10** con i fosfati inorganici e gli anioni nucleotidici (ATP e ADP). Sono state studiate le proprietà coordinative di **L11** nei confronti dello Zn(II) e sono state investigate le interazioni tra il suo complesso binucleare di Zn(II) e alcuni metaboliti di interesse biologico.

Nel seguente capitolo sono riportate le caratteristiche generali dello studio; per maggiori dettagli si rimanda alle pubblicazioni allegate in appendice.

4.2 Protonazione dei leganti

La protonazione dei leganti è stata effettuata mediante misure potenziometriche in soluzioni acquose (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K e 313.1K per **L10**). Per meglio comprendere la distribuzione dei protoni sui singoli leganti sono state anche effettuate misure ¹H-NMR, oltre che titolazioni spettrofotometriche per evidenziare la eventuale protonazione dell'unità eteroaromatica. I risultati per **L8-L10** sono riportati in Tabella 4.1 e in Fig. 4.2. Per **L11** i risultati sono stati riportati precedentemente⁴ ed è stato visto che i primi protoni vanno a collocarsi sugli atomi di azoto della catena alifatica data la loro maggiore basicità rispetto agli atomi di azoto aromatici. Solo il quinto protone, va a collocarsi sugli atomi di azoto del biperidile.

Tabella 4.1- Costanti di protonazione di **L8, L9, L10** e **L11** determinate in soluzione acquosa (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K).

Equilibrio	Log K			
	L8	L9	L10	L10
	T=298.1K	T=298.1K	T=298.1K	T=313.1K
$L + H^+ = [LH]^+$	10.24(1)	10.14(1)		
$[LH]^+ + H^+ = [LH_2]^{2+}$	9.87(1)	10.10(1)		
$[LH_2]^{2+} + H^+ = [LH_3]^{3+}$	8.02(1)	8.59(1)	10.6(1)	9.7(1)
$[LH_3]^{3+} + H^+ = [LH_4]^{4+}$	7.24(1)	7.79(1)	7.78(5)	7.0(1)
$[LH_4]^{4+} + H^+ = [LH_5]^{5+}$	6.51(2)	6.98(1)	5.49(5)	5.1(1)
$[LH_5]^{5+} + H^+ = [LH_6]^{6+}$		6.90(1)	4.67(5)	4.3(1)
$[LH_6]^{6+} + H^+ = [LH_7]^{7+}$			3.22(6)	2.9(1)
$[LH_7]^{7+} + H^+ = [LH_8]^{8+}$			2.2(1)	2.0(1)

I leganti **L8** e **L9** legano fino a sei protoni acidi nel range di pH 2.5-10.5. Tutte le costanti di protonazione sono più alte rispetto a quella riportata per la protonazione della 1,10-fenantrolina (logK=4.96),⁵ suggerendo che gli atomi di azoto eteroaromatici non sono interessati da protonazione nel range di pH investigato. Alle misure potenziometriche sono state affiancate anche misure ¹H-NMR, spettrofotometriche e fluorimetriche. Attraverso lo studio della dipendenza dal pH dei segnali ¹H-NMR, si è potuto notare che i primi tre

step (**L8**) e quattro step (**L9**) di protonazione dei leganti, interessano i gruppi amminici centrali della catena alifatica. Gli step di protonazione successivi interessano gli atomi di azoto N_a vicini alla fenantrolina, mentre i protoni eteroaromatici non subiscono sostanziali variazioni in tutto il range di pH investigato. Il fatto che la fenantrolina non sia interessata da protonazione, è confermato anche dagli spettri U.V., infatti la banda di assorbimento della fenantrolina a 270 nm subisce solo un piccolo redshift di circa 4nm, accompagnato da debole aumento di assorbanza sotto pH 9. Al contrario, gli spettri di emissione di **L8** e **L9** sono fortemente dipendenti dal pH. Come mostrato in Fig. 4.2 per **L8**, il recettore non è emissivo a pH alcalino e mostra la tipica banda di emissione della fenantrolina solo a pH acido quando si ha la formazione della specie $[LH_5]^{5+}$. Nella specie $[LH_4]^{4+}$, i gruppi amminici benzilici non protonati possono dare luogo a quench di emissione di fluorescenza.

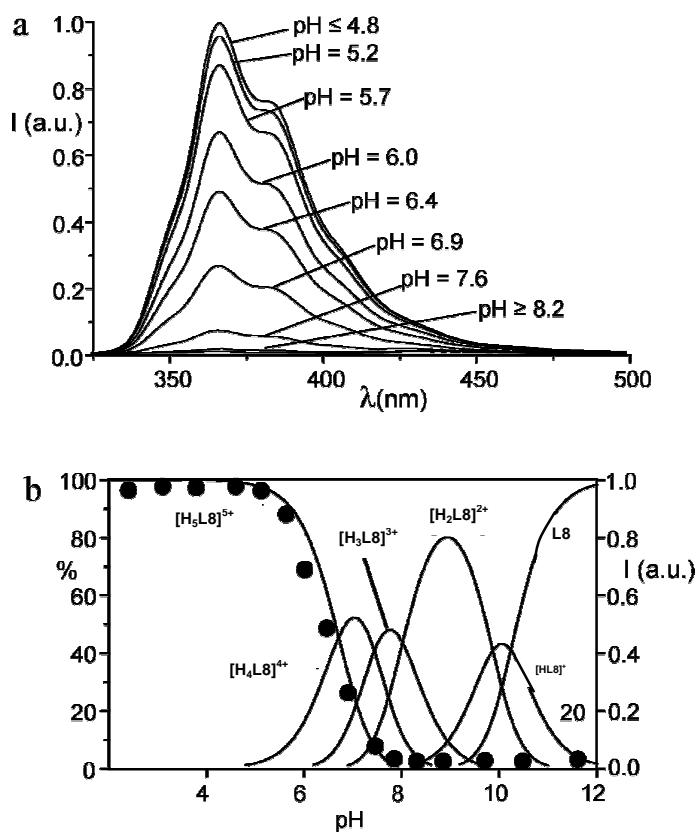


Fig. 4.2- Spettri di emissione di **L8** a diversi valori di pH (a) e dipendenza della sua intensità di emissione a 366 nm ($\lambda_{exc}=270$ nm) (b).

L10 è una base molto forte per quanto riguarda i primi due step di protonazione e attraverso misure potenziometriche e 1H -NMR è stato visto

che la specie $[H_2L10]^{2+}$ non può essere deprotonata anche in soluzioni fortemente alcaline. Considerando che la costante di protonazione della piridina è di 5.67 unità logaritmiche⁶, mentre le costanti di protonazione delle ammine secondarie si trovano in un range tra 9 e 11 unità logaritmiche, si può ipotizzare che i primi due step di protonazione della specie $[H_2L10]^{2+}$ interessino i gruppi amminici della catena alifatica. Sono stati registrati spettri 1H -NMR a diversi valori di pH e alla temperatura di 313.1 K perché a temperatura ambiente presentano una notevole flussionalità. La dipendenza dal pH di questi segnali è riportata in Fig.4.3.

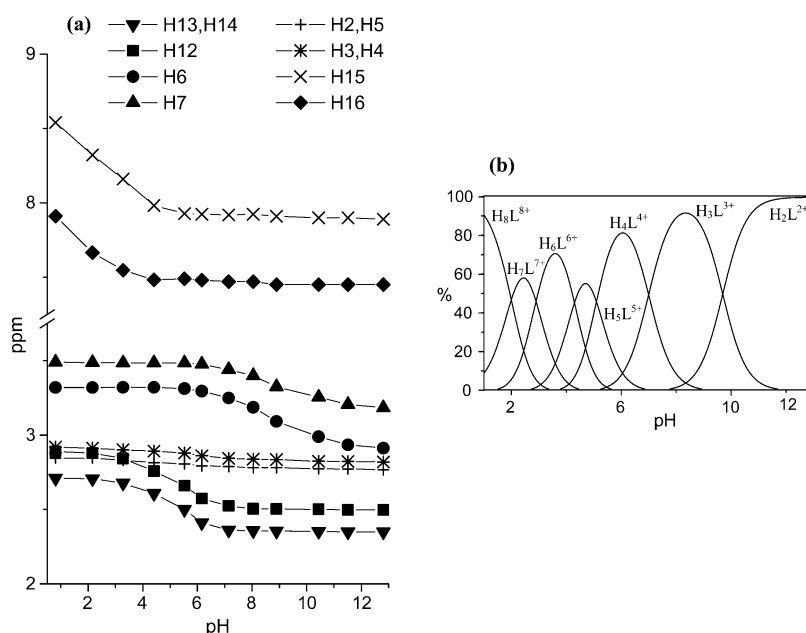


Fig. 4.3- (a) Dipendenza dal pH dei segnali 1H -NMR del legante **L10** (313.1K), (b) diagramma di distribuzione delle specie protonate del legante.

In base a questo andamento si può ipotizzare che i primi due protoni acidi della specie $[H_2L10]^{2+}$ siano in compartecipazione tra N1 e N2 e tra N1' e N2'. I due macrocicli esterni si comportano come una “spugna protonica” che si carica positivamente e riduce l’affinità protonica da parte dell’anello centrale. Nella specie $[H_4L10]^{4+}$, i due protoni acidi sono legati a N3 e N3' degli anelli esterni. Nella specie $[H_6L10]^{6+}$, i due protoni acidi sono legati a N6 e N6' dell’anello tetraamminico centrale. Nella specie $[H_8L10]^{8+}$, i due protoni acidi sono legati a N5 e N5' delle due unità piridina.

4.3 Coordinazione anionica in soluzione acquosa

La protonazione dei leganti forma specie protonate cariche positivamente in grado di dare stabili complessi con specie anioniche. L'interazione con i nucleotidi (Fig. 4.4) è stata studiata con titolazioni potenziometriche in quanto la formazione di complessi anionici con recettori poliammonici è strettamente dipendente dal pH. I recettori **L8-L10** formano complessi stabili 1:1 in soluzione acquosa (Tabella 4.2). Non sono stati invece trovati addotti di tipo 2:1 o 2:2.

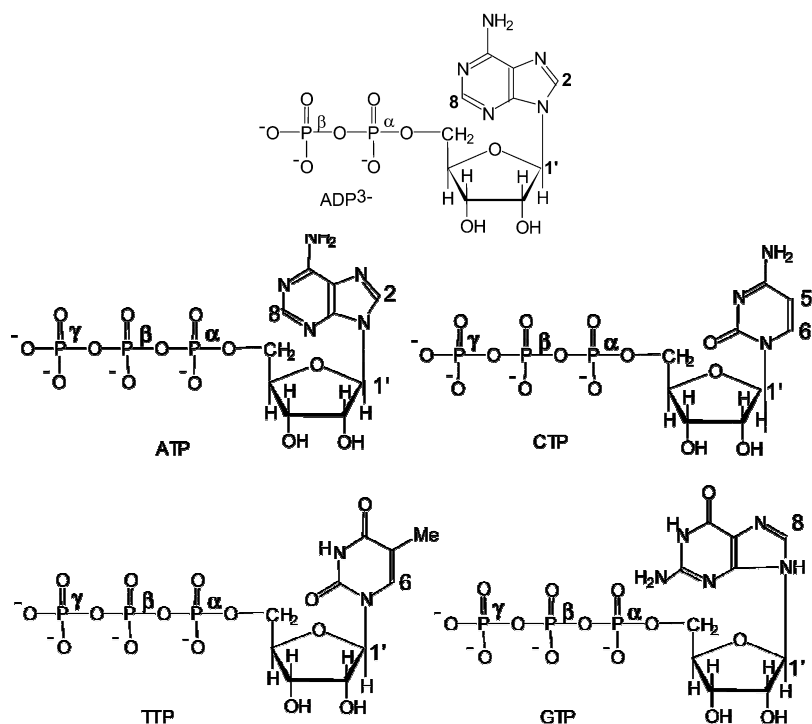


Fig. 4.4- Numerazione dei protoni e degli atomi di fosforo per i nucleotidi ADP, ATP, CTP, TTP e GTP

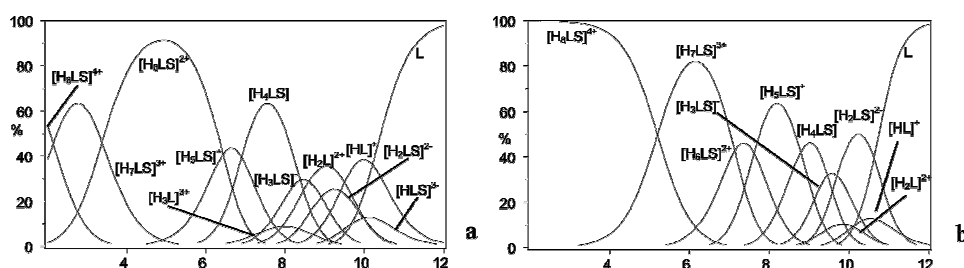
Tabella 4.2- Costanti di stabilità degli addotti formati tra **L8** e **L9** e i nucleotidi ATP, CTP, TTP e GTP e degli addotti tra **L10** e ATP e ADP, fosfato, di fosfato e trifosfato. Tutte le misure potenziometriche sono state effettuate in soluzioni acquose di NMe_4Cl 0.1M a 298.1K.

Equilibrio	logK			
	S ⁴⁺ = ATP	S ⁴⁺ = CTP	S ⁴⁺ = TTP	S ⁴⁺ = GTP
$[\text{HL8}]^+ + \text{S}^{4+} = [\text{HL8S}]^{3-}$	2.61(3)		3.57(1)	
$[\text{H}_2\text{L8}]^{2+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_2\text{L8S}]^{2-}$	3.12(3)		3.80(1)	3.24(2)
$[\text{H}_3\text{L8}]^{3+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_3\text{L8S}]^-$	4.11(3)	3.01(4)	4.27(2)	4.07(2)
$[\text{H}_4\text{L8}]^{4+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_4\text{L8S}]$	5.66(3)	4.64(5)	5.70(2)	5.59(3)
$[\text{H}_3\text{L8}]^{3+} + [\text{HS}]^{3-} = [\text{H}_4\text{L8S}]$	5.67(4)		5.64(2)	5.30(3)
$[\text{H}_4\text{L8}]^{4+} + [\text{HS}]^{3-} = [\text{H}_5\text{L8S}]^+$	5.73(4)	6.01(5)	6.09(2)	5.93(3)
$[\text{H}_5\text{L8}]^{5+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_5\text{L8S}]^+$		6.13(5)		
$[\text{H}_5\text{L8}]^{5+} + [\text{HS}]^{3-} = [\text{H}_6\text{L8S}]^{2+}$	6.05(4)	5.29(5)	5.31(2)	5.48(3)
$[\text{H}_5\text{L8}]^{5+} + [\text{H}_2\text{S}]^{2-} = [\text{H}_7\text{L8S}]^{3+}$	5.30(4)	5.83(5)	4.29(2)	4.60(3)
$[\text{H}_5\text{L8}]^{5+} + [\text{H}_3\text{S}]^- = [\text{H}_8\text{L8S}]^{4+}$	5.64(4)			
$[\text{H}_2\text{L9}]^{2+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_2\text{L9S}]^{2-}$	4.29(2)	3.16(2)	3.03(3)	2.87(3)
$[\text{H}_3\text{L9}]^{3+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_3\text{L9S}]^-$	5.41(2)	4.38(2)	4.15(3)	4.47(3)
$[\text{H}_4\text{L9}]^{4+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_4\text{L9S}]$	7.08(2)	5.98(2)	5.24(3)	5.75(3)
$[\text{H}_4\text{L9}]^{4+} + [\text{HS}]^{3-} = [\text{H}_5\text{L9S}]^+$	8.86(3)	7.84(2)	7.11(3)	6.60(3)
$[\text{H}_5\text{L9}]^{5+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_5\text{L9S}]^+$	8.89(3)	7.27(2)	7.21(3)	6.93(3)
$[\text{H}_5\text{L9}]^{5+} + [\text{HS}]^{3-} = [\text{H}_6\text{L9S}]^{2+}$	9.68(3)	8.95(2)	7.67(4)	7.87(3)
$[\text{H}_6\text{L9}]^{6+} + \text{S}^{4+} = [\text{H}_6\text{L9S}]^{2+}$	9.91(3)	8.62(2)	7.98(3)	8.40(3)
$[\text{H}_6\text{L9}]^{6+} + [\text{HS}]^{3-} = [\text{H}_7\text{L9S}]^{3+}$	9.55(3)	8.58(4)	8.06(3)	7.16(3)
$[\text{H}_6\text{L9}]^{6+} + [\text{H}_2\text{S}]^{2-} = [\text{H}_8\text{L9S}]^{4+}$	9.17(3)	8.06(4)	3.57(1)	

Equilibrio	Logβ	
	S= ADP ³⁻	S= ATP ³⁻
$\text{H}_2\text{L10} + \text{S} + \text{H} = \text{H}_3\text{L10}$	14.89(1)	
$\text{H}_2\text{L10} + \text{S} + 2\text{H} = \text{H}_4\text{L10}$	23.37(1)	23.22(6)
$\text{H}_2\text{L10} + \text{S} + 3\text{H} = \text{H}_5\text{L10}$	29.87(1)	32.14(9)
$\text{H}_2\text{L10} + \text{S} + 4\text{H} = \text{H}_6\text{L10}$	35.58(1)	38.24(8)
$\text{H}_2\text{L10} + \text{S} + 5\text{H} = \text{H}_7\text{L10}$	40.48(1)	42.95(8)
$\text{H}_2\text{L10} + \text{S} + 6\text{H} = \text{H}_8\text{L10}$	43.81(1)	47.86(9)
$\text{H}_2\text{L10} + \text{S} + 7\text{H} = \text{H}_9\text{L10}$		51.87(8)

Equilibrio	Log β		
	S= PO ₄ ³⁻	S= P ₂ O ₇ ⁴⁻	S= P ₃ O ₁₀ ⁵⁻
H ₂ L10 + S + H = H ₃ L10	14.99(3)		
H ₂ L10 + S + 2H = H ₄ L10	26.28(3)	23.44(4)	
H ₂ L10 + S + 3H = H ₅ L10	34.13(3)	31.92(3)	32.19(8)
H ₂ L10 + S + 4H = H ₆ L10	41.44(2)	38.13(4)	38.20(9)
H ₂ L10 + S + 5H = H ₇ L10	46.99(2)	44.43(5)	44.40(8)
H ₂ L10 + S + 6H = H ₈ L10	51.76(3)	52.77(5)	49.41(8)
H ₂ L10 + S + 7H = H ₉ L10	55.08(4)	53.58(5)	53.56(5)

Esaminando i valori delle costanti di equilibrio di tutti i sistemi si può notare che per un dato legante le forze di interazione con il substrato anionico cresce con l'aumentare del grado di protonazione del legante.



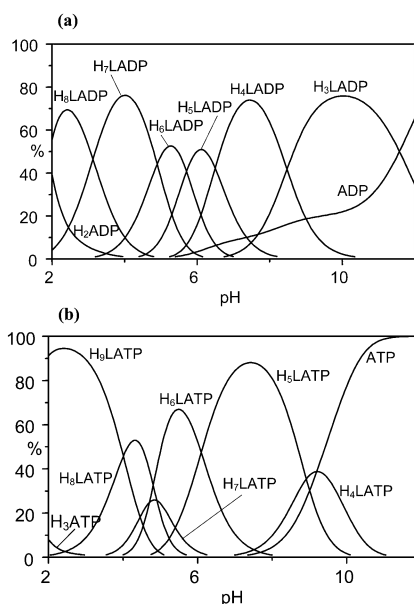


Fig. 4.6- Distribuzione degli addotti di ADP (a) e ATP (b) con **L10** ($[L10]=[ADP]=[ATP]=1 \cdot 10^{-3}M$, 298.1K, NMe_4Cl 0.1M)

Per semplificare il problema dovuto alla presenza in soluzione, allo stesso pH, di diversi equilibri, può essere utile calcolare le costanti di stabilità effettive.⁷ Ad un dato pH, se sono noti la quantità totale di substrato libero ($\Sigma H_{(h-i)}S$), del recettore libero (ΣH_iL), e dell'addotto formato (ΣH_hLS), si può definire la costante di stabilità effettiva mediante la seguente equazione:

$$K_{eff} = \Sigma H_hLS / (\Sigma H_{(h-i)}S \cdot \Sigma H_iL)$$

Riportando in grafico la dipendenza dal pH delle costanti effettive si può notare che in tutti i casi la stabilità degli addotti è fortemente dipendente dal pH (articoli in appendice). Si nota un aumento di stabilità passando da pH alcalino a pH 7, si ha un massimo tra pH 7 e pH4 per **L8** e **L9**, e tra pH 4.5 e 3.5 per **L10**, e poi una debole diminuzione a pH più acidi. Tra pH 7 e pH4 si ha un maggior numero di gruppi ammonio protonati e quindi maggiori interazioni con i substrati anionici. A pH più acidi si avrà la progressiva formazione in soluzione di specie substrato più protonate e la conseguente diminuzione delle interazioni con il recettore. Si può vedere anche che **L9** mostra una più marcata affinità per i substrati rispetto a **L8** e una notevole selettività di legame per ATP rispetto a GTP, TTP e CTP. Nel caso di **L10**, la stabilità degli addotti aumenta nell'ordine fosfato < difosfato < trifosfato \approx ADP < ATP. La sequenza non può essere semplicemente ricondotta alle diverse interazioni elettrostatiche o di legame a idrogeno, infatti a pH 4 ATP e ADP presentano una carica negativa minore o uguale a quella di

trifosfato e di difosfato. Per comprendere meglio la natura delle interazioni che porta a queste considerevoli selettività, sono stati analizzati i diversi sistemi host-guest attraverso misure ^1H e ^{31}P NMR. In Fig. 4.7 sono riportati i chemical shifts dei segnali ^{31}P NMR di ATP in presenza di **L9** e in Tabella 4.3 sono elencati i CIS (complexation-induced-shifts) dei diversi segnali a pH 6 per i leganti **L8** e **L9**. Si vedono dei notevoli upfield shifts per i segnali del gruppo fosfato terminale P_γ e di minore entità per il gruppo centrale P_β . Il segnale di P_α è solo debolmente condizionato dalla presenza del recettore e quindi è possibile che sia solo leggermente coinvolto nella stabilizzazione degli addotti. Per **L9** si può notare una sequenza di upfield shift dei segnali ^{31}P NMR di questo tipo: $\text{ATP} > \text{CTP} > \text{TTP} \approx \text{GTP}$, che conferma la sequenza di stabilità determinata con le misure potenziometriche. Inoltre gli upfield shift per **L9** sono maggiori che per **L8**.

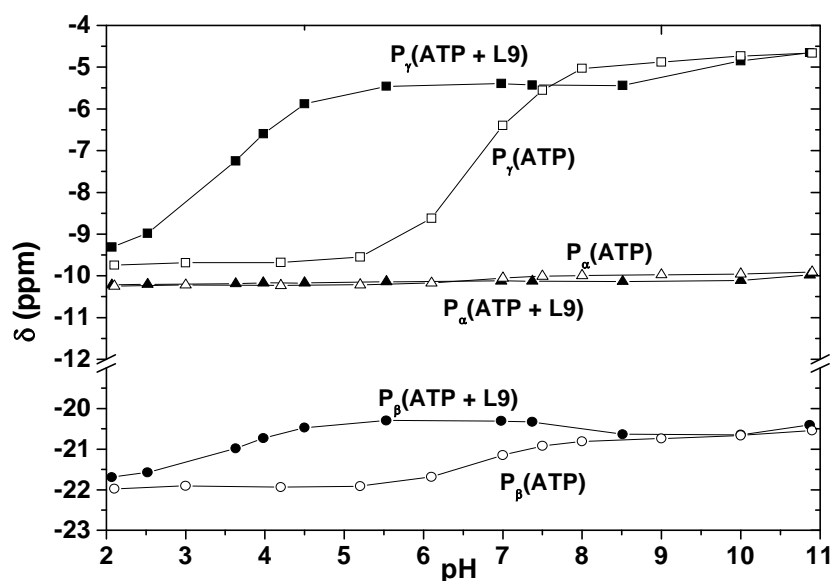


Fig. 4.7- Dipendenza dal pH dei chemical shifts ^{31}P NMR dei segnali di ATP in assenza e in presenza di un equivalente di **L9** ($[\text{L9}] = [\text{ATP}] = 5 \cdot 10^{-3}\text{M}$)

Tabella 4.3- Shifts ^{31}P NMR dei nucleotidi negli addotti con **L8** e **L9** e corrispondenti CIS (D_2O , pH6, 298K)

	ATP			CTP			TTP			TTP		
	P_α	P_β	P_γ	P_α	P_β	P_γ	P_α	P_β	P_γ	P_α	P_β	P_γ
	Recettore L8											
δ (ppm)	-10.7	-21.8	-6.0	-10.7	-22.0	-7.7	-10.8	-22.6	-7.9	-11.0	-21.9	-8.6
CIS	0.2	2.2	3.0	0.2	0.7	2.9	0.0	0.5	2.6	0.1	0.5	2.0
	Recettore L9											
δ (ppm)	-9.9	-20.3	-5.2	-10.5	-21.5	-6.5	-10.8	-22.2	-7.6	-10.9	-21.3	-7.4
CIS	1.0	2.7	4.8	0.4	1.2	3.8	0.1	0.9	2.9	0.2	1.1	3.2

Analizzando gli spettri ^1H NMR a diversi pH per soluzioni contenenti i nucleotidi e i recettori **L8** e **L9**, si può notare un coinvolgimento delle nucleobasi nel processo di riconoscimento. Infatti dalla Fig. 4.8 e dalla Tabella 4.4 che riporta i CIS, si può vedere che tutti i nucleotidi in presenza di **L8** e **L9** mostrano upfield shifts per i segnali dei protoni aromatici e per il protone anomero $\text{H}1'$. In particolare, i CIS sono più alti a pH debolmente acido e diminuiscono notevolmente a pH alcalino. Comunque, questi valori sono tutti più bassi di quelli osservati per i segnali ^{31}P . Questo indica che le interazioni tra la fenantrolina e le nucleobasi sono meno sensibili al pH del mezzo rispetto alle interazioni carica-carica. Nel caso di **L9** si può individuare una sequenza di upfield shifts nell'ordine $\text{ATP} \gg \text{GTP} > \text{TTP} > \text{CTP}$. Inoltre, anche i segnali ^1H NMR della fenantrolina di **L9** mostrano rilevanti upfield shifts con una sequenza simile a quella dei protoni delle nucleobasi, suggerendo che l'unità fenantrolina di **L9** e le nucleobasi sono accoppiate da interazioni di tipo π -stacking, che diminuiscono passando da ATP a CTP. Nel caso del recettore **L8** più piccolo, la formazione degli addotti, induce shifts più piccoli nelle risonanze ^1H delle nucleobasi e della fenantrolina. Dai risultati NMR si può concludere che le sequenze di stabilità dei vari addotti non sono solo determinate da interazioni elettrostatiche tra gruppi fosfato e gruppi ammonio, ma anche da interazioni tra le nucleobasi e i due recettori. In

particolare l'addotto di **L9** con ATP mostra le più forti interazioni carica-carica e π -stacking.

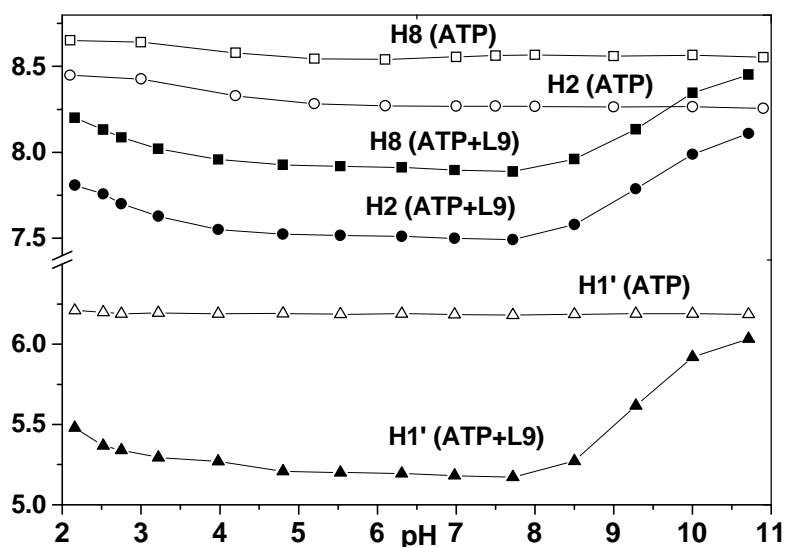


Fig. 4.8- Dipendenza dal pH dei segnali ^1H NMR dei protoni H2 e H8 di adenina e del protone H1' di ATP in assenza e in presenza di un equivalente di **L9** ($[\text{L9}] = [\text{ATP}] = 5 \cdot 10^{-3}\text{M}$)

Tabella 4.4- Shifts ^1H NMR dei protoni della fenantrolina, dei protoni aromatici delle nucleobasi e del protone anomero H1' negli addotti di **L8** e **L9** con ATP, CTP, GTP e TTP e corrispondenti CIS (D_2O , pH6, 298K)

		H2	H1	H3		H8	H2	H1'
L8	δ	8.31	7.78	7.76	ATP	8.22	7.95	5.83
	CIS	-0.09	-0.11	-0.07		-0.33	-0.34	-0.38
L9	δ	8.27	7.63	7.65	ATP	7.91	7.49	5.25
	CIS	-0.26	-0.32	-0.14		-0.60	-0.76	-0.96
L8		H2	H1	H3		H6	H5	H1'
	δ	8.32	7.82	7.65	CTP	7.75	6.11	5.88
L9	CIS	-0.08	-0.07	-0.08		-0.20	-0.11	-0.14
	δ	8.39	7.73	7.72	CTP	7.67	6.02	5.79
L9	CIS	-0.14	-0.22	-0.08		-0.28	-0.20	-0.24
		H2	H1	H3		H6		H1'

L8	δ	8.34	7.83	7.67	TTP	7.68	6.13
	CIS	-0.06	-0.06	-0.06		-0.10	-0.19
L9	δ	8.35	7.75	7.71	TTP	7.43	5.90
	CIS	-0.18	-0.20	-0.09		-0.35	-0.42
		H2	H1	H3		H8	H1'
L8	δ	8.28	7.78	7.63	GTP	8.08	5.75
	CIS	-0.11	-0.11	-0.10		-0.15	-0.10
L9	δ	8.35	7.67	7.70	GTP	7.79	5.46
	CIS	-0.23	-0.28	-0.10		-0.44	-0.39

Per quanto riguarda **L10**, la Fig. 4.9 mostra un downfield shift dei segnali P_γ , e, in misura minore, P_β di ATP dopo complessazione, e il downfield shift di P_β di ADP. In entrambi i casi la variazione dei chemical shift è dipendente dal pH e maggiore nel range di pH 9-4, in accordo con lo studio potenziometrico.

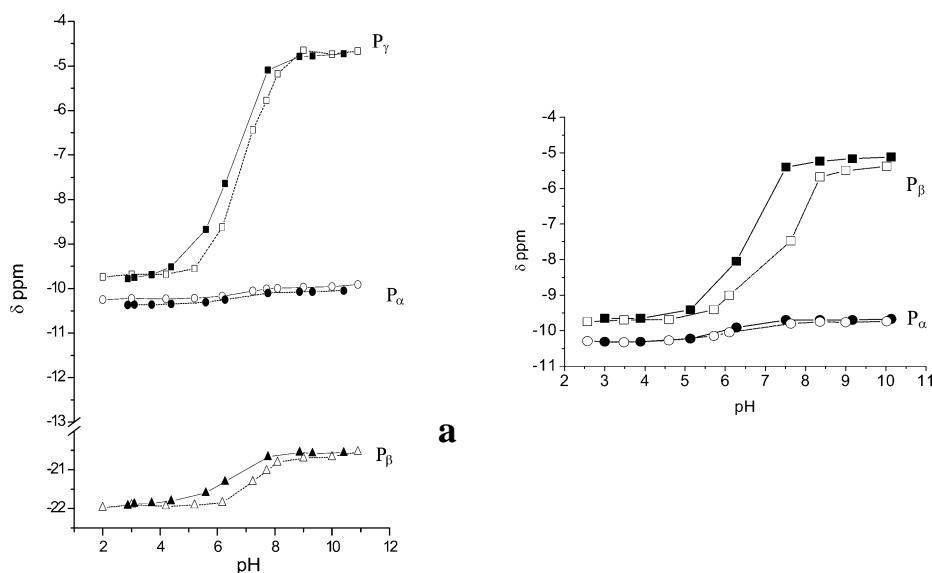


Fig. 4.9- Dipendenza dal pH dei chemical shifts ^{31}P NMR dei segnali di ATP (a) e ADP (b) in assenza e in presenza di un equivalente di **L10** ($[\text{L10}] = [\text{ATP}] = [\text{ADP}] = 1 \cdot 10^{-3}\text{M}$).

In Fig. 4.10 è riportata la dipendenza dal pH dei segnali dei protoni dell'unità adenina dei nucleotidi. Per entrambi i sistemi si nota upfield shift dei segnali dei nucleotidi. Da notare che le variazioni dei chemical shift dopo

complessazione di ATP e ADP sono più piccole di quelle osservate per la coordinazione di ATP e ADP da parte di macrocicli poliammonici.⁸

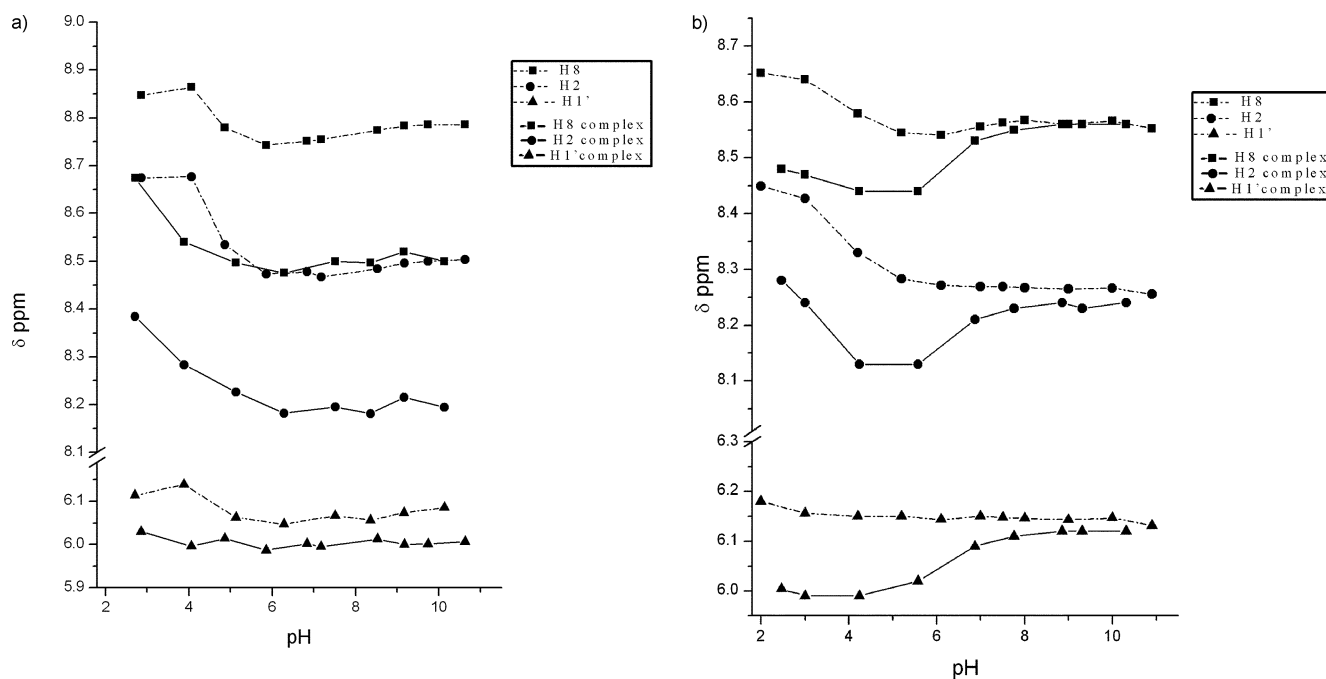


Fig. 4.10- Dipendenza dal pH dei chemical shifts ^1H NMR dei protoni H2 e H8 di adenina e del protone H1' di ADP (a) e ATP (b) in assenza e in presenza di un equivalente di **L10** ($[\text{L10}] = [\text{ATP}] = [\text{ADP}] = 1 \cdot 10^{-3} \text{M}$).

Quando interazioni di tipo π -stacking tra l'unità adenina e una unità eteroaromatica contribuiscono significativamente alla formazione dell'addotto si hanno spostamenti delle risonanze dei protoni dell'unità adenina anche maggiori di 1 ppm. In questo caso, evidentemente si hanno solo deboli interazioni tra l'unità adenina del substrato e l'unità piridina del legante **L10**.

4.4 Molecular modeling e analisi strutturale

Per ottenere informazioni strutturali circa le modalità di coordinazione dei sistemi in esame, è stato effettuato per **L8** e **L9** uno studio di molecular modelling, mediante calcoli di dinamica molecolare con simulazione implicita del solvente sugli addotti $\text{LH}_6^{6+}\text{-XTP}$, operando una ricerca conformazionale mediante la tecnica del 'simulated annealing' (SA). E' stato visto che i conformeri campionati per ogni sistema danno luogo a ricorrenti modalità e

geometrie di coordinazione, ed è stato possibile per ciascun sistema individuare due famiglie strutturali denominate con le lettere A e B; di seguito sono riportati i conformeri a minima energia per ogni famiglia dei quattro addotti simulati (distanze $<2 \text{ \AA}$, ad eccezione dei legami a idrogeno coinvolgenti gruppi funzionali delle nucleobasi, angoli di legame compresi tra $130\text{-}180^\circ$) (Fig.4.11-4.14).

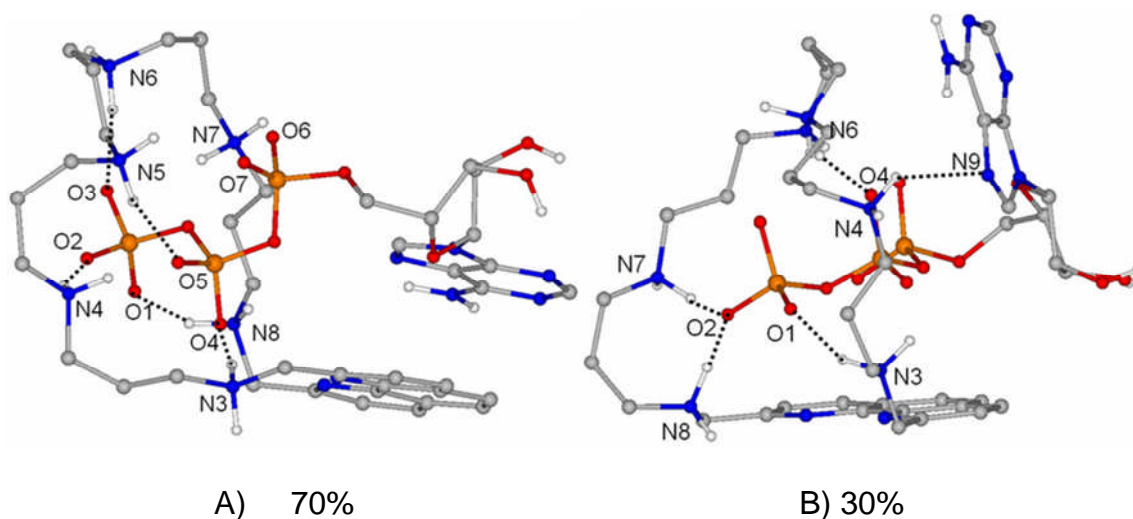


Fig. 4.11– Conformeri a minima energia per le famiglie A e B dell’addotto **L9-ATP**.

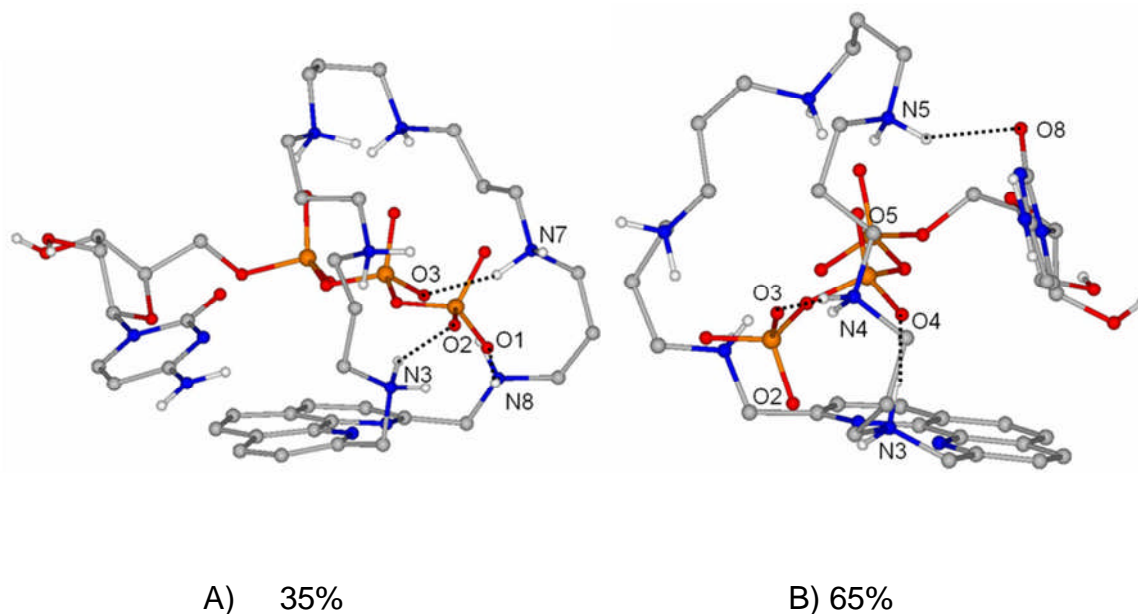


Fig. 4.12– Conformeri a minima energia per le famiglie A e B dell’addotto **L9-CTP**.

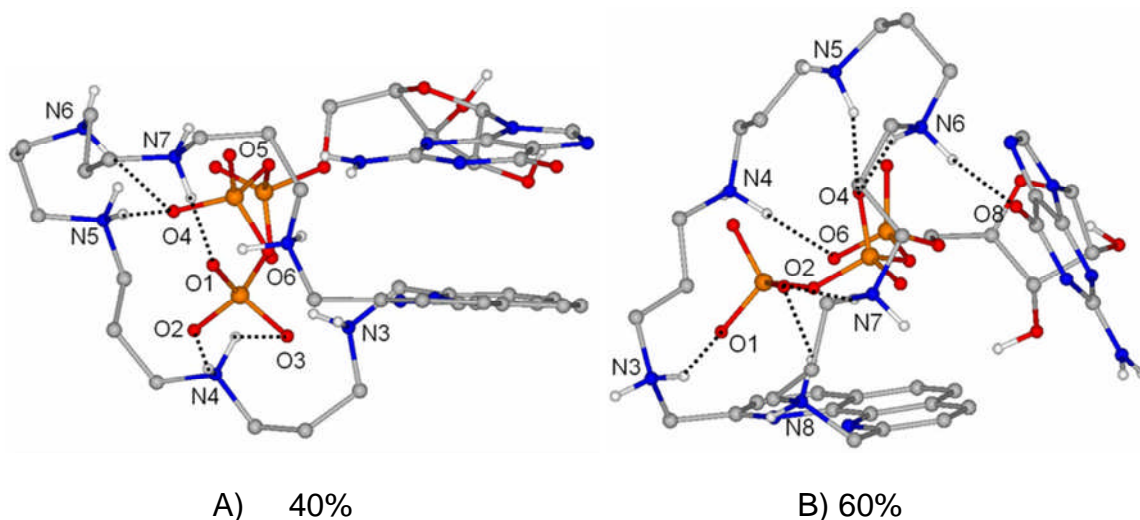


Fig. 4.13– Conformeri a minima energia per le famiglie A e B dell'addotto **L9-GTP**.

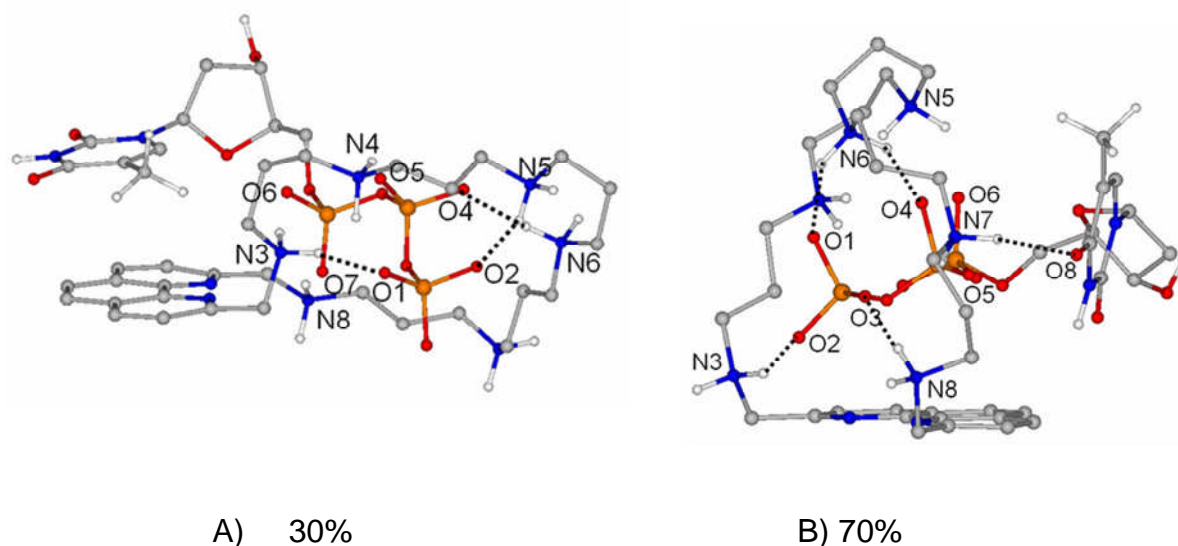


Fig. 4.14– Conformeri a minima energia per le famiglie A e B dell'addotto **L9-TTP**.

E' possibile osservare nelle figure riportate che il recettore tende ad assumere nei complessi una conformazione piegata, con una disposizione pressoché perpendicolare tra il piano contenente l'unità fenantrolinica e il piano medio definito dalla catena poliammonica. In tutti i sistemi si osserva che il gruppo ribosio costituente il nucleotide assume una conformazione 'syn', che permette la simultanea interazione della nucleobase e della catena trifosfato con il recettore: il fosfato γ risulta in questo modo incapsulato nella cavità del recettore e la nucleobase risulta disponibile per un'interazione di π -stacking con l'unità fenantrolinica. La famiglia denominata con A raccoglie per ogni sistema i conformeri che danno interazione di π -stacking tra la nucleobase e

l'unità fenantrolinica del recettore, e risulta la più popolata unicamente per l'addotto con ATP (70%). Come è logico aspettarsi, le nucleobasi più estese (guanina ed adenina) instaurano una più decisa interazione di stacking con l'unità aromatica del recettore (distanza interplanare fenantrolina/base azotata, 3.3-3.4Å), come ben evidenziato dalla disposizione pressochè parallela delle nucleobasi rispetto all'unità fenantrolinica per gli addotti LH₆⁶⁺-ATP e LH₆⁶⁺-GTP (Fig. 4.11 e 4.13). I conformeri a minima energia appartenenti alle famiglie B dei quattro substrati mostrano, in luogo dell'interazione di stacking, un'interazione via legame a idrogeno tra gli atomi di ossigeno carbonilici di CTP, GTP e TTP, denominati come O8, l'atomo di azoto N9 dell'ATP, con un gruppo ammonico del recettore. In particolare, tutti i substrati instaurano legami a idrogeno coinvolgenti gli atomi di azoto in posizione benzilica del legante, denominati come N3 ed N8: l'addotto con ATP presenta però il maggior numero di interazioni via legame a idrogeno; queste interazioni, insieme alla alta percentuale di conformeri che mostrano un'interazione di π-stacking col recettore, possono spiegare la più elevata stabilità dell'addotto **L9**-ATP osservata in soluzione acquosa rispetto agli altri tre sistemi. Nel caso di GTP, si poteva attendere che, possedendo una nucleobase più estesa come adenina, la famiglia più popolata fosse la A. In realtà, la struttura della guanina è piuttosto ingombrata, per la compresenza dei gruppi C=O e -NH₂. A differenza di ATP, nell'addotto di guanina con **L9**, questi due gruppi sono orientati verso la catena alifatica di **L9**. Quindi l'ingombro sterico tra la guanina e la parte alifatica di **L9** giustifica questa scarsa tendenza di GTP a formare addotti con interazioni π-stacking. Nel caso di **L8**, si osservano conformazioni simili a quelle trovate per **L9**, ma in questo caso il maggior numero di conformeri è simile a quelli osservati per le famiglie B. Il risultato è in accordo con i dati ¹H NMR. La differenza è riconducibile alle minori dimensioni di **L8** rispetto a **L9**. Per ottenere maggiori informazioni sulle caratteristiche strutturali degli addotti, si è tentato di ottenere cristalli degli addotti adatti all'analisi attraverso diffrazione a raggi X da soluzioni acquose contenenti i nucleotidi e i recettori in rapporto molare 1:1. Nel caso del sistema TTP-**L9** si sono ottenuti cristalli del composto [(H₆**L9**)₂(TTP)₂·(H₂O)₂]₂Br₄·7H₂O. La struttura cristallina è costituita da un addotto dimerico

$[(H_6L9)_2(TTP)_2(H_2O)_2]^{4+}$, quattro anioni bromuro e sette molecole di acqua di cristallizzazione (Fig. 4.15).

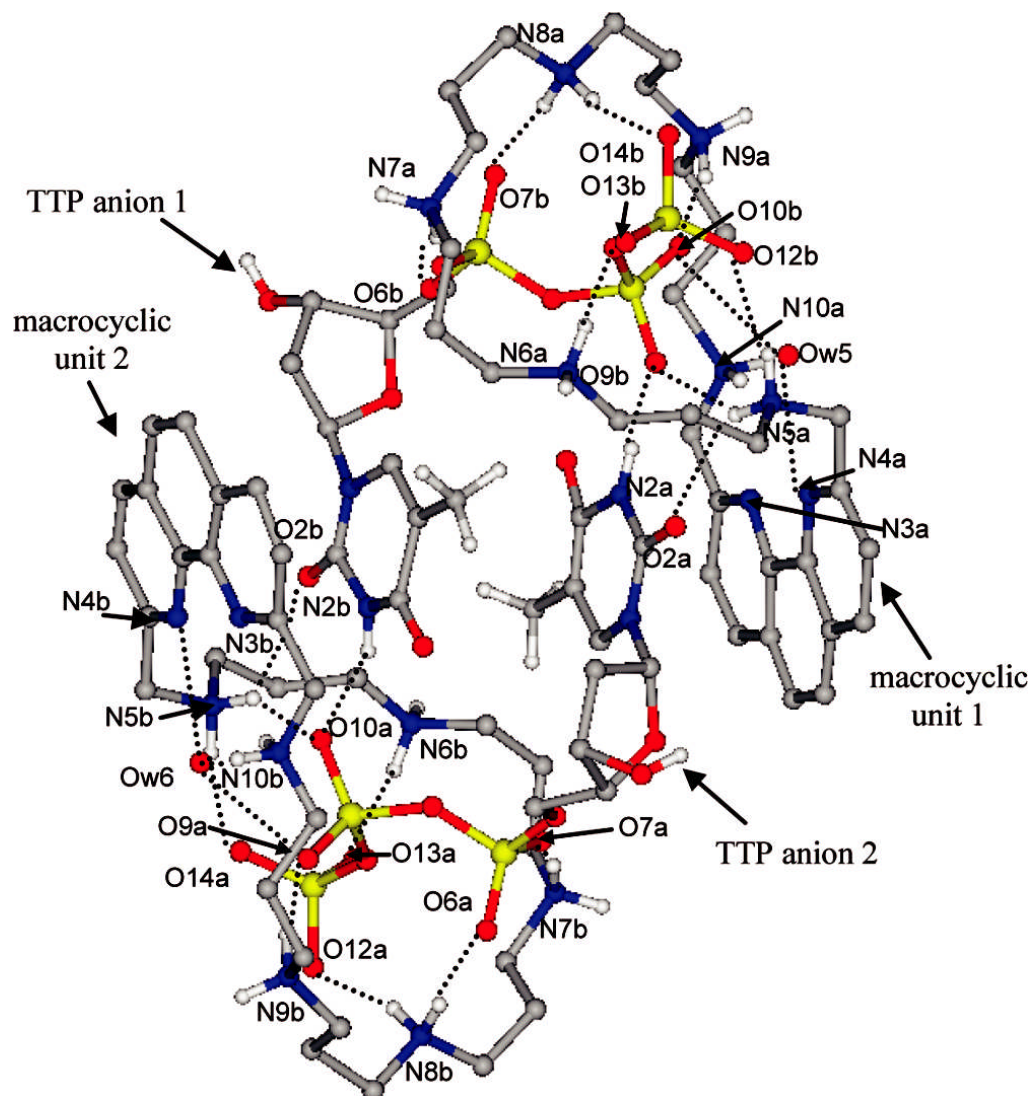


Fig. 4.15- Struttura cristallina del catione $[(H_6L9)_2(TTP)_2(H_2O)_2]^{4+}$.

Tabella 4.5- Distanze dei legami a idrogeno per il catione $[(H_6L9)_2(TTP)_2(H_2O)_2]^{4+}$.

Atomi	Distanza (Å)	Atomi	Distanza (Å)
N2a-O9b	2.75(1)	N5b-O10a	2.69(2)
N2b-O10a	2.76(1)	N5b-O14a	2.75(3)
N6a-O13b	2.63(2)	N6b-O13a	2.70(2)
N9b-O9a	2.78(3)	N10a-Ow5	2.79(3)
N8a-O7b	2.77(2)	N8b-O12a	2.83(3)
N8a-O14b	2.73(2)	N8b-O6a	2.86(2)
N5a-O2a	2.96(1)	N7b-O7a	2.72(3)
N5a-O9b	2.78(2)	N10b-Ow6	2.76(3)
N5a-O12b	2.82(2)	N4a-Ow5	2.89(2)
N7a-O6b	2.72(3)	Ow5-O10b	2.94(2)
N9a-O10b	2.61(3)	N4b-Ow6	2.94(2)
N5b-O2b	3.04(2)	Ow6-O9a	2.87(2)

Il catione $[(H_6L9)_2(TTP)_2(H_2O)_2]^{4+}$, con simmetria di inversione non cristallografica, è formato da due recettori **L9**, due anioni TTP, due molecole di acqua, tenuti insieme da diversi legami a idrogeno e interazioni di natura π -stacking. Ogni recettore assume una conformazione ripiegata attorno all'asse degli atomi di azoto benzilici, come osservato nei conformeri calcolati. I due recettori assumono una disposizione ciclica di tipo testa-coda e definiscono una cavità tridimensionale in cui può essere ospitato il TTP. La catena trifosfato di ogni anione TTP risulta incapsulata nella cavità macrociclica di un recettore protonato dando luogo alla formazione di stretti ponti di idrogeno, mentre la sua base pirimidinica si trova chiusa a sandwich tra una unità fenantrolina dell'altro recettore e un gruppo timidina dell'altro anione TTP. Si ha una disposizione incolonnata di due unità fenantrolina e due unità timidina con interazioni π -stacking con distanze interplanari di 3.3 Å tra i piani di fenantrolina e timidina e di 3.6 Å tra le due unità timidina. Si instaurano anche dei contatti di tipo legame a idrogeno indiretti, mediati da molecole di acqua, tra il P_β di ciascun TTP e gli atomi di azoto della fenantrolina (N4a o N4b) e i singoli gruppi ammonio benzilici (N10a o N19b). Infine i gruppi carbonile della timidina (O2a o O2b) interagiscono via legame a idrogeno con gli atomi di azoto protonati del recettore, mentre ciascun

atomo di azoto della timidina (N2a o N2b) è legato via legame a idrogeno con il fosfato P_{β} di una diversa unità TTP. Le interazioni che si evidenziano in questa struttura cristallografica sono le stesse presenti nei conformeri calcolati. Anche se in letteratura si trovano molti studi riguardanti la complessazione di nucleotidi da parte di recettori poliammonici sintetici, in precedenza è stata riportata solo una struttura cristallina di questo tipo di addotti. ⁹

Per il legante **L10** sono state condotte simulazioni MD in vacuo usando un modello implicito di solvente acqua, e considerando il recettore H_hL^{h+} ($h=3, 4$ e 6). Si è potuto notare che, in dipendenza dalla carica e dalla polarità del solvente, i due macrocicli laterali tendono ad allontanarsi all'aumentare della carica molecolare. Mentre in vacuo, nella forma H_3L^{3+} il recettore si presenta con una forma a calice, nella forma H_6L^{6+} è completamente aperto (Fig. 4.16).

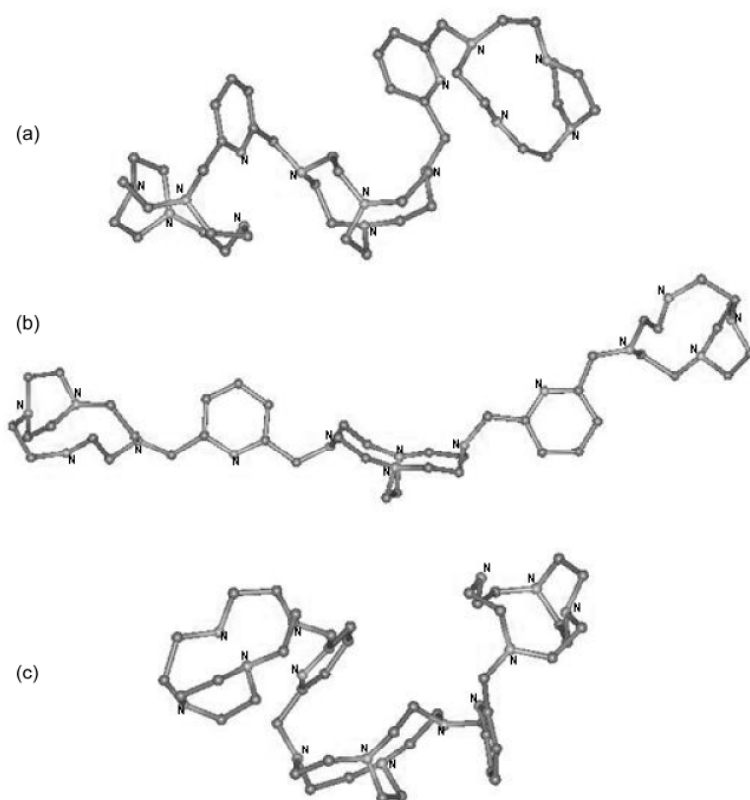


Fig. 4.16- Rappresentazioni delle conformazioni a minima energia del recettore H_3L^{3+} in vacuo (a), di H_6L^{6+} in vacuo (b) e di H_6L^{6+} in un modello implicito di solvente acqua.

Aumentando la polarità del solvente si vede che i due anelli esterni carichi positivamente, si portano vicino al macrociclo centrale, affacciandosi con una

conformazione a calice (Fig. 4.16c). In genere la forma H_3L10^{3+} risulta essere quella più ingombrata, con i siti di legame che puntano verso l'interno della struttura molecolare. Sono state analizzate le interazioni tra le forme minimizzate di energia del recettore con i nucleotidi ATP e ADP. Per la forma H_4L10^{4+} , indipendentemente dal mezzo, si vede che l'anione ADP più piccolo interagisce solo con una interazione di legame a idrogeno tra un atomo di ossigeno del gruppo fosfato P_β e un gruppo NH_2^+ . Nel caso di ATP si ha l'interazione dei due gruppi vicini P_α e P_β (Fig. 4.17). Per la forma H_6L10^{6+} , più aperta, si vede che i protoni acidi del macrobicyclo centrale possono interagire con i guest, dando luogo a interazioni di tipo legame a idrogeno (distanza $NH\cdots O$ minore di 2.0 Å) con gli atomi di ossigeno dei gruppi fosfato di entrambi i nucleotidi. In solvente polare, gli anioni interagiscono via legame a idrogeno con un anello esterno del recettore che si trova a forma di calice (Fig. 4.18b).

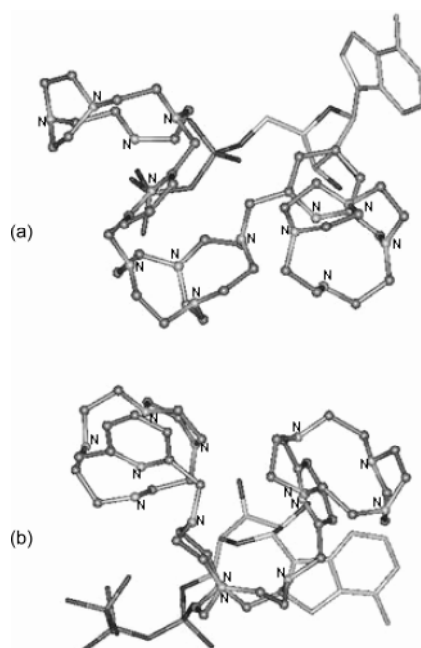


Fig. 4.17- Conformeri a minima energia per i sistemi H_4L10^{4+}/ADP^{3-} (a) e H_4L10^{4+}/ATP^{3-} in un modello implicito di solvente acqua.

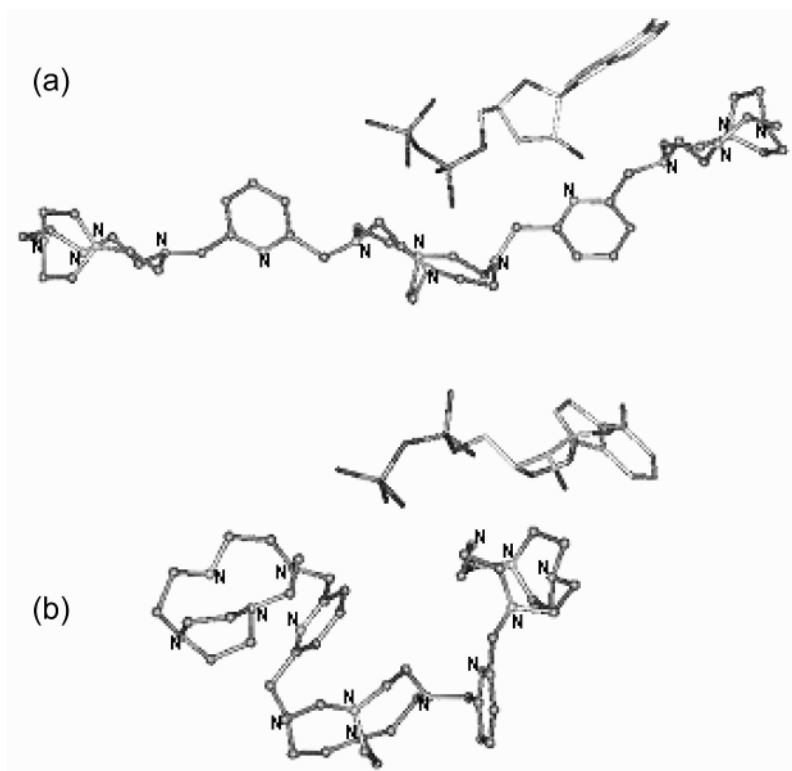


Fig. 4.18- Conformeri a minima energia per i sistemi $H_6L10^{6+}/HADP^{2-}$ in vacuo(a) e $H_6L10^{6+}/HADP^{2-}$ in un modello implicito di solvente acqua.

4.5 L9 come chemosensore fluorescente per ATP

I recettori **L8** e **L9** mostrano una dipendenza dal pH di emissione di fluorescenza di tipo ON-OFF-ON. Sono emissivi solo sotto pH 8. Lo stesso profilo è stato riscontrato per **L8** in presenza di 1 equivalente di tutti i nucleotidi. Al contrario per **L9**, non vi sono differenze in presenza dei nucleotidi tranne ATP, che induce variazioni significative nello spettro di emissione di fluorescenza. In effetti, la fenantrolina in **L9** diventa emissiva in presenza di ATP solo sotto pH 4.5 (Fig. 4.19).

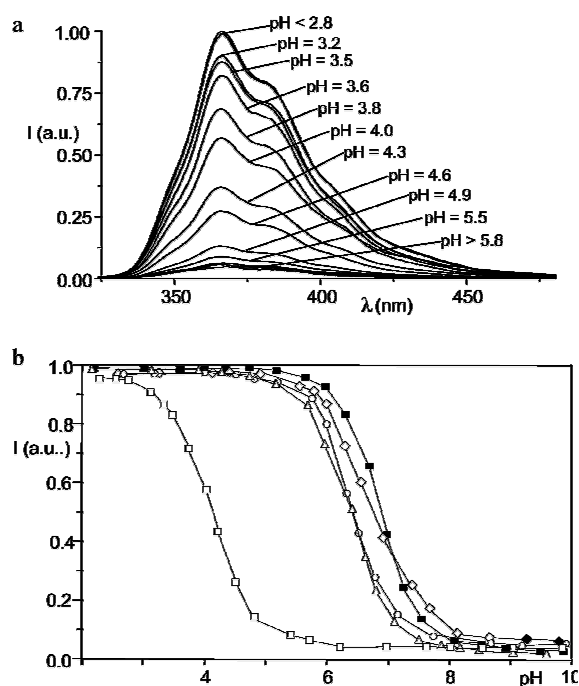


Fig. 4.19- Spettri di emissione di fluorescenza di **L9** a diversi valori di pH (a) e dipendenza dell'emissione in fluorescenza a 366 nm in assenza (■) e in presenza di ATP (□), CTP (Δ), GTP (○), e TTP (◇) (b). ($[L9]=[ATP]=[CTP]=[GTP]=[TTP]=2.5 \cdot 10^{-5}M$).

Quindi **L9** non è solo capace di legare selettivamente ATP rispetto agli altri nucleotidi, ma anche di segnalarne la presenza in un preciso range di pH (4.5-7). In linea di principio il quenching dell'emissione di fluorescenza può avvenire per processo PET coinvolgente o l'adenina o un gruppo amminico non protonato verso l'unità fenantrolina elettrone-ricca. In effetti per questo complesso sono state notate con calcoli MM e misure 1H -NMR, le interazioni π -stacking più forti. Dalle misure 1H -NMR, si vede che per questo complesso si hanno anche le interazioni di tipo carica-carica più forti, tra l'unità trifosfato e la catena poliamminica. Questo può portare a un trasferimento protonico da un gruppo ammonio a un gruppo fosfato; conseguentemente la coppia solitaria sul gruppo amminico è disponibile per il quenching di emissione della fenantrolina. Questo tipo di interazione è più forte a pH debolmente acido; sotto pH 4.5, quando si ha la protonazione del trifosfato si ha la diminuzione della possibilità del trasferimento protonico. Pertanto si può supporre che a valori di pH debolmente acidi, il quenching di emissione di fluorescenza sia guidato da un processo PET coinvolgente una coppia solitaria di un gruppo amminico, che si deprotona a seguito di trasferimento

protonico indotto dalle forti interazioni elettrostatiche presenti in questo campo di pH.

L9 è capace di segnalare la presenza di ATP in modo raziometrico: l'emissione di fluorescenza di **L9** è completamente spenta in presenza di 1 equivalente di ATP, mentre con gli altri nucleotidi si notano solo piccole variazioni di emissione di fluorescenza. Esperimenti competitivi mostrano che la presenza simultanea degli altri nucleotidi non altera sostanzialmente l'effetto operato da ATP.

4.6 Influenza della topologia molecolare nel riconoscimento degli anioni nucleotidi

I macrocicli **L8** e **L9** presentano una estesa unità eteroaromatica, la fenantrolina, inserita nella loro architettura molecolare, mentre **L10** è un tris-macrociclo contenente tre unità cyclen (cyclen=1,4,7,10-tetraazacyclododecano) rinforzato con due ponti 2,6-piridinbis(metilene). Come visto precedentemente i siti di protonazione di questi leganti sono i gruppi amminici delle catene mentre le unità eteroaromatiche non sono coinvolte nella protonazione. I dati potenziometrici e ^{31}P NMR, mostrano il ruolo importante giocato dalle forze elettrostatiche e dai legami a idrogeno nelle interazioni nucleotide-recettore poliammonico. Tutti i leganti nelle loro forme protonate si possono comportare da recettori polifunzionali per anioni nucleotidi. Infatti i gruppi ammoniaci possono dare interazione carica-carica e di legame a idrogeno coi gruppi fosfato P_γ e P_β e contemporaneamente, interazioni carica-dipolo con il sistema π del nucleotide. Dal punto di vista qualitativo le interazioni ATP-legante sono le stesse per tutti i sistemi. Abbiamo però potuto vedere che nonostante **L10** formi addotti 1:1 in un più vasto campo di pH (80% di specie formata a pH10 per il sistema **L10**/ADP) e possa raggiungere, a parità di pH, un grado di protonazione indubbiamente maggiore rispetto a **L8** e **L9**, le interazioni carica-carica e via legame a idrogeno, non sono più forti di quelle di **L8** e **L9**, contrariamente a quello che ci si poteva aspettare. Infatti, i calcoli MD hanno chiarito che questo recettore è sicuramente maggiormente protonabile, ma l'aumento di carica in solvente

acquoso provoca lo spostamento dei due anelli esterni carichi positivamente, che si portano vicino al macrociclo centrale, affacciandosi con una conformazione a calice. In queste condizioni con i siti protonabili di legame che puntano verso l'interno della struttura molecolare, risulta più difficoltosa l'interazione via legame a idrogeno con gli anioni nucleotidi. Meno sorprendente, la presenza di più deboli interazioni via π -stacking tra i substrati e **L10**. L'unità piridina di ridotte dimensioni rispetto alla fenantrolina, interagisce con le nucleobasi più debolmente rispetto a **L8** e **L9**. Pertanto i due recettori **L8** e **L9** risultano più preorganizzati rispetto a **L10** e, in particolare, **L9** risulta anche un ottimo chemosensore per ATP in soluzione acquosa.

4.7 Proprietà di complessazione dello Zn(II) da parte di **L11**

Poiché la coordinazione dello ione Zn(II) da parte di un legante macrociclico può guidare la successiva interazione con substrati biologici e causarne il cleavage idrolitico (es. nel caso di DNA), sono state studiate le proprietà di complessazione dello ione Zn(II) da parte di **L11** in soluzione acquosa per via potenziometrica (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K). I risultati sono riportati in Tabella 4.5.

Tabella 4.5- Costanti di formazione dei complessi di Zn(II) con **L11** determinate in soluzione acquosa (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K)

Equilibrio	logK
$\mathbf{L11} + \text{Zn}^{2+} = [\text{ZnL11}]^{2+}$	12.11(4)
$[\text{ZnL11}]^{2+} + \text{H}^+ = [\text{ZnHL11}]^{3+}$	7.10(2)
$[\text{ZnHL11}]^{3+} + \text{H}^+ = [\text{ZnH}_2\mathbf{L11}]^{4+}$	5.22(3)
$[\text{ZnL11}]^{2+} + \text{OH}^- = [\text{ZnL11}(\text{OH})]^+$	3.05(5)
$[\text{ZnL11}]^{2+} + \text{Zn}^{2+} = [\text{Zn}_2\mathbf{L11}]^{4+}$	4.71(7)
$[\text{Zn}_2\mathbf{L11}]^{4+} + \text{OH}^- = [\text{Zn}_2\mathbf{L11}(\text{OH})]^{3+}$	5.88(7)
$[\text{Zn}_2\mathbf{L11}(\text{OH})]^{3+} + \text{OH}^- = [\text{Zn}_2\mathbf{L11}(\text{OH})_2]^{2+}$	5.19(7)

Dai dati riportati in Tabella 4.5 si può osservare che il legante forma sia specie mononucleari che binucleari. Come si può notare, il complesso mononucleare $[\text{ZnL}]^{2+}$ dà luogo a due specie protonate con costanti di protonazione che fanno presupporre la presenza di atomi d'azoto non coinvolti o poco coinvolti nella complessazione e quindi ulteriormente disponibili per la coordinazione di un ulteriore ione Zn (II).

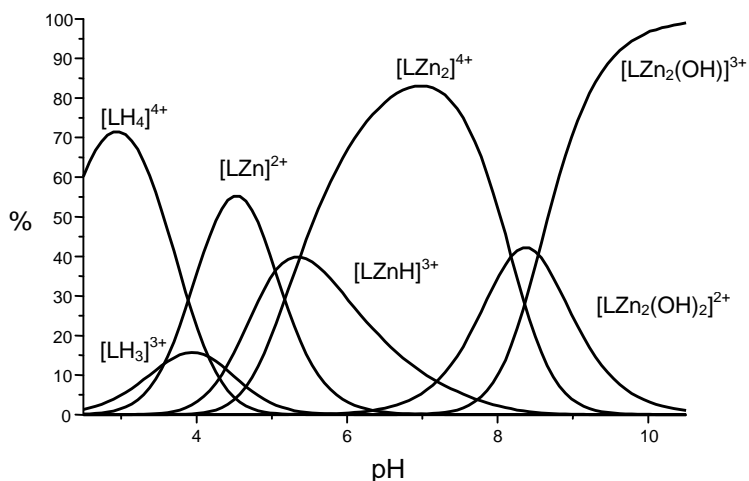


Fig. 4.20- Diagramma di distribuzione delle specie formate da Zn(II) e **L11** in rapporto molare 2:1 ($[\text{L11}] = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, in NMe_4Cl 0.1 M, 298.1 K).

In Fig. 4.20 è riportato il diagramma di distribuzione delle specie formate dal legante in presenza di 2 equivalenti di di Zn(II). Si può osservare che si ha la formazione del complesso $[\text{Zn}_2\text{L11}]^{2+}$ a pH debolmente acido, mentre a partire da pH debolmente alcalino si ha la formazione di specie mono e diidrossilate. Le proprietà di coordinazione sono state studiate anche mediante misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche. E' noto che il biperidile è caratterizzato da una banda di assorbimento a circa 290 nm, che subisce uno shift a circa 310 nm in seguito alla coordinazione dello ione metallico. La formazione di questa banda può essere utilizzata per seguire la formazione del complesso in soluzione.

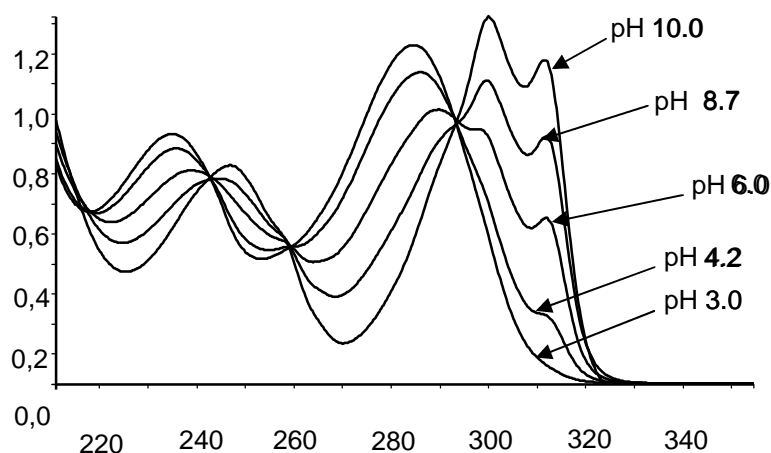


Fig. 4.21- Spettri di assorbimento UV di **L11** ($[L11] = 1 \cdot 10^{-3}$ M) in presenza di 2 equivalenti di Zn(II) a vari valori di pH a 298.1K.

La banda a circa 310 nm si forma per pH maggiori di 4, indicando la coordinazione dello ione Zn^{2+} da parte dell'unità biperidile. Questi risultati sono in buon accordo con quelli ottenuti dalle misure potenziometriche. In modo analogo, la coordinazione di Zn(II) al biperidile dà luogo ad una banda di emissione di fluorescenza a circa 330 nm. La banda di emissione inizia a formarsi a pH debolmente acidi dove ha inizio la formazione del complesso, dopodiché l'intensità di emissione di fluorescenza aumenta fino a pH 8, dove il complesso di nucleare di Zn(II) è completamente formato in soluzione. Per $pH >$ di 8 la banda non subisce variazioni rilevanti.

4.8 Coordinazione di metaboliti da parte dei complessi di Zn(II) con L11

Vista la particolare formazione del complesso dinucleare di Zn(II) da parte di **L11**, abbiamo analizzato le sue proprietà coordinative nei confronti di alcuni metaboliti molto rilevanti dal punto di vista biologico contenenti l'unità immidica: l'Uridina (U), l'Uridilil(3'→5')uridina (UpU), 3'-azido-3'-deossitimidina (AZT), 5-Fluoro-Uracile (5FU) e la Riboflavina (R) (Fig. 4.23).

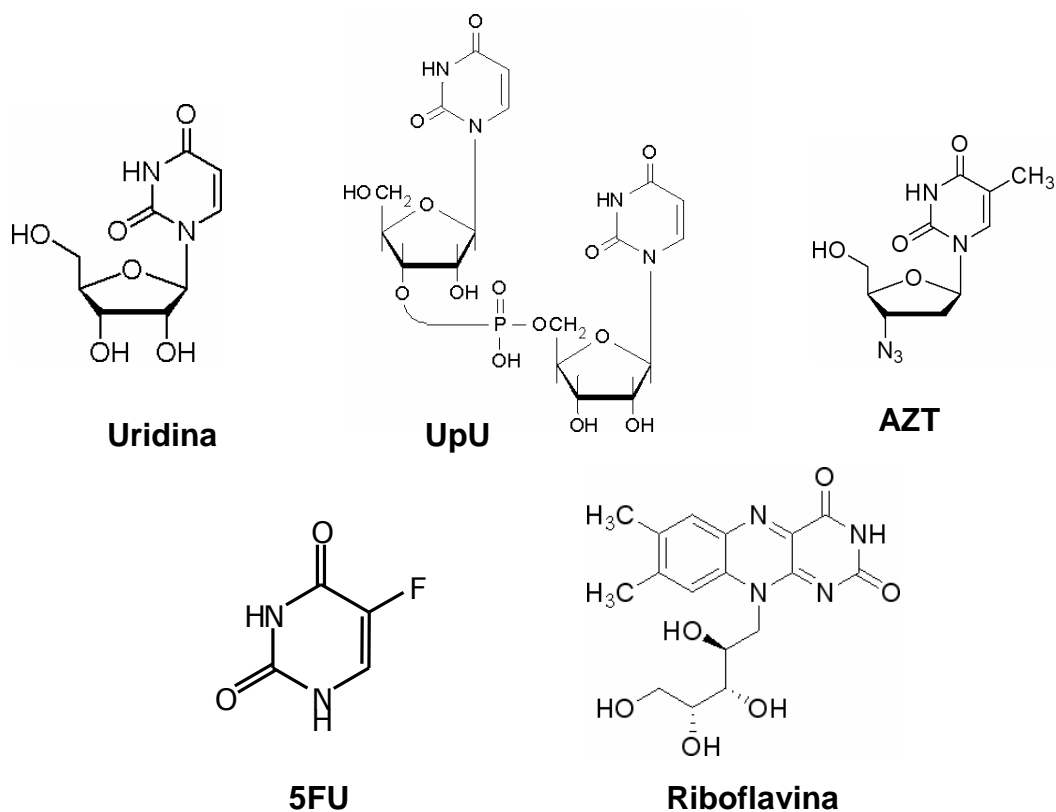
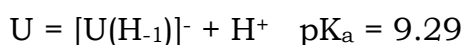
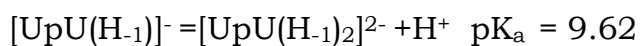
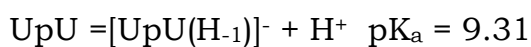


Fig 4.23- Rappresentazione dei substrati Uridina, UpU, AZT, 5FU, Riboflavina.

L'uridina presenta in soluzione acquosa un solo equilibrio acido-base, relativo alla deprotonazione dell'unità immidica della funzione uracile:



L'UpU presenta invece due equilibri acido-base, vista la presenza di due unità uracile nella molecola:



Uridina e UpU presentano spettri di assorbimento UV simili, con una singola banda di assorbimento compresa tra 230 e 280 nm, con un massimo a 257 nm, come si nota in Fig. 4.24.

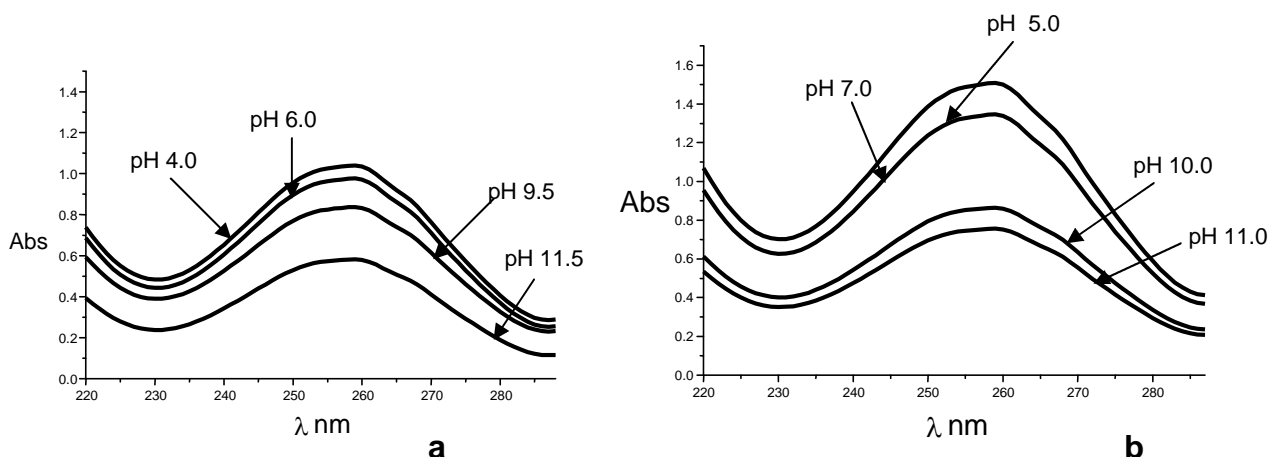


Fig. 4.24- Spettri di assorbimento di uridina ($[U] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) (a) e di UpU ($[UpU] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) (b) a diversi valori di pH.

La deprotonazione delle unità uracile porta ad una diminuzione della banda di assorbimento a 257 nm (Fig. 4.24). In pratica tale diminuzione di assorbimento è dovuta alla presenza in soluzione delle specie $[U(H_{-1})]^{-}$ o $[UpU(H_{-1})_2]^{2-}$. I due substrati non danno luogo ad emissione di fluorescenza sia nelle loro forme neutre che deprotonate.

La deprotonazione dell'unità uracile porta ad una variazione negli spettri ^1H NMR dei substrati. In particolare nel caso dell'uridina si osservano shift upfield per i segnali dei protoni 5 e 6 dell'unità uracile e per il protone dell'unità ribosio 1' (Fig. 4.25). Upfield shift analoghi sono osservabili per i segnali dei protoni dell'unità uracile dell'UpU.

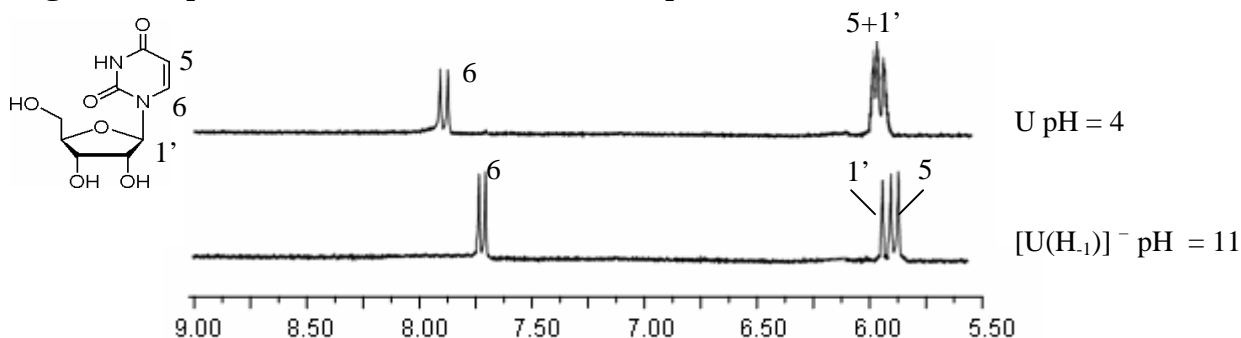
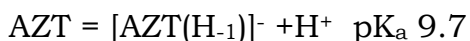


Fig. 4.25- Spettri ^1H -NMR di Uridina (U) protonata (pH=4) e deprotonata (pH=11) in D_2O a 298.1K.

L'AZT presenta in soluzione acquosa un solo equilibrio acido-base, anche in questo caso dovuto alla deprotonazione dell'unità uracile:



Lo spettro UV è caratterizzato da una singola banda tra 230 e 295 nm, con un massimo a 266 nm e l'assorbanza dello spettro diminuisce passando da pH acidi a pH alcalini in seguito al processo di deprotonazione dell'unità immidica dell'uracile (Fig. 4.26).

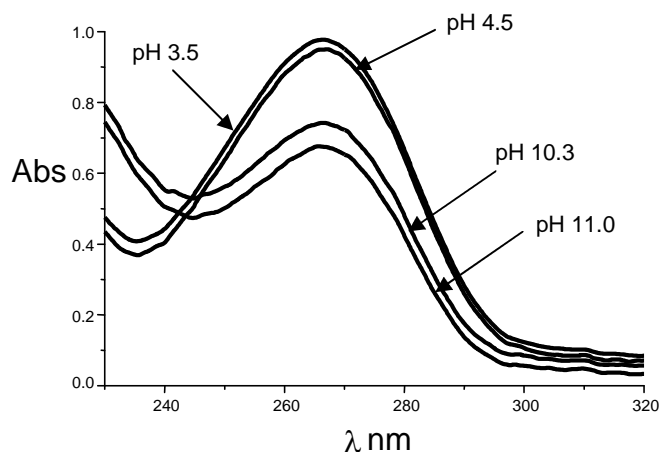


Fig. 4.26 Spettri di assorbimento di AZT ($[AZT] = 7.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) a diversi valori di pH.

AZT non è caratterizzato da emissione di fluorescenza. Anche lo spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'AZT (Fig. 4.27) risulta modificato a seguito del processo di deprotonazione. Si può notare che i due segnali subiscono un upfield shift passando da pH acidi (AZT protonato) a pH alcalini (AZT deprotonato). Come nel caso dell'Uridina e del'UpU, la deprotonazione del gruppo immidico dell'unità uracile dell'AZT porta ad uno upfield shift del segnale in posizione 2 e del protone 1' dell'unità zuccherina.

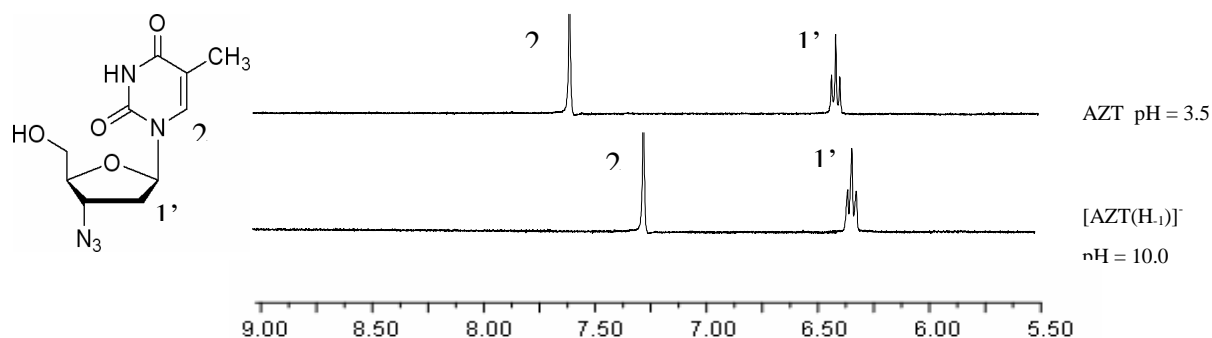
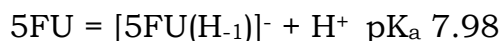


Fig. 4.27- Spettri $^1\text{H-NMR}$ di AZT protonato (pH=3.5) e deprotonato (pH=10) a 298.1K in D_2O .

Anche il 5-fluoro-Uracile presenta in soluzione acquosa un unico equilibrio acido-base:



È da notare che il valore di pK_a di questo substrato è decisamente più basso rispetto a quelli misurati per U, UpU e AZT, a causa della presenza dell'atomo di fluoro, fortemente elettrone-attrattore, che aumenta l'acidità della funzione imidica del substrato stesso.

La deprotonazione del gruppo uracile porta a delle variazioni delle caratteristiche UV-Vis. In particolare, come si può osservare dalla Fig. 4.28, l'assorbimento a 265 nm diminuisce con la deprotonazione del 5FU. Accanto a questo si può anche osservare come a pH 10 vi sia la comparsa di una spalla a circa 300 nm.

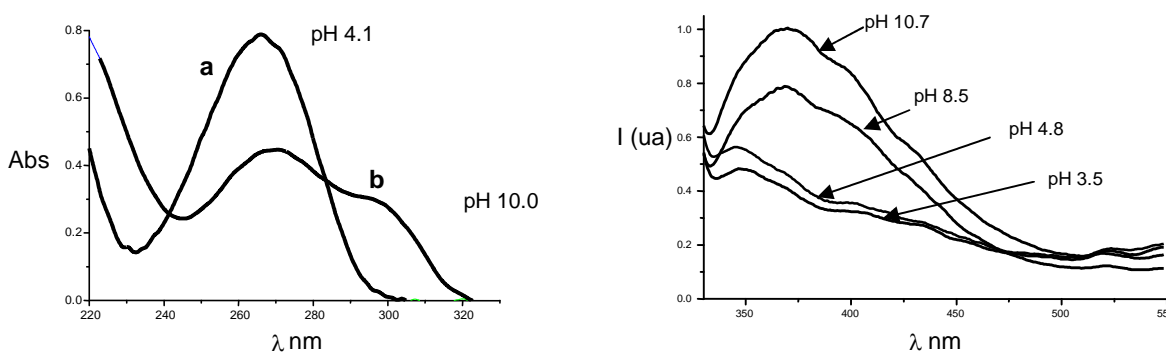


Fig. 4.28- Spettri di assorbimento UV di 5FU ($[5FU] = 2 \cdot 10^{-4} M$) a pH 4.1 e pH 10 e spettri di emissione di fluorescenza ($[5FU] = 4 \cdot 10^{-5} M$) a vari valori di pH.

A differenza degli altri substrati il 5FU è caratterizzato da una debole emissione di fluorescenza, anche essa dipendente dal pH. In particolare la deprotonazione del substrato porta alla formazione di una banda di emissione a circa 370 nm. (Fig. 4.28).

Infine, in Fig. 4.29 si possono notare gli spettri 1H -NMR del 5FU nella sua forma protonata (pH 3.6) e deprotonata (pH 11). Si può notare come, anche in questo caso, la deprotonazione del substrato porti ad uno upfield shift dell'unico segnale del 5FU, passando da pH acidi (5FU protonato) a pH alcalini (5FU deprotonato).

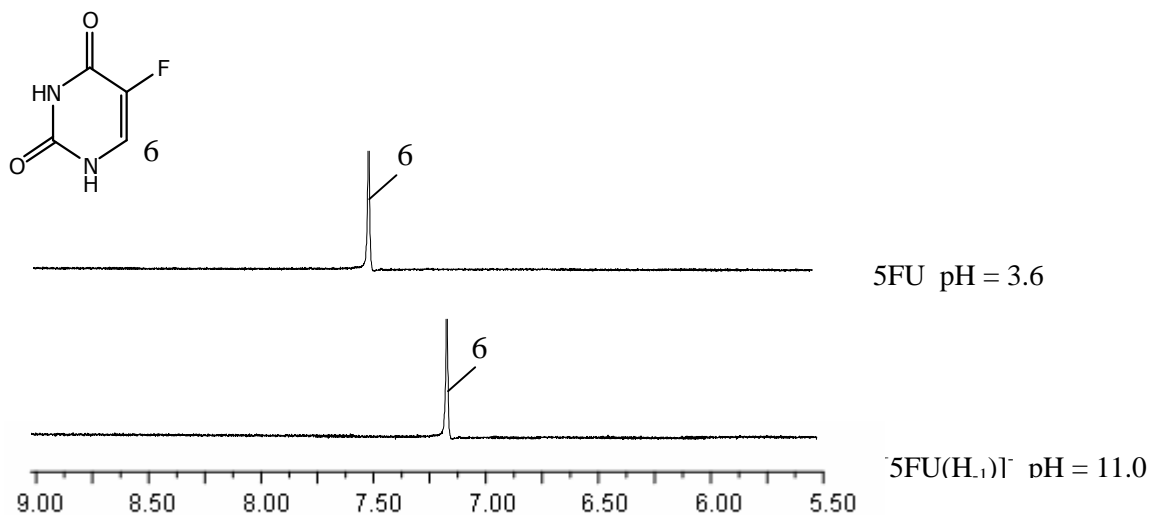


Fig. 4.29- Spettri $^1\text{H-NMR}$ di 5FU (pH = 3.6) e $[\text{5FU(H-1)}]^-$ (pH = 11.0) a 298.1K in D_2O .

La riboflavina presenta in soluzione acquosa tre specie stabili in equilibrio tra di loro al variare del pH (Fig. 4.30)

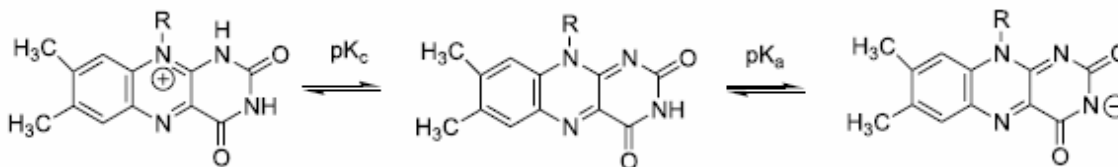
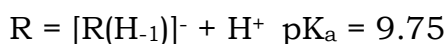


Fig. 4.30- Equilibri di protonazione in soluzione acquosa della riboflavina.

- A pH molto acidi (pH < di 0.4) è dominante la forma cationica RH^+ .
- Nel range $0.4 < \text{pH} < 9.75$ è dominante la forma neutra R.
- A pH > 9.75 è dominante la forma monoanionica $[\text{R(H-1)}]^-$ contenente un gruppo immidico deprotonato.

L'equilibrio relativo alla deprotonazione del gruppo immidico è caratterizzato da un valore di pK_a pari a:



Per quanto riguarda l'assorbimento UV-Vis la riboflavina presenta due bande di assorbimento con massimi centrati a circa tra 360 e 440 nm (Fig. 4.31).

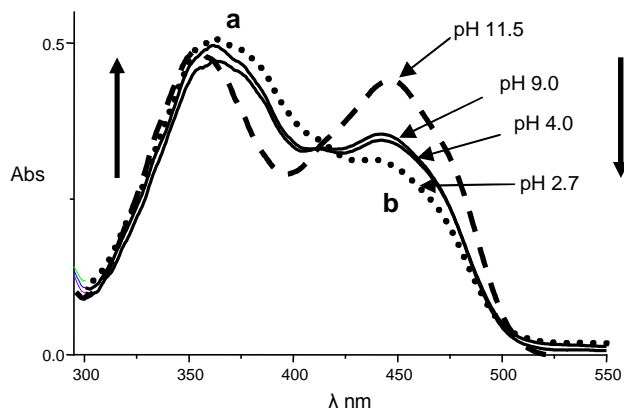


Fig. 4.31- Spettri di assorbimento della Riboflavina ($[R] 5 \cdot 10^{-5} M$) a vari valori di pH.

Osservando lo spettro si può notare come la banda a 360 nm non risenta molto del pH e subisca solo un leggero aumento al diminuire del pH (a). Viceversa, l'assorbimento a 440 nm diminuisce in modo sensibile al diminuire del pH per effetto della formazione della specie neutra R.

La riboflavina, infine, presenta un'emissione di fluorescenza (una banda singola a 515 nm) che risulta essere fortemente pH-dipendente, con un massimo di intensità di emissione tra pH 9 e 10 come è ben evidenziato in Fig. 4.32.

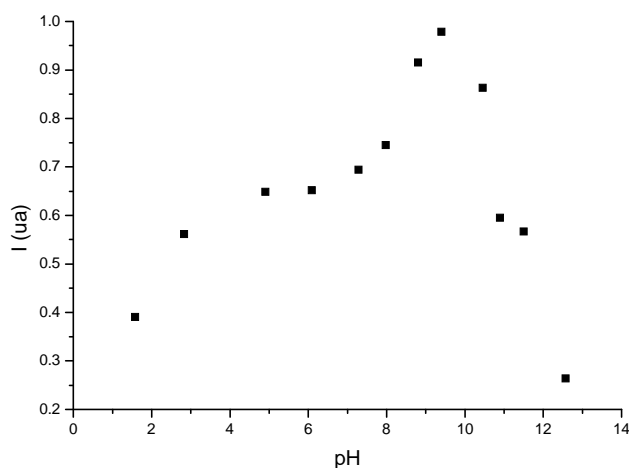
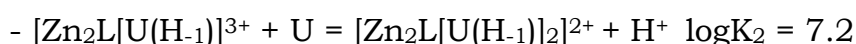
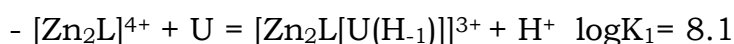


Fig. 4.32- Emissione di fluorescenza della riboflavina ($[R] 1 \cdot 10^{-6} M$) a diversi valori di pH.

Il complesso dinucleare di zinco contiene due ioni Zn(II) a distanza ravvicinata con una sfera di coordinazione non saturata dagli atomi donatori del legante. Ciò fa sì che il complesso sia un potenziale recettore per altre specie chimiche che possono coordinarsi agli ioni metallici.

Il complesso $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$ presenta una notevole tendenza a coordinare l'uridina. Attraverso misure potenziometriche è stato possibile evidenziare come il complesso coordini una prima unità di uridina già a pH acidi. Il processo è accompagnato dal rilascio di un protone acido e porta alla formazione di una specie contenente un'unità uridina deprotonata $[\text{Zn}_2\text{L}[\text{U}(\text{H}_{-1})]]^{3+}$. Questo processo è seguito dalla deprotonazione e coordinazione di una seconda unità di uridina a pH debolmente acido (circa 6) con la formazione di una specie $[\text{Zn}_2\text{L}[\text{U}(\text{H}_{-1})_2]]^{2+}$ contenente due unità uridina deprotonate come si può osservare dal diagramma di distribuzione delle specie di Fig. 4.33.

Le costanti di addizione delle due unità uridina sono riportate di seguito:



La costante complessiva per l'aggiunta di due unità uridina

($\text{Zn}_2\text{L} + 2\text{U} = [\text{Zn}_2\text{L}[\text{U}(\text{H}_{-1})_2]]^{2+} + 2\text{H}^+$) è pari a 15.3 unità logaritmiche.

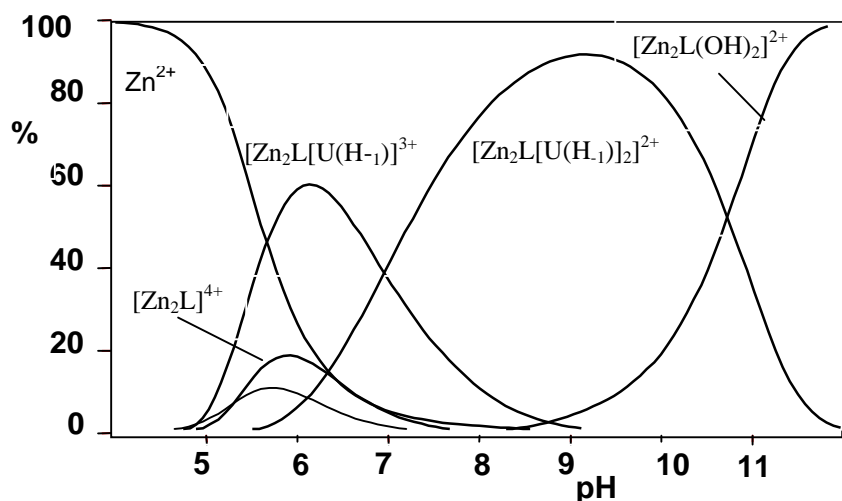
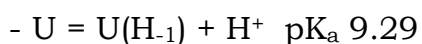


Fig. 4.33- Diagramma di distribuzione del sistema Zn_2L -uridina contenente $[\text{Zn}_2\text{L11}]^{4+}$ e uridina in rapporto molare 1:2. ($[\text{Zn}_2\text{L11}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\text{NMe}_4\text{Cl} 0.1 \text{ M}$, 298.1 K).

Si può osservare, confrontando i valori delle costanti di protonazione del substrato e quelle del substrato legato al complesso una diminuzione dei valori di pK_a per la deprotonazione dell'unità uracile.



Ciò è in accordo con un processo di coordinazione che è “assistito” dallo ione metallico. In altre parole lo ione metallico facilita la deprotonazione dell'unità uracile grazie al processo di coordinazione allo ione.

La deprotonazione dell'unità uracile in seguito alla coordinazione al centro metallico è confermata dagli spettri 1H NMR registrati a diversi valori di pH su soluzioni contenenti il complesso e l'uridina in rapporto 1:2. Infatti la deprotonazione dell'unità uracile libera porta ad un upfield shift dei segnali dei protoni 5 e 6 dell'uracile e del protone 1' dell'unità ribosio. Nell'uridina libera ciò si osserva solo a pH molto alcalini ($pH > 9$). (Fig 4.34b). In presenza del complesso di Zn(II) questo shift è già osservabile a partire da pH 6, a causa della deprotonazione dell'uracile in seguito alla coordinazione allo ione metallico. (Figura 4.34 e-h).

La Fig. 4.34 mostra anche, accanto agli upfield shift dei segnali dell'uracile, un upfield shift dei segnali del bipyridile del complesso, sempre a partire da pH 6. Ciò è probabilmente dovuto a delle interazioni di π -stacking tra l'uracile e il dipiridile. Si può osservare anche che i segnali del sistema subiscono, a pH molto alcalini, un downfield shift dando luogo allo spettro del complesso registrato in assenza del substrato a pH molto alcalini (Fig. 4.34 i). Ciò è dovuto alla decomposizione dell'addotto con l'uridina con formazione della specie $[Zn_2L11(OH)_2]^{2+}$. La coordinazione degli ioni OH^- , infatti porta al distacco dell'uridina dai centri metallici, come evidenziato dal diagramma di distribuzione delle specie riportato in Fig. 4.33.

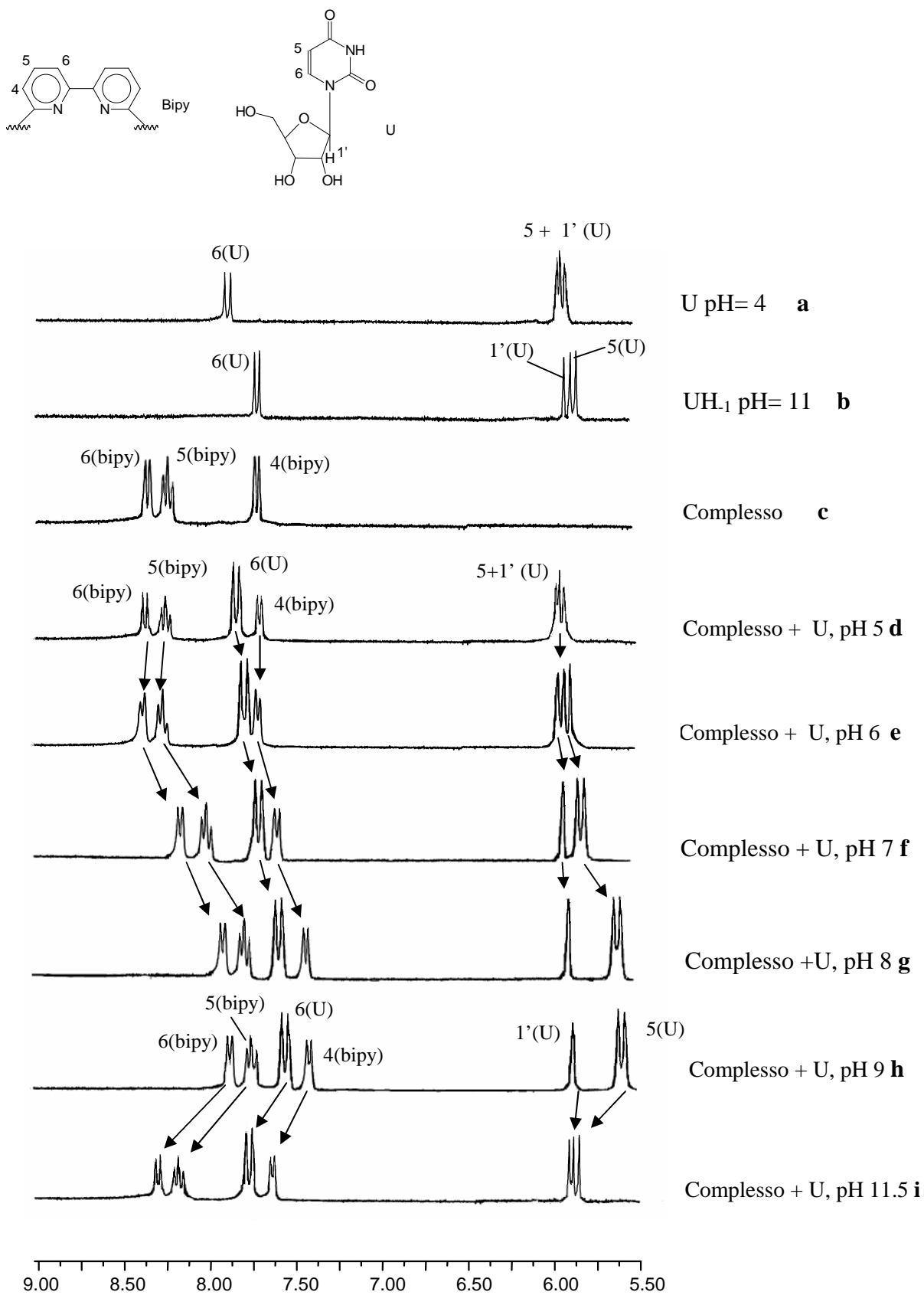


Fig. 4.34- Spettri ¹H NMR dell'uridina (a,b), del complesso (c) e del sistema Zn₂L-uridina in rapporto molare 1:2 (d-i) ([Zn₂L] = 1·10⁻³ M) a vari valori di pH a 25°C in soluzione di D₂O.

In Fig. 4.35 è riportato lo spettro UV del sistema $[Zn_2L]^{2+}$ -Uridina. Si può osservare come a pH 2.5 lo spettro di assorbimento di Zn_2L -uridina presenti una banda a 260 nm (a) simile a quella dell'uridina non protonata (Fig. 4.24). La banda dell'unità dipiridile a 290 nm (non coordinata allo ione metallico) risulta coperta dalla banda di assorbimento dell'uridina. Infatti a pH acidi non essendosi formato il complesso non si ha alcuna interazione col substrato. A pH 8 la formazione del complesso binucleare di Zn(II) porta alla deprotonazione e coordinazione dell'uridina. Ciò comporta una netta diminuzione della banda di assorbimento del substrato (b) che avviene a valori di pH inferiori rispetto all'uridina da sola. Oltre a questo si può osservare la formazione di un'ulteriore banda a 315 nm, tipica dell'unità bipiridile coordinata allo ione Zn(II).

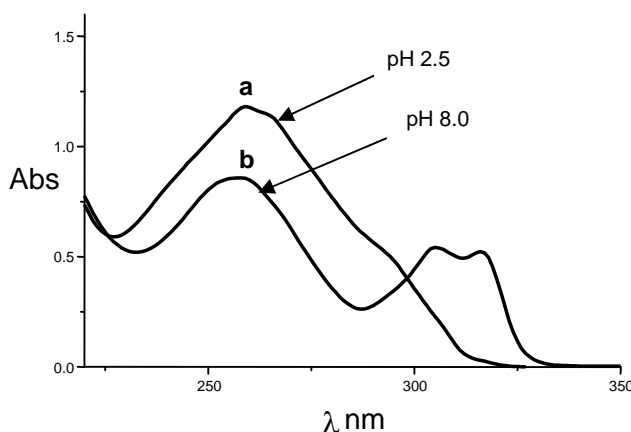


Fig. 4.35- Spettri di assorbimento di Zn_2L11 -uridina in rapporto molare 1:2 ($[Zn_2L11]^{4+} = 2.5 \cdot 10^{-5} M$) a pH 2.5 e pH 8.

La coordinazione dell'uridina porta a notevoli cambiamenti nello spettro di emissione del complesso di Zn(II), con la formazione di una nuova banda a circa 440 nm. (Fig.4.36). Si può osservare come la formazione dell'addotto porti ad una diminuzione dell'emissione di fluorescenza della banda a 330 nm del complesso ed al contempo alla formazione di una nuova banda di emissione non strutturata a lunghezze d'onda più elevate (440 nm). Questa banda di emissione è diagnostica per la formazione di un ecciplesso e si può attribuire ad un'interazione di π -stacking allo stato eccitato, che coinvolge l'unità aromatica del bipiridile del complesso e l'unità eteroaromatica del

substrato. Inoltre tale banda di emissione è strettamente dipendente dal pH; infatti l'intensità di emissione a 440 nm aumenta all'aumentare della formazione dell'addotto fino a pH 9 e poi inizia a diminuire.

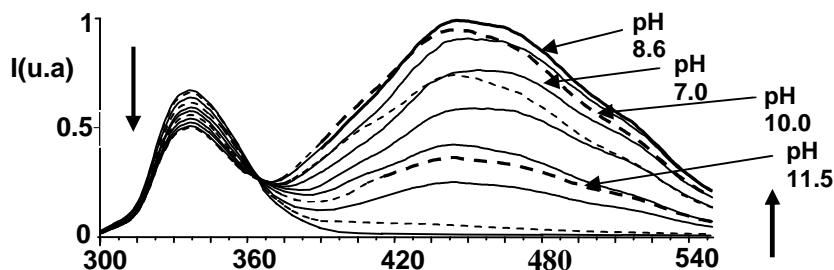


Fig.4.36- Spettri di fluorescenza del sistema $[Zn_2L11]$ -uridina in rapporto molare 1:2 ($[Zn_2L11]^{4+} = 2.5 \cdot 10^{-5} M$, $\lambda_{exc} 290 nm$, 298.1K).

Ciò avviene perchè a pH maggiori di 9 si ha la decomposizione dell'addotto con l'uridina con la formazione della specie $[Zn_2L11(OH)_2]^{2+}$. La coordinazione degli ioni OH^- , infatti porta al distacco dell'uridina dai centri metallici del complesso provocando quindi la decomposizione del complesso stesso e il conseguente spegnimento dell'emissione di fluorescenza. In Fig. 4.37 è stato riportata l'emissione del complesso $[Zn_2L]^{4+}$ con l'uridina in rapporto molare 1:2, sovrapposto al diagramma di distribuzione delle specie. È evidente come l'emissione d'ecplesso sia dovuta alla formazione della specie $[Zn_2L[(UH_1)_2]^{2+}$, che contiene due unità uridina coordinate, mentre la specie $[Zn_2L[(UH_1)]^{3+}$ non dà emissione di ecplesso. Ciò suggerisce che la formazione dell'ecplesso sia dovuta alla presenza di 3 unità eteroaromatiche (il dipiridile e 2 unità uridina) a distanza ravvicinata l'una all'altra.

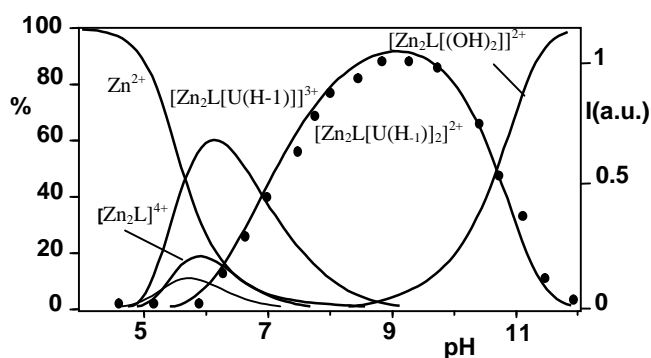


Fig.4.37- Intensità di emissione a 440 nm (asse y a destra) in funzione del pH confrontato col diagramma di distribuzione di $[Zn_2L]^{2+}$ -uridina (1:2) ($[Zn_2L] 2.5 \cdot 10^{-5} M$, $\lambda_{exc} 290 nm$, 298.1K).

È stato inoltre analizzato l'andamento dell'intensità d'emissione a 440 nm dell'addotto per aggiunte successive di Uridina a una soluzione del complesso a pH 9 (Fig. 4.38 a). Si osserva un aumento lineare dell'emissione a 440 nm fino ad un rapporto molare $U/[Zn_2L]^{4+}$ pari a due (Fig. 4.38b). Ciò conferma la formazione di un addotto stabile in rapporto stechiometrico 1:2 già evidenziato dalle misure potenziometriche. Accanto a questo, è importante notare come il complesso risponda in maniera "raziometrica" alla presenza di substrato, cioè con un'emissione di ecciplesso che aumenta proporzionalmente alla concentrazione dell'uridina, condizione necessaria per la realizzazione di un chemosensore capace di quantificare la concentrazione di un analita in soluzione.

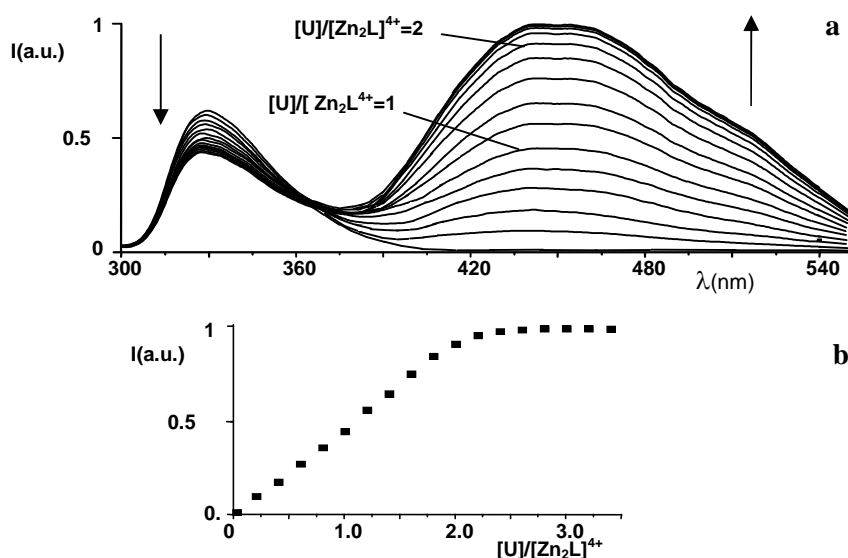


Fig. 4.38- Spettri di fluorescenza di Zn_2L11 -uridina per aggiunte successive di Uridina a pH=9 (a) e andamento dell'emissione di fluorescenza a 440 nm in funzione del rapporto $[U]/[Zn_2L11]^{4+}$ (b).

Il complesso binucleare di Zn(II) presenta una notevole tendenza anche alla coordinazione dell'UpU. Attraverso misure potenziometriche è stato possibile evidenziare come il complesso coordini un'unità di UpU a pH debolmente acidi. Il processo è accompagnato dal rilascio di un protone acido e porta alla formazione di una specie contenente un'unità UpU deprotonata $[Zn_2L[UpU(H-1)]]^{3+}$. Questo processo è seguito dall'ulteriore rilascio di un protone acido a pH debolmente alcalino (circa 8) con la formazione di una specie

$[Zn_2L[UpU(H_2)]]^{2+}$ contenente le due unità uracile dell'UpU deprotonate come si può osservare dal diagramma di distribuzione delle specie in Fig. 4.39.

La costante di addizione dell'unità UpU al complesso è:

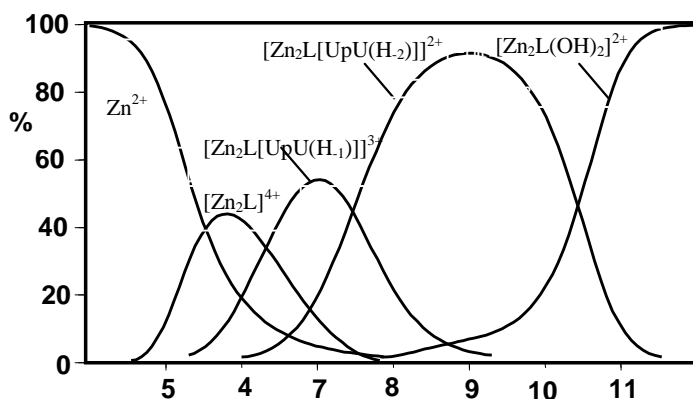
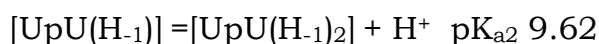
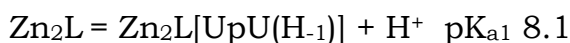
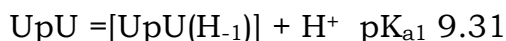


Fig.4.39- Diagramma di distribuzione per sistema $[Zn_2L]-UpU$ in rapporto molare 1:1 ($[Zn_2L]^{4+} = 2.5 \cdot 10^{-5} M$) a 298.1K).

Si può osservare, confrontando i valori delle due costanti di protonazione del substrato e quelle del substrato legato al complesso una diminuzione dei valori di pK_a corrispondenti:



In presenza del complesso di Zn(II) la deprotonazione del substrato avviene a pH più bassi rispetto all'UpU libero, a conferma che il processo di deprotonazione è "assistito" dagli ioni metallici, come già osservato per l'Uridina.

Lo spettro UV del sistema $[Zn_2L]-UpU$ presenta caratteristiche simili a quello del sistema $[Zn_2L]$ -uridina com'è logico aspettarsi per il fatto che i due sistemi presentano analoghi gruppi coordinativi.

Come nel caso dell'uridina, gli spettri di fluorescenza registrati a diversi valori di pH su soluzioni contenenti il complesso e l'UpU in rapporto molare 1:1, mostrano come la formazione dell'addotto tra il complesso e l'UpU, in

analogia con quanto visto per l'Uridina, porti ad una diminuzione dell'emissione di fluorescenza della banda a 330 nm del complesso e, al contempo, alla formazione di una nuova banda di emissione non strutturata spostata a lunghezze d'onda maggiori (445 nm). Questa banda di emissione è dovuta, anche in questo caso, alla formazione di un ecciplesso attribuibile ad un'interazione di π -stacking allo stato eccitato, che coinvolge l'unità aromatica del bipyridile del complesso e l'unità eteroaromatica dell' UpU legata agli ioni Zn(II). Tale banda di emissione è strettamente dipendente dal pH infatti l'intensità di emissione a 445 nm aumenta all'aumentare del pH fino a pH 8.8 per poi diminuire a pH maggiori, dove si ha la decomposizione dell'addotto con l'UpU con la formazione della specie $[Zn_2L(OH)_2]^{2+}$ (Fig. 4.40).

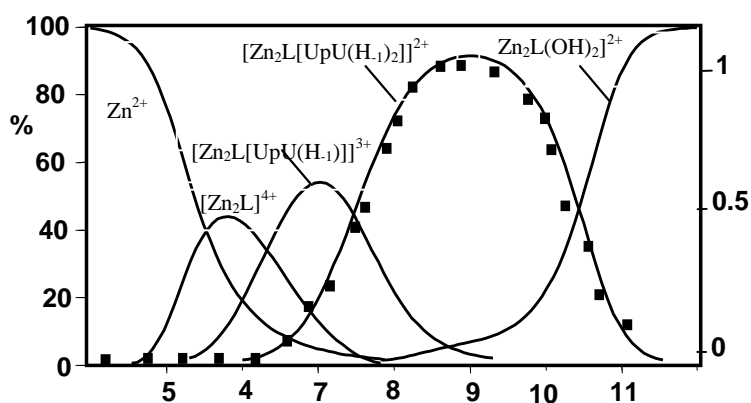


Fig. 4.40- Intensità di emissione a 445 nm in funzione del pH sovrapposta al diagramma di distribuzione del sistema $[Zn_2L11]^{4+}$ -UpU in rapporto molare 1:1 ($[Zn_2L11] = 2.5 \cdot 10^{-5}$ M, λ_{ecc} 290 nm, 298.1K).

Aggiunte successive di UpU ad una soluzione del complesso portano ad un aumento lineare dell'emissione a 445 nm, (Fig. 4.41 b) che indica la formazione di un addotto $[Zn_2L]$ -UpU con stechiometria 1:1. Anche in questo caso il sistema risponde in maniera "raziometrica" alla presenza di UpU. La Fig. 4.40 evidenzia come la specie $[Zn_2LUpU[(H-1)]]^{3+}$ non produce emissione di ecciplesso. Probabilmente la coordinazione della prima unità uracile dell'UpU avviene sull'atomo di Zn(II) non coordinato all'unità fluorogena del dipiridile, e per cui nella specie $[Zn_2L-UpU[(H-1)]]^{3+}$ si ha una distanza troppo elevata tra il bipyridile e l'unità uracile per poter dare interazioni di π -stacking.

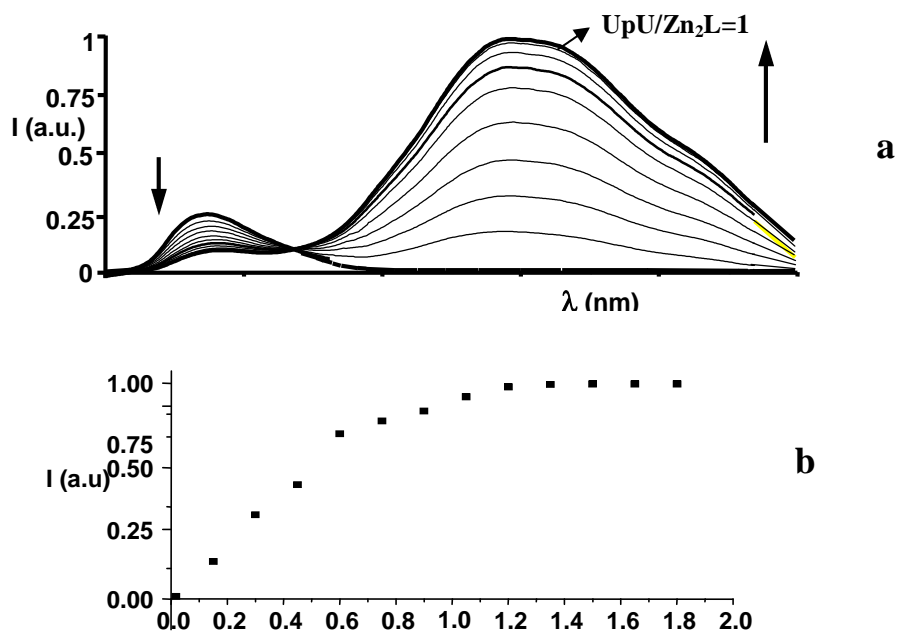


Fig. 4.41- Spettri di fluorescenza di $[Zn_2L]$ -UpU per aggiunte successive di UpU a pH 8.6 (a) e variazione dell'emissione di fluorescenza a 445 nm in funzione del rapporto $[UpU]/[Zn_2L]$ (b).

Nel caso dell' UpU l'emissione di ecciplesso è dovuta alla sola specie $[Zn_2L-[UpU(H_2)]]^{2+}$. Ciò è dovuto alla formazione metallo-assistita dell'addotto in cui entrambe le unità uracile dell'UpU si deprotonano e si coordinano ai due ioni Zn(II) dando luogo ad un sistema rigido in cui l'unità dipiridile del complesso e l'unità eteroaromatica dell'UpU, poste a breve distanza tra loro, interagiscono mediante π -stacking. (Fig. 4.42).

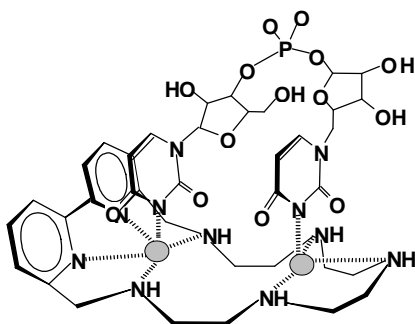


Fig. 4.42- Formula di struttura ipotizzata per l'interazione tra $[Zn_2L11]^{4+}$ e l'UpU deprotonato nel complesso $[Zn_2L11[UpU(H_2)]]^{2+}$.

Va osservato, infine, come il presente complesso sia estremamente selettivo nella coordinazione dei substrati contenenti l'unità uracile. Misure potenziometriche hanno infatti evidenziato che ribonucleotidi diversi

(adenosina, timidina, citidina) e diribonucleotidi non contenenti l'unità uridina, quali ApA, CpC e GpG, non danno interazioni apprezzabili col complesso di Zn(II). Allo stesso tempo non si osservano emissioni di ecciplesso in presenza degli stessi ribonucleotidi e di diribonucleotidi come ApA, CpC e GpG.

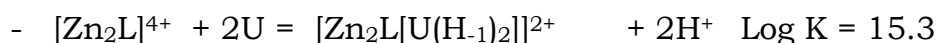
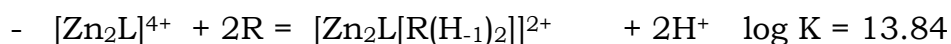
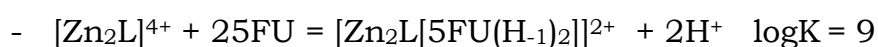
Il decadimento di emissione dell'ecciplesso è riconducibile a un singolo esponenziale, in accordo con la presenza di un unico complesso π -stacking; i tempi di vita misurati a circa 440 nm per i complessi [**L11**·U(H₋₁)₂] e [**L11**·UpA(H₋₂)] sono di 750 e 300 ps rispettivamente e sono più piccoli di quelli osservati per [**L11**·UpU(H₋₂)] (1.4 ns). Il valore più alto per il complesso con UpU è in accordo con la presenza di un assembly più rigido e stabile di tipo π -stacking tra due unità uracile e una dipiridile, probabilmente dovuta alla presenza di un linker tra le due unità uracile in UpU.

Quindi il complesso dinucleare di Zn(II) con **L11** rappresenta un potenziale chemosensore per la sequenza UpU in poliribonucleotidi. Aggiungendo esaribonucleotidi contenenti la sequenza UpU come 5'-AAUUA-3' a una soluzione di complesso a pH 8.6 si osserva la formazione di una nuova banda di emissione a 440 nm. Al contrario, lo spettro di emissione non subisce variazioni a seguito dell'aggiunta di esaribonucleotidi quali 5'-AUAAU-3' o 5'-AAAUA-3', che contengono rispettivamente due unità U separate da due nucleotidi A e una singola U. Quindi la banda a 440 nm osservata per 5'-AAUUA-3' può essere ragionevolmente condotta a una interazione tra il complesso di nucleare di Zn(II) e la sequenza UpU nell'esaribonucleotide.

Lo studio condotto nei confronti di Uridina e UpU è stato esteso ad altri substrati, di importanza biologica e farmacologica, contenenti il gruppo immidico CO-NH-CO (AZT, 5FU, riboflavina) per evidenziare se il nostro complesso possa funzionare da recettore anche per questi substrati.

A differenza di Uridina e UpU, in cui le misure potenziometriche hanno permesso di osservare i due step successivi di addizione di una prima e di una seconda molecola di substrato, nel caso di AZT, 5FU, riboflavina, le

misure effettuate hanno permesso di determinare solo la costante relativa al processo di addizione simultanea di due molecole di substrato al complesso. Anche in questo caso, comunque, l'addizione delle due molecole di substrato è accompagnata dal rilascio di due protoni acidi, ad indicare che la coordinazione è accompagnata dalla deprotonazione delle funzioni immidiche di 5FU, AZT e ribofavina. Le costanti di addizione relative alla formazione dei tre addotti sono riportate di seguito insieme a quelle calcolate per l'addizione di due unità uridina al complesso:



Può essere interessante notare come le costanti di addizione di 2 molecole di AZT e riboflavina siano solo leggermente più basse di quelle trovate nel caso dell'Uridina. Il 5FU, invece, mostra una minore tendenza a coordinarsi al complesso metallico, probabilmente dovuto alla presenza del sostituito fluoro, in posizione 5, con caratteristiche fortemente elettron-attrattive, che rendono il doppietto libero dell'unità immidica deprotonata (CO-N⁽⁻⁾-CO) meno disponibile alla coordinazione ai centri metallici.

I diagrammi di distribuzione dei tre sistemi [Zn₂L]-AZT, [Zn₂L]-5FU e [Zn₂L]-R sono riportati in Fig. 4.43. In tutti e tre i casi si osserva la coordinazione dei substrati deprotonati nella regione alcalina. Come è stato già osservato nel caso dei sistemi con l'Uridina e l'UpU, la coordinazione dei gruppi ossidrilici (OH⁻) ai centri metallici con la formazione di specie [Zn₂L(OH)₂]²⁺ porta ad un distacco dei substrati dal complesso di Zn(II) con una conseguente decomposizione degli addotti.

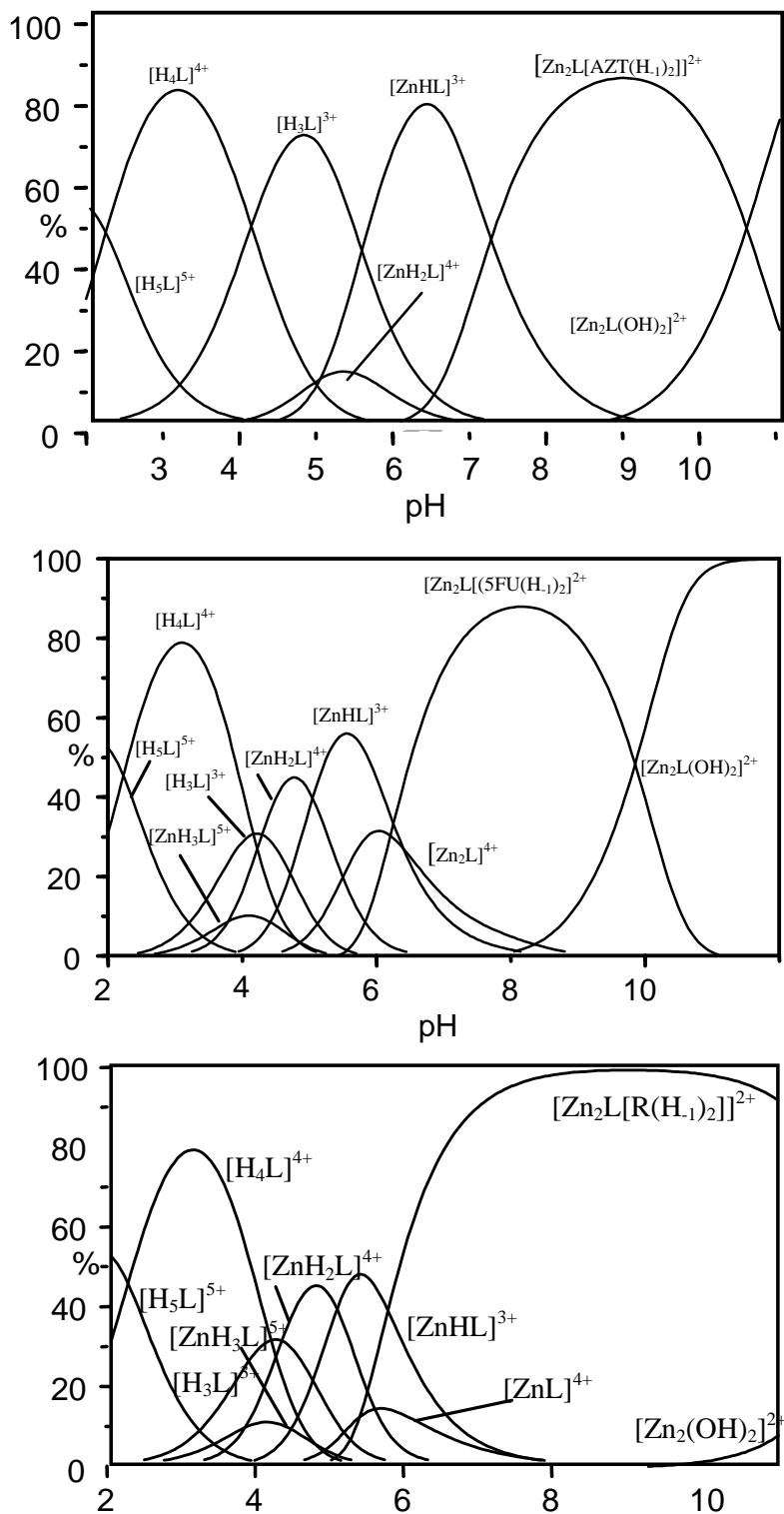


Fig. 4.43- Diagrammi di distribuzione per i sistemi Zn_2L11 -AZT (a), -5FU (b), -R (c) in rapporto molare 1:2 ($[Zn_2L]^{4+} = 10^{-3}$ M, NM_4Cl 0.1 M, 298.1K).

La deprotonazione dell'unità uracile in seguito alla coordinazione al centro metallico è confermata dagli spettri 1H NMR registrati a diversi valori di pH su soluzioni contenenti il complesso e i tre substrati in rapporto 1:2. Come abbiamo visto la deprotonazione dell'unità uracile del 5FU libero, questa porta ad un upfield shift del segnale del protone dell'uracile in posizione 6 solo a pH molto alcalini (pH >9) (Fig. 4.44 b). In presenza del complesso di

Zn(II) questo shift è già osservabile a partire da pH circa 6, a causa della deprotonazione e coordinazione delle unità uracile allo ione metallico. (Fig. 4.44 e-h). La Fig. 4.44 mostra anche, accanto al upfield shift del segnale del 5FU, un upfield shift dei segnali del bipyridile del complesso, sempre a partire da pH 6.2. Ciò è probabilmente dovuto a delle interazioni di π -stacking tra l'uracile e il dipiridile. Infine a pH molto alcalini (pH > 11) i segnali dell'addotto subiscono un downfield shift dando luogo nuovamente allo spettro del complesso registrato in assenza del substrato. Ciò è dovuto alla decomposizione degli addotti con formazione della specie $[Zn_2L(OH)_2]^{2+}$.

Per il sistema Zn_2L -AZT si osserva lo stesso andamento degli spettri 1H NMR al variare del pH, osservati per il 5FU.

In Fig. 4.45 è rappresentato invece l'andamento degli spettri 1H MNR della riboflavina protonata e deprotonata (a,b), del complesso (c) e del sistema Zn_2L -R in rapporto molare 1:1 al variare del pH (d,l). Anche in questo sistema si possono osservare variazioni di chemical shift dei segnali del bipyridile e dei protoni in posizione 1 e 2 della riboflavina. Questi subiscono un upfield shift in seguito alla coordinazione ai centri metallici, come già osservato nel caso del 5FU e del AZT. Le variazioni di chemical shift risultano però maggiori (per i protoni del bipyridile) probabilmente perchè la riboflavina presenta un'unità aromatica estesa ed è quindi in grado di dare interazioni di π -stacking più forti per l'unità dipiridile rispetto agli altri substrati.

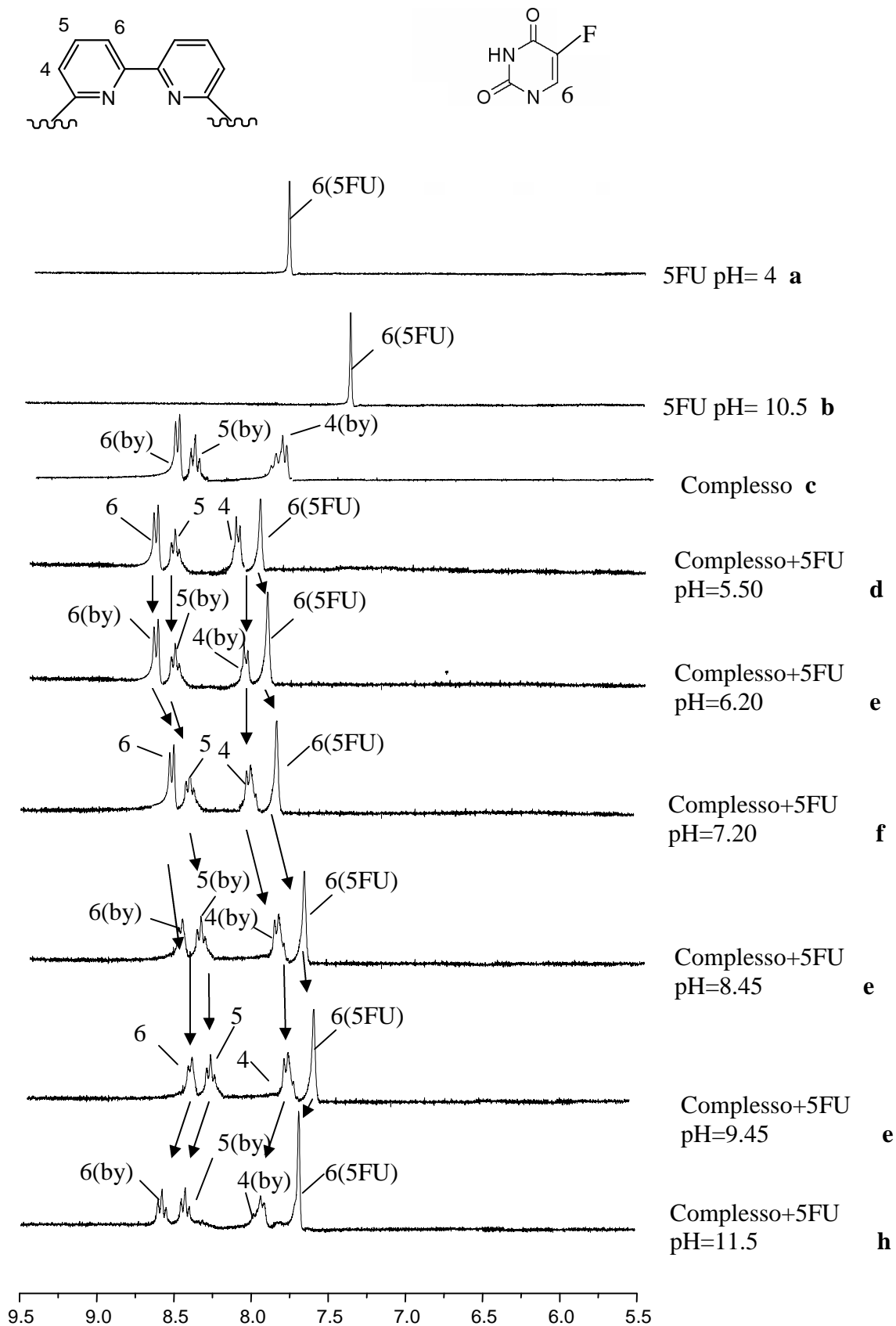


Fig. 4.44- Spettri ¹H NMR di 5FU (a,b), del complesso (c) e del sistema Zn₂L-5FU (d-i) in rapporto molare 1:2 a vari valori di pH a 298.1K in soluzione di D₂O.

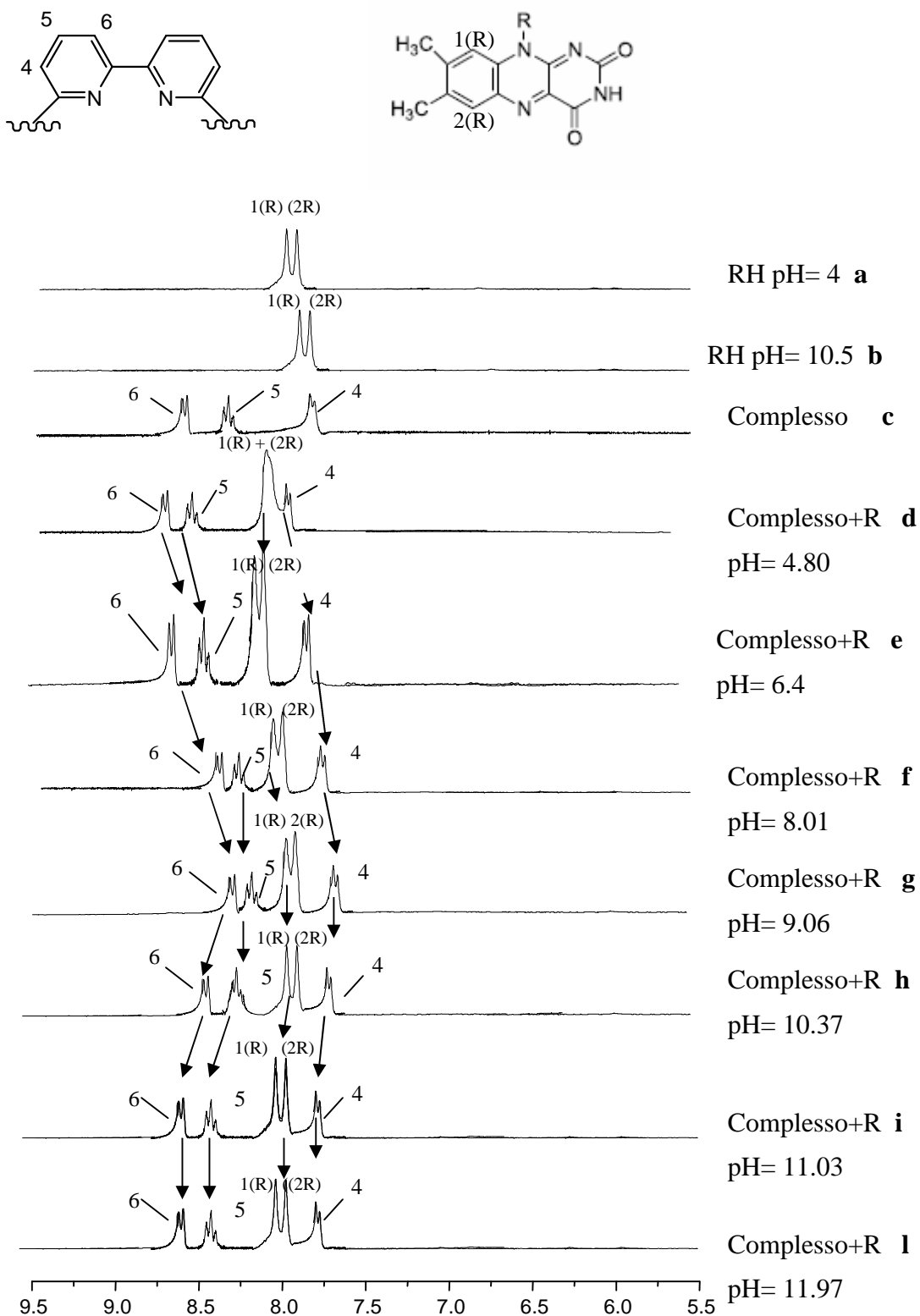


Fig. 4.45- Spettri ^1H NMR di Riboflavina (a,b), del complesso (c) e del sistema $\text{Zn}_2\text{L-R}$ (d-i) in rapporto molare 1:2 a vari valori di pH a 298.1K in soluzione di D_2O .

In Fig. 4.46 sono riportati gli spettri UV dei sistemi Zn_2L -AZT e Zn_2L -5FU a diversi valori di pH .

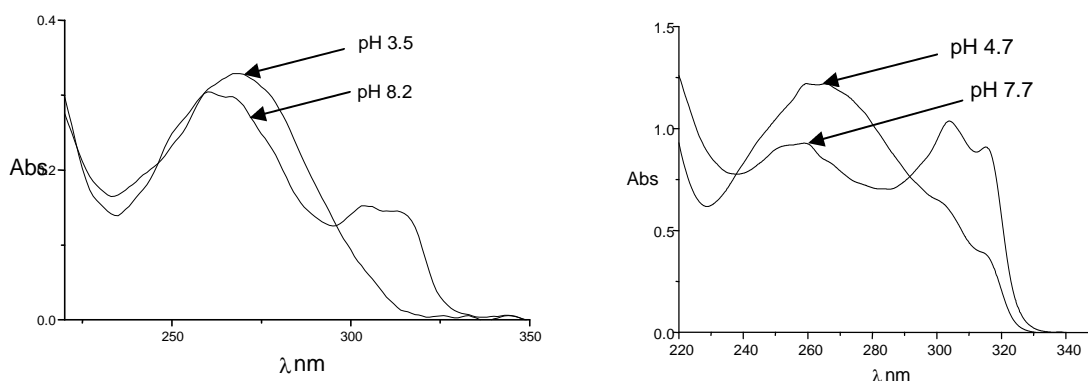


Fig. 4.46- Spettri di assorbimento di Zn_2L -AZT e di Zn_2L -5FU in rapporto molare 1:2 ($[L]=1 \cdot 10^{-4}$ M) a diversi valori di pH.

Dall'analisi delle due figure si può osservare come a pH acidi gli spettri di assorbimento di Zn_2L -AZT e di Zn_2L -5FU siano simili a quelli dei substrati non coordinati (AZT di Fig. 4.26 e 5FU di Fig. 4.28) in accordo con l'assenza di interazione tra i substrati ed il complesso a pH acidi. A pH debolmente alcalini, invece, la deprotonazione e la conseguente coordinazione dei substrati porta ad una diminuzione della banda di assorbimento di 5FU e AZT a circa 260 nm. Questi risultati confermano ulteriormente che la coordinazione dei substrati è collegata alla loro deprotonazione.

Per quanto riguarda la Riboflavina si può osservare (Fig. 4.47) come a pH acidi (3.0-4.1) lo spettro di assorbimento dell'addotto sia sostanzialmente uguale a quello della Riboflavina non protonata di Fig. 4.31 (una banda a 360 nm con una spalla a 450 nm). A pH alcalini la formazione dell'addotto con il complesso binucleare di zinco porta alla deprotonazione e coordinazione della riboflavina e comporta un cambiamento della forma dello spettro di assorbimento con una diminuzione dell'assorbanza a 360 nm ed un aumento dell'assorbanza a 450nm.

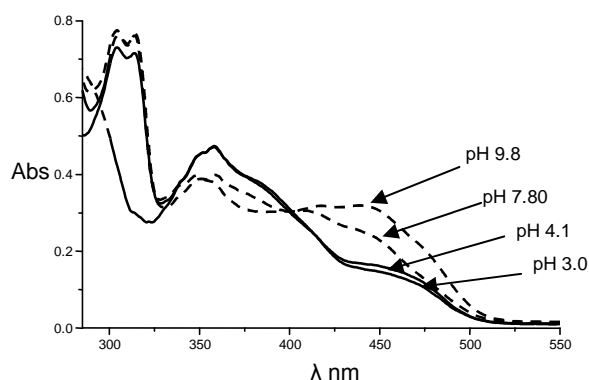


Fig. 4.47- Spettri di assorbimento del sistema $[Zn_2L]$ -Riboflavina in rapporto molare 1:2. ($[Zn_2L]^{4+} = 2.5 \cdot 10^{-6} M$) a vari valori di pH .

Purtroppo la coordinazione del 5FU e della riboflavina non può essere seguita per via fluorimetrica verificando l'eventuale presenza di un ecciplesso, a causa dell'emissione propria di questi substrati anche in assenza del complesso proprio nella stessa regione di formazione dell'ecciplesso stesso. Inoltre l'emissione di 5FU e Riboflavina rimane sostanzialmente invariata in presenza del complesso

Per quanto riguarda L'AZT invece, analogamente ai sistemi Zn_2L -Uridina e Zn_2L -UpU, si può osservare come la formazione dell'addotto porti ad una diminuzione dell'emissione di fluorescenza della banda a 330 nm del complesso (Fig. 4.48 a) ed al contempo alla formazione di una nuova banda di emissione non strutturata spostata a lunghezze d'onda maggiori (438 nm). Questa banda di emissione di ecciplesso si può attribuire ancora una volta all'interazione di π -stacking allo stato eccitato, tra l'unità aromatica del biperidile del complesso e l'unità eteroaromatica deprotonata dell'AZT coordinata allo ione $Zn(II)$. Dalla Fig. 4.48a si può anche osservare come la formazione dell'addotto porti ad un'emissione di ecciplesso meno intensa rispetto alle emissioni osservate per i sistemi con Uridina e UpU. Ciò è dovuto al fatto che il sistema complesso $[[Zn_2L[AZT(H_{-1})_2]]^{2+}$ presenta una costante di formazione più bassa rispetto agli altri addotti di 1-2 ordini di grandezza e risulta solo parzialmente formato in soluzioni contenenti il complesso e l'AZT in rapporto molare 1:2. La completa formazione dell'addotto si osserva solo per rapporti molarli maggiori di 3. Ciò è ben evidenziato in Fig. 4.48b, che mostra come l'intensità di emissione a 438 nm assuma rapporti costanti solo per rapporti molarli $[AZT]/[Zn_2L]^{4+} > 3$.

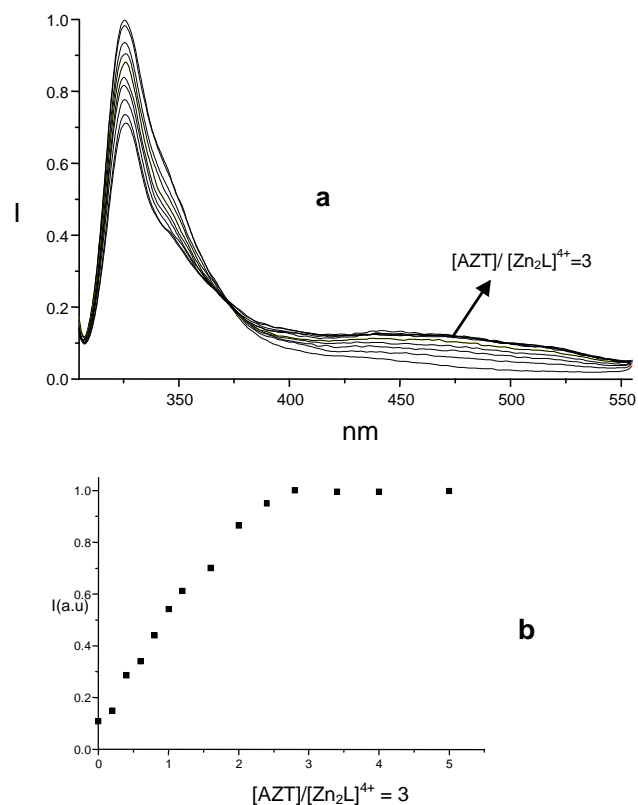


Fig. 4.48- Spettri di fluorescenza di $[Zn_2L]^{4+}$ per aggiunte successive di AZT al complesso a pH 9.6 (a) e variazione dell'emissione di fluorescenza a 438 nm in funzione del rapporto $[AZT]/[Zn_2L]^{4+}$ (b).

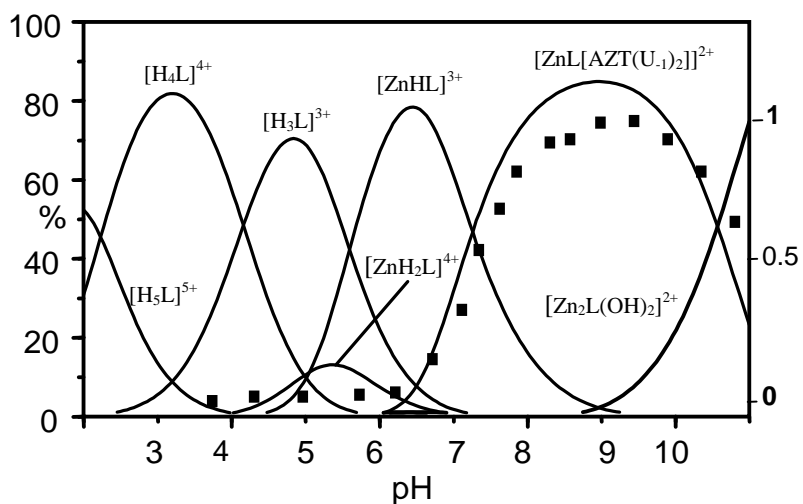


Fig. 4.49- Intensità di emissione a 438 nm in funzione del pH, sovrapposto al diagramma di distribuzione del sistema Zn_2L in rapporto molare 1:2 ($[Zn_2L]^{4+} = 1.14 \cdot 10^{-5} M$, $\lambda_{exc} 290 nm$, 298.1K)

Concludendo, il complesso dinucleare di Zn(II) con il legante **L11** mostra una spiccata capacità di aggiungere substrati contenenti la funzione immidica CO-NH-CO, tramite un processo di deprotonazione “metallo-assistita” della funzione immidica e simultanea coordinazione dell’atomo di azoto deprotonato della stessa funzione ai centri metallici. In particolare, misure potenziometriche evidenziano come il complesso formi, già a pH neutro o debolmente alcalino, addotti con stechiometria metallo-recettore/substrato 1:2 con uridina, 5-fluorouracile, AZT e riboflavina nelle loro forme deprotonate. Nel caso dell’UpU è osservata invece la formazione di un addotto con stechiometria 1:1 in cui entrambe le unità uracile sono deprotonate. Entrambi i due centri metallici sono coinvolti nella formazione di questi addotti. Ciascun ione metallico, infatti, agisce come sito di legame per l’atomo di azoto deprotonato di una singola funzione immidica. Nel caso di uridina, UpU e AZT l’aggiunta dei substrati deprotonati al complesso di Zn(II) altera in maniera significativa le proprietà di emissione dell’unità dipiridile con la formazione di una nuova banda di emissione non strutturata a circa 450 nm, spostata verso il rosso di oltre 100 nm rispetto alla normale emissione del dipiridile a 330 nm. Questa nuova banda può essere attribuita ad un’emissione di ecciplesso originata da una interazione di π -stacking tra il dipiridile nel suo stato eccitato e le unità uracile di uridina o AZT.

Questa ipotesi è confermata dallo studio ^1H NMR dei sistemi, che evidenziano la presenza di un’interazione di stacking nello stato fondamentale e da misure di spettroscopia UV transiente, che mettono in luce la presenza di una stabilizzante interazione tra uracile e dipiridile anche nello stato eccitato. E’ importante sottolineare come il complesso di Zn(II) dia luogo a una risposta raziometrica, in termini di intensità di emissione, alla presenza di uridina e UpU, con un incremento lineare dell’intensità di emissione all’aumentare della concentrazione dei substrati in soluzione. Allo stesso tempo, il complesso di Zn(II) è del tutto incapace di coordinare nucleosidi quali adenosina, citidina, o guanidina e dinucleotidi quali ApA, GpG o CpC. Selettività nella coordinazione e risposta raziometrica alla presenza dei substrati rendono questo complesso un buon chemosensore di fluorescenza per substrati aromatici contenenti l’unità immidica CO-NH-CO.

4.9 Bibliografia

1. (a) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Biagini, S.; Faggi, E.; Meini, S.; Giorgi, C.; Spepi, A.; *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7349-7363. (b) Bazzicalupi, C.; Biagini, S.; Bencini, A.; Faggi, E.; Giorgi, C.; Matera, I.; Valtancoli, B.; *Chem. Commun.* **2006**, 4087-4089. (c) Bencini, A.; Biagini, S.; Giorni, C.; Handel, H.; Le Baccon, M.; Mariani, P.; Paoletti, P.; Paoli, P.; Rossi, P.; Tripier, R.; Valtancoli, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5610-5621. (d) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bussotti, L.; Berni, E.; Biagini, S.; Faggi, E.; Foggi, P.; Giorni, C.; Lapini, A.; Marcelli, A.; Valtancoli, B. *Chem. Commun.* **2007**, 1230-1232
2. (a) Hirsch, A. K. H.; Fischer, F. R.; Diederich, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 338-352. (b) Dugas, H. *Bioorganic Chemistry: a Chemical Approach to Enzyme Action*; Springer: New York, **1996**. (c) Davidson, A. M. L.; Dassa, E.; Orelle, C.; Chen, J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 317-364. (d) Alton, G. R.; Lunney, E. A. *Expert Opin. Drug Discovery* **2008**, *3*, 595-605. (e) Lewis, J. A.; Lebois, E. P.; Lindsley, C. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 269-280. (f) Matte, A.; Delbaere, L. T. J. *Handbook Proteins* **2007**, 1,114-118. (g) Turk, B. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 4-10. (h) Hollenstein, K.; Dawson, R. J. P.; Locher, K. P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 412-418. (i) Morrow, J. R.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*,539-548. (l) Rye, C. S.; Baell, J. B. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 3127-3141.
3. (a) Alpha, B.; Anklam, E.; Deschenaux, R.; Lehn, J.M.; Pietraskiewicz, M.; *Helv. Chim. Acta*, **1988**, *71*, 1042. (b) Weck, M.; Mohr, B.; Sauvage, J.P.; Grubbs, R.H.; *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 5463.
4. Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Masotti, A.; Paoletti, P.; *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 7686.
5. Smith, R. M.; Martell, A. E. *NIST Stability Constants Database*, version 4.0; National Institute of Standards and Technology: Washington, DC, **1997**.
6. Anderegg, G.; Wanner, *Inorg. Chim. Acta* **1986**, *113*, 101-108
7. Bianchi, A.; Garcia-España, E. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 1727-1732.
8. Aucejo, R.; Diaz, P.; Garcia-España E.; Alarcon, J.; Delgado-Pinar, E.; Torres, F.; Soriano, C.M.; Guillem, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 44-51
9. Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Faggi, E.; Giorgi, C.; Santarelli, S.; Valtancoli, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2440-2441

5. Sintesi e studio dell'interazione con DNA di complessi di Ru(II) e Pt(II) contenenti unità eteroaromatiche estese

5.1. Introduzione

Il DNA rappresenta attualmente il substrato su cui si concentra gran parte della ricerca in campo biomedico. Per uno studio approfondito dei meccanismi di riconoscimento molecolare, del tipo di interazioni (legame ad idrogeno, forze di Van der Waals, π -stacking...) che guidano il processo formativo di addotti molecola/DNA e delle reazioni che possono derivare da tale interazione (formazione di legami covalenti irreversibili, modificazione della struttura della doppia elica con alterazione o inibizione dei processi di trascrizione e duplicazione, rottura della sequenza nucleotidica, ecc.), occorre poter disporre di semplici molecole, modificabili a piacimento, in funzione delle esigenze richieste. Per questo nasce l'esigenza di sintetizzare dei *recettori molecolari*, vale a dire specie in grado di assolvere almeno ad una delle funzioni di riconoscimento, trasporto oppure attivazione (o disattivazione) di sostanze chimiche bersaglio, in questo caso il DNA. Oltre a reazioni, generalmente irreversibili e non selettive, che prevedono la formazione di legami covalenti, si possono avere anche interazioni mediante forze deboli, che portano ad una disposizione essenzialmente esterna della molecola rispetto al DNA¹ (A in Fig. 5.1), oppure ad una collocazione della molecola nelle scanalature del DNA che, in funzione dell'ingombro sterico, può avvenire nel solco maggiore o in quello minore² (*groove binding* B in Fig. 5.1) o, infine, ad *intercalazione* della molecola³ (C in Fig. 5.1).

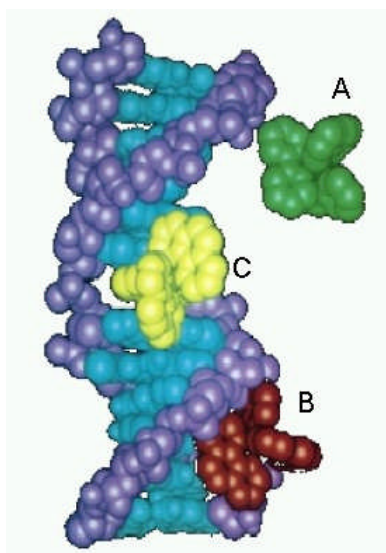


Fig. 5.1- Tipi di interazione recettore/DNA. **A** legame elettrostatico; **B** groove binding; **C** intercalazione.

Gli effetti che in genere accorrono sulle molecole intercalanti sono delle variazioni nelle caratteristiche spettroscopiche e pertanto ci danno la possibilità di determinare le costanti di equilibrio degli addotti formati con DNA attraverso misure di assorbimento e/o fluorescenza.

Gli effetti più comuni di molecole intercalanti sul DNA sono stati ampiamente documentati^{4,5} e possono essere ricondotti a tre casi:

- Inibizione degli enzimi dipendenti dal DNA (es. DNA-polimerasi).
- Mutazione, che disturba l'ordine di lettura del codice genetico.
- Danni al DNA (es. rottura).

Tra i recettori molecolari idonei ad interagire con il DNA, grande interesse è rivolto ai metallo-recettori: complessi, solubili in acqua, costituiti da un catione metallico coordinato a uno o più leganti contenenti un residuo aromatico o eteroaromatico esteso.

La presenza del metallo contribuisce a definire l'architettura del recettore. Sono stati realizzati vari metallo-intercalatori sintetici, aventi diverse geometrie coordinative attorno allo ione metallico, in grado di interagire con il DNA: dai complessi planari quadrati di Pt(II), studiati all'inizio da Lippard^{6,7} (Fig. 5.2, A), alle strutture tridimensionali dei più recenti complessi ottaedrici di Co(III), Ru(II), Os(II), Rh(III) ed altri ioni di metalli di transizione⁸ (Fig. 5.2,

B), ai complessi di Cu(II) e Zn(II) che presentano geometrie coordinative meno rigide^{9,10}.

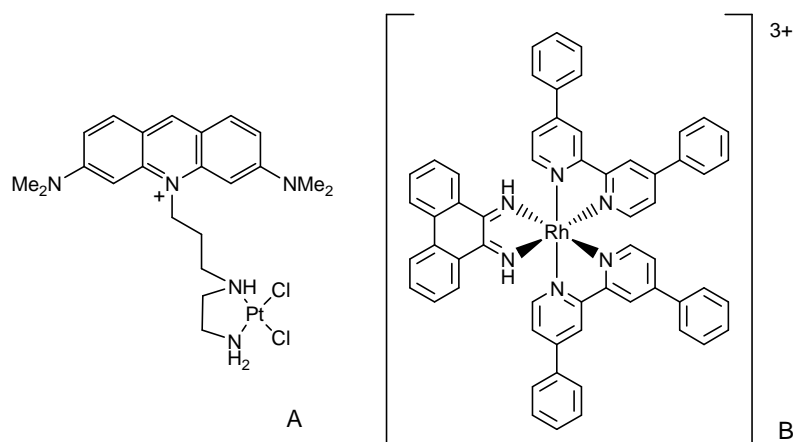


Fig. 5.2-

A) [10-[6-[(2-amminoetil)ammino]esil]-3,6-bis(dimetilammino)-acridinio]dicloroplatino(II);

B) [Rh(DPB)₂phi]³⁺ (DPB=4,4'-difenilbipiridile; phi=9,10-fenantrenechinonediimmina).

Il metallo presente in un metallo-recettore, oltre ad una funzione strutturante, ha anche una funzione attiva in quanto può interagire con il DNA formando con esso legami covalenti (come i derivati del cis-platino), oppure può funzionare da centro di attivazione per processi di varia natura sul DNA (idrolitici, redox, ecc.).^{8,11,12}

Anche la parte organica (il legante/i leganti) è di primaria importanza, non solo per le sue proprietà d'interazione con il DNA, ma anche perchè determina il numero di posizioni coordinative disponibili sullo ione metallico, lo protegge da agenti coordinanti indesiderati e regola le sue proprietà redox, elettroniche e magnetiche.

L'interazione della parte organica di un metallo-recettore con il DNA può essere così forte e specifica al punto di determinare la selettività del processo di associazione fra metallo-recettore e substrato.

Ad esempio, l'utilizzo di unità eteroaromatiche estese, come la 1,10-fenantrolina o la dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (rispettivamente phen e dppz in Fig. 5.3), incrementa notevolmente le interazioni di stacking con le coppie di basi azotate del polinucleotide e, di conseguenza, anche la stabilità dell'addotto recettore/DNA (costante di stabilità > 10⁶ M⁻¹).

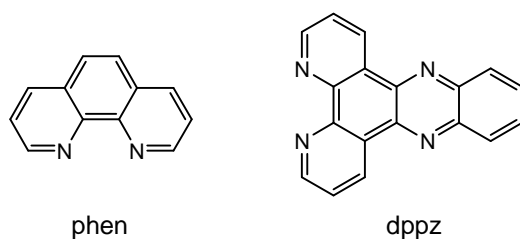


Figura 5.3- I leganti phen e dppz.

In particolare, i complessi di Ru(II) contenenti il legante dppz, suscitano un notevole interesse, poiché possono comportarsi come sensori di tipo light-switches per opportune sequenze del DNA e conseguentemente sono stati usati come sensori fluorescenti nel campo della diagnostica del DNA.¹³

Lo stato eccitato di questi complessi è caratterizzato da una luminescenza con un lungo tempo di vita, in cui l'elettrone promosso si trova localizzato sul legante dppz.¹⁴ Comunque essi hanno una emissione molto debole in acqua, poiché in questo solvente si ha legame o trasferimento di protoni verso gli atomi di azoto della fenazina,¹⁵ ma la loro luminescenza viene ripristinata a seguito di interazione con il DNA, perché le molecole di acqua che circondano il dppz vengono rilasciate a seguito dell'intercalazione, dando luogo ad un effetto light-switching. Anche se l'intercalazione è il fenomeno generalmente accettato come elemento fondamentale di interazione per questi complessi con il DNA, il modo di interazione rimane oggetto di dibattito poiché sono possibili tipi di interazione quali laterale e "di testa", osservati per il sistema DNA/[Os(phen)₂(dppz)]²⁺¹⁶ e "di superficie" o parzialmente intercalativi osservati per gli addotti di diversa stechiometria formati da [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺.¹⁷

Considerate quindi le caratteristiche che deve possedere un metallo-recettore per poter interagire con il DNA, è stata sintetizzata una nuova famiglia di complessi di Ru(II) (**L13-L15** in Fig. 5.4). I complessi combinano le proprietà dei complessi di Ru(II) contenenti l'unità dppz a quelle dei macrocicli metallo-intercalanti. Infatti essi recano un macrociclo poliamminico, in grado di coordinare un secondo ione (es. Cu²⁺, che potrebbe essere capace di provocare la rottura della catena polinucleotidica). E' stato precedentemente dimostrato che le specie poliprotonate del macrociclo così come i suoi

complessi con Zn(II), funzionano come recettori multifunzionali nei confronti di specie substrato come ATP utilizzando interazioni elettrostatiche, legami a idrogeno, di coordinazione e π -stacking,¹⁸ nella formazione degli addotti recettore-substrato. Inoltre, il complesso **L13** è in grado di agire come fotocatalizzatore nelle reazioni di ossidazione/riduzione in processi coinvolgenti specie anioniche.¹⁹ La sfera di coordinazione del Ru(II) è completata da diversi residui eteroaromatici: il primo contiene due gruppi bipyridile, il secondo due dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina), il terzo un gruppo bipyridile e uno dppz.

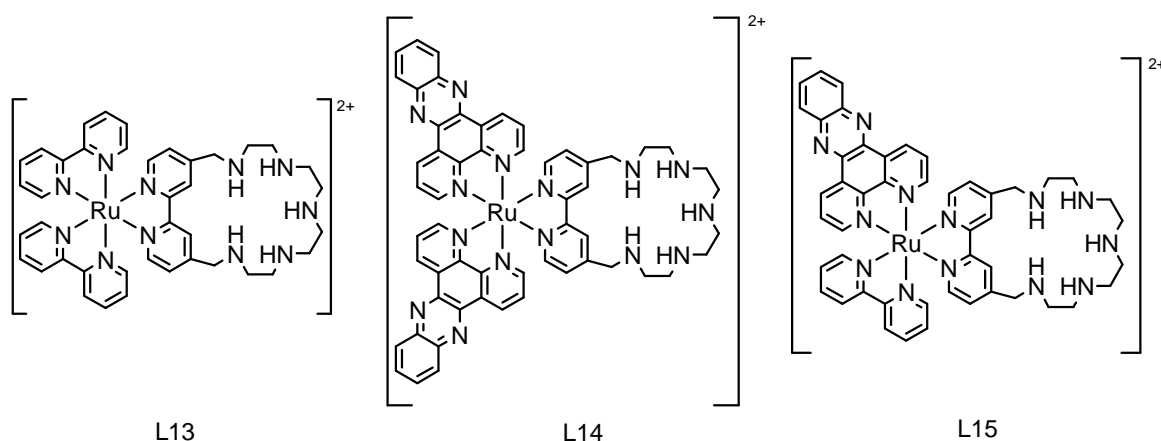


Fig. 5.4-La famiglia di complessi di Ru(II) **L13-L15**.

Inoltre è stato sintetizzato un nuovo complesso di Pt(II) contenente una unità proflavina dalle note proprietà intercalanti²⁰ (**L16** in Fig. 5.5).

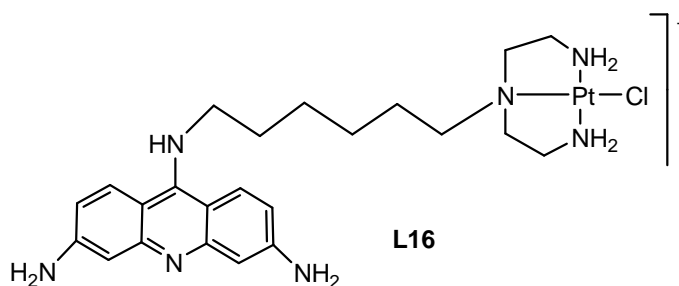


Fig. 5.5- Il complesso di Pt(II) **L16**.

In un precedente lavoro¹⁰ è riportata la sintesi dell'interazione con DNA del legante riportato in Fig. 5.6.

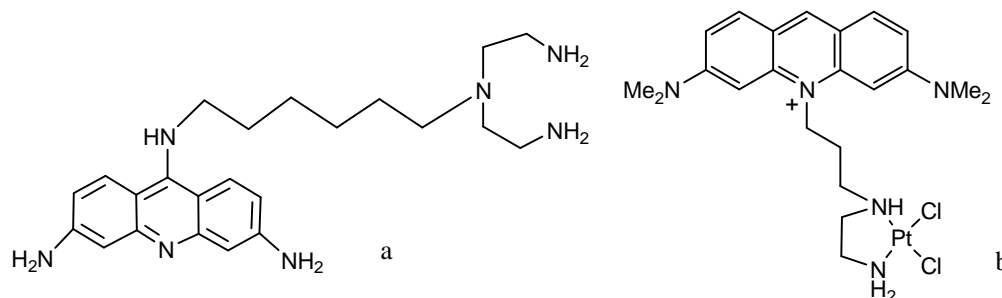


Fig. 5.6 Legante precedentemente studiato (a) e complesso di Pt(II) di un legante analogo riportato da Lippard(b).

Come si può notare dalla figura, esso è stato progettato con intento analogo a quello di Lippard.²¹ Il legante 3,6-diamino-9-[6,6-bis(2-aminoetil)-1,6-diaminoetil]acridina (a) è caratterizzato da una unità proflavina e da una unità dietilentriammina capace di coordinare ioni metallici. Il nuovo aspetto strutturale di (a) è dovuto al fatto che il sito di coordinazione di ioni metallici è legato alla posizione C9 dell'acridina invece che alla posizione N10. Poiché, come atteso, l'atomo N10 è protonato a pH fisiologico sia nel legante libero che nei complessi metallici, è risultato interessante analizzare l'effetto del gruppo ammonio N10 carico positivamente sul processo di interazione con DNA. Esso può infatti influenzare la formazione di interazioni di tipo elettrostatico e di legame idrogeno con gli atomi di ossigeno del polianione. È stato così sintetizzato il complesso di Pt(II) di tale legante per studiare, in analogia con Lippard, la combinazione di due effetti in una molecola bifunzionale: la capacità intercalativa dell'unità proflavina e l'attività dell'unità dietilammino-cloro-platino. È noto infatti che il *cis*-Diamminodicloroplatino (II) (*cis*-DDP), largamente usato in chemioterapia, è capace di produrre lesioni del DNA,²² e che l'uso combinato di farmaci intercalanti con *cis*-DDP ha avuto risultati soddisfacenti nel trattamento di alcuni tumori di tipo solido.²³

Per tutti i sistemi sono state studiate le proprietà di interazione con il DNA da un punto di vista termodinamico e per L14 anche da un punto di vista cinetico.

5.2. Protonazione di L13-L15 e formazione dei loro complessi con Cu(II)

Le costanti di protonazione di **L13-L14** e le costanti dei formazione dei loro complessi con Cu(II) , determinate in soluzione acquosa di NMe₄Cl 0.1 M a 298.1 ± 0.1 K, sono mostrate nella Tabella 5.1. Sfortunatamente, non è stato possibile studiare gli equilibri di protonazione e complessazione per **L15**, a causa della sua scarsa solubilità a pH superiore a 5.

Tabella 5.1- Costanti di protonazione e di complessazione di Cu(II) da parte dei complessi **L13** e **L14** determinate in Me₄NCl 0.1 M a 298.1±0.1 K.

Equilibrio	Log K	
	L = L13	L = L14
$L + H^+ = HL^+$	8.92(5)	8.52(9)
$HL^+ + H^+ = H_2L^{2+}$	8.10(5)	5.9(1)
$H_2L^{2+} + H^+ = H_3L^{3+}$	5.54(6)	4.4(1)
$H_3L^{3+} + H^+ = H_4L^{4+}$	3.97(6)	2.6(1)
$H_4L^{4+} + H^+ = H_5L^{5+}$	3.03(6)	2.7(1)
$L + Cu^{2+} = CuL^{2+}$	14.1(1)	8.82(4)
$CuL^{2+} + H^+ = CuHL^{3+}$	6.33(7)	6.36(3)
$CuHL^{3+} + H^+ = CuH_2L^{4+}$	5.11(4)	4.49(1)
$CuH_2L^{4+} + H^+ = CuH_3L^{5+}$		2.89(2)
$CuL^{2+} + OH^- = CuL(OH)^+$		4.82(7)
$CuL(OH)^+ + OH^- = CuL(OH)_2$		3.86(6)
$CuL^{2+} + Cu^{2+} = Cu_2L^{4+}$	3.7(2)	
$Cu_2L^{4+} + OH^- = Cu_2L(OH)^{3+}$	8.1(1)	
$Cu_2L(OH)^{3+} + OH^- = Cu_2L(OH)_2^{2+}$	5.2(1)	

Come mostrato dai diagrammi di distribuzione delle specie protonate (Fig. 5.7), **L14** inizia a legare protoni sotto pH 10 con la formazione della specie monoprotonata **HL14**, che diventa la specie principale a pH fisiologico dove

si trova con una abbondanza superiore al 90%. I successivi step di protonazione avvengono a pH più acido in accordo con il pattern atteso per i macrocicli poliamminici.²⁴

In generale, il complesso **L14** mostra delle costanti di protonazione mediamente più basse rispetto a **L13**.

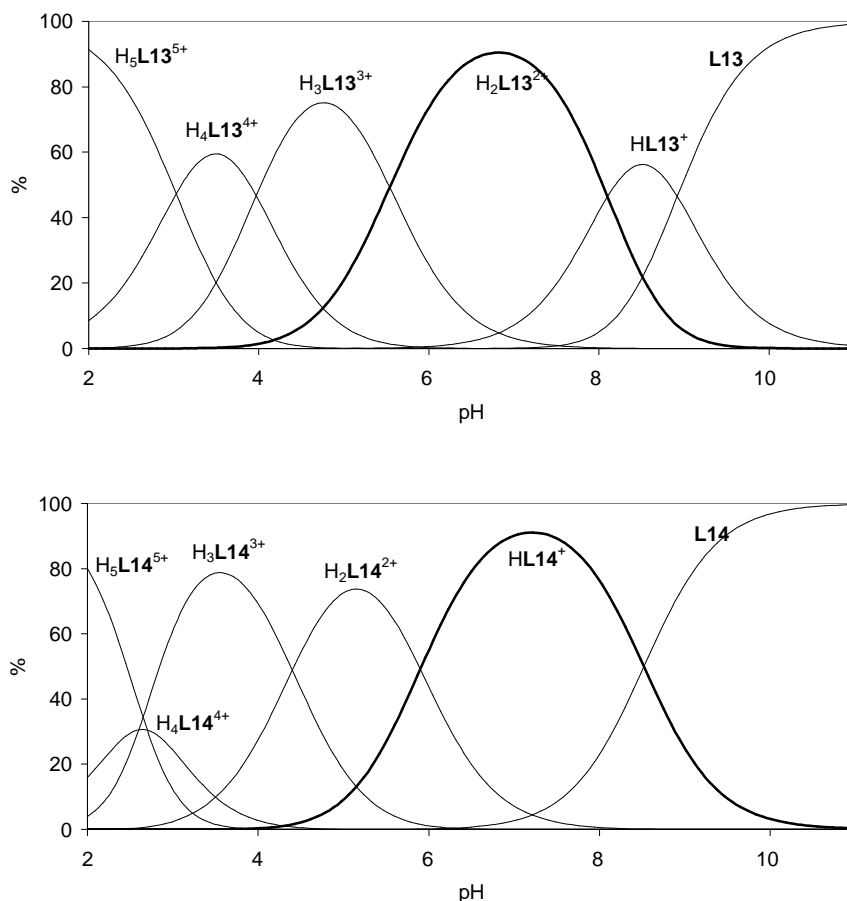


Fig. 5.7- Diagrammi di distribuzione delle specie H_nL^{n+} per **L13** e **L14** in soluzione acquosa (Me_4NCl 0.1 M; 298.1 ± 0.1 K); $[L] = 1 \cdot 10^{-5}$ M.

La complessazione del Cu(II) da parte di **L13** e **L14** avviene in tutto il range di pH investigato (2.5-10.5) (Fig. 5.8). **L13** è in grado di coordinare sia Cu^{2+} che Zn^{2+} ¹⁹ mentre **L14** è in grado di formare complessi stabili con Cu^{2+} , ma non ha mostrato capacità coordinativa nei confronti di Zn^{2+} .

$CuL13^{4+}$ e $CuL14^{4+}$ sono le specie maggiormente presenti a pH fisiologico, essendo formate per circa il 90%. Queste specie danno luogo a complessi mono-, di- e triprotonati, al diminuire del pH, mentre a pH alcalino si ha la deprotonazione delle molecole di acqua coordinate al metallo con la formazione di mono- e di-idrossocomplessi. Questo sta ad indicare che il

macrociclo non è in grado di completare la sfera di coordinazione del Cu(II), favorendo la coordinazione di altre specie esogene. Questa è una interessante caratteristica di **L13** e **L14** perché lo ione Cu(II) coordinato può giocare un ruolo attivo nella interazione con il DNA.

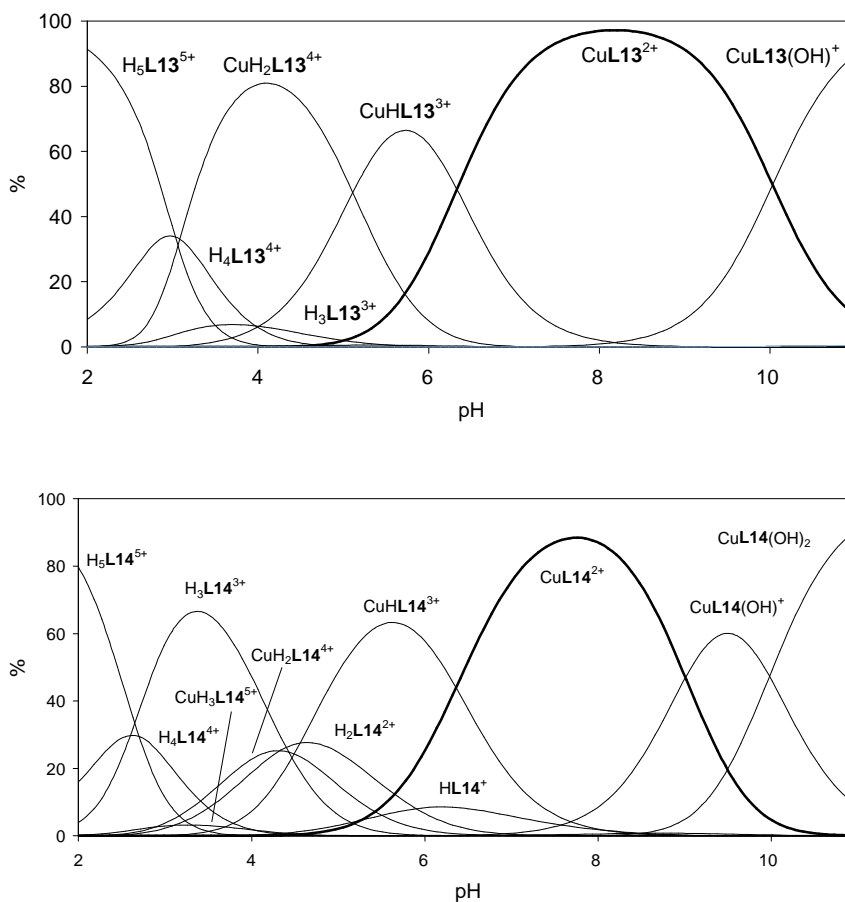


Fig. 5.8- Diagrammi di distribuzione per i sistema Cu²⁺ + **L13** e **L14** (rapporto 1:1) (Me₄NCl 0.1 M; 298.1±0.1 K); [Cu²⁺] = [L] = 1·10⁻⁵ M.

La protonazione dei complessi di Ru(II) è stata studiata anche tramite spettroscopia UV-visibile e spettrofluorimetria, registrando spettri a diversi valori di pH. In Fig. 5.9 sono riportati gli spettri di assorbimento registrati a pH 2 e 11 per **L14** e **L15**. Gli spettri dei due complessi sono molto simili e mantengono la maggior parte delle caratteristiche dei componenti. Essi mostrano una banda larga a circa 450 nm attribuita a un trasferimento di carica metallo-legante $d\pi \rightarrow \pi^*$ senza una apprezzabile risoluzione, che coinvolge i diversi leganti (bpy, dppz) coordinati al metallo, e altre due bande a più bassa lunghezza d'onda dovute a transizioni centrate sul legante di tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. La prima a circa 360 nm è tipica del dppz, anche se per il dppz libero

questa banda si presenta come due picchi separati, ²⁵ mentre la banda più intensa è centrata a circa 280 nm ed è probabilmente dovuta ad una sovrapposizione della banda di dpy e della transizione interlegante del dppz di tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. ²⁶

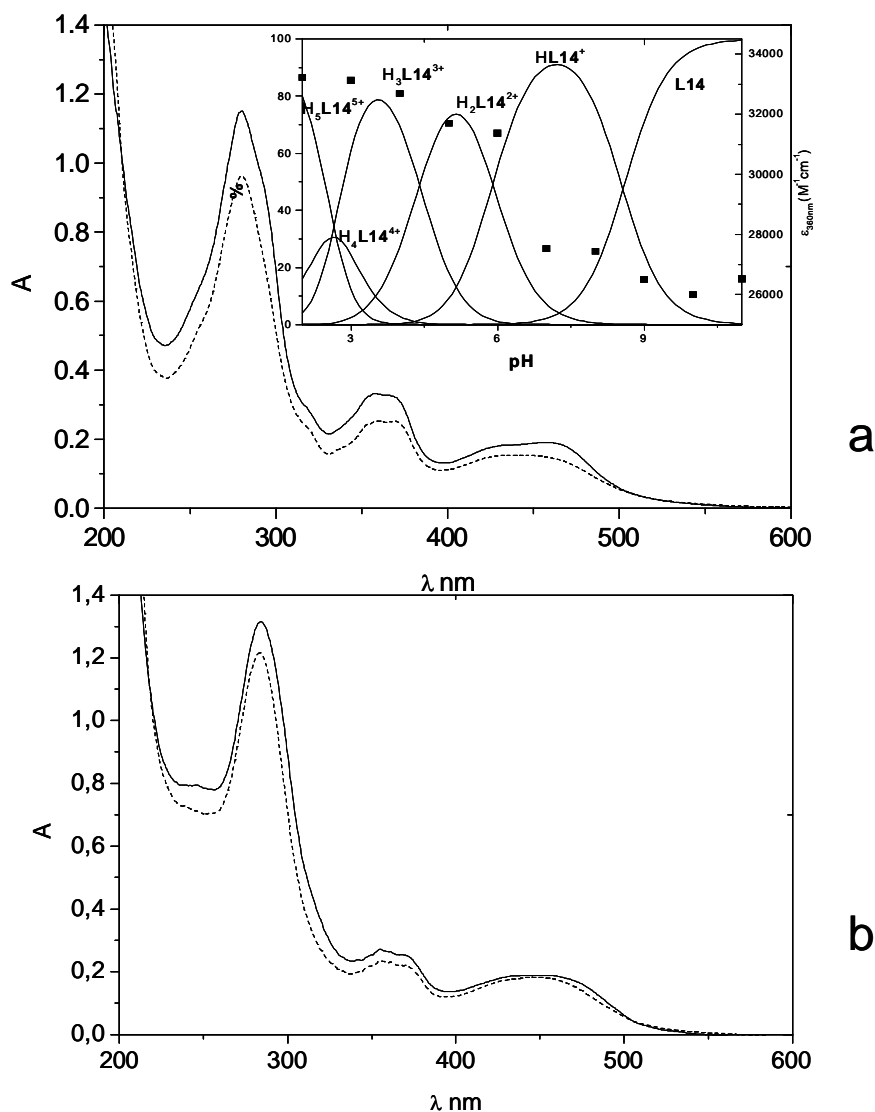


Fig. 5.9- Spettri di assorbimento di **L14** (a) e **L15** (b) registrati in soluzioni acquose a pH 2 (—) e pH 11 (...). T = 298 K. Riquadro: diagramma di distribuzione delle specie protonate di **L14** e variazione dell'assorbimento a 360 nm in funzione del pH.

Questi spettri sono confrontabili con quelli precedentemente riportati per **L13**. ¹⁹ Come per **L13**, gli spettri di assorbimento di **L14** e **L15** non cambiano in maniera significativa con il pH, nonostante si possano notare alcune variazioni relative alla protonazione degli atomi di azoto benzilici dell'unità macrociclica (riquadro Fig. 5.9). Per quanto riguarda l'emissione di **L13-L15**

c' è da notare che, al contrario di quanto osservato per **L13**, il cui stato eccitato MLCT è caratterizzato da un luminescenza con lungo tempo di vita in soluzione acquosa,¹⁹ **L14** e **L15** sono spenti in acqua, mentre sono emissivi in etanolo. Questa è una caratteristica comune per i complessi di Ru(II) contenenti dppz o derivati del dppz,¹⁴⁻¹⁵ che è stata attribuita al legame o trasferimento di protoni verso gli atomi di azoto della fenazina.¹⁵ In accordo, la progressiva addizione di acqua a soluzioni etanoliche di **L14** e **L15** porta al progressivo spegnimento dell'emissione di fluorescenza (Fig. 5.10). Questa evidenza sperimentale mostra che le proprietà di emissione di questi complessi sono fortemente influenzati dal micro-intorno del gruppo dppz. Come già accennato precedentemente, a seguito di interazione con DNA in acqua e dell'intercalazione tra coppie di basi, l'emissione di **L14** e **L15** sarà ripristinata.

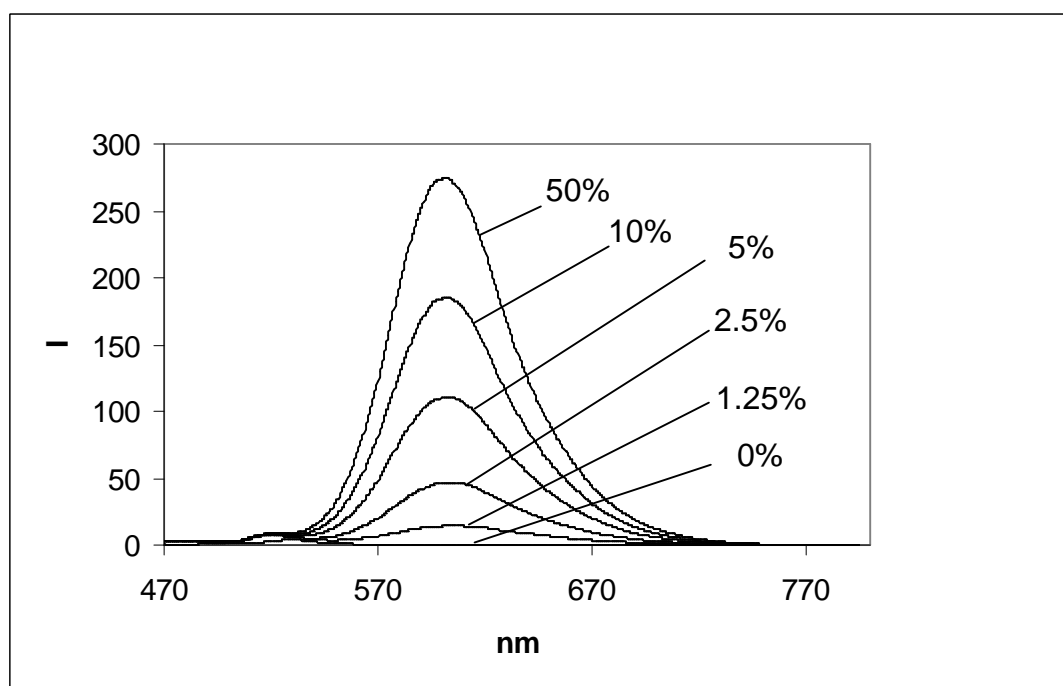


Fig. 5.10- Spettri di emissione di fluorescenza di **L14** in etanolo in presenza di diverse percentuali di acqua. Le percentuali sono riferite ai volumi dei solventi. T = 298 K.

5.3. Interazione dei complessi di Ru(II) L13-L15 con DNA

E' stato condotto uno studio dell'interazione con DNA naturale dei due complessi di rutenio **L14**=Ru(dppz)₂(44'TT) e **L15**=Ru(bipy)(dppz)(44'TT)], soli o in una forma in cui nel ciclo poliamminico (44'TT) veniva coordinato uno ione Cu²⁺. A scopo di confronto, è stata analizzata anche la reattività di un complesso di rutenio analogo, **L13**=Ru(bipy)₂(44'TT), dove entrambi i residui dppz sono sostituiti con leganti bipyridile, mentre l'anello poliamminico rimane invariato. L'analisi degli equilibri è stata condotta attraverso titolazioni sia di tipo spettrofotometrico che spettrofluorometrico. In ambedue i casi le titolazioni venivano svolte aggiungendo quantità crescenti di DNA direttamente nella cella contenente l'opportuno complesso di Rutenio. Gli spettri di assorbimento di **L13** non subiscono variazioni visibili per l'aggiunta di DNA, a dimostrare che la reattività di seguito decritta dei complessi **L14** e **L15** è fortemente legata alla presenza di almeno un residuo intercalante (dppz) e che nessun contributo apprezzabile al dato ottico misurato può provenire dalla eventuale (minoritaria) interazione tra polinucleotide e ciclo poliamminico, per lo meno nelle condizioni delle esperienze (I = 0.1M, pH = 7). Esperimenti di elettroforesi su gel hanno permesso di verificare se i complessi **L14** e **L15**, soli o coordinanti Cu²⁺, fossero o meno in grado di alterare la struttura secondaria del DNA fino, al limite, a produrre la rottura del legame fosfodiesterico.

E' in corso l'analisi cinetica dei diversi sistemi; vengono riportati qui di seguito i risultati preliminari sino ad ora ottenuti riguardanti il sistema **L14**/DNA.

TERMODINAMICA

L15 : Ru(dppz)(bipy)(44'TT)

Lo spettro di assorbimento del solo legante **L15** è mostrato in Fig. 5.11, (a). Aggiungendo DNA l'assorbanza tende a diminuire (b) finché, per grandi eccessi di polimero, si ha un leggero aumento di segnale (c). Lo spettro varia in modo più marcato nella regione intorno ai 350nm.

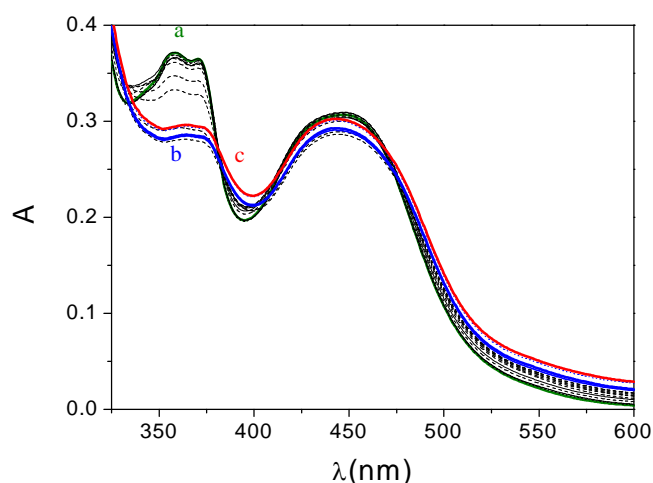


Fig. 5.11- Spettri di assorbimento UV-Visibile del sistema Ru(dppz)(bipy)(44TT)/DNA. $C_{Ru} = 2 \times 10^{-5} M$; $I = 0.1 M$ (NaCl); $pH = 7$; $T = 25^{\circ}C$; $C_{DNA} = 0 M$ (a) $7.7 \times 10^{-5} M$ (b) $2.5 \times 10^{-4} M$ (c).

La Fig. 5.12 mostra una curva di titolazione ottenuta per $\lambda = 357 nm$.

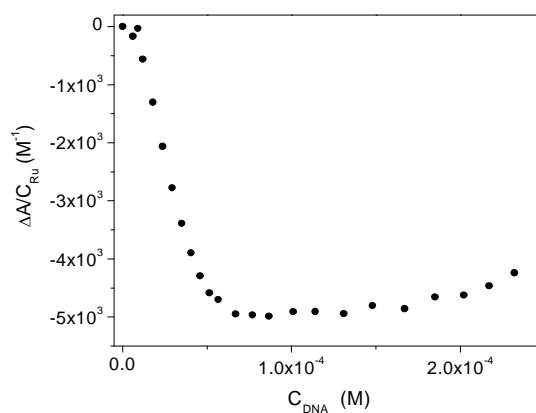


Fig. 5.12- Isotherma di binding del sistema Ru(dppz)(bipy)(44TT)/DNA. $C_{Ru(l)} = 2 \times 10^{-5} M$; $I = 0.1 M$; $pH = 7$; $T = 25^{\circ}C$.

Per quanto riguarda le misure di fluorescenza, usando come lunghezza d'onda di eccitazione $\lambda_{exc} = 400 nm$ in seguito all'aggiunta di polimero al colorante si osserva la nascita di una nuova banda centrata intorno a circa 610 nm (Fig. 5.13).

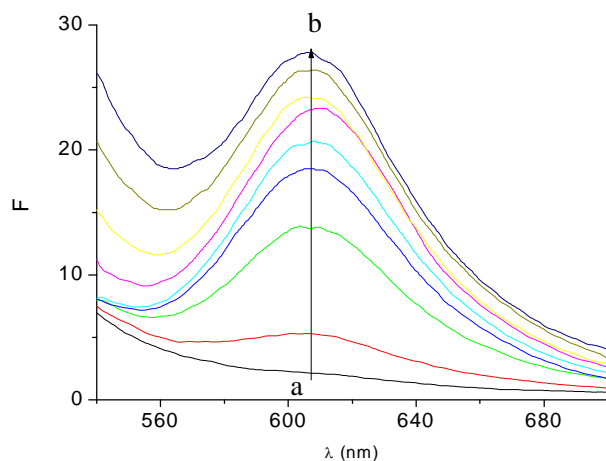


Fig. 5.13- Spettri di fluorescenza del sistema $\text{Ru}(\text{dppz})(\text{bipy})(44^*\text{TT})/\text{DNA}$. $C_{\text{Ru}} = 2.3 \times 10^{-6} \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$; $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$; $C_{\text{DNA}} = 0 \text{ M}$ (a), $2.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (b).

L'isoterma di binding ottenuta, misurata a $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$, appare ben delineata (Fig. 5.14); tuttavia non si osserva il raggiungimento del plateau che indica la fine del processo ma piuttosto una deviazione costante del segnale in salita. Questo comportamento indica la presenza di un secondo fenomeno, che si evidenzia in condizioni di eccesso di DNA.

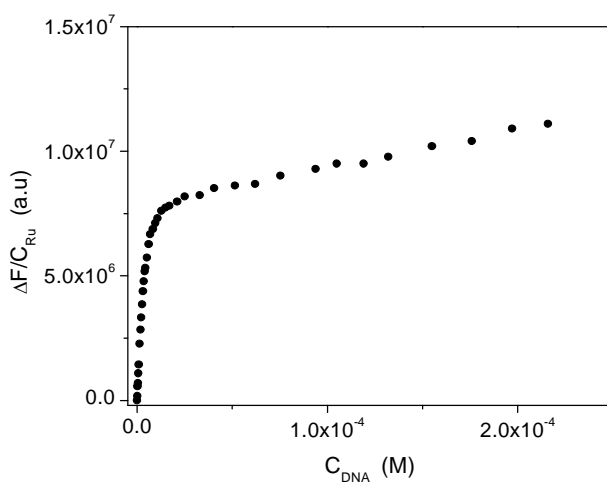


Fig. 5.14- Isotherma di binding ottenuta da un esperimento di titolazione spettrofluorimetrica per il sistema $\text{Ru}(\text{dppz})(\text{bipy})(44^*\text{TT})/\text{DNA}$. $C_{\text{Ru(l)}} = 2.3 \times 10^{-6} \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$; $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$.

Va notato che durante le titolazioni, in corrispondenza di concentrazioni di DNA superiori a quelle riportate nei grafici delle figure precedenti, si è osservata una precipitazione dei reagenti. E' dunque lecito supporre che la deriva osservata del segnale a fine titolazione (sia in assorbanza che in fluorescenza) possa essere imputata alla formazione di aggregati supramolecolari che costituiscono un primo stadio, ancora relativamente stabile in soluzione, della successiva crescita dell'aggregato che porta alla precipitazione vera e propria.

Tralasciando dunque la parte finale degli esperimenti e concentrandosi sui primi punti, ovvero quelli verosimilmente collegati al processo di binding colorante/polinucleotide vero e proprio, è possibile procedere con l'analisi quantitativa della reazione che può essere schematizzata come segue:



dove con P si intende una coppia di basi del DNA, con D una molecola di **L15** (ovvero del complesso di Rutenio).

Sulla base di una reazione semplice tipo quella di equazione (1), l'analisi del tratto iniziale dell'isoterma di binding può essere condotta tramite l'equazione di Hildebrand & Benesi non semplificata (Eq. (2)) che permette di stimare il valore della costante di equilibrio K per le reazione (1) di questo sistema.

$$\frac{C_{DNA} C_{Ru}}{\Delta A} + \frac{\Delta A}{\Delta \epsilon^2} = \frac{1}{\Delta \epsilon} (C_{DNA} + C_{Ru}) + \frac{1}{K \Delta \epsilon} \quad (2)$$

In (Eq. 2) C_{DNA} e C_{Ru} sono rispettivamente le concentrazioni analitiche totali del DNA e del complesso di Rutenio, $\Delta A = A - \epsilon_D C_{Ru}$ e $\Delta \epsilon = \epsilon_{PD} - \epsilon_D$ dove con ϵ_i si intende il coefficiente di estinzione molare della specie i; in particolare ϵ_D è noto a pari a A^0/C_D dove con A^0 si intende la lettura di assorbanza ottenuta per $C_{DNA} = 0$. L'Eq. (2) può essere applicata anche a esperimenti di

fluorescenza, semplicemente sostituendo rispettivamente a ΔA e $\Delta \epsilon$, $\Delta F = F - \phi_D C_{Ru}$ e $\Delta \phi = \phi_{PD} - \phi_D$ ($\phi_D = F^0/C_D$). L'analisi prevede una procedura iterativa dato che $\Delta \epsilon$ ($\Delta \phi$) non è noto. Nel termine di sinistra $\Delta A/\Delta \epsilon^2$ viene in prima approssimazione trascurato, successivamente $1/\Delta \epsilon$ viene calcolato come pendenza del plot $C_{DNA}C_{Ru}/\Delta A$ vs. $(C_{DNA} + C_{Ru})$ ed utilizzato per ri-calcolare il termine di sinistra e così via fino a convergenza.

Un esempio di trattamento secondo Eq. (2) è mostrato in Fig 5.15. Il valore ottenuto per la costante di equilibrio K , come rapporto tra pendenza ed intercetta della retta interpolante, è riportato in Tabella 5.2.

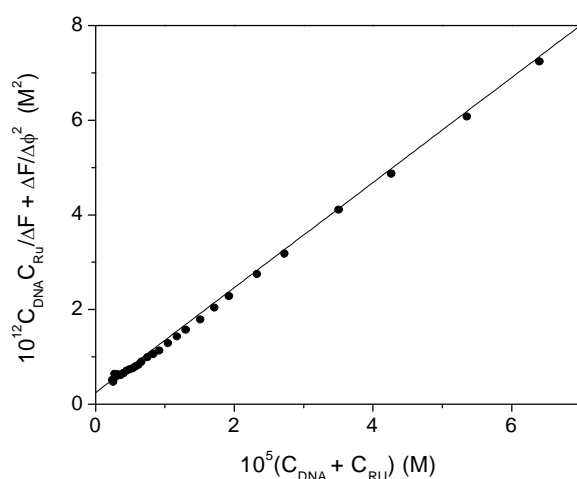


Fig. 5.15- Analisi secondo Eq. (2) di una titolazione spettrofluorimetrica per il sistema Ru(dppz)(bipy)(44TT)/DNA. $I = 0.1$ M; $\lambda_{exc} = 400$ nm; $\lambda_{em} = 610$ nm; pH = 7; T = 25°C.

Poiché le titolazioni di fluorescenza si sono mostrate più efficienti per l'analisi di questi sistemi, negli esperimenti successivi è stato preferito questo metodo per le valutazioni quantitative alle misure di assorbimento.

Poiché dati antecedenti di letteratura su sistemi analoghi a quello qui analizzato dove complessi di rutenio interagiscono con polinucleotidi,²⁷ hanno rivelato la presenza di fenomeni cooperativi, anche nel caso in questione abbiamo voluto verificare la presenza o meno di tali processi. In particolare, alla analisi semplificata ottenuta tramite Eq. (2) è seguita una

più complessa, svolta sulla base della equazione di McGhee e Von Hippel sotto riportata (Eq. (3)).

$$\frac{r}{[D]} = K_{GH} \times (1 - nr) \times \left(\frac{(2\omega + 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right)^{n-1} \times \left(\frac{1 - (n + 1)r + R}{2(1 - nr)} \right)^2 \quad (3)$$

dove

$$R = \sqrt{\{[1 - (n + 1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr)\}} \quad (4)$$

$r = [PD]/C_{DNA}$, $[D]$ è la concentrazione molare del complesso di rutenio libero all'equilibrio, n è la dimensione del sito e ω è il parametro di cooperatività. La dimensione del sito è definita come il numero di coppie di basi adiacenti inabilite a reagire ulteriormente per il fatto che una prima molecola di complesso si è inserita in una coppia di basi, ovvero $C_P/[PD]$ in condizioni di saturazione del polinucleotide. Il parametro di cooperatività è maggiore di uno in casi di cooperatività positiva (ovvero affinità che aumenta a mano a mano che cresce il numero di molecole che hanno interagito) ed è tanto più grande quanto il processo è cooperativo. Va puntualizzato che la costante di equilibrio ricavate tramite Eq. (3), K_{GH} , non coincide con la costante K ricavata tramite Eq. (2). K_{GH} è la costante di equilibrio per la formazione del complesso complesso/polimero per $r \rightarrow 0$, ovvero in condizioni in cui ciascun evento di binding avviene in maniera totalmente indipendente dal grado di occupazione del polimero ovvero dalla presenza o meno di altre molecole di colorante.

L'analisi secondo Eq. (3) prevede di costruire un grafico di $r/[D]$ vs. r attraverso i dati sperimentalmente ottenuti durante una titolazione: si ha infatti che $[PD] = \Delta F/\Delta\phi$ e $[D] = C_{Ru} - [PD]$. In Fig. 5.16 si può vedere il grafico di $r/[D]$ vs. r ottenuto nel caso del sistema $Ru(dppz)(bipy)(44^*TT)/DNA$.

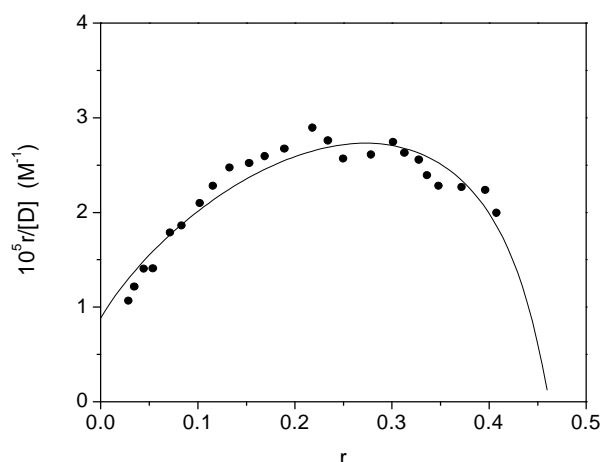


Fig. 5.16- Analisi secondo Eq. (3-4) di una titolazione spettrofluorimetrica per il sistema Ru(dppz)(bipy)(44'TT)/DNA. I = 0.1 M; λ_{exc} = 400 nm; λ_{em} = 610 nm; pH = 7; T = 25°C.

L'andamento a campana del grafico è indice della presenza di fenomeni cooperativi. Da un punto di vista quantitativo il trattamento secondo l'Eq. (3) fornisce i dati riportati in Tabella 5.2.

L15 e ione Cu(II) inserito nell'azamacrocilo: Ru(dppz)(bipy)(Cu44'TT)

Nel caso di questo sistema si è dovuto procedere in primo luogo con il controllare tramite misure di assorbanza l'effettiva formazione del complesso Ru(dppz)(bipy)(Cu44'TT) e le condizioni sperimentali necessarie. Si è dunque condotta una titolazione fatta aggiungendo la soluzione contenente lo ione Cu²⁺ (CuCl₂) sia nel campione che nel riferimento, ovvero in modo da correggere il risultato per l'eventuale contributo del rame all'assorbanza.

La concentrazione massima di rame raggiungibile è stata pari a 1.1×10^{-4} M. Le curve ottenute durante l'esperimento sono mostrate in Fig. 5.17.

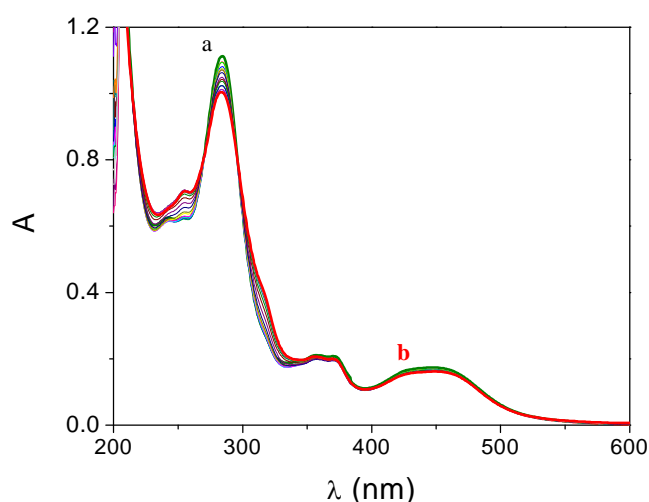


Fig. 5.17- Spettri di assorbimento del sistema Ru(dppz)(bipy)(Cu44TT). $C_{Ru} = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M}$; $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$; $C_{Cu} = 0 \text{ M}$ (**a**), $1.1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (**b**).

Analizzando i dati a 283 nm tramite una equazione del tutto analoga ad Eq. (2) è stato possibile determinare la costante relativa alla formazione del complesso metallico Ru(dppz)(bipy)(Cu44TT) che è risultata essere pari a $(1.0 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Tale valore permette di calcolare e confermare che mescolando in rapporto 1:1 lo ione Cu^{2+} e il legante (I) nelle condizioni di lavoro ($C_{Ru} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) si otteneva solo il 37% di complesso. Si è scelto per le misure successive di unire rame (II) e legante (I) in rapporto 5:1. In questo modo la formazione del complesso sale a circa l'80%, tuttavia, nasce l'inconveniente della presenza in soluzione di rame libero.

Durante la titolazione spettrofluorometrica della miscela 5:1 $\text{Cu}^{2+}:(\text{I})$ con DNA, eccitando a 400nm, si osserva come nel caso precedente la nascita di una banda a circa 610nm (Fig. 5.18).

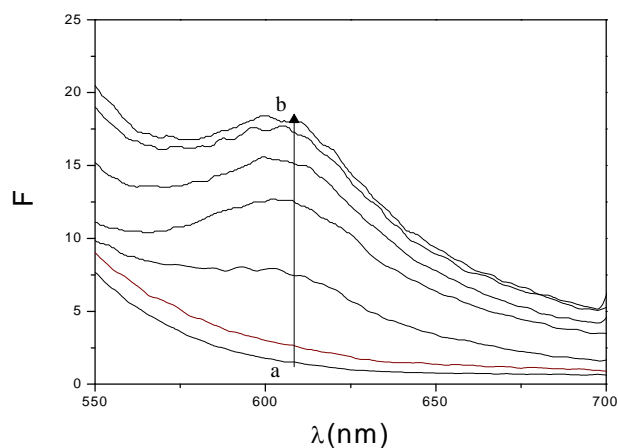


Fig. 5.18- Spettri di fluorescenza del sistema $[\text{Ru}(\text{dppz})(\text{bipy})(\text{Cu44}^{\text{TT}})]/\text{DNA}$ (Cu:Ru=5:1). $C_{\text{Ru}} = 9 \times 10^{-6} \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$; $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$; $C_{\text{DNA}} = 0 \text{ M}$ (a), $2.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (b).

L'isoterma di binding mostra un andamento analogo a quello già visto in assenza di rame (Fig. 5.19). La costante di binding K , ricavata tramite Eq. (2) è riportata in Tabella 5.2.

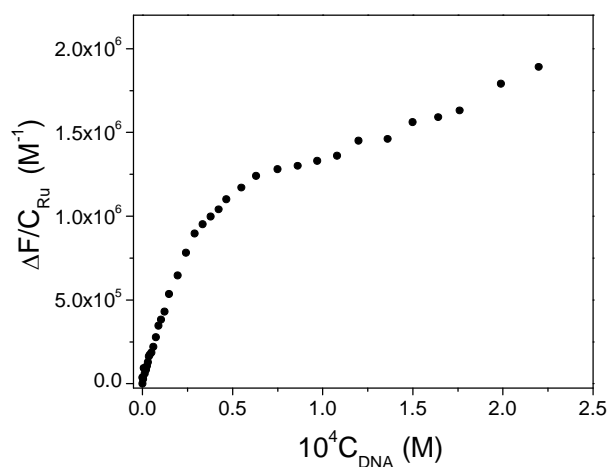


Fig. 5.19- Isoterma di binding del sistema $\text{Ru}(\text{dppz})(\text{bipy})(\text{Cu44}^{\text{TT}})/\text{DNA}$. $C_{\text{Ru}} = 9 \times 10^{-6} \text{ M}$; Cu:Ru=5:1; $I = 0.1 \text{ M}$; $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$.

La Fig. 5.20 mostra che nel caso presente un grafico di $r/[D]$ vs. r non presenta alcun andamento a campana. Questo sta ad indicare che la formazione del complesso di rame ha provocato una drastica diminuzione del carattere cooperativo dell'interazione del complesso di rutenio con il polinucleotide.

I punti sperimentali sono interpolabili, piuttosto che con Eq. (3), con l'equazione sotto riportata che concerne il trattamento secondo il modello di McGhee&von Hippel in assenza di cooperatività

$$\frac{r}{[D]} = K_{GH} \times \frac{(1 - nr)^n}{[1 - (n - 1)r]^{n-1}} \quad (5)$$

dove, mentre ovviamente scompare il parametro ω , permangono, con lo stesso significato di Eq. (3), K_{GH} e n . I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 5.2.

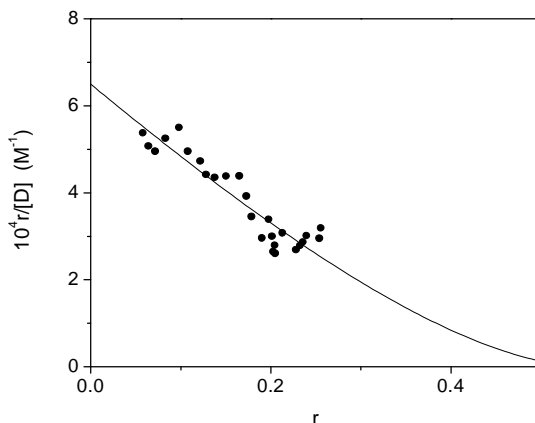


Fig. 5.20- Analisi secondo Eq. (5) di una titolazione spettrofluorimetrica per il sistema Ru(dppz)(bipy)(Cu44'TT)/DNA. I = 0.1 M; λ_{exc} = 400 nm; λ_{em} = 610 nm; pH = 7; T = 25°C.

L14: Ru(dppz)₂(44'TT)

La titolazione spettrofotometrica ha evidenziato che l'andamento spettrale e le variazioni ottenute durante la titolazione sono simili a quelle viste nel caso del legante **L15** (Fig. 5.21).

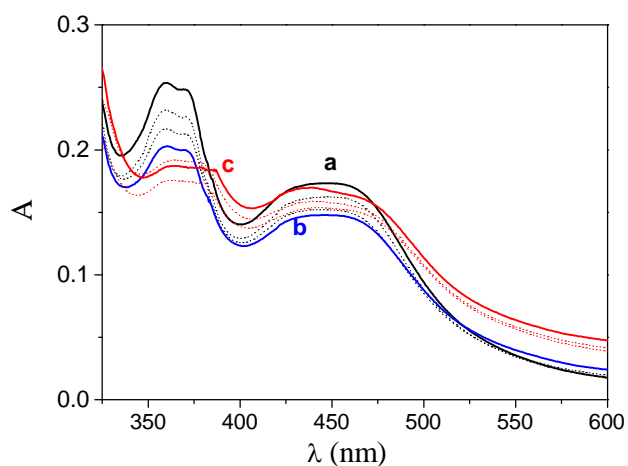


Fig. 5.21- Spettri di assorbimento UV-Visibile del sistema $\text{Ru(dppz)}_2(44'\text{TT})/\text{DNA}$. $C_{\text{Ru}} = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M}$; $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$; $C_{\text{DNA}} = 0 \text{ M}$ (a), $2.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ (b), $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ (c).

Se si analizza il sistema $\text{Ru(dppz)}_2(44'\text{TT})/\text{DNA}$ attraverso misure di fluorescenza, l'aggiunta di polimero a **L14** provoca variazioni più regolari, ovvero la nascita di una banda intorno ai 600nm (Fig. 5.22).

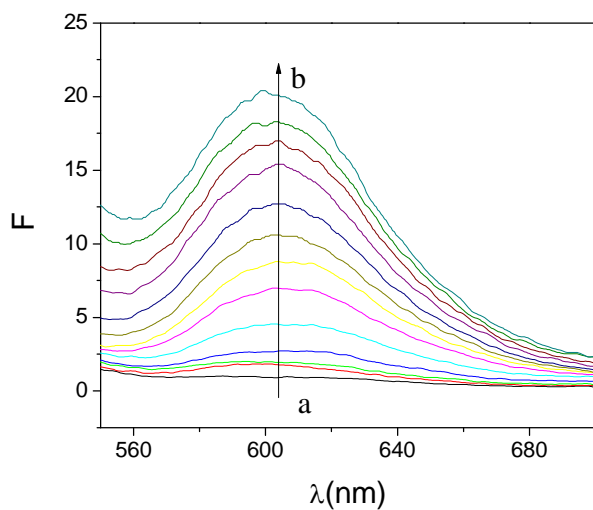


Fig. 5.22. Spettri di fluorescenza del sistema $\text{Ru(dppz)}_2(44'\text{TT})/\text{DNA}$. $C_{\text{D}} = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M}$; $\text{pH} = 7$; $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$; $T = 25^\circ\text{C}$; $C_{\text{P}} = 0 \text{ M}$ (a), $3.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (b).

L'isoterma di binding, misurata a $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$, appare simile a quanto osservato in precedenza (Fig. 5.23).

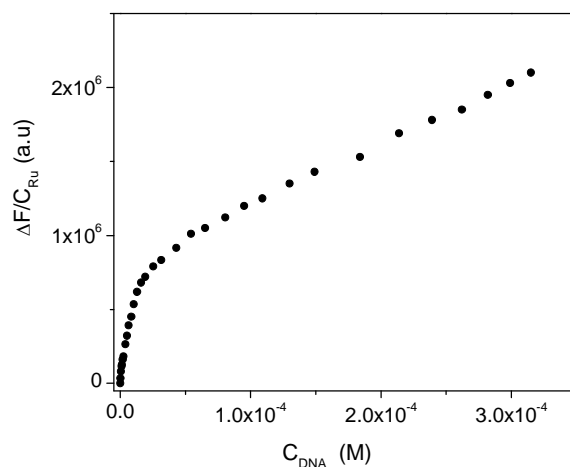


Fig. 5.23- Isoterma di binding del sistema $\text{Ru(dppz)}_2(44\text{TT})/\text{DNA}$. $C_D = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $I = 0.1 \text{ M}$; $\text{pH} = 7$; $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$; $T = 25^\circ\text{C}$.

Dall'analisi del tratto iniziale dell'isoterma di binding per mezzo Eq. (2) è possibile stimare il valore della costante di binding, K . Il valore ottenuto è riportato in Tabella 5.2.

In assenza di cooperatività (mancanza andamento a campana del grafico di Fig. 5.24), i dati sono stati analizzati anche attraverso Eq. (5); i parametri ottenuti si trovano anch'essi riuniti in Tabella 5.2.

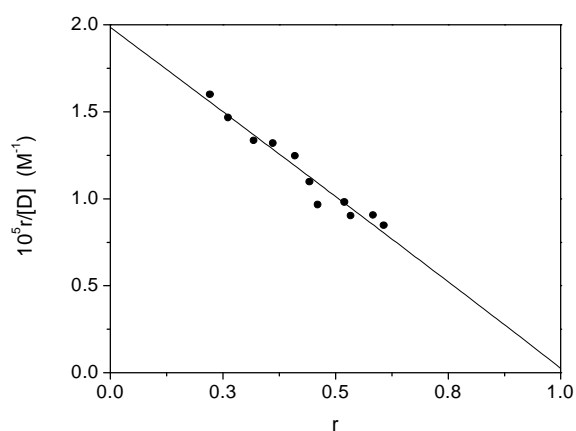


Fig. 5.24- Analisi secondo Eq. (5) di una titolazione spettrofluorimetrica per il sistema $\text{Ru(dppz)}_2(44\text{TT})/\text{DNA}$. $I = 0.1 \text{ M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$; $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$.

L14 e ione Cu(II) inserito nell'azamacrocilo: Ru(dppz)₂(Cu44'TT)

Sono state condotte titolazioni di fluorescenza in cui il DNA viene fatto interagire con Ru(dppz)₂(44'TT) complessato con lo ione Cu²⁺. La formazione del complesso Ru(dppz)₂(Cu44'TT) viene fatta per semplice mescolamento di quantità equimolecolari di ione Cu²⁺ e complesso di rutenio, poiché la costante di equilibrio per la formazione di detto complesso (logK = 8.82), calcolata per via potenziometrica, assicura la quantitatività della reazione.

Anche per il sistema Ru(dppz)₂(Cu44'TT)/DNA si osserva, al procedere della titolazione spettrofluorimetrica dove quantità crescenti di DNA vengono aggiunte alla cella contenente la soluzione di colorante, un aumento di una banda di emissione centrata intorno ai 600nm (Fig. 5.25).

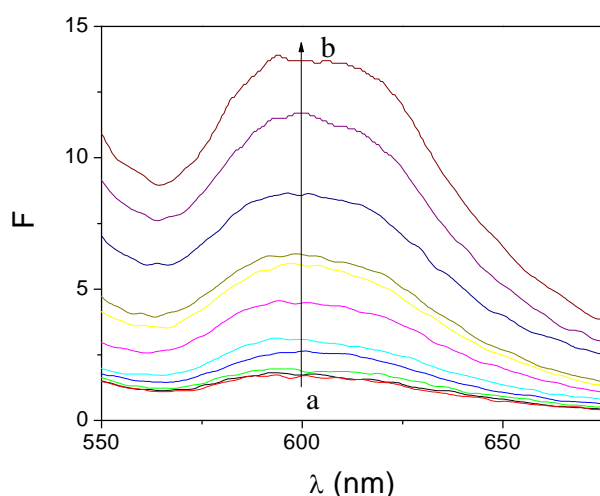


Fig. 5.25- Spettri di fluorescenza del sistema Ru(dppz)₂(Cu44'TT)/DNA. C_{Ru} = 1·10⁻⁵ M; C_{Cu}:C_{Ru} = 1:1; I = 0.1 M; pH = 7; λ_{exc} = 450 nm; T = 25°C; C_P = 0 M (a), 2·10⁻⁴ M (b).

L'isoterma di binding costruita a partire dai dati della titolazione spettrofluorimetrica (Fig. 5.26) mostra un andamento molto simile a quello osservato quando non è presente il rame.

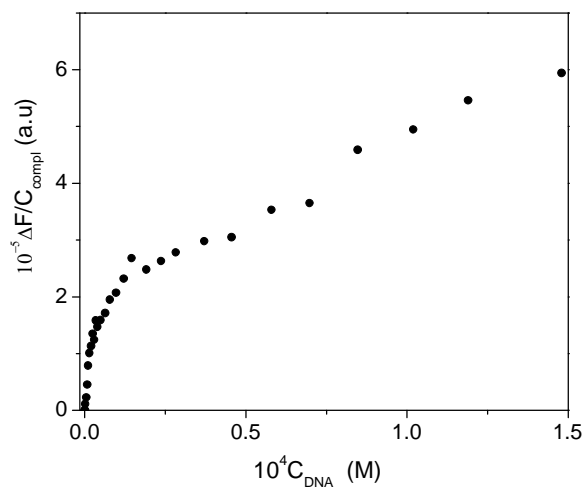


Fig. 5.26- Isotherma di binding del sistema Ru(dppz)₂(Cu44^{TT})/DNA. $C_{Ru} = 1 \cdot 10^{-5}$ M; $C_{Cu}:C_{Ru} = 1:1$; $I = 0.1$ M; $pH = 7$; $\lambda_{exc} = 450$ nm; $\lambda_{em} = 600$ nm; $T = 25^\circ C$.

La costante relativa alla parte iniziale della titolazione è riportata in Tabella 5.2. Nuovamente anche in questo sistema non viene evidenziata alcuna cooperatività (Fig. 5.27) e l'analisi viene condotta anche attraverso Eq. (5). I parametri ottenuti sono raccolti in Tabella 5.2.

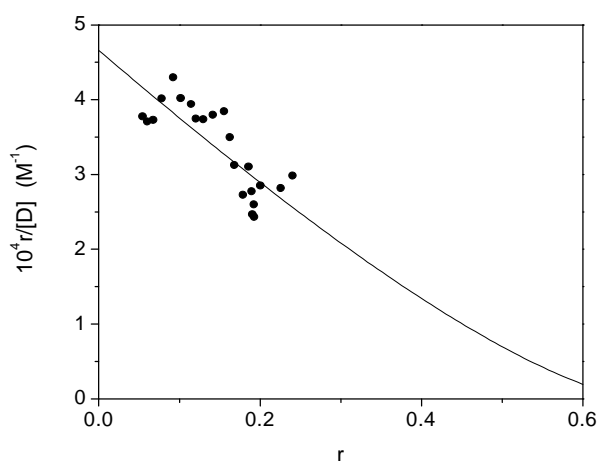


Fig. 5.27- Analisi secondo Eq. (5) di una titolazione spettrofluorimetrica per il sistema Ru(dppz)₂(Cu44^{TT})/DNA. $I = 0.1$ M; $\lambda_{exc} = 400$ nm; $\lambda_{em} = 600$ nm; $pH = 7$; $T = 25^\circ C$.

Tabella 5.2. Parametri di reazione per l'interazione con il DNA dei due complessi Ru(dppz)(bipy)(44'TT) (I) e Ru(dppz)₂(44'TT) (II). I = 0.1 M, pH = 7, T = 25°C.

	K (M ⁻¹)	K _{GH} (M ⁻¹)	n	ω
L15 /DNA	(4.6 ± 0.2)×10 ⁵	(8.0 ± 0.6)×10 ⁴ ^a	2.2 ± 0.1	12 ± 1
Cu L15 /DNA	(3.3 ± 0.3)×10 ⁴	(6.5 ± 0.2)×10 ⁴ ^b	1.8 ± 0.1	-
L14 /DNA	(2.1 ± 0.1)×10 ⁵	(2.0 ± 0.1)×10 ⁴ ^b	0.99 ± 0.03	-
Cu L14 /DNA	(3.2 ± 1.0)×10 ⁴	(4.7 ± 0.2)×10 ⁴ ^b	1.5 ± 0.1	-

^a Equazione (3); ^b Equazione (5)

Si noti come tanto più n si avvicina al valore di uno, quanto più K coincide con K_{GH}. In effetti la costante K, ottenuta secondo il modello più semplice, prevede la non interazione (ovvero deformazione) di siti vicini e dunque n = 1.

MISURE DI ELETTROFORESI SU GEL

Sono state effettuate delle misure di elettroforesi su gel di agarosio (1%) del DNA mescolato ai complessi **L14** e **L15** e con i loro complessi di rame(II), sia in presenza che in assenza di H₂O₂. E' noto infatti che alcuni metallo-intercalatori producono cleavage nei confronti del DNA in presenza di perossidi. Sono state preparate soluzioni contenenti **L15**/DNA, **L14**/DNA, [Cu:**L15**] (5:1)/DNA e [Cu:**L14**] (1:1)/DNA con concentrazioni di acido nucleico simili (2÷3×10⁻⁴M). Ad aliquote di suddette soluzioni è stata aggiunta H₂O₂ (conc finale nel pozzetto 1.8×10⁻³M). Le corse elettroforetiche sono state eseguite ad almeno 48h di distanza dal mescolamento dei reagenti, in modo che avesse modo di avvenire l'eventuale cleavage del DNA. Fotografie di esperimenti di corsa elettroforetica sono mostrati in Fig. 5.28.

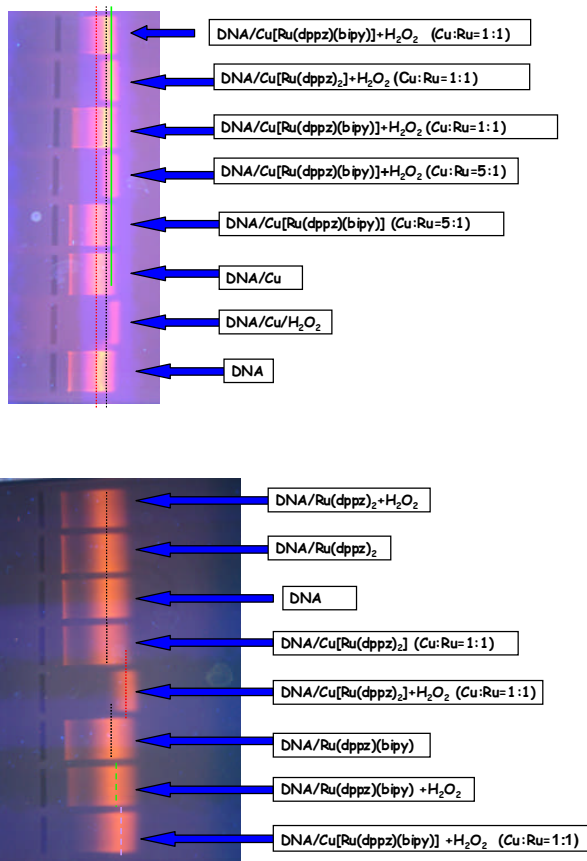


Fig.5.28- Elettroforesi su gel di diverse miscele con DNA dei due leganti Ru(dppz)(bipy)(44^{TT}) e Ru(dppz)₂(44^{TT})/DNA coordinanti Cu²⁺, in assenza o in presenza di acqua ossigenata. I = 0.1 M; pH = 7; T = 25°C, 50mA, 65V, gel 1%.

In ogni caso si è verificato che solo soluzioni in cui siano presenti contemporaneamente H₂O₂ e Cu mostrano una mobilità maggiore delle altre, indice di una avvenuta frammentazione del polimero. Tuttavia non si è notata alcuna modificazione del profilo caratteristico delle bande mescolando il DNA con i complessi **L14** e **L15** sia in presenza che in assenza di rame. Inoltre, miscele di DNA con complesso di rutenio coordinante Cu²⁺ in presenza di acqua ossigenata, pur mostrando frammentazione, non mostrano risultati diversi da quelli ottenuti quando il complesso di rutenio non sia presente.

CINETICA

E' stato condotto uno studio cinetico dell'interazione del $\text{Ru}(\text{dppz})_2(44'\text{TT})$ (**L14**) con DNA attraverso la tecnica stopped-flow con rivelazione in assorbanza ($\lambda = 360\text{nm}$). Si sono registrate le curve cinetiche assorbanza vs. tempo per diverse concentrazioni di complesso di rutenio (C_{Ru}) e DNA (C_{DNA}), sempre in condizioni di eccesso di DNA ($C_{\text{DNA}} > 8 \times C_{\text{Ru}}$). I campi delle singole concentrazioni di colorante e polinucleotide utilizzati sono $C_{\text{Ru}} = 4.1 \times 10^{-6} \div 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $C_{\text{DNA}} = 5.0 \times 10^{-5} \div 2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$. Le curve ottenute sono tutte di tipo biesponenziale (Fig. 5.29).

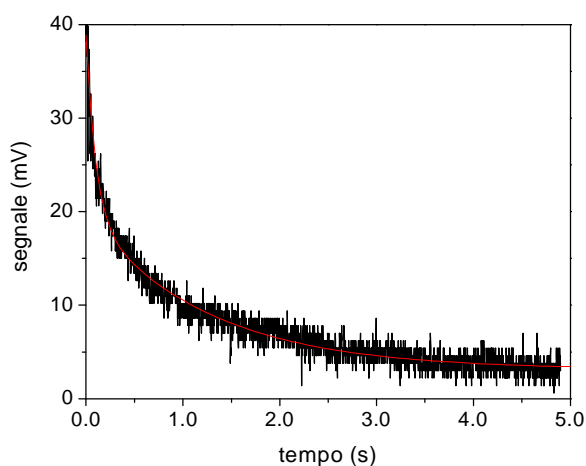


Fig. 5.29- Curva cinetica stopped-flow per il sistema $\text{Ru}(\text{dppz})_2(44'\text{TT})/\text{DNA}$. $C_{\text{Ru}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, $I = 0.1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7$, $\lambda = 360\text{nm}$, $T = 25^\circ\text{C}$.

Le curve cinetiche sono state analizzate tramite interpolazione con una funzione del tipo $y = A_0 + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$, operazione che ha permesso di ricavare i valori numerici delle due costanti di tempo rispettivamente per l'effetto cinetico veloce, $1/\tau_1$, e per l'effetto lento, $1/\tau_2$. Ciascun esperimento è stato ripetuto dieci volte. I valori di $1/\tau$ utilizzati per i calcoli successivi sono quelli ricavati tramite una procedura di accumulazione delle curve che ha permesso di aumentare il rapporto segnale/rumore e dunque diminuire gli errori ed ottenere valori medi.

Gli andamenti ottenuti delle costanti di tempo sono i seguenti:

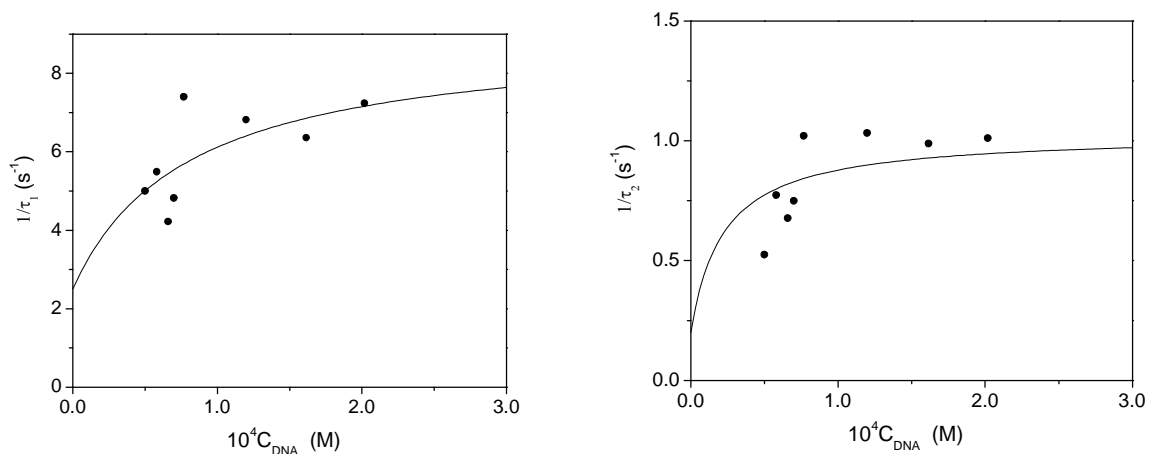


Fig. 5.30- Dipendenza della costante di tempo per l'effetto veloce, $1/\tau_1$, e per l'effetto lento, $1/\tau_2$, dalla concentrazione del reagente in eccesso (C_{DNA}) per il sistema $Ru(dppz)_2(44^*TT)/DNA$. $I = 0.1$ M, $pH = 7$, $\lambda = 360nm$, $T = 25^\circ C$.

Un tale risultato sperimentale è in accordo con un modello del tipo



dove P è una coppia di basi del DNA, D è il complesso di rutenio, P,D è una forma pre-intercalata di complesso polinucleotide/legante, mentre PD_1 e PD_2 sono due forme diversamente intercalate; inoltre, nello schema di reazione (6), K_0 è la costante di equilibrio per la formazione di P,D, k_i è la costante cinetica per la formazione di PD_i e k_{-i} è la costante cinetica per la dissociazione di PD_i .

Gli andamenti sperimentali vengono interpolati, sulla base dello schema (6) ovvero con le equazioni (7) e (8).

$$\frac{1}{\tau_1} = \frac{K_0 k_1 C_P}{1 + K_0 C_P} + k_{-1} \tag{7}$$

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{K_f k_2 C_P}{1 + K_f C_P} + k_{-2} \quad (8)$$

dove $K_f = K_0(1+K_1) = K_0(1+k_1/k_{-1})$. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 5.3.

Tabella 5.3. Parametri cinetici di reazione per l'interazione con il DNA di Ru(dppz)₂(44'TT) (II). I = 0.1 M, pH = 7, T = 25°C.

10 ⁻⁵ K (M ⁻¹) ^a	10 ⁻⁴ K ₀ (M ⁻¹)	K ₁ b	K ₂ c	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)	k ₋₁ (s ⁻¹)	k ₋₂ (s ⁻¹)
1.8±1.6	1.3±0.5	2.6±1.0	4.1±0.3	6.5±2.4	0.83±0.06	2.5±0.5	0.2±0.1

^a K = K₀(1+K₁(1+ K₂)); ^bK₁ = k₁/k₋₁; ^cK₂ = k₂/k₋₂.

Si noti che, nonostante l'errore relativamente elevato con il quale si sono ricavati i parametri cinetici, si ha un buon accordo tra il valore della costante di equilibrio complessiva K ottenuta tramite combinazione dei parametri cinetici e quello misurato direttamente tramite le titolazioni (K = 2.1×10⁵, Tabella 5.2).

CONCLUSIONI

I complessi di rutenio analizzati **L14** e **L15** interagiscono con il DNA naturale. Specialmente grazie alla tecnica di fluorescenza si è potuto analizzare il modo di binding principale del complesso di rutenio al DNA, interazione che ha luogo quando esistono in soluzione quantità comparabili di complesso e di polinucleotide (concentrazioni in coppie di basi).

In condizioni di eccesso di polinucleotide si verificano fenomeni di aggregazione supramolecolare che possono sfociare nella precipitazione dei reagenti. E' interessante notare come questo effetto sia osservabile in modo pressoché identico per i due complessi **L14** e **L15**, sia in assenza che in presenza di rame. Questo implica che non sia necessaria la presenza di due distinti residui dppz alla formazione degli aggregati.

Per quanto riguarda il binding del complesso al DNA, in accordo con le proprietà già note da letteratura pregressa circa il residuo dppz, il fenomeno di diminuzione di assorbimento di luce (ipocromismo) e quello di aumento della banda di fluorescenza del complesso (dato dall'allontanamento di molecole di solvente, che provocano un quenching di segnale emesso, al momento dell'intercalazione) insieme al valore della dimensione del sito n risultata in genere maggiore di uno concordano nell'indicare che l'interazione più plausibile per tutti i sistemi analizzati è una intercalazione.

La reazione di intercalazione in una certa coppia di basi del DNA produce una deformazione della struttura del DNA che si propaga nelle coppie di basi vicine. Questo fa sì che, anche in condizione di completa saturazione non tutte le coppie di basi ma solo una ogni n (dove n è la dimensione del sito) possano essere occupate. Questo fenomeno, detto del sito escluso, prevede che n sia maggiore di uno.

D'altra parte, per lo meno nel caso del complesso di rutenio con due dppz **L14** che è stato analizzato anche da un punto di vista cinetico, pare più plausibile parlare di intercalazione parziale. Infatti, il valore della K_0 ricavato (Tabella 5.3), relativo alla formazione del pre-intercalato P,D, risulta essere molto elevato e predominante rispetto alle costanti dei successivi step intercalativi. Questo non deve sorprendere, dato l'elevato ingombro sterico dei complessi di Rutenio analizzati, che non permette ad un singolo residuo dppz la libertà necessaria ad un inserimento più profondo nella doppia elica.

E' importante notare che solo il sistema in cui è presente un solo residuo dppz, in assenza di ione rame nel macrociclo, presenta fenomeni di cooperatività. Questo porta a due conclusioni. In primo luogo, sebbene il contributo diretto della presenza dell'azamacrociclo non è stato evidenziato da misure spettrofotometriche circa l'interazione del complesso **L13** con DNA, tale contributo deve comunque essere non trascurabile poiché il riempimento o meno del ciclo poliamminico produce differenze di reattività. In secondo luogo, si può ragionevolmente presumere che, in assenza di un secondo dppz maggiormente ingombrante, il complesso **L15** può trovarsi ad occupare lungo il DNA posizioni più vicine, tanto vicine che non è più

trascurabile una interazione legante/legante che sarebbe alla base della cooperatività. Tale ipotesi è in corso di conferma attraverso calcoli teorici.

Le costanti di equilibrio dei sistemi in cui il macrociclo sia stato riempito da uno ione rame sono significativamente inferiori a quanto ottenuto nel caso del complesso di rutenio tal quale. Questo fatto conferma ulteriormente il fatto che il complesso azamacrociclico contribuisce alla reattività del sistema. La ridotta affinità è in accordo con la aumentata rigidità del sistema quando questo viene a coordinare lo ione metallico.

Purtroppo nessuno dei due complessi analizzati, tal quali o uniti a rame(II), ha fino ad ora mostrato la capacità di produrre alterazioni consistenti della struttura secondaria del polinucleotide. Effetti di aumentata mobilità di DNA si osservano solo in presenza di acqua ossigenata, ma tale mobilità non è sensibilmente differente da quella del polinucleotide in presenza della sola miscela $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ed in assenza di **L14** o **L15**.

5.4. Equilibri di interazione di L16 con DNA

L'interazione di **L16** con DNA è stata studiata mediante misure di fluorescenza e le condizioni di concentrazione di **L16** ($1.97 \cdot 10^{-6}\text{M}$) e a pH 7 nelle quali sono state fatte le misure, sono state scelte in maniera da evitare l'autoaggregazione di **L16**, sulla base delle informazioni di un precedente lavoro dove si riporta l'interazione del legante libero e del suo complesso di Zn(II) con l'acido nucleico. ¹⁰

TERMODINAMICA

L'interazione con il DNA è evidenziata da cambiamenti degli spettri di fluorescenza che avvengono aggiungendo aliquote crescenti di DNA a una soluzione di **L16**.

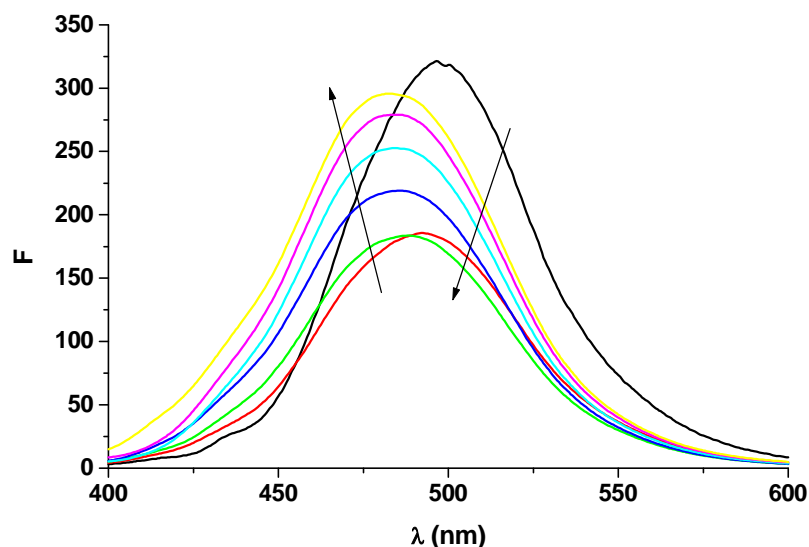


Fig. 5.31- Spettri di emissione di fluorescenza registrati durante la titolazione spettrofluorimetrica del sistema DNA/**L16** : I=0.11M (NaCl), pH=7 (NaCac 0.01M), T=298K $C_{Dye} = 1.97 \cdot 10^{-6}M$

E' stato scelto di eccitare il complesso alla lunghezza d'onda $\lambda_{exc}=380$ nm e di monitorare l'emissione a $\lambda_{em}=500$ nm. All'aumentare della concentrazione di DNA si assiste prima ad una diminuzione dell'intensità di fluorescenza e successivamente a un aumento di questa con il contemporaneo spostamento dell'emissione verso lunghezze d'onda minori (Fig. 5.31) L'andamento della titolazione può essere evidenziato per mezzo dell'isoterma di binding (Fig. 5.32) in cui viene riportata la differenza tra il segnale di fluorescenza misurato e quello iniziale (ΔF) rapportata alla concentrazione di colorante C_D , rispetto alla concentrazione di DNA.

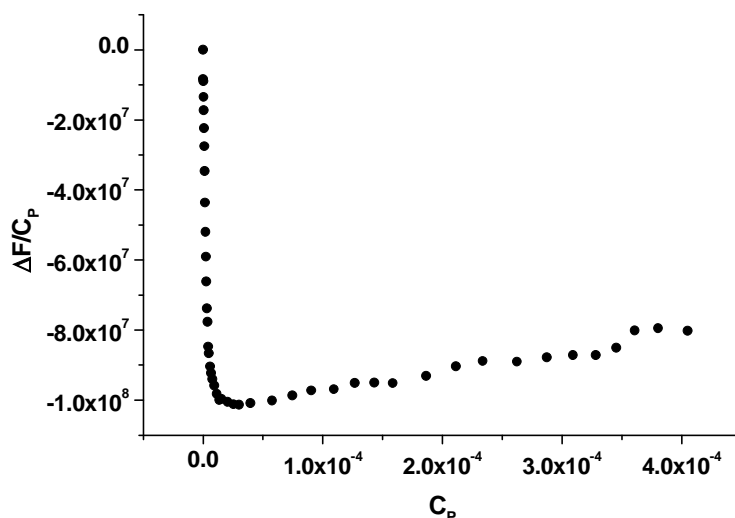


Fig. 5.32- Titolazione spettrofluorimetrica per il sistema DNA/**L16**. $C_D=1 \cdot 10^{-6}M$, I=0.11M, (NaCl), pH=7 (NaCac 0.01M), T=298K

L'isoterma conferma l'andamento bifasico della titolazione già evidenziato dall'analisi degli spettri, indicando la complessità del processo di interazione tra **L16** e DNA. I dati relativi ai rami (1) e (2) dell'isoterma in Fig. 5.32 sono stati elaborati applicando l'equazione (eq. 9), che viene qui riportata

$$\frac{\Delta F}{C_D} = \frac{K\Delta\phi[P]}{1 + K[P]} \quad (9)$$

C_D è la concentrazione totale del legante, $[P]$ è il polinucleotide libero. Si utilizza una procedura iterativa in cui in prima approssimazione $[P] = C_P$, si calcola K che viene usato per determinare $[P]$, e si procede fino a convergenza. Per (1) poiché C_P è piccolo, sono necessarie 4-5 iterazioni per arrivare a convergenza, mentre per (2), dove C_P è maggiore, è sufficiente una iterazione. Inoltre per il ramo (2) l'eq. 9 diventa

$$\frac{\Delta F}{C_D} = \frac{K\Delta\phi[P]}{1 + K[P]} + \text{cost} \quad (10)$$

Sono state ripetute più titolazioni nelle stesse condizioni sperimentali (pH e forza ionica, temperatura). I valori medi ottenuti sono riportati in Tabella 5.4.

Allo scopo di valutare la dipendenza dalla temperatura dei parametri di equilibrio del sistema DNA/**L16** sono state eseguite titolazioni spettrofotometriche e spettrofluorimetriche alle temperature di 14, 18, 25, 32, 34 e 40°C. I valori della costante di equilibrio K ottenuti sono riassunti nella Tabella 5.4

Tabella 5.4 Parametri di equilibrio per il sistema DNA/**L16**. $I=0,11M$ (NaCl), $pH=7$ (NaCac 0,01M).

T (°C)	K_1 (M ⁻¹)	K_2 (M ⁻¹)
14	$(5.6 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(3.3 \pm 0.6) \cdot 10^4$
18	$(6.6 \pm 1.2) \cdot 10^5$	$(3.9 \pm 0.3) \cdot 10^4$
25	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(1.9 \pm 0.3) \cdot 10^4$
32	$(6.4 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(1.5 \pm 1.5) \cdot 10^3$
34	$(5.9 \pm 0.3) \cdot 10^5$	$(7.7 \pm 1,2) \cdot 10^3$
40	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(5.3 \pm 5.2) \cdot 10^2$

La dipendenza dei parametri di equilibrio dalla temperatura è stata analizzata secondo la forma integrata dell'equazione di Vant'Hoff

$$\ln K = \text{cost} - \frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} \quad (11)$$

dove K rappresenta la costante di equilibrio della reazione, ΔH° La variazione di entalpia molare standard, R la costante dei gas in Joule mol⁻¹K⁻¹, T la temperatura espressa in gradi Kelvin e cost è uguale a $\Delta S^\circ/R$.

Riportando in grafico il logaritmo naturale della costante di equilibrio in funzione del reciproco della temperatura assoluta, si ottiene l'andamento lineare mostrato in Fig. 5.33.

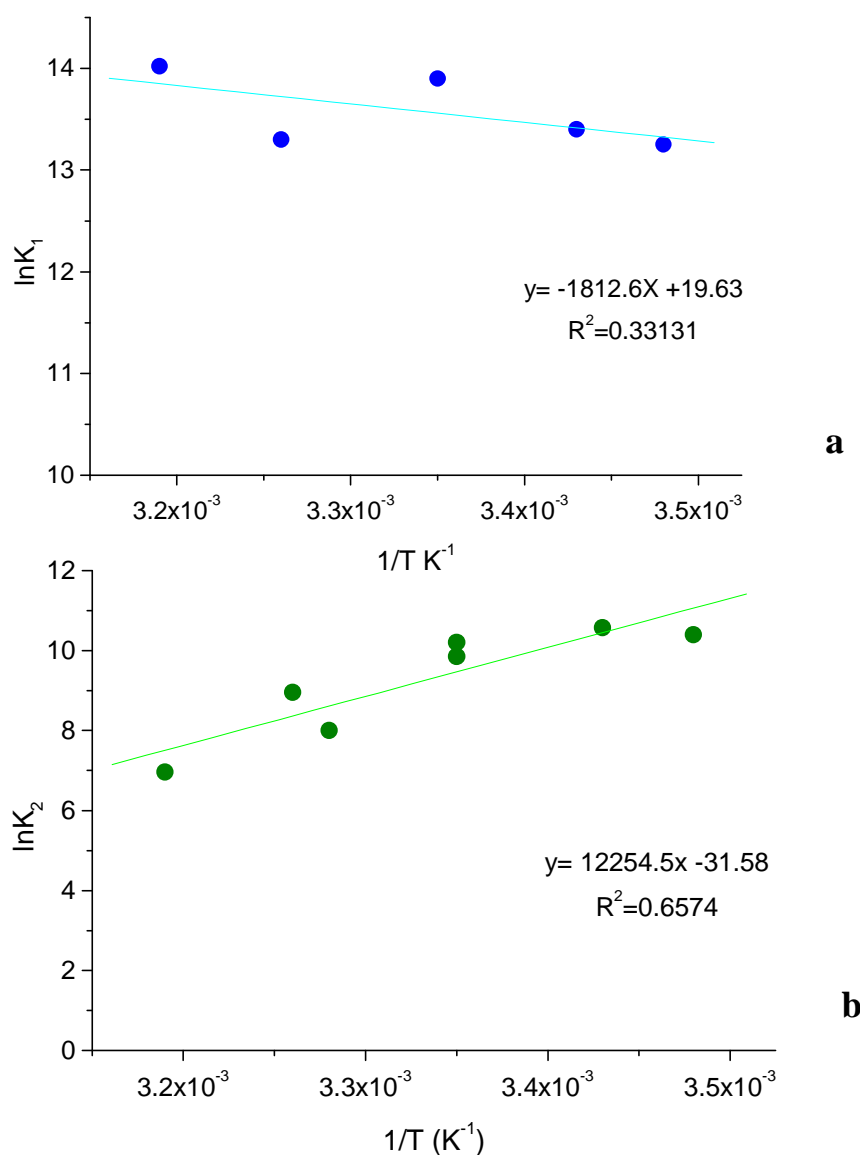


Fig. 5.33- Andamento di $\ln K_1$ (a) e di $\ln K_2$ (b) in funzione di $1/T$ per il sistema DNA/**L16**. I=0,11M (NaCl), pH=7 (NaCac 0,01M).

I valori di ΔH° e di ΔS° ricavati per K_1 e K_2 sono riportati in Tabella 5.5.

Tabella 5.5- Parametri termodinamici per il sistema DNA/**L16**. I=0,11M (NaCl), pH=7(NaCac 0,01M).

	$\Delta H^\circ (KJmol^{-1})$	$\Delta S^\circ (JK^{-1}mol^{-1})$
K_1	3.426	38.27
K_2	-26.147	-69.04

Considerando il grafico di Chaires (Fig. 5.34),²⁸ che riporta ΔH° in funzione di $-T\Delta S^\circ$ per una serie di molecole coloranti interagenti con DNA, e i risultati da noi ottenuti è possibile affermare che il primo modo di interazione, di natura endotermica, rientra tra i casi di interazione esterna con il DNA, mentre il secondo modo, altamente esotermico, è senza dubbio associabile a un processo intercalativo.

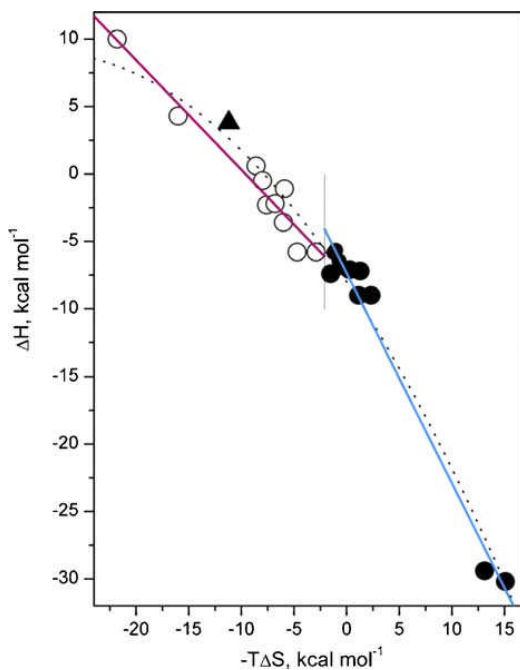
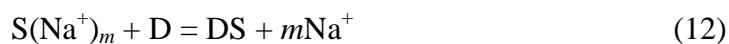


Fig. 5.34- Grafico di Chaires.

L'interazione fra **L16** e il DNA è una reazione che intercorre tra specie cariche, poiché sulla molecola di legante è presente una carica positiva, dovuta alla protonazione, nelle nostre condizioni sperimentali (pH 7), dell'atomo di azoto del gruppo proflavinico intercalante,¹⁰ mentre il DNA porta una carica negativa su ogni gruppo fosfato. Queste cariche negative determinano un intorno in cui si addensano i controioni, nel nostro caso ioni Na⁺, che formano una nube ionica lungo la catena del polinucleotide. Nel momento in cui una molecola di **L16** interagisce con il DNA, verranno spostate un certo numero di cariche positive. Si presume dunque che esista una dipendenza della costante di equilibrio dalla concentrazione salina del mezzo.

Se indichiamo con S(Na⁺)_m un sito del DNA con i suoi controioni, con D il legante, con DS il complesso che si forma in seguito all'interazione e con m il numero di ioni sodio spostati, la reazione di complessazione può essere scritta come



Potremo definire una costante di equilibrio K' secondo la relazione

$$K' = \frac{[DS][\text{Na}^+]^m}{[S(\text{Na}^+)_m][D]} \quad (13)$$

ovvero:

$$K' = K[\text{Na}^+]^m \quad (14)$$

dove K è la costante di complessazione che ricaviamo dalle titolazioni spettrofluorimetriche e spettrofotometriche.

Passando alla forma logaritmica, si ottiene

$$\log K' = \log K + m \log [\text{Na}^+] \quad (15)$$

e, riarrangiando

$$\log K = \log K' - m \log [\text{Na}^+] \quad (16)$$

Questa equazione è stata derivata dalla teoria di Record (1978) secondo la quale i polinucleotidi in soluzione possono essere assimilati ad un cilindro carico negativamente circondato da un'atmosfera di controioni positivi.

Nel caso presente, lo studio della dipendenza della costante di equilibrio dalla concentrazione salina è stato realizzato conducendo titolazioni a diversa concentrazione di NaCl (da 0,002 M a 1 M). I risultati mostrano chiaramente un progressivo aumento della costante di equilibrio al diminuire della forza ionica (Tabella 5.6). Questo andamento conferma l'esistenza di una interazione elettrostatica tra le cariche positive del legante **L16** e le cariche negative dei gruppi fosfato dello scheletro del DNA. Al diminuire della forza ionica le cariche negative distribuite lungo la doppia elica del DNA risultano meno schermate dagli ioni positivi del sale (Na⁺) e di conseguenza l'interazione con le cariche positive del **L16** risulta favorita.

Tabella 5.6- Parametri di equilibrio per il sistema DNA/L13 a diversi valori di forza ionica. pH=7, T=25°C.

I (M)	K₁ (M⁻¹)	K₂ (M⁻¹)
0,002	(1,7 ± 0,4)×10 ⁷	(2,7 ± 0,3)×10 ⁵
0,01	(1,1 ± 0,2)×10 ⁶	(1,9 ± 0,3)×10 ⁴
0,11	(7,5 ± 0,4)×10 ⁵	(2,7 ± 0,3)×10 ⁴
1	(7,8 ± 0,2)×10 ⁴	-

Riportando in grafico i valori di logK in funzione di -log[Na⁺], si osserva l'andamento lineare mostrato in Fig. 5.35.

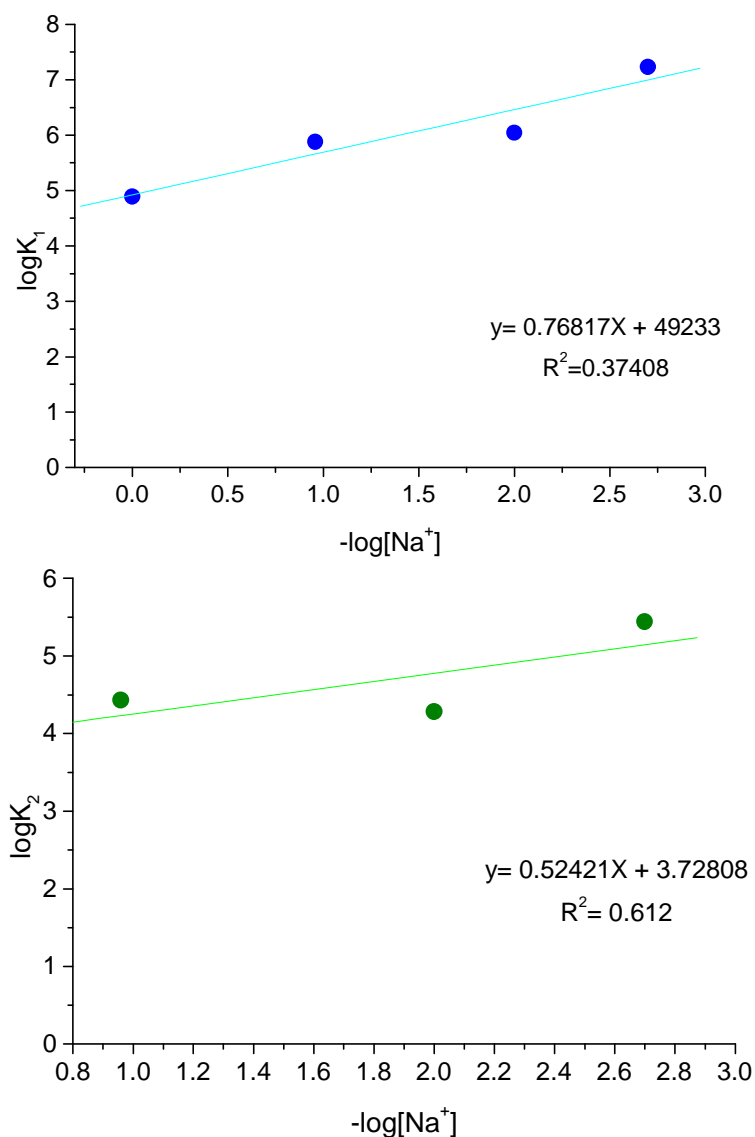


Fig. 5.35- Andamento di $\log K$ in funzione di $-\log[\text{Na}^+]$ per il sistema DNA/**L16**. pH=7, T=25°C.

La pendenza della retta fornisce m , ovvero il numero di controioni che vengono spostati dal polimero in seguito all'intercalazione del legante. Il valore di m ottenuto è pari a 0.646 per K_1 e 0.596 per K_2 quindi ciascuna molecola di **L16** che si complessa con un paio di basi di DNA sposta circa 0.6 ioni sodio, ossia sono necessarie due molecole di **L16** per spostare uno ione sodio. Questo fenomeno si verifica solitamente per molecole aromatiche estese che presentano una parziale intercalazione tra coppie di basi del DNA. La costante relativa al primo modo di interazione (K_1), mostra una più marcata dipendenza dalla forza ionica di quella (K_2) relativa al secondo modo. Ciò è in accordo con la natura bifasica del processo che prevede una prima

interazione esterna, dove la carica positiva di **L16** interagisce più direttamente con i controioni situati esternamente alla doppia elica.

Per valutare se esiste una reazione di tipo irreversibile tra **L16** e DNA sono stati registrati spettri di assorbimento U.V.-visibile a tempi diversi fino a un tempo massimo di otto giorni.

In Fig. 5.36 sono riportati gli spettri differenza tra il sistema **L16**/DNA e **L16** a tempi successivi per le regioni U.V. e visibile.

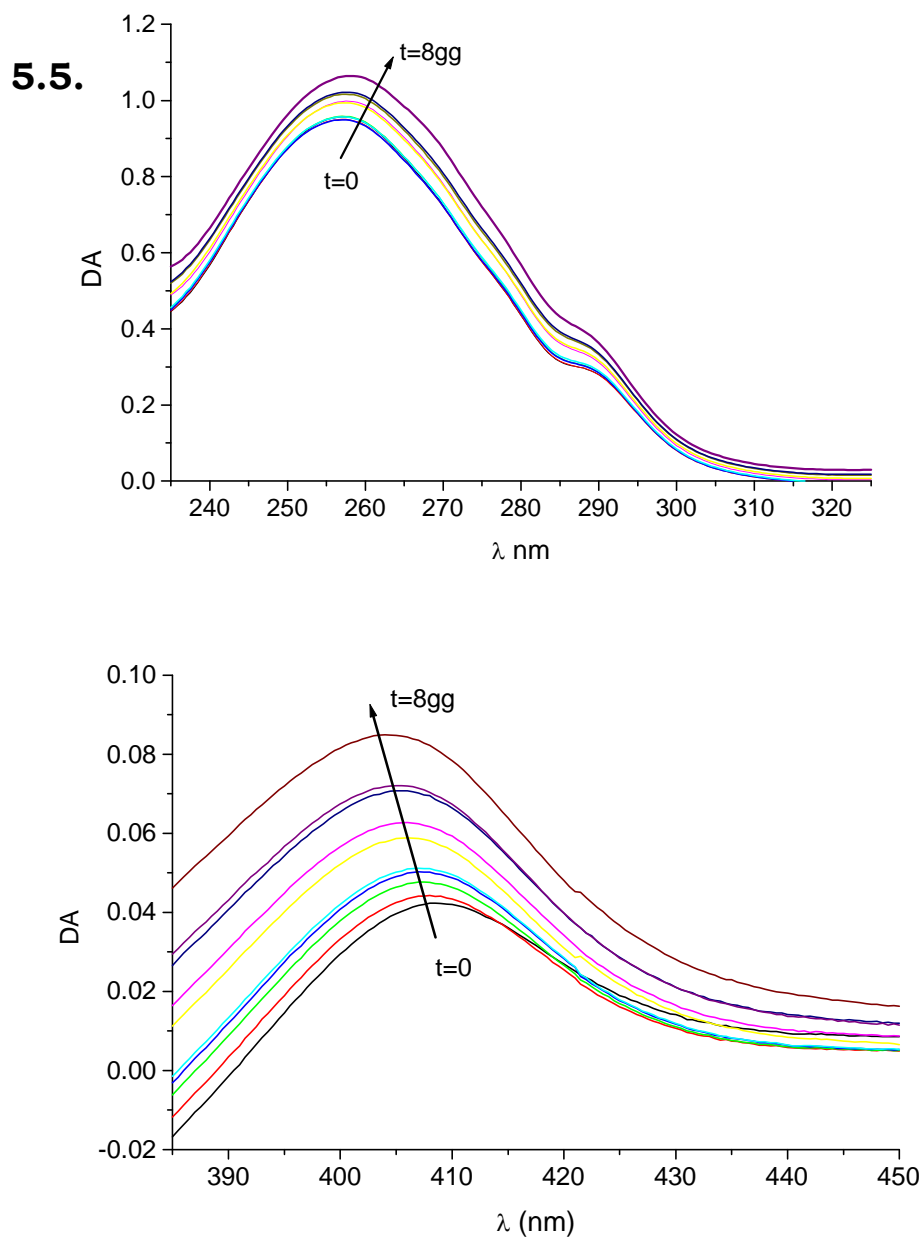


Fig. 5.36- Spettri di assorbimento nella regione U.V. (a) e visibile (b) da $t=0$ a $t=11176 \text{ min} = 186.26 \text{ h} = 7.8 \text{ gg}$ $I=0,11 \text{ M}$ (NaCl), $\text{pH}=7$ (NaCac $0,01 \text{ M}$), 298.1 K .

Si può osservare che, nel tempo, la banda nella regione visibile subisce un aumento di intensità e un progressivo blue-shift, mentre la banda di assorbimento nella regione U.V. , subisce un aumento di intensità e un progressivo red-shift. In precedenza sono stati riportati lavori analoghi al presente nei quali si studiava l' interazione di complessi acridinici recanti unità Pt(II) con sequenze PolyA e PolyU. ²⁹ E' stato notato anche in questi lavori un progressivo blue-shift della banda caratterizzante il colorante ed il fenomeno è stato imputato ad una interazione di legame tra il l'atomo di Pt e l'atomo di azoto N7 dell'adenina. Nel nostro caso, oltre all'adenina, è presente anche l' unità guanina che può reagire con il platino. In Fig. 5.37 è riportato in grafico l'andamento nel tempo della variazione di assorbanza del sistema **L16**-DNA per la lunghezza d'onda $\lambda = 408\text{nm}$.

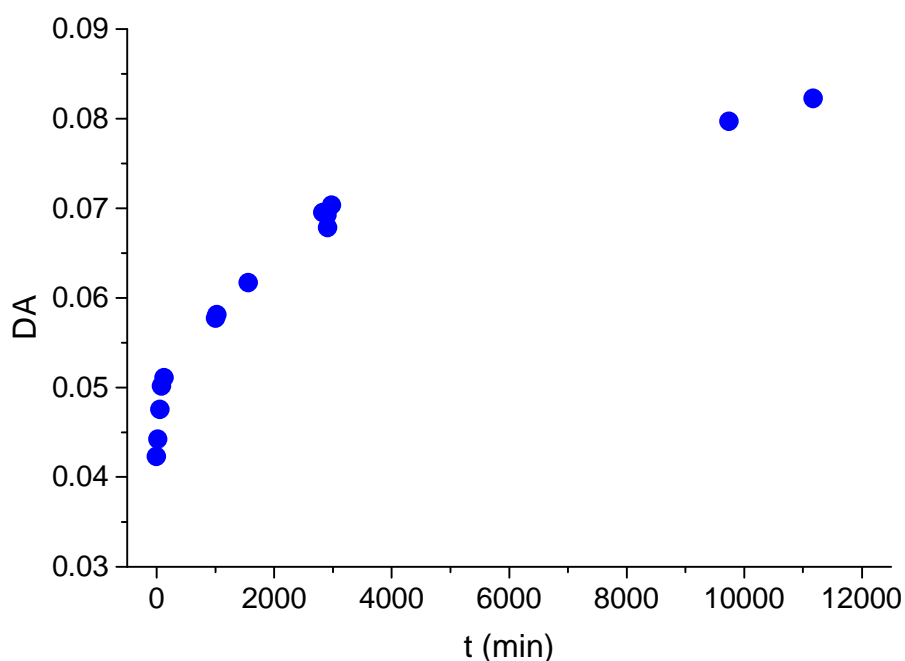


Fig. 5.37 Andamento nel tempo della variazione di assorbanza del sistema **L16**-DNA per la lunghezza d'onda $\lambda = 408\text{nm}$.

Per determinare i parametri cinetici di questa reazione è stata considerata la seguente equazione:

$$S = S_{\infty} + Ae^{-t/\tau}$$

Dove τ è il tempo di semivita del processo.

Passando al logaritmo:

$$\ln \frac{1}{A} + \frac{t}{\tau} = \ln(S_{\infty} - S)$$

Riportando in grafico $\ln(S_{\infty}-S)$ vs t si ottiene una retta la cui pendenza è $1/\tau$.

Si verifica che per $\lambda= 408\text{nm}$, $\tau=3571 \text{ min} \approx 60 \text{ ore}$. Il valore di τ è dello stesso ordine di grandezza del valore riportato nel lavoro precedentemente citato.²⁹

CONCLUSIONI

L16 presenta interazione con DNA mediante meccanismo bifasico: un primo modo di carattere esterno e un secondo modo intercalativo. Successivamente si verifica una reazione lenta di attacco del platino alle nucleobasi (adenina, guanina) mediante un processo con semivita di circa 60h. Questo ultimo processo è circa 10 volte più lento dell'analogo processo presentato dal cis-Pt, ma è comunque dello stesso ordine di grandezza di processi simili che coinvolgono l'interazione covalente di farmaci antitumorali contenenti Pt(II) con i polinucleotidi.²⁹

5.5 Bibliografia

1. Carrier A.; Le Ber P.; Auclair C.; *Biochemistry*, **1990**, 29(25), 6002-6009.
2. Nguyen S.; Hamelberg D.; Bailly C.; Colson P.; Stanek J.; Brun R.; Niedle S.; Wilson W. D.; *Biophys. J.* **2004**, 86(2), 1028-1041.
3. Matsuzawa Y.; Minagawa K.; Yoshikawa K.; Matsumoto M.; Doi M.; *Nucleic Acids Symposium Series*, **1991**, 25, 131-132.
4. Gale E. F.; Cundiffe E.; Reynolds P. E.; Richmond M. H.; Waring M. J.; *The molecular basis of antibiotic action*, Wiley, London, **1972**, pp.173-277.
5. Niedle S.; *Prog. Med. Chem.* **1979**, 16, 151-221.
6. Jennette, K. W.; Lippard, S. J.; Vassiliades, G. A.; Bauer, W. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, 71, 3839.
7. Lippard, S. J.; *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 211.
8. Erkkila, K. E.; Odom, D. T. J.; Barton, K., *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2777.

9. Biver, T.; Secco, F.; Tinè, M. R.; Venturini, M.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1531.
10. Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Biver, T.; Boggioni, A.; Bonacchi, S.; Danesi, A.; Giorgi, C.; Gratteri, P.; Marchal Ingrain, A.; Secco, F.; Sissi, C.; Valtancoli, B.; Venturini, M.; *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 184-196.
11. Chand, D. K.; Schneider, H. J.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Ciattini, S.; Valtancoli, B.; *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 4001.
12. Biver, T.; Lombardi, D.; Secco, F.; Tinè, M.R.; Venturini, M.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Valtancoli, B.; *Dalton Trans.* **2006**, 1524.
13. (a) Y. Jenkins, A.E. Friedman, N.J. Turro, C.J. Burton, *Biochemistry*, **1992**, 31, 10809-10816. (b) A.E. Friedman, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, N.J. Turro, J.K. Burton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4960-4962. (c) R.E. Holmlin, J.K. Barton, *Inorg. Chem.*, **1995** 34, 7-8. (d) R.E. Holmlin, E.D.A. Stemp, J.K. Burton, *Inorg. Chem.* **1998**, 37 29-34. (e) F. Westlung, F. Pierard, M.P. Eng, B. Nordén, P. Lincoln, *J. Phy. Chem. B* **2005**, 109, 17327-17332.
14. (a) Q.G. Mulazzani, M. D'Angelantonio, M. Venturi, M.L. Boillot, J.C. Chambron, E. Amouyal, *New J. Chem.* **1990**, 13, 441-447. (b) Chambron, J.-P. Sauvage, *Chem. Phys. Lett.* 1991, 182 603-607. (c) E. Amouyal, A. Homsy, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1990** 1841. (d) J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, E. Amouyal, P. Koffi, *Nouv. J. Chim.* **1985**, 9, 527-529.
15. (a) B. Gholamkhash, K. Koike, N. Negishi, H. Hori, K. Takeuchi, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 756-765. (b) R.B. Nair, B.M. Cullum, C.J. Murphy, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 962. (c) C. Turro, S.H. Bossmann, Y. Jenkins, J.K. Barton, N.J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9026-9032
16. (a) R.E. Holmlin, J.K. Barton, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 7-8. (b) R.E. Holmlin, E.D.A. Stemp, J.K. Burton, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 29-34.
17. (a) I. Haq, P. Lincoln, D. Suh, B. Nordén, B.Z. Chowdhry, J.B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 117, 4788-4796. (b) T. Biver, C. Cavazza, F. Secco, M. Venturini, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 461-469.
18. C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, A. Danesi, E. Faggi, C. Giorgi, C. Lodeiro, E. Oliveira, F. Pina, B. Valtancoli, *Inorg. Chim. Acta* **2008**, 361 3410-3419.
19. C. Lodeiro, F. Pina, A.J. Parola, A. Bencini, A. Bianchi, C. Bazzicalupi, S. Ciattini, C. Giorgi, A. Masotti, B. Valtancoli, J. Seixas de Melo, *Inorg. Chem.* **2001**, 40 6813-6819

- 20.** Lerman, L.S. *J. Mol. Biol.* **1961** 3, 18-30
- 21.** Bowler, B. E.; Ahmed, K. J.; Sundquist, W.I.; Hollis, L.S.; Whang, E.E.; Lippard, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 111, 1299-1306.
- 22.** Brabec, V., Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 103-123.
- 23.** Pizzocaro, G., Salvioni, R.; Pasi, M.; Zanoni, F.; Dilani, F.; Pilotti, S.; Monfardini, S. *Cancer*, **1985**,56, 249-255.
- 24.** A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-España, M. Micheloni, J.A. Ramirez, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 188, 97 .
- 25.** M. Yamada, Y. Tanaka, Y. Yoshimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65, 1006-1011.
- 26.** C.-S. Choi, L. Mishra, T. Mutai, K. Araki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, 73, 2051-2058.
- 27.** Biver, T.; Cavazza, C.; Secco, F.; Venturini, M. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2007**, 101, 461-469.
- 28.** Chaires J.; *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, 453, 26.
- 29.** Ciatto, C.; D'amico, M.L.; Natile, G.; Secco, F.; Venturini, M. *Biophysical Journal* **1999**, 77, 2717-2724.

6. Recettori poliamminici contenenti l'unità bipyridile o fenantrolina come chemosensori fluorescenti per ioni metallici e potenziali sistemi recettivi per il DNA.¹

6.1. Introduzione

E' noto che sistemi macrocicli poliamminici, contenenti l'unità fenantrolina, siano in grado di interagire con il DNA² grazie alla copresenza di una unità potenzialmente intercalante quale la fenantrolina e della catena poliammonica protonabile in grado di interagire con il polianione tramite interazioni di tipo elettrostatico. Inoltre sistemi di questo tipo sono in grado di coordinare ioni metallici quali Zn(II), che possono promuovere il cleavage idrolitico del DNA, o di Cu(II) che possono promuovere invece un processo di cleavage ossidativo. La fenantrolina è un costituente attivo di molti chemosensori fluorimetrici e, pertanto, le sue caratteristiche emissive facilitano lo studio dell'interazione dei leganti nei quali essa è presente con il DNA. Il più comune approccio nella realizzazione di chemosensori sintetici è il design di molecole che contengono una unità legante e una unità segnalante, separate da uno spaziatore. I macrocicli poliamminici sono senza dubbio fra le unità leganti più versatili per i cationi metallici,³ essendo capaci, fra l'altro, di formare complessi stabili con cationi metallici. Inoltre, l'abbinamento di unità leganti poliamminiche, di natura idrofila, a unità fluorogeniche quali la fenantrolina, di natura idrofoba, può assicurare al chemosensore risultante una buona solubilità in soluzione acquosa. Per questi motivi abbiamo studiato il legante **L5** contenente una unità fenantrolina e una catena

poliamminica in cui i gruppi amminici sono separati da catene propileniche. Abbiamo inoltre considerato il legante **L4** strutturalmente analogo a **L5** ma contenente una unità bipyridile (Fig. 6.1).

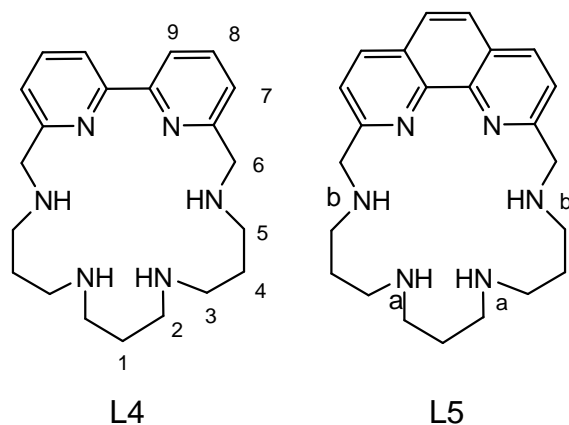


Fig. 6.1- Rappresentazione dei leganti **L4** e **L5**.

Per il momento lo studio si è limitato a definire le caratteristiche coordinative dei due leganti nei confronti degli ioni metallici Zn(II), Cu(II), Cd(II), e Pb(II). Nel presente capitolo sono riportati gli aspetti più importanti del lavoro, per informazioni più dettagliate si rimanda all'articolo in appendice.

6.2. Protonazione di L4 e L5

Poiché la protonazione dei recettori poliamminici è competitiva con il processo di complessazione degli ioni metallici, è stata studiata preliminarmente la basicità di **L4** e **L5** utilizzando sia titolazioni potenziometriche che misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche in soluzione acquosa. Le costanti di protonazione di entrambi i leganti sono riportate in Tabella 6.1.

Tabella 6.1- Costanti di protonazione di **L4** e **L5** (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K)

Equilibrio	logK	
	L4	L5
$L + H^+ = [LH]^+$	9.94(1)	10.39(3)
$[LH]^+ + H^+ = [LH_2]^{2+}$	8.96(2)	9.01(2)
$[LH_2]^{2+} + H^+ = [LH_3]^{3+}$	7.03(2)	7.35(2)
$[LH_3]^{3+} + H^+ = [LH_4]^{4+}$	5.95(2)	6.02(4)

I recettori hanno mostrato un pattern di protonazione molto simile: entrambi i leganti possono legare fino a quattro protoni acidi nell'intervallo di pH investigato (2.5-10.5), con costanti di protonazione simili. Tutte le costanti di protonazione di **L4** e **L5** sono più alte di quelle riportate per 2,2'-bipiridile e 1,10-fenantrolina (logK=4.42 e 4.96 rispettivamente).⁴ Questo suggerisce che gli atomi di azoto eteroaromatici non sono direttamente coinvolti nel processo di protonazione in soluzione acquosa nel range di pH investigato. Gli atomi di azoto della fenantrolina possono comunque protonarsi a valori di pH molto acidi, infatti la lenta evaporazione di una soluzione acquosa di HCl 0.1M contenente **L5** e NaClO₄ ha portato alla cristallizzazione del sale [(H_{4.5}**L5**)(H₂O)_{0.5}Cl_{0.5}]-[ClO₄]-2H₂O che contiene sia la forma tetraprotonata che pentaprotonata di **L5**.

La registrazione di spettri ¹H-NMR a diversi valori di pH permette di seguire i successivi step di protonazione. A pH 12, lo spettro ¹H-NMR è caratterizzato da un set di nove segnali, sei per i protoni metilenici alifatici e tre per i protoni aromatici, in accordo con una simmetria C_{2v} mediata nel tempo. Come mostrato in Fig. 6.2, la formazione delle specie mono- e diprotonate del legante nel range di pH 11-8, è accompagnata da un visibile downfield shift dei segnali dei protoni H1, H2 e H3, vicini ai gruppi amminici N_a che indica che i primi due step di protonazione interessano i due atomi di azoto centrali della catena tetraamminica. Un simile comportamento è stato visto per **L5**. I due successivi step di protonazione interessano i gruppi amminici benzilici N_b, come giustificato dal downfield shift osservato per le risonanze di H5 e H6

sotto pH 8. Le risonanze dei protoni eteroaromatici non mostrano shift significativi nel range di pH 12-2, indicando che in questo range di pH non avviene la protonazione del biperidile. Questo è confermato dagli spettri UV di entrambi i recettori che non mostrano, anche a pH 2, il tipico red-shift delle bande caratteristiche del 2,2'-biperidile⁵ e della 1,10-fenantrolina⁶ che accompagna la loro protonazione.

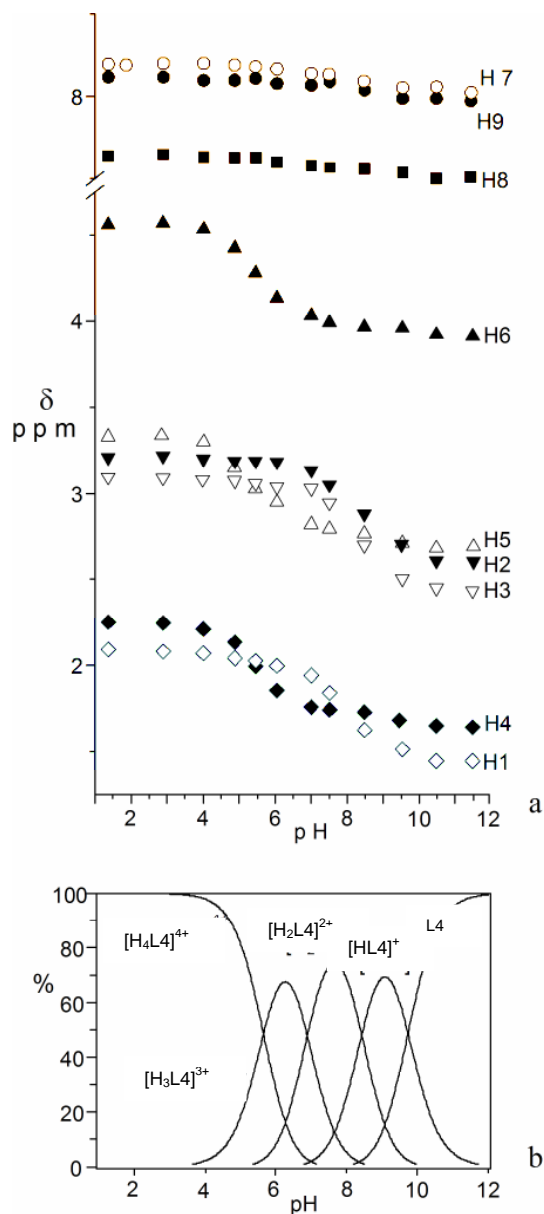


Fig. 6.2 (a) Dipendenza dal pH dei segnali ¹H-NMR di **L4**. (b) Diagramma di distribuzione delle specie protonate (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K).

Gli spettri di emissione di **L5** in soluzione acquosa sono fortemente dipendenti dal pH. Come mostrato in Fig. 6.3, il recettore non è emissivo a pH alcalino e mostra la tipica banda di emissione della fenantrolina solo a valori di pH acidi, quando si forma la specie $[H_4L5]^{4+}$. Questo comportamento può essere attribuito alla presenza, nelle specie a minor grado di protonazione, di atomi di azoto non protonati le cui coppie di non legame possono spegnere l'emissione di fluorescenza dell'unità fenantrolina attraverso un processo di trasferimento elettronico. La protonazione di tutti i gruppi amminici della catena alifatica, che ha luogo sotto pH 7, impedisce questo trasferimento elettronico fotoindotto (PET) rendendo possibile l'emissione di fluorescenza della fenantrolina. Al contrario, il legante **L4** mostra solo una debole emissione di fluorescenza, anche a pH acido, in accordo con la scarsa natura emissiva del 2,2'-bipiridile.⁷

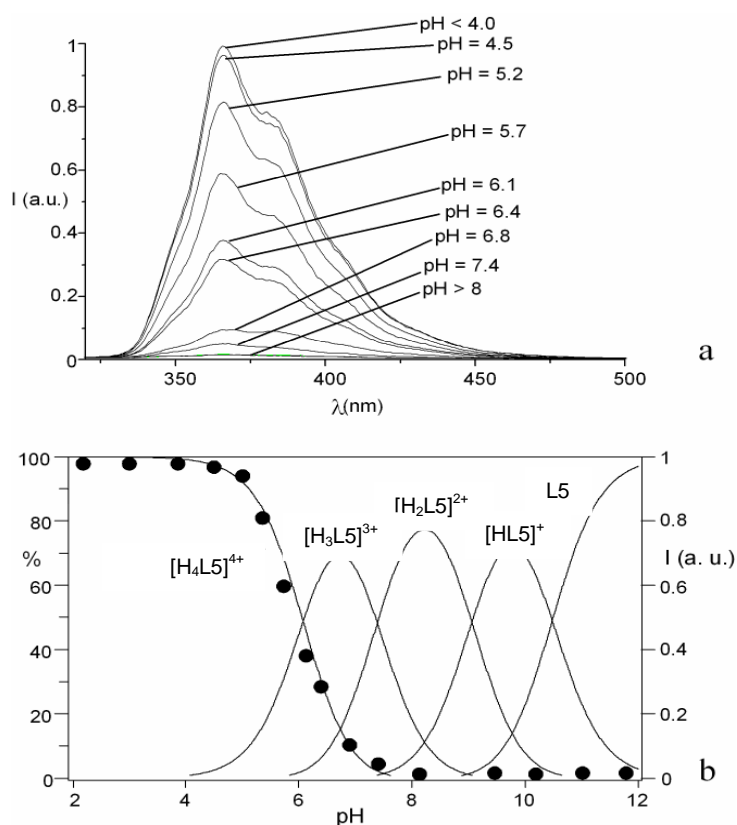


Fig. 6.3- Sopra: spettri di emissione di **L5** a diversi valori di pH. Sotto: intensità di emissione di **L5** a 366nm in dipendenza del pH (298 K, $\lambda_{ex}=280$ nm, 0.1M NMe₄NO₃).

6.3. Caratteristiche strutturali di complessi metallici allo stato solido

Sono stati ottenuti cristalli adatti all'analisi mediante diffrazione a raggi x dei complessi protonati $[\text{Cu}(\text{HL4})(\text{ClO}_4)][(\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (a), $[\text{Zn}(\text{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (b), $[\text{Cd}(\text{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (c), $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (d), $[\text{Zn}(\text{HL5})\text{Br}][\text{Br}][\text{ClO}_4]$ (e) e $[\text{Pb}(\text{HL5})\text{Br}][\text{PF}_6]_{1.5} \cdot [\text{NO}_3]_{0.5} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (f), da soluzioni acquose debolmente acide. In Tabella 6.2 sono riportate le distanze (Å) e gli angoli (°) di legame per gli intorni coordinativi del metallo in (a), (b), (c) e (d), mentre in Tabella 6.3 sono riportate le distanze (Å) e gli angoli (°) di legame per gli intorni coordinativi del metallo in (e) e (f).

Tabella 6.2- Distanze (Å) e angoli (°) di legame per gli intorni coordinativi del metallo in $[\text{Cu}(\text{HL4})(\text{ClO}_4)][(\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (a), $[\text{Zn}(\text{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (b), $[\text{Cd}(\text{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (c), $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (d).

	(a)	(b)	(c)	(d)
	Cu1 (X = O5)	Zn1 (X = Br2)	Cd1 (X = Br1)	Pb1 (X = Br1)
M-X	2.414(6)	2.366(2)	2.577(1)	2.841(1)
M-N1	1.925(4)	2.11(1)	2.341(6)	2.509(8)
M-N2	1.955(6)	2.140(9)	2.349(5)	2.518(8)
M-N3	2.037(4)	2.145(9)	2.354(5)	2.760(8)
M-N6	2.041(5)	2.148(9)	2.350(6)	2.722(7)
X-M-N6	89.8(2)	107.6(2)	103.3(1)	77.1(2)
X-M-N2	100.0(2)	112.3(2)	114.0(1)	85.9(2)
X-M-N3	91.1(2)	103.2(3)	99.6(1)	87.8(2)
X-M-N1	103.3(2)	113.0(3)	114.8(1)	82.4(2)
N6-M-N2	162.3(2)	136.3(3)	132.6(2)	128.9(2)
N6-M-N3	113.5(2)	111.4(3)	131.2(2)	157.4(2)
N6-M-N1	83.1(2)	75.7(3)	70.5(2)	64.8(2)
N2-M-N3	81.3(2)	76.4(3)	71.1(2)	65.5(2)
N2-M-N1	80.3(2)	72.8(4)	67.7(2)	65.4(2)
N3-M-N1	158.3(2)	139.1(3)	134.3(2)	130.5(2)

Tabella 6.3- Distanze (Å) e angoli (°) di legame per gli intorni coordinativi del metallo in [Zn(HL5)Br][Br][ClO₄] (e) e [Pb(HL5)Br][PF₆]_{1.5}·[NO₃]_{0.5}·H₂O (f).

[ZnHL5Br]Br(ClO₄)_[e]		[PbHL5Br](PF₆)_{1.5}(NO₃)_{0.5}·H₂O^(f)	
Zn1-Br1	2.354	Pb1-Br1	2.735(1)
Zn1-N1	2.370	Pb1-N1	2.540(9)
Zn1-N2	2.047	Pb1-N2	2.51(1)
Zn1-N3	2.276	Pb1-N3	2.69(1)
Zn1-N4	2.072	Pb1-N6	2.77(1)
Br1-Zn1-N1	99.2	Br1-Pb1-N1	90.6(2)
Br1-Zn1-N3	102.5	Br1-Pb1-N3	76.8(2)
Br1-Zn1-N2	115.2	Br1-Pb1-N2	88.4(2)
Br1-Zn1-N4	118.2	Br1-Pb1-N6	77.3(2)
N1-Zn1-N3	149.4	N1-Pb1-N3	128.8(3)
N1-Zn1-N2	75.0	N1-Pb1-N2	65.5(3)
N1-Zn1-N4	98.0	N1-Pb1-N6	62.7(3)
N3-Zn1-N2	76.4	N3-Pb1-N2	64.7(3)
N3-Zn1-N4	90.5	N3-Pb1-N6	151.7(3)
N2-Zn1-N4	126.6	N2-Pb1-N6	125.8(3)

In tutti i complessi di **L4**, il metallo è coordinato dai due atomi di azoto del biperidile e dagli atomi di azoto vicini all'unità eteroaromatica (Fig. 6.4). I rimanenti atomi di azoto non sono coinvolti nella coordinazione ed almeno uno di essi è protonato. Un atomo di ossigeno di un anione perclorato o un anione bromuro completano la sfera di coordinazione degli ioni metallici, la cui geometria coordinativa può essere descritta come una piramide quadrata distorta nella quale i quattro atomi di azoto definiscono il piano di base ed il controione la posizione apicale. Nel caso del complesso [Pb(H₂L4Br)]³⁺, anche se l'arrangiamento degli atomi donatori attorno al metallo può essere ancora assimilato a una piramide quadrata, la geometria di coordinazione presenta una forte distorsione dal poliedro teorico. Il complesso [Zn(HL5)Br]²⁺ mostra

differenze significative dal corrispondente complesso con **L4**. Lo ione Zn^{II} risulta ancora pentacoordinato dai due atomi di azoto eteroaromatici, da due gruppi amminici alifatici e dall'anione bromuro, ma in questo caso solo uno dei due atomi di azoto benzilici è coinvolto nella coordinazione del metallo. Probabilmente, la maggiore rigidità dell'unità fenantrolinica in **L5** impedisce la simultanea coordinazione di entrambi i gruppi amminici benzilici al metallo. Nel caso del catione $[Pb(HL5)Br]^{2+}$, sia la geometria di coordinazione che la conformazione del legante sono molto simili a quelli del corrispondente complesso di Pb^{II} con **L4**.

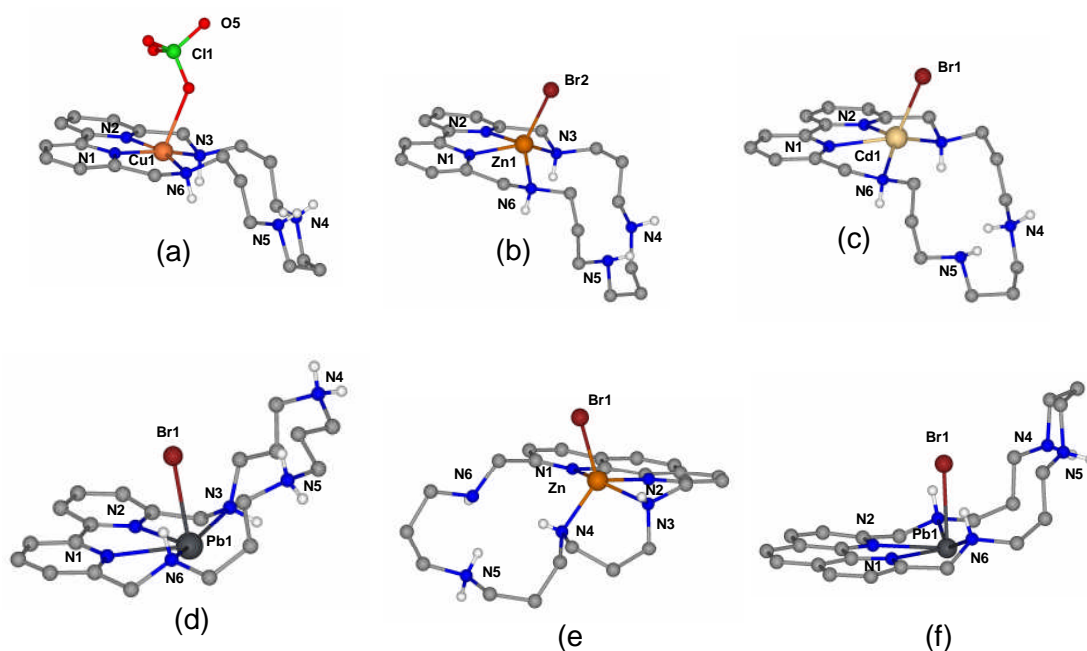


Fig. 6.4- Rappresentazioni delle strutture cristalline dei complessi $[Cu(HL4)(ClO_4)]^{2+}$ (a), $[Zn(HL4)Br]^{2+}$ (b), $[Cd(HL4)Br]^{2+}$ (c), $[Pb(H_2L4)Br]^{3+}$ (d), (e) $[Zn(HL5)Br]^{2+}$ (e) e $[Pb(HL5)Br]^{2+}$ (f). Colori: grigio = C, bianco=H.

6.4. Complessazione dei metalli in soluzione acquosa

Le proprietà coordinative dei due leganti nei confronti di Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II} e Pb^{II} sono state studiate in soluzione acquosa attraverso titolazioni potenziometriche, che hanno portato alla determinazione delle loro costanti di formazione (Tabella 6.4).

Tabella 6.4- Costanti di stabilità dei complessi di **L4** e **L5** con Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II} e Pb^{II} in soluzione acquosa (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K)

Equilibrio	LogK			
	Cu ^{II}	Zn ^{II}	Cd ^{II}	Pb ^{II}
$M^{2+} + L4 = [ML4]^{2+}$	15.2(1)	10.85(1)	13.9(1)	8.7(1)
$[ML4]^{2+} + H^+ = [ML4H]^{3+}$	9.5(1)	8.01(1)	7.04(8)	8.7(1)
$[ML4H]^{3+} + H^+ = [ML4H_2]^{4+}$	5.9(1)	6.10(1)	6.05(7)	7.5(1)
$[ML4H_2]^{4+} + H^+ = [ML4H_3]^{5+}$	3.9(1)	4.5(1)	3.93(5)	
$[ML4]^{2+} + OH^- = [ML4(OH)]^+$	2.7(1)	4.5(1)	4.01(1)	
$[ML4(OH)]^+ + OH^- = [ML4(OH)_2]$		3.5(1)		7.4(1)
$M^{2+} + L5 = [ML5]^{2+}$	13.90(3)	9.83 ^[b]	10.21(1)	8.6(3)
$[ML5]^{2+} + H^+ = [MHL5]^{3+}$	9.04(2)	8.41	8.66(1)	9.26(2)
$[ML5H]^{3+} + H^+ = [ML5H_2]^{4+}$	5.97(3)	7.15	7.20(1)	7.65(1)
$[ML5H_2]^{4+} + H^+ = [ML5H_3]^{5+}$	5.46(2)	5.30		
$[ML5]^{2+} + OH^- = [ML5(OH)]^+$		3.90		3.77(3)
$[ML5(OH)]^+ + OH^- = [ML5(OH)_2]$		2.47		

Entrambi i leganti formano complessi stabili 1:1 con i metalli considerati. Inoltre si può notare che $[ML4]^{2+}$ e $[ML5]^{2+}$ hanno una notevole tendenza a legare protoni acidi in soluzione acquosa dando luogo a specie mono-, di- e in alcuni casi, triprotonate. Ulteriori informazioni sulla complessazione di questi ioni metallici sono state ottenute registrando spettri UV dei complessi a diversi valori di pH. E' stato notato come la coordinazione del metallo da parte dell'unità biperidilica è accompagnata dalla scomparsa della banda del

legante a 293 nm e dalla simultanea formazione di una banda strutturata a 305 nm (Fig.6.5), mentre la coordinazione da parte della 1,10-fenantrolina può essere accompagnata sia da un aumento che da una diminuzione della banda di assorbimento a 270 nm. Questi cambiamenti spettrali, che sono diagnostici per il coinvolgimento degli atomi di azoto aromatici nella coordinazione del metallo, suggeriscono una forte somiglianza fra le strutture dei complessi in soluzione e quelle osservate nelle strutture cristalline.

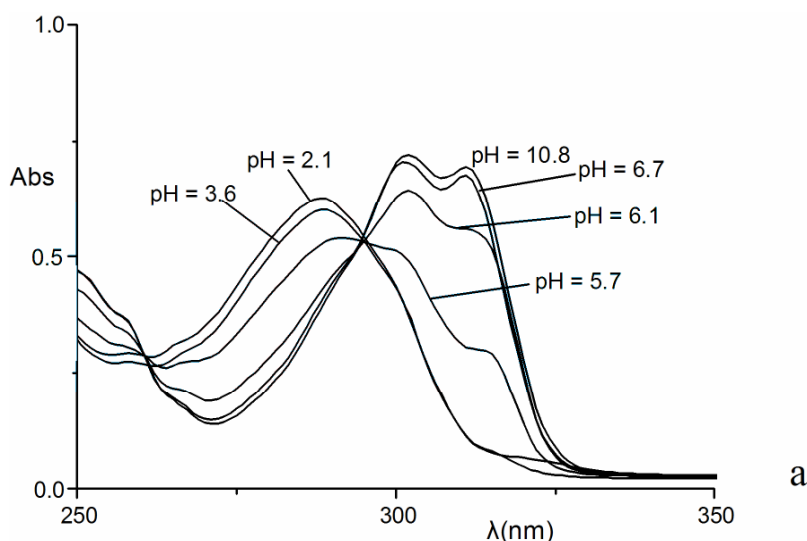
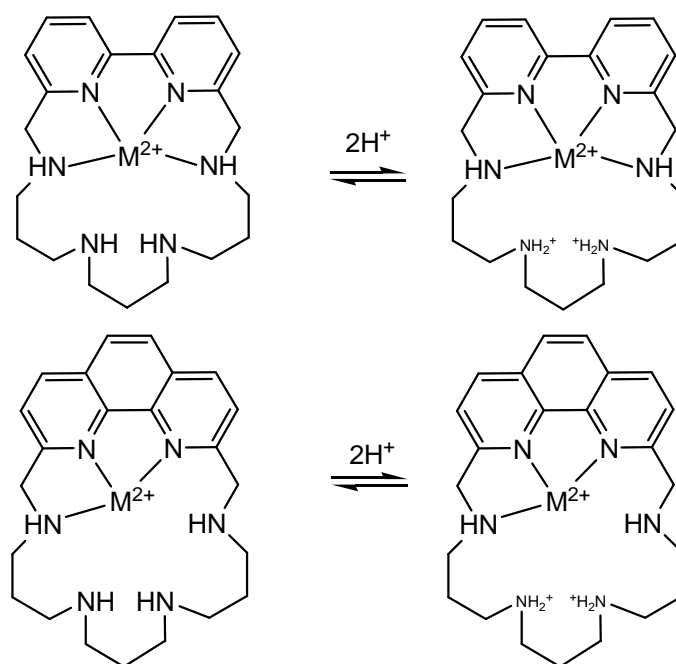


Fig. 6.5- Spettri di assorbimento di **L4** in presenza di 1 equivalente di Zn^{II} a diversi valori di pH.

Se si confrontano le capacità coordinative di questi due leganti, si osserva che i complessi $[ML4]^{2+}$ sono in genere più stabili dei corrispondenti $[ML5]^{2+}$ ad eccezione del complesso con Pb^{II} . Nei complessi con **L4**, i due anelli piridinici possono ruotare attorno all'asse 2,2' conferendo all'intero macrociclo una flessibilità sufficiente a portare entrambi i gruppi amminici benzilici in contatto con il catione metallico, come osservato nelle strutture cristalline. Nel caso di **L5**, la maggiore rigidità dell'unità fenantrolina impedisce a un atomo di azoto benzilico di coordinarsi al metallo con una risultante minore stabilità (Schema1).



Schema 1- Modalità di legame proposti per **L4** e **L5** nei complessi $[ML]^{2+}$ e $[H_2ML]^{4+}$ ($M = Cu^{II}$, Zn^{II} , Cd^{II}).

Il catione Pb^{II} , di dimensioni maggiori, è coordinato nello stesso modo tetradentato sia da **L4** che da **L5**, con conseguenti costanti di stabilità molto simili (Fig. 6.4).

Tra i metalli studiati, Cu^{II} forma i complessi più stabili, come atteso a causa dell'energia di stabilizzazione del campo cristallino (CFSE). Da notare anche la maggiore stabilità dei complessi $[CdL]^{2+}$ rispetto a quelli $[ZnL]^{2+}$ e $[PbL]^{2+}$. Ancora più interessante è il confronto delle capacità coordinative dei due leganti rispetto ai diversi cationi metallici. Per fare questo possiamo considerare un sistema competitivo composto, in concentrazione equimolare, da un legante e dagli ioni metallici che vogliamo valutare e calcolare la percentuale di ciascun ione metallico presente in forma complessa (come sommatoria di tutte le sue forme complesse) nel campo di pH di interesse. Si ottengono così dei grafici delle percentuali di formazione dei complessi in funzione del pH che possono essere interpretati in termini di selettività. La Fig. 6.6 mostra i grafici ottenuti per i sistemi competitivi contenenti **L4** o **L5** e Zn^{II} , Cd^{II} e Pb^{II} .

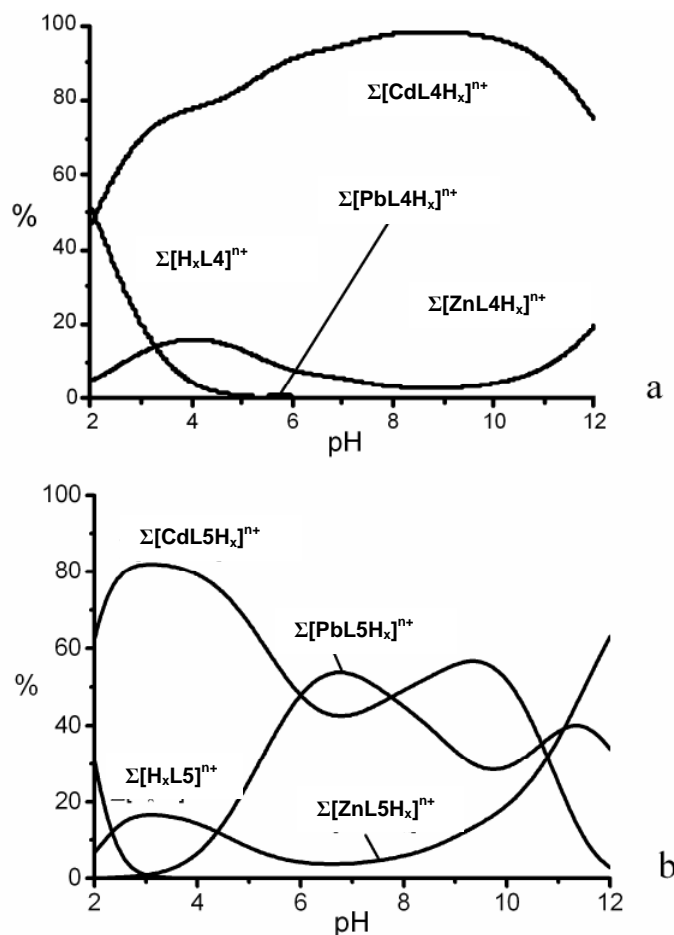


Fig.6.6- Percentuali globali delle specie complesse formate da **L4** (a) e **L5** (b), in presenza di Zn^{II} , Cd^{II} e Pb^{II} in funzione del pH ($[L]=[Zn^{II}]=[Cd^{II}]=[Pb^{II}]=1 \times 10^{-3}M$, $L = L4, L5$).

Come si può notare, mentre **L5** mostra una scarsa capacità nel riconoscere selettivamente i singoli cationi metallici, **L4** è caratterizzato da una notevole selettività per Cd^{II} nei confronti di Zn^{II} e Pb^{II} . Ad esempio fra pH 7 e 10 i complessi di Cd^{II} con **L4** sono quasi le uniche specie presenti in soluzione. Questa spiccata selettività di **L4** per il Cd^{II} trova una giustificazione nelle strutture cristalline dei complessi che dimostrano un migliore adattamento dimensionale e stereochimico tra Cd^{II} e il sito di coordinazione tetradentato del legante. Infatti, l'analisi cristallografica dei complessi $M(HL4)]^{3+}$ allo stato solido mostra che mentre Cd^{II} forma forti legami Cd-N, Zn^{II} dà luogo a interazioni M^{II} -N più deboli ed il Pb^{II} presenta un intorno coordinativo distorto con due delle quattro distanze di legame più lunghe. La migliore complementarità del sito coordinativo di **L4** con lo ione Cd^{II} è stata

evidenziata anche mediante calcoli di tipo DFT sviluppati usando come coordinate di partenza quelle derivanti dalle strutture cristalline.

6.5. L4 e L5 come chemosensori fluorimetrici

Il funzionamento di **L4** e **L5** come chemosensori fluorescenti è stato studiato mediante misure spettrofluorimetriche su soluzioni acquose contenenti i leganti e gli ioni metallici in rapporto 1:1 a diversi valori di pH. Nel caso di **L4**, in presenza degli ioni Cu^{II} e Pb^{II} l'emissione del legante è completamente spenta su tutto il campo di pH. Lo spegnimento è semplicemente dovuto alla formazione dei complessi metallici, come generalmente osservato per ioni paramagnetici come Cu^{II} o cationi di metalli pesanti come Pb^{II} . Diverso è il comportamento in presenza degli ioni Zn^{II} e Cd^{II} . Come mostrato in Fig. 6.7 per Cd^{II} , l'emissione di fluorescenza mostra un profilo di tipo OFF-ON-OFF, con un massimo di intensità di emissione a pH 6.2. In particolare, tra le specie complesse presenti in soluzione, solo quelle protonate sono emmissive. Questo comportamento, che è stato incontrato anche nel caso di Zn^{II} , può essere interpretato in considerazione del fatto che i complessi $[\text{ZnL4}]^{2+}$ e $[\text{CdL4}]^{2+}$ sono caratterizzati dalla presenza di gruppi amminici della catena alifatica, non coinvolti nella coordinazione del metallo, che possono dare luogo a spegnimento dell'emissione in fluorescenza del complesso mediante un processo PET. La protonazione dei due gruppi amminici centrali inibisce il processo PET ristabilendo l'emissione di fluorescenza dei complessi. Infine, la diminuzione di emissione osservata sotto pH 4 è semplicemente dovuta alla dissociazione del complesso.

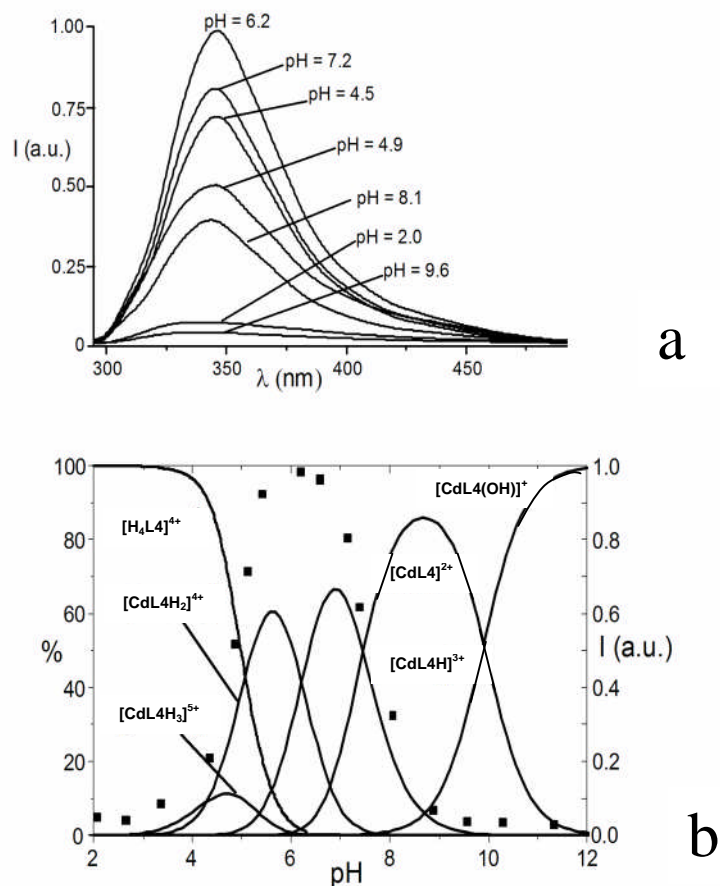


Fig. 6.7- Spettri di emissione di fluorescenza di **L4** in presenza di 1 equivalente di Cd^{II} (a) e intensità di emissione di fluorescenza a 345 nm (■, asse y destro) in funzione del pH sovrapposta alle curve di distribuzione dei complessi (asse y sinistro) per un sistema contenente **L4** e Cd^{II} in rapporto molare 1:1 ($[\text{L1}] = [\text{Cd}^{\text{II}}] = 1 \times 10^{-5} \text{M}$, 298K, $\lambda_{\text{exc}} = 298 \text{ nm}$, 0.1M NMe_4NO_3) (b).

Le caratteristiche di emissione dei complessi protonati con Zn^{II} e Cd^{II} sono confermate dagli spettri di emissione di fluorescenza dei composti solidi $[\text{Zn}(\text{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ e $[\text{Cd}(\text{HL4})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ disciolti in CH_3CN anidro. Inoltre, aggiungendo aliquote crescenti di Zn^{II} o Cd^{II} a una soluzione acquosa di **L4**, tamponata a pH 6.5, si osserva che il recettore è capace di dare una risposta raziometrica ai cationi metallici grazie all'aumento di emissione di fluorescenza derivante dalla coordinazione (CHEF). Un esperimento competitivo condotto aggiungendo aliquote crescenti di Pb^{II} a una soluzione contenente **L4** e Cd^{II} in rapporto 1:1 a pH 6.5 mostra che l'emissione del complesso di Cd^{II} viene solo debolmente alterata dalla presenza di più di 1 eq. di Pb^{II} (si ha solo una diminuzione del 5% in presenza di 3 eq. di Pb^{II}). Al

contrario per il complesso di Zn^{II} si ha una diminuzione dell'emissione del 18% in presenza di 1 solo eq. di Pb^{II} .

Nel caso di **L5** tutti i complessi metallici, compresi quelli con Zn^{II} e Cd^{II} , non mostrano emissione di fluorescenza nel campo di pH investigato. A differenza di **L4**, nei complessi di **L5** con Zn^{II} e Cd^{II} , un gruppo amminico benzilico è debolmente legato o non legato al catione metallico e, essendo meno basico dei gruppi amminici centrali della catena alifatica, esso non sarà protonato nelle specie $[M(HL5)]^{3+}$ e $[M(H_2L5)]^{4+}$. La coppia solitaria di tale gruppo amminico può produrre lo spegnimento dell'emissione di fluorescenza della fenantrolina.

6.6. Conclusioni

Nell'ottica di progettare nuovi chemosensori fluorescenti in grado di interagire con il DNA è stato sintetizzato il legante **L5** contenente una unità fenantrolina. A titolo di confronto è stato sintetizzato anche il legante **L4** analogo, ma contenente una unità bipyridile. Investigando le loro capacità coordinative nei confronti di ioni metallici è stato visto che il legante, **L4** è capace di coordinare e segnalare selettivamente Cd^{II} rispetto a Zn^{II} e Pb^{II} . Al contrario, per **L5** si hanno complessi non emissivi. Questo conferma che nel design di chemosensori fluorescenti piccole variazioni dei parametri strutturali possono influenzare le proprietà di selettività degli stessi.

6.7. Bibliografia

1. Bazzicalupi, C.; Bencini A.; Biagini, S.; Bianchi A.; Faggi E.; Giorgi C.; Marchetta, M.; Totti, F.; Valtancoli, B. *Chemistry* **2009**, *15*, 8049-8063.
2. Biver, T.; Lombardi, D.; Secco, F.; Tiné, M.R.; Venturini, M.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Valtancoli, B. *Danton Trans.* **2006** 1524-1533
3. C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, L. Borsari, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, J.C. Lima, A.J. Parola, F. Pina, *Dalt. Trans.* **2004**, 591.

4. R.M. Smith, A.E. Martell, NIST Stability Constants Database, Version 4.0, National Institute of Standards and Technology, Washington, **1997**.
5. C. Lodeiro, A.J. Parola, F. Pina, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, A. Masotti, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 2968.
6. N. Armaroli, L. De Cola, V. Balzani, J.-P. Sauvage, C.O. Dietrich-Buchecker, J.M. Kern, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, 88, 553.
7. C. Anda, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, P. Fornasari, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, A. J. Parola, F. Pina, *Dalt. Trans.* **2003**, 1299

7. Nuovo legante poliamminico contenente due subunità 2,9-fenantrolina come chemosensore fluorescente per lo ione Zn(II) e potenziale recettore per il DNA

7.1. Introduzione

Considerando ancora il fatto che sistemi macrocicli poliamminici, contenenti l'unità fenantrolina, siano in grado di interagire con il DNA sia tramite meccanismi intercalativi che interazioni di tipo elettrostatico, è stato progettato e sintetizzato il legante **L6** contenente due unità 2,9-fenantrolina collegate da due catene poliamminiche in cui i gruppi amminici sono separati da catene propileniche (Fig. 7.1).

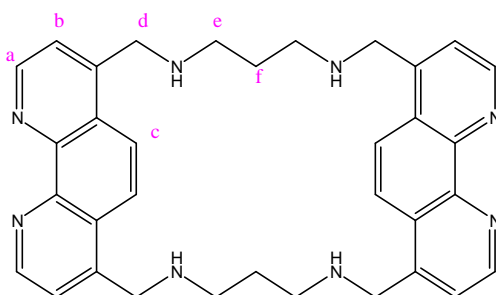


Fig. 7.1- Rappresentazione del legante **L6** e nomenclatura dei protoni.

Il legante **L6**, con due unità fenantrolina è potenzialmente un ottimo retore metallo-intercalante perché non solo si può inserire tra coppie di basi del polinucleotide come una pinza, ma grazie alla coordinazione di due ioni Zn(II) da parte delle stesse unità fenantrolina può portare gli ioni Zn(II) nelle immediate vicinanze dei legami fosfodiesterici e promuoverne il cleavage idrolitico.

7.2. Protonazione del legante L6

Le costanti di protonazione di **L6** sono state determinate integrando misure potenziometriche e misure spettrofotometriche in soluzione acquosa (NMe₄Cl 0.1 M). Le costanti sono riportate in Tabella 7.1 e il diagramma di distribuzione delle specie in Fig. 7.1.

Tabella 7.1- Costanti di protonazione di **L6** (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K).

Equilibrio	logK
$L + H^+ = [LH]^+$	9.21(1)
$[LH]^+ + H^+ = [LH_2]^{2+}$	8.71(1)
$[LH_2]^{2+} + H^+ = [LH_3]^{3+}$	5.01(1)
$[LH_3]^{3+} + H^+ = [LH_4]^{4+}$	4.32(1)
$[LH_4]^{4+} + H^+ = [LH_5]^{5+}$	3.99(1)
$[LH_5]^{5+} + H^+ = [LH_6]^{6+}$	3.22(1)

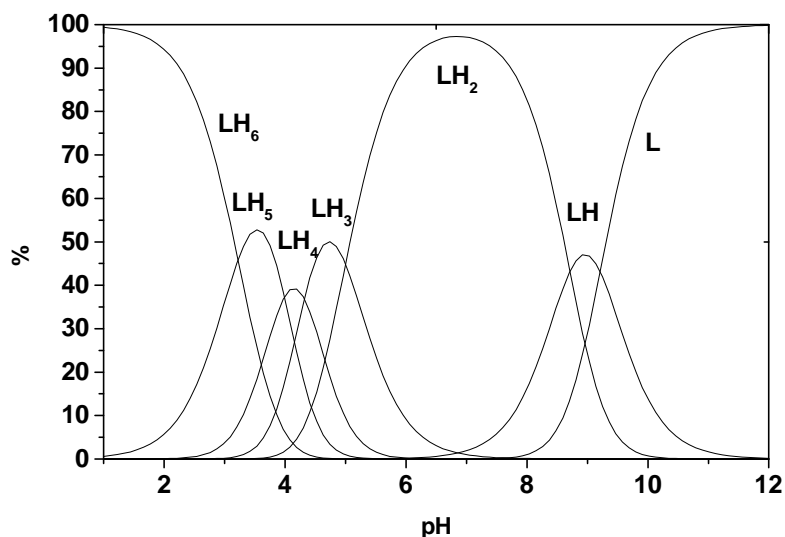


Fig. 7.2- Diagramma di distribuzione delle specie protonate di **L6** ($[L6]=4 \cdot 10^{-6}M$)

Come si può notare dal diagramma di distribuzione delle specie in Fig. 7.2, il legante lega fino a sei protoni e la specie diprotonata LH₂ è la predominante nel più ampio intervallo di pH.

Informazioni relative agli atomi di azoto coinvolti nella protonazione sono state ottenute registrando spettri $^1\text{H-NMR}$ di una soluzione $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ del legante in acqua deuterata analizzando la variazione di chemical shift dei segnali al variare del pH. L'intervallo di pH analizzato va da 2 a 7 poiché a valori di pH superiori si ha la precipitazione del legante. In Fig. 7.3 è riportata la variazione dei chemical shift dei segnali dei protoni.

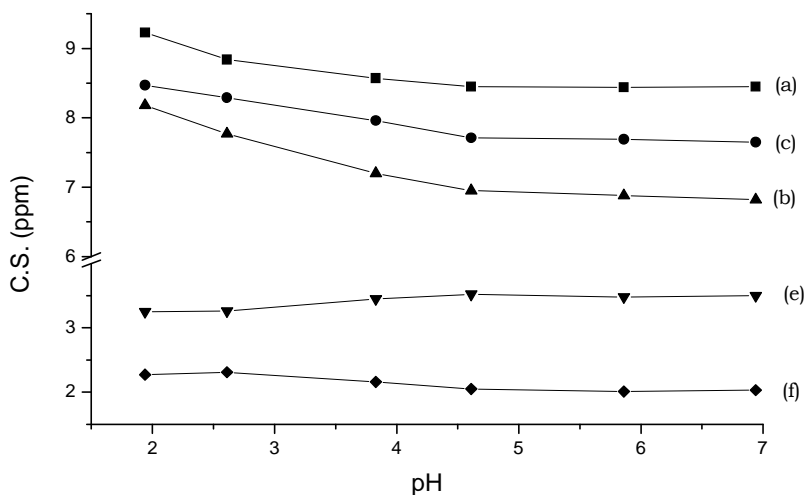


Fig. 7.3- Variazione dei chemical shift dei segnali dei protoni in funzione del pH ($[\text{L6}] = 5 \cdot 10^{-3}\text{M}$).

Si può notare che sotto pH 4 si ha un downfield shift dei segnali dei protoni aromatici, che indica la protonazione dell'unità fenantrolina. Molto probabilmente i primi quattro protoni entrano nella cavità macrociclica del legante e gli ultimi due protoni sono legati dall'unità fenantrolina.

La protonazione del legante è stata studiata anche mediante misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche. In Fig.7.4 sono riportati gli spettri di assorbimento del legante **L6** a diversi valori di pH.

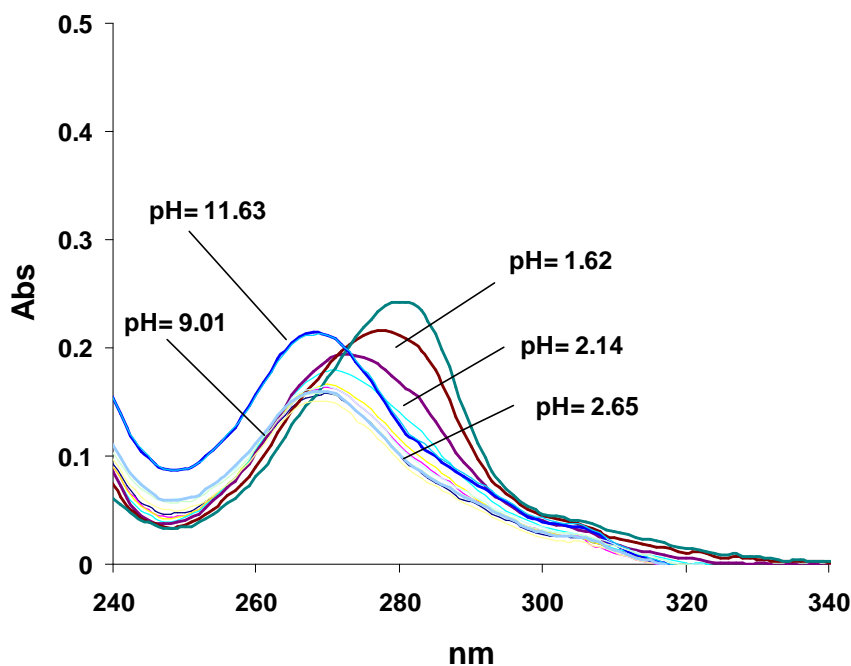


Fig. 7.4- Spettri di assorbimento di **L6** a diversi valori di pH ($[L6]=4.8 \cdot 10^{-6}M$).

Come si può notare, la banda di assorbimento della fenantrolina subisce delle variazioni al variare del pH. In particolare, al diminuire del pH si ha la diminuzione della banda a 267nm, lo shift a 280nm e l'aumento della banda a 280nm in corrispondenza della protonazione dell'unità fenantrolina. Questo andamento è ancora più evidente se si considera la sovrapposizione degli assorbimenti delle due bande al diagramma di distribuzione delle specie (Fig. 7.5).

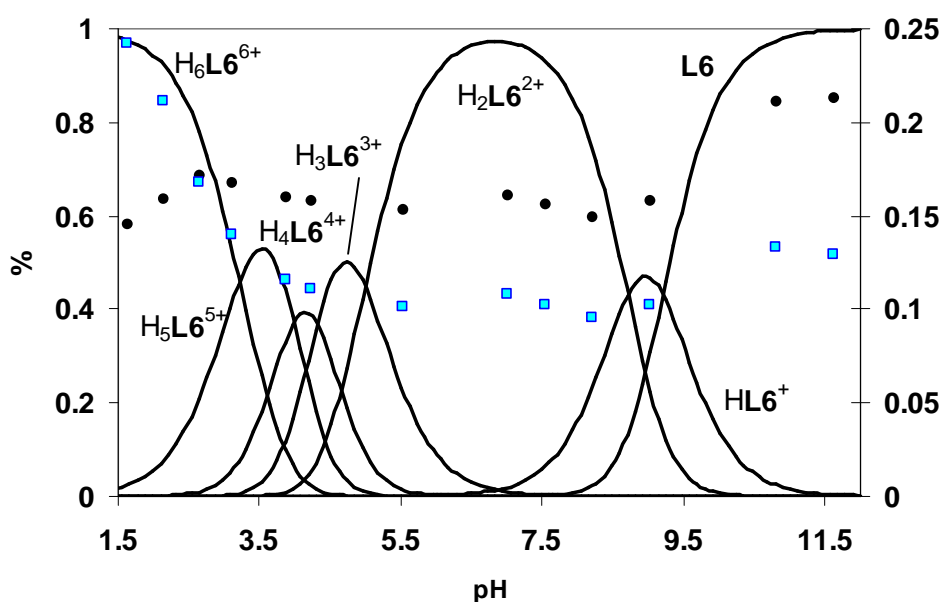


Fig. 7.5- Valori di assorbimento per $\lambda_1=267nm$ (●) e $\lambda_2=280nm$ (□) sovrapposti al digramma di distribuzione delle specie protonate ($[L6]=4.8 \cdot 10^{-6}M$).

Come si può notare, in corrispondenza della formazione della specie LH_5 e in modo più evidente in corrispondenza della specie LH_6 si ha l'aumento della intensità di assorbimento della banda a 280 nm. Questo può essere ragionevolmente ricondotto alla protonazione delle due unità fenantrolina.

Sono state effettuate misure per verificare se nell'intervallo di concentrazioni di lavoro il legante **L6** segue la legge di Lambert-Beer in soluzione e si possono escludere fenomeni di autoaggregazione. Come si può osservare dalla Fig. 7.6, la dipendenza dell'assorbanza dalla concentrazione è lineare per cui si può concludere che nell'intervallo di concentrazioni di lavoro non sono presenti fenomeni di autoaggregazione del legante.

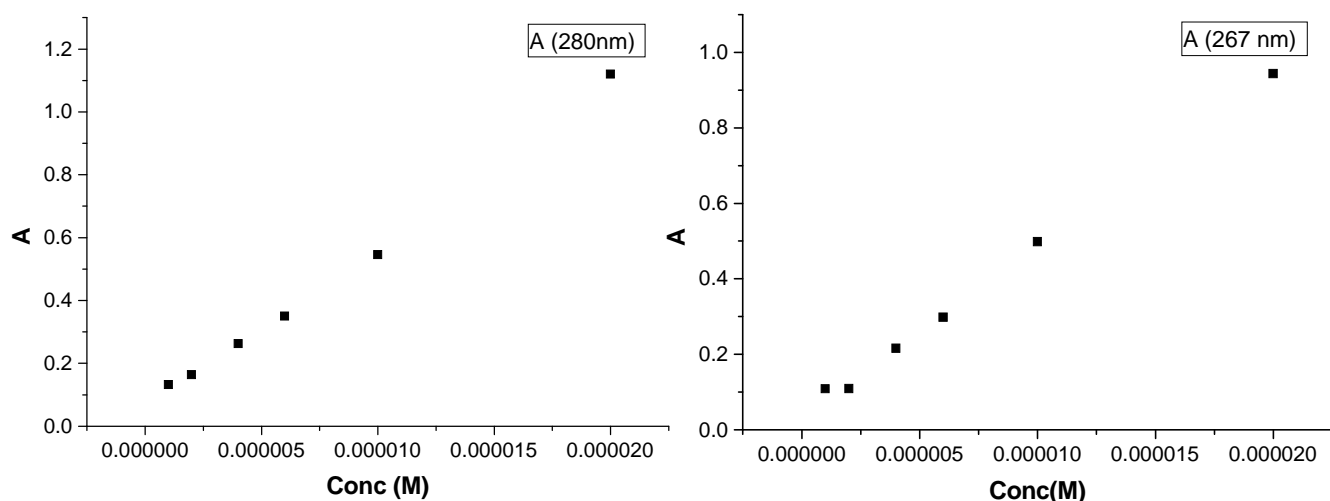


Fig. 7.6- Variazione dell'assorbanza di **L6** in funzione della concentrazione in ambiente acido (A (280 nm)) e in ambiente basico (A (267 nm)).

Nonostante questa informazione preliminare, è stato visto che è necessario studiare il comportamento del legante preparando soluzioni acquose fresche prima di ogni misura. L'analisi spettrofluorimetrica permette di ottenere informazioni molto interessanti. In Fig. 7.7 è riportata la variazione dell'intensità di emissione di fluorescenza a 365 nm sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie protonate.

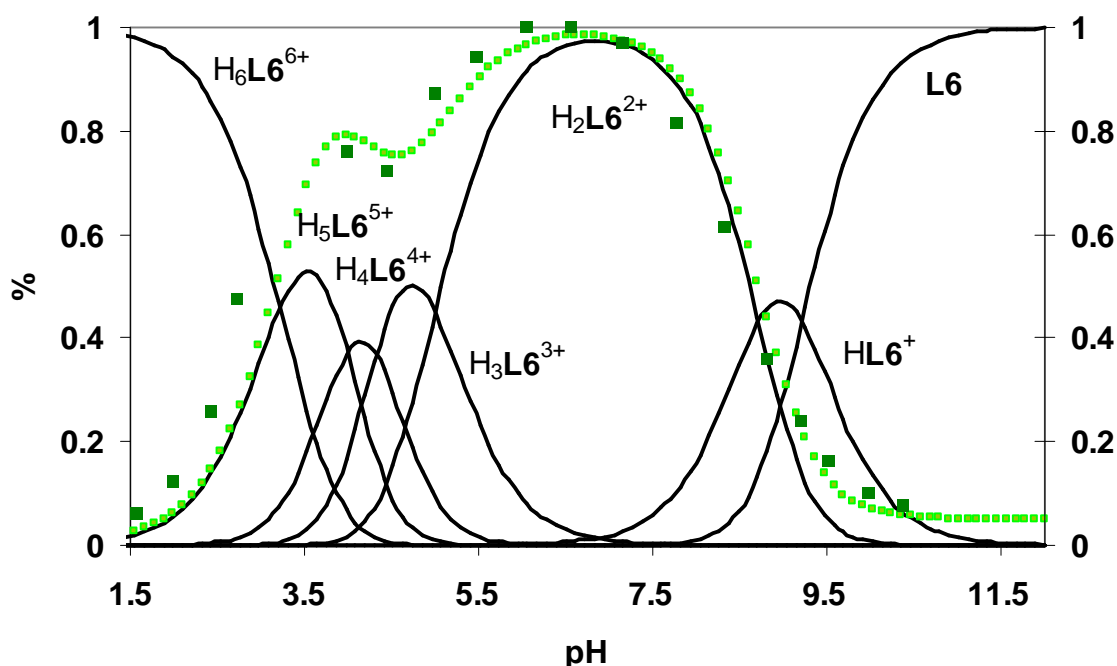


Fig. 7.7- Variazione di intensità di emissione di fluorescenza a 365 nm sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie $[L6]=4.08 \cdot 10^{-6}M$.

Come si può notare le specie in soluzione acquosa che contribuiscono in modo rilevante all'emissione in fluorescenza sono LH_2 , LH_3 , LH_4 e LH_5 . In corrispondenza di LH_5 e LH_6 , quando si ha la protonazione di entrambe le unità fenantrolina si assiste al quenching delle unità fenantrolina. Il risultato è in accordo con i dati raccolti attraverso le misure spettrofotometriche e 1H -NMR. Il fatto che l'emissione in fluorescenza subisca quenching solo in corrispondenza della specie LH a pH alcalini, suggerisce che i primi due protoni relativi alla LH_2 si collochino nella cavità poliamminica e siano condivisi da due atomi di azoto. Quando uno dei due protoni esce dalla cavità la coppia elettronica dei due atomi di azoto liberi provoca un effetto quenching sulle unità fenantrolina.

Per avere maggiori informazioni su questo particolare comportamento sono stati eseguiti calcoli di molecular modeling effettuati con simulazione implicita del solvente. E' stato visto che il legante completamente deprotonato si presenta con una conformazione a libro aperto, in cui le due unità fenantrolina si trovano in posizioni distanti (Fig. 7.8). Questo è in accordo con l'assenza di emissione di fluorescenza a pH superiore a 9. La

presenza di coppie elettroniche libere sugli atomi di azoto provoca il quenching dell'emissione di fluorescenza dell'unità fenantrolina eccitata.

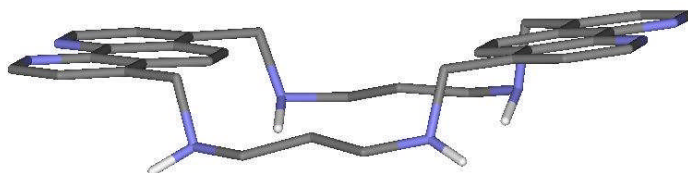


Fig. 7.8 – Conformazione di **L6**.

Al contrario, per la specie diprotonata si può notare come i due protoni siano coinvolti nella formazione di forti ponti idrogeno tra gli atomi di azoto delle due catene propileniche (Fig. 7.9).

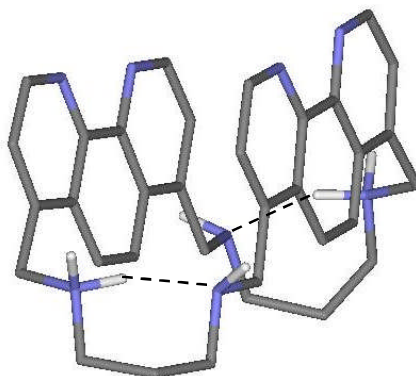


Fig. 7.8 – Conformazione di $[H_2L6]^{2+}$

Questo porta ad un avvicinamento delle due unità fenantrolina con una distanza interplanare di 3.85 Å, compatibile con la presenza di una interazione di π - π stacking. Questo comportamento è in accordo con quanto già visto in letteratura,¹ per un sistema analogo contenente due unità 1,10-fenantrolina separate da due catene 2-2' ossidietilammina. Era stata vista la formazione di aggregati allo stato solido con supermolecole impaccate con

interazioni π - π stacking e distanze interplanari fenantrolina-fenantrolina di 3.4 Å.

La particolare conformazione assunta dal legante e l'assenza di coppie elettroniche libere sugli atomi di azoto rende ragione dell'aumento di emissione di fluorescenza in corrispondenza della specie LH₂.

Quando all'interno della catena poliamminica sono presenti quattro protoni si assiste alla rottura di questi ponti a idrogeno e alla riapertura della molecola (Fig. 7.10).

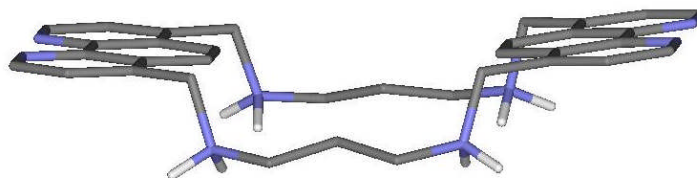


Fig. 7.10- Conformazione di [H₄L₆]⁴⁺.

Questo spiega la diminuzione di emissione di fluorescenza in corrispondenza della formazione della specie tetraprotonata. Successivamente si ha un nuovo aumento di emissione in corrispondenza delle specie LH₅ e di nuovo una diminuzione dell'emissione in corrispondenza della specie LH₆. E' noto infatti che la protonazione dell'unità fenantrolina comporta una diminuzione dell'emissione di fluorescenza.

7.3. Coordinazione dello ione Zn(II) da parte di L6

In Tabella 7.2 sono riportate le costanti di stabilità degli addotti di L6 con Zn(II) determinate per via potenziometrica in soluzione acquosa (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K).

Tabella 7.2- Costanti di stabilità degli addotti di **L6** con Zn(II).

Equilibrio	logK
$Zn^{2+} + L = ZnL^{2+}$	8.1 (1)
$ZnL^{2+} + H^+ = ZnHL^{3+}$	9.8 (2)
$ZnHL^{3+} + H^+ = ZnH_2L^{4+}$	6.6 (1)
$ZnH_2L^{4+} + 2H^+ = ZnH_4L^{6+}$	8.1 (1)
$ZnL^{2+} + OH^- = ZnLOH^+$	2.3 (1)
$2Zn^{2+} + L + = Zn_2L^{4+}$	6.5 (1)
$2Zn^{2+} + L + 2OH^- = Zn_2L(OH)_2$	-1.2 (1)

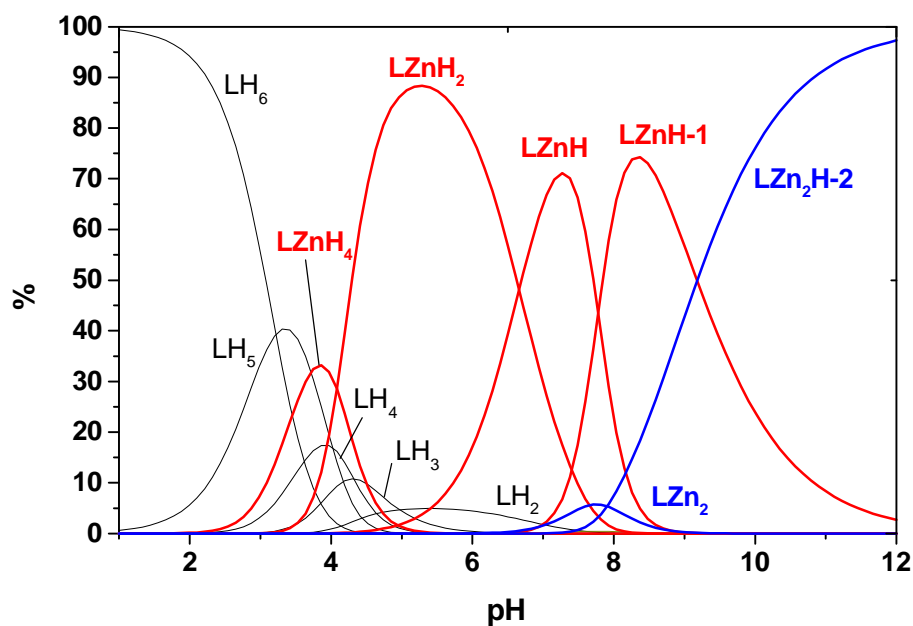


Fig. 7.11- Diagramma di distribuzione delle specie complesse per il sistema **L6**:Zn(II) 1:2 ([L6]=4.08·10⁻⁶).

Come si può notare dal diagramma di distribuzione delle specie in Fig. 7.11, si ha la formazione di specie mononucleari di Zn(II) tra pH 4 e pH 9, mentre sopra pH 9 si ha la formazione di specie di nucleari di Zn(II) e della specie LZn₂(OH)₂.

Il sistema è stato studiato da un punto di vista spettrofotometrico e spettrofluorimetrico. In Fig.7.12 sono riportati gli spettri di assorbimento del sistema L6:Zn(II) 1:2 a diversi valori di pH e una sovrapposizione dei valori di assorbimento a 280 nm e 267 nm al diagramma di distribuzione delle specie.

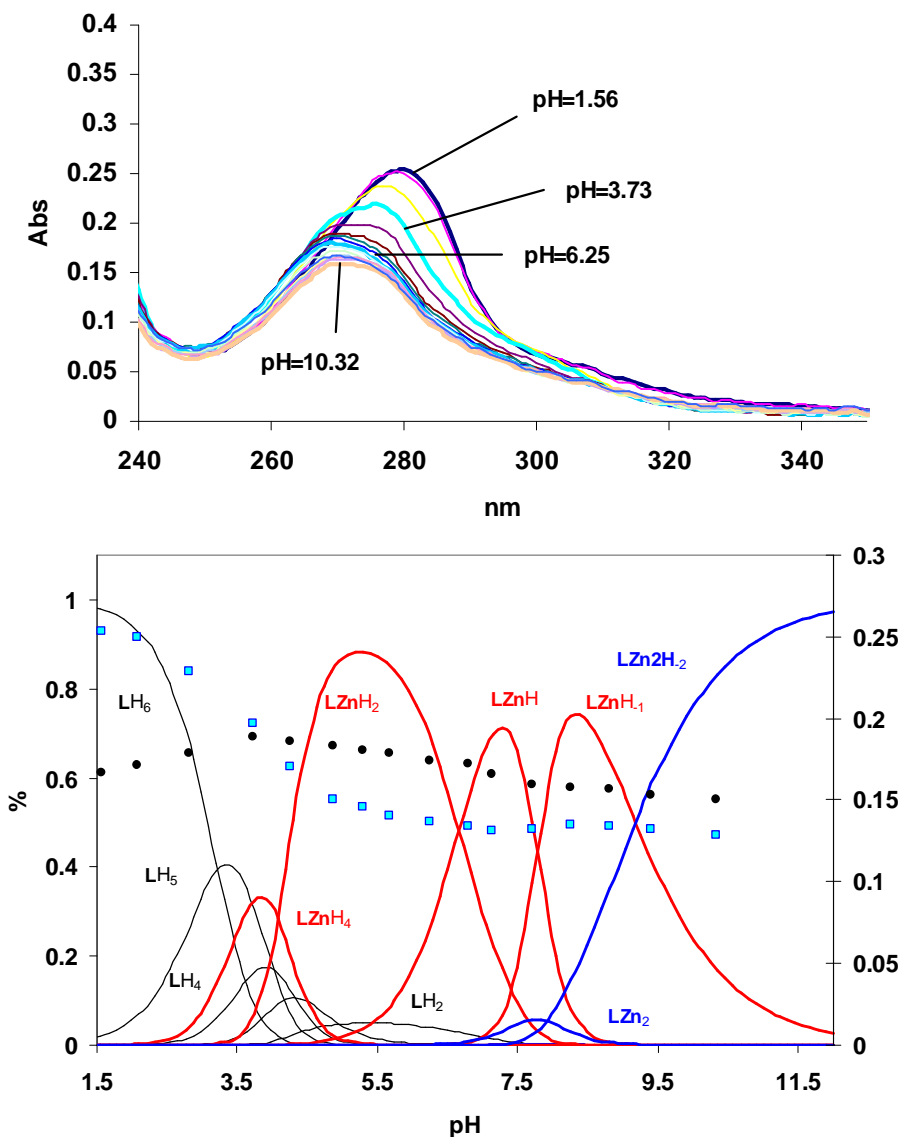


Fig. 7.12- Spettri di assorbimento per il sistema **L6:Zn(II)** 1:2 a diversi valori di pH e sovrapposizione dei valori di assorbimento a $\lambda_1=267\text{nm}$ (●) e $\lambda_2=280\text{nm}$ (□) sovrapposti al diagramma delle specie complesse ($[\text{L6}]=4.08 \cdot 10^{-6}\text{M}$).

Si può notare che l'assorbimento a 280 nm aumenta sempre in corrispondenza della protonazione del legante libero presente in queste condizioni. Al contrario la banda a 267 nm è diagnostica della formazione di specie complesse stabili sopra pH 4. Per avere maggiori informazioni e

verificare la stechiometria dell'addotto con Zn(II) sono stati registrati spettri di assorbimento aggiungendo aliquote crescenti di Zn(II) a una soluzione di legante a pH=10 (Fig. 7.13).

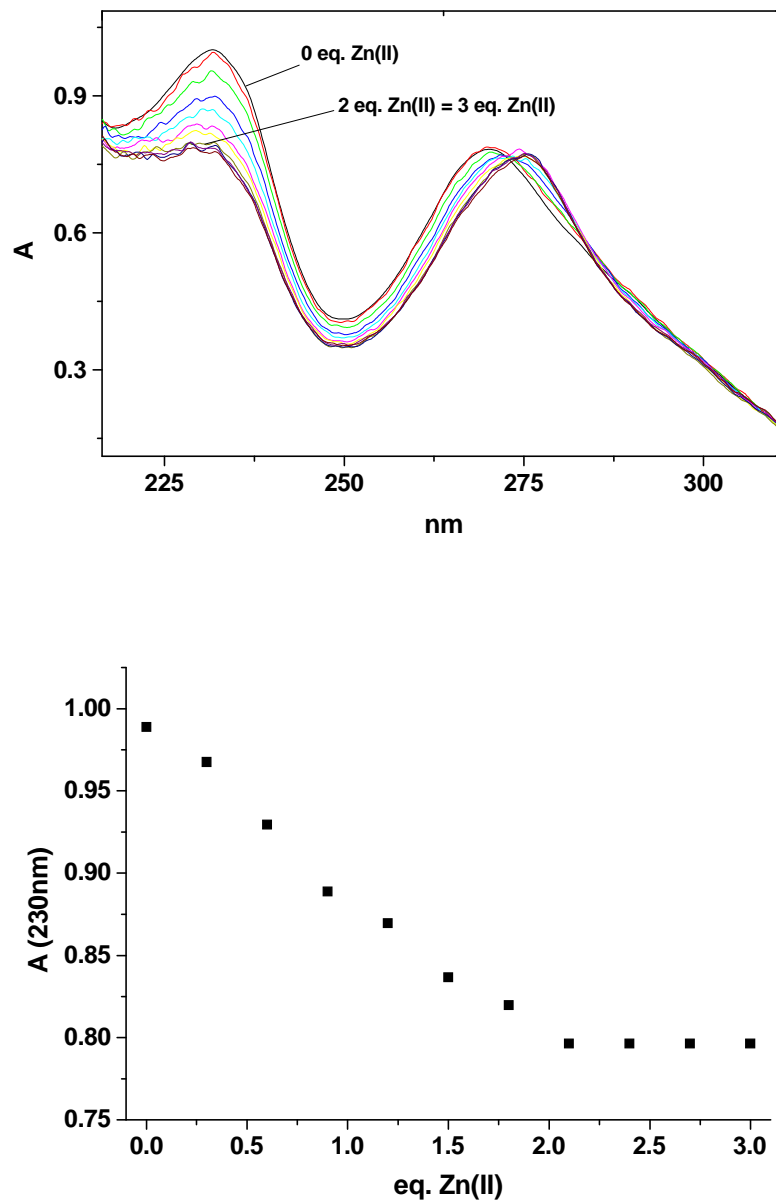


Fig. 7.13- Spettri di assorbimento di **L6** registrati a pH =10 aggiungendo aliquote crescenti di Zn(II) e variazione dell'assorbimento a 230 nm in funzione degli equivalenti di Zn(II) aggiunti.

Come si può notare dalla Fig. 7.13 l'aggiunta di aliquote crescenti di Zn(II) determina una diminuzione della banda di assorbimento a 230 nm e uno spostamento della banda a 267 nm fino a 275 nm. In corrispondenza di 2

equivalenti di Zn(II) si raggiunge un plateau in accordo con la formazione di un complesso dinucleare.

E' stato poi studiato l'effetto sull'emissione in fluorescenza del legante aggiungendo 2 equivalenti di ione Zn(II). In Fig. 7.14 è riportata la variazione dell'emissione in fluorescenza del sistema **L6**:Zn(II) a 365 nm sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie e messa a confronto con l'intensità di emissione del legante.

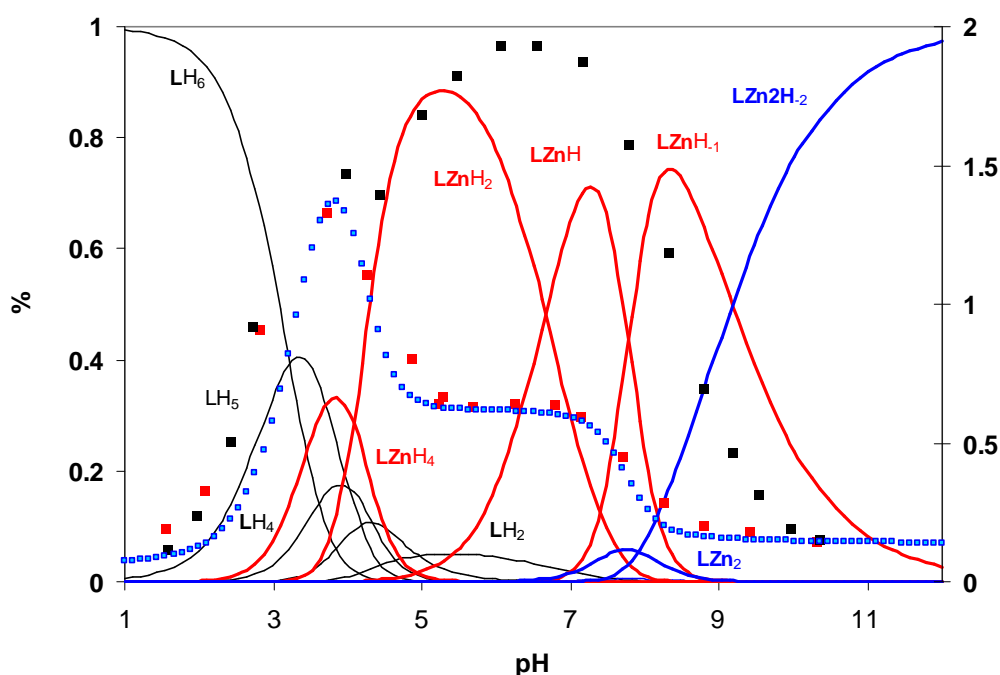


Fig. 7.14- Variazione dell'emissione in fluorescenza del sistema **L6**:Zn(II) a 365 nm sovrapposta al diagramma di distribuzione delle specie e messa a confronto con l'intensità di emissione del legante a 365 nm. ($[L6]=4.08 \cdot 10^{-6}M$).

In Tabella 7.3 sono riportate le rese quantiche delle singole specie presenti in soluzione per **L6** e per il sistema **L6**:Zn(II) 1:2.

Tabella 7.3- Rese quantiche relative alle diverse specie presenti in soluzione per il sistema **L6**: Zn(II) 1:2.

Specie	Resa Quantica
L	0.00025
LH ⁺	0.00075
LH ₂ ²⁺	0.005
LH ₃ ³⁺	0.003
LH ₄ ⁴⁺	0.004
LH ₅ ⁵⁺	0.005
LH ₆ ⁶⁺	0.00035
ZnL ²⁺	0.0004
ZnHL ³⁺	0.003
ZnH ₂ L ⁴⁺	0.003
ZnH ₄ L ⁶⁺	0.013
ZnLOH ⁺	0.00085
Zn ₂ L ⁴⁺	0.00115
Zn ₂ L(OH) ₂	0.0007

Considerando la Fig. 7.14 e la Tabella 7.3 si può affermare che in presenza di due ioni Zn(II) le rese quantiche di fluorescenza del legante rimangono inalterate e si aggiungono i contributi delle diverse specie complesse con Zn(II). Un primo visibile effetto del quenching si ha in corrispondenza della formazione delle specie LZnH₄ e LZnH e un secondo in corrispondenza della formazione delle specie LZn₂ e LZn₂(OH)₂. L'effetto di quenching da parte di Zn nei confronti della fenantrolina è molto raro. Usualmente l'effetto è di aumento dell'intensità di emissione in fluorescenza. Per chiarire l'effetto che lo Zinco ha sul legante sono stati registrati spettri di emissione di fluorescenza a pH 6 della fenantrolina e della fenantrolina in presenza di aliquote crescenti di zinco (Fig. 7.15).

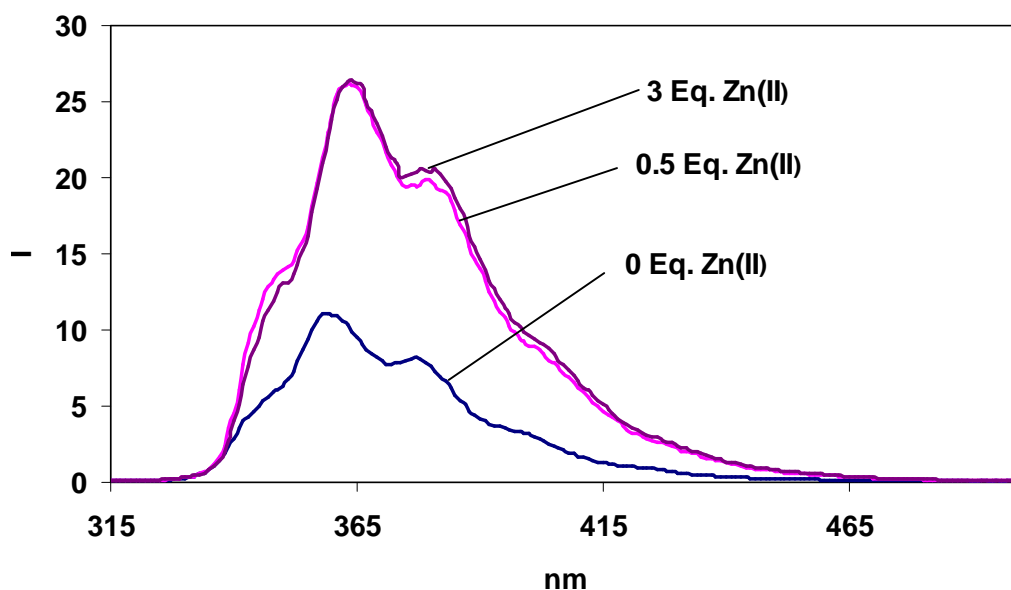
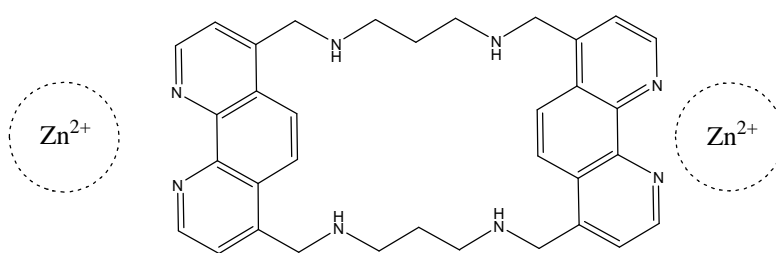


Fig. 7.15- Spettri di emissione di fluorescenza a pH 6 della fenantrolina e della fenantrolina in presenza di aliquote crescenti di zinco.

Come si può notare l'effetto è senza dubbio quello di aumento dell'emissione di fluorescenza già con l'aggiunta di 0.5 eq. di Zinco. Pertanto nel nostro sistema si può ipotizzare che con una stechiometria 1:2 L:Zn, gli ioni Zn siano coordinati dalle due unità fenantrolina e gli atomi di azoto della catena poliamminica liberi provochino quenching dell'emissione in fluorescenza (Schema1).



Schema 1- Coordinazione di due ioni Zn(II) da parte di **L6**.

Sono stati registrati spettri di emissione di fluorescenza a pH variabile del legante in presenza di tre ioni zinco ma non sono state notate variazioni particolari. Il risultato conferma i dati ottenuti per via potenziometrica, secondo i quali non sono presenti specie con stechiometria **L6**:Zn(II) 1:3.

Concludendo si può affermare che, pur lo zinco contribuendo all'emissione in fluorescenza, si verifica un primo quenching in corrispondenza della formazione della specie $LZnH_2$ e una successiva diminuzione in parte dovuta alla formazione del complesso binucleare LZn_2 e in parte dovuta alla formazione delle idrosso-specie ad pH alcalini.

Per avere maggiori informazioni sulla coordinazione dello $Zn(II)$ sono state analizzate le specie in corrispondenza della formazione delle quali sono stati notati i due fenomeni di quenching di emissione di fluorescenza, eseguendo calcoli di molecular modeling con simulazione implicita del solvente. Mentre la specie $LZnH_4$ è risultata essere molto fluorescente (resa quantica 0.013), la specie $LZnH_2$ sembra essere la principale responsabile del primo fenomeno di quenching in presenza di $Zn(II)$ (Fig. 7.16).

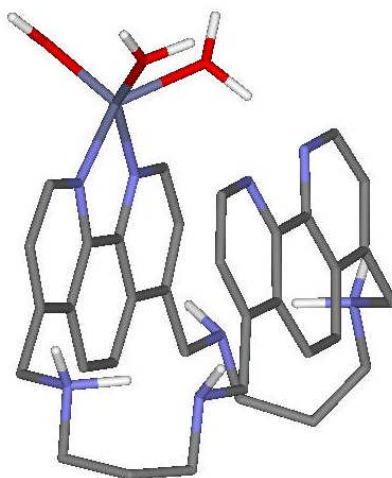


Fig. 7.16 – Conformazione di $LZnH_2$.

Lo ione metallico risulta essere coordinato da una unità fenantrolina e la presenza di ponti idrogeno tra i due protoni e gli atomi di azoto della catena poliamminica assicura alla specie una conformazione piegata con una distanza interplanare fenantrolina-fenantrolina di 3.47 Å. La sfera di coordinazione del metallo è completata da tre molecole di acqua. Il calcolo conferma che la coordinazione dello $Zn(II)$ avviene da parte dell'unità fenantrolina e che questo si può ben definire un caso molto raro di

quenching di emissione di fluorescenza a seguito di una coordinazione di uno ione Zn(II) da parte dell'unità fenantrolina.

La specie $LZn_2(OH)_2$ in corrispondenza della quale si ha il secondo e definitivo quenching di emissione di fluorescenza ha invece una conformazione più aperta con le due unità fenantrolina che coordinano ognuna uno ione Zn(II). La sfera di coordinazione dello ione metallico è completata da un gruppo idrossido e da due molecole di acqua (Fig. 7.17).

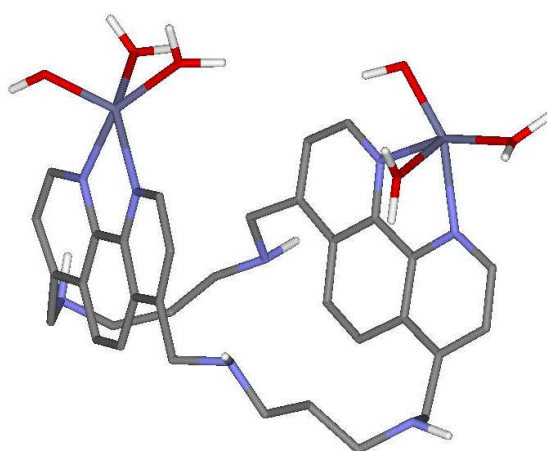


Fig. 7.17 - Conformazione di $LZn_2(OH)_2$.

Ancora una volta la coordinazione di un altro ione Zn(II) determina un raro fenomeno di quenching di emissione di fluorescenza. Inoltre la presenza di gruppi idrossido e di atomi di azoto con coppie elettroniche libere a pH alcalino determina il totale quenching dell'emissione di fluorescenza.

7.4. Conclusioni

Il legante **L6** presenta due unità fenantrolina legate da due catene propilamminiche. Le due unità eteroaromatiche si trovano a una distanza tale che, in particolari condizioni di protonazione (ad esempio nella specie diprotonata LH_2), possono dare interazione di π - π stacking. La presenza di

questa conformazione in soluzione è ben evidenziata dalla notevole resa quantica della specie LH₂. La coordinazione dello ione Zn(II) da parte del legante porta alla formazione di specie mono e binucleari il cui effetto è un unusuale quenching di emissione di fluorescenza. Pertanto il legante **L6** è risultato essere un interessante chemosensore per lo ione Zn(II) in soluzione. Sarà altrettanto interessante studiarne le proprietà di interazione con il DNA, da solo e in presenza di ioni Zn(II) per testarne l'efficacia come metallo-intercalante. Le due unità fenantrolina si possono infatti inserire tra coppie di basi del polinucleotide e la particolare architettura del legante permetterebbe di inserirsi come una pinza nel DNA determinandone notevoli modificazioni strutturali .

7.5. Bibliografia

1. Cruz, C.; Delgado, R.; Drew, M.G.B.; Félix, V. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 4023-4034

8. Studio di un nuovo legante contenente l'unità fenantrolina e due unità naftaleniche come potenziale recettore per il DNA. Esempio di un sensore fluorescente per gli ioni Cd(II) e Zn(II). Formazione di un ecciplesso in soluzione

8.1. Introduzione

Sono di notevole importanza sistemi chimici in grado di compiere movimenti controllati a livello molecolare. In particolare si rivolge maggiore attenzione a quei sistemi molecolari nei quali è possibile controllare i movimenti attraverso input esterni (pH, temperatura, luce, potenziale redox, ioni metallici).¹ Un metodo interessante per determinare la presenza in soluzione di specie non fluorescenti, è quello di utilizzare recettori fluorescenti, le cui proprietà di emissione possono essere modificate dall'interazione con composti target. Precedentemente sono stati studiati leganti in grado di compiere movimenti a seguito della coordinazione dello ione Zn(II) e di funzionare da macchina molecolare guidata da input quali pH e luce.²

Per ottenere maggiori informazioni circa il funzionamento di questi sistemi è stato sintetizzato un nuovo legante contenente una unità fenantrolina e due unità naftalene (**L7** in Fig. 8.1) e ne sono state studiate le proprietà come chemosensore nei confronti degli ioni Cu(II), Zn(II), Cd(II) e Pb(II) in soluzione acqua/etanolo.

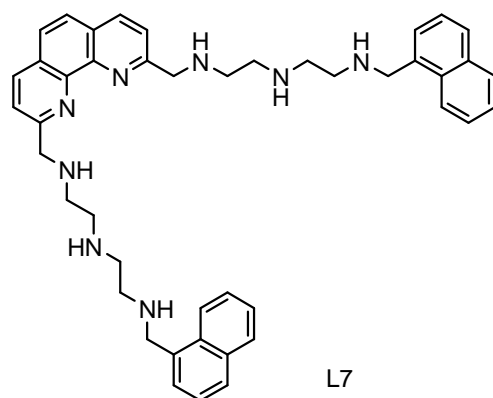


Fig. 8.1- Rappresentazione del legante **L7**.

Questo nuovo legante in presenza degli ioni Zn(II) e Cd(II) ha mostrato di disporre di una peculiare emissione di un ecciplesso dovuta ad una nuova specie risultante dal movimento di avvicinamento di un braccio naftalenico al cromoforo fenantrolina (Fig. 8.2). Lo scopo del presenta lavoro è quello di ottenere parametri termodinamici in soluzione per poter comprendere meglio i parametri energetici legati al movimento del braccio e alla formazione dell'ecciplesso. L'energia di attivazione dell'ecciplesso è stata ottenuta in soluzione acqua/etanolo.

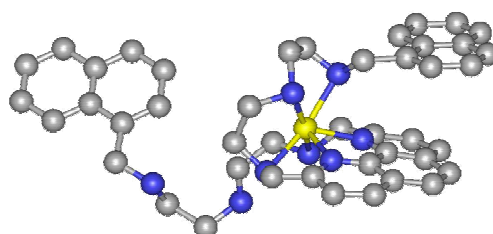


Fig. 8.2- Formazione di un ecciplesso attribuibile all'interazione via π -stacking di un gruppo naftalenico con il gruppo fenantrolinico promossa dalla coordinazione dello ione metallico da parte di **L7**.

Il legante **L7** è stato sintetizzato nell'ottica di studiarne le proprietà coordinative nei confronti del DNA. Non a caso l'unità fenantrolina ha delle note proprietà intercalanti e inoltre, la geometria di coordinazione dello ione Zn(II) da parte di questo legante potrebbe portare lo ione metallico nelle vicinanze del DNA e coinvolgere l'acido nucleico in reazioni di "cleavage" idrolitico. Al momento sono stati condotti gli studi di complessazione dei metalli Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II} e Pb^{II}, per avere informazioni sulle sue possibili conformazioni in presenza di questi ioni metallici.

8.2. Protonazione di L7

La protonazione del legante è stata effettuata mediante misure potenziometriche in soluzioni acqua – etanolo (50:50, v:v, NMe₄Cl 0.1M, 298.1K), a causa di problemi di precipitazione del legante a pH > 4 in acqua. I risultati sono riportati in Tabella 8.1 e il diagramma di distribuzione delle specie in Fig. 8.3.

Tabella 8.1- Costanti di protonazione di **L7** determinate in soluzione H₂O/EtOH (50:50, v.v, NMe₄Cl 0.1M, 298.1K)

Equilibrio	Log K
$L + H^+ = [HL]^+$	9.71(5)
$[HL]^+ + H^+ = [H_2L]^{2+}$	8.44(5)
$[H_2L]^{2+} + H^+ = [H_3L]^{3+}$	7.63(6)
$[H_3L]^{3+} + H^+ = [H_4L]^{4+}$	6.51(7)
$[H_4L]^{4+} + H^+ = [H_5L]^{5+}$	3.91(9)
$[H_5L]^{5+} + H^+ = [H_6L]^{6+}$	2.82(8)

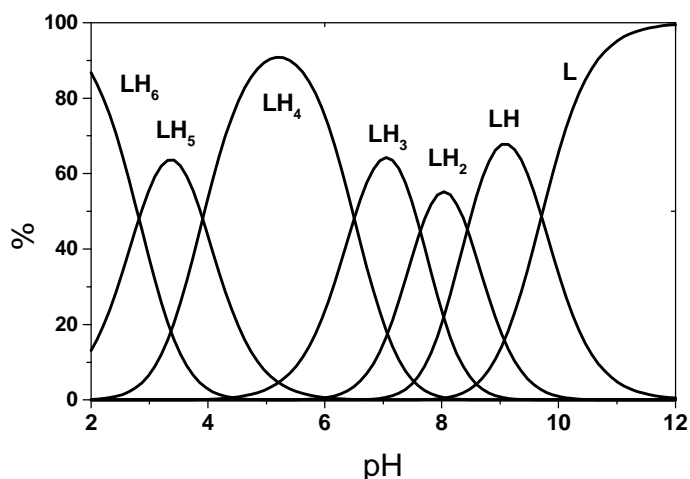


Fig. 8.3- Diagramma di distribuzione delle specie protonate di **L7**. [L] = 10⁻³M, H₂O/EtOH (50:50,v.v), 298.1 K.

Dai valori riportati in Tabella 8.1 e dal diagramma di distribuzione delle specie protonate riportato in Fig. 8.3 si osserva una evidente separazione tra i valori delle prime quattro costanti ($\text{Log } K = 9.71, 8.44, 7.63, 6.51$) e quelli delle ultime due ($\text{Log } K = 3.91, 2.82$). Questo comportamento può essere razionalizzato in termini di repulsione tra le cariche positive nelle specie poliprotonate del legante. Dal momento che i gruppi amminici secondari del legante sono più basici degli atomi di azoto della fenantrolina, è logico aspettarsi che i primi stadi di protonazione avvengano sulle catene poliamminiche. Data la flessibilità delle catene alifatiche si può supporre che nei primi stadi di protonazione ci sia stabilizzazione delle specie protonate mediante formazione di legami a idrogeno fra i gruppi ammonio ed i gruppi amminici adiacenti non protonati.

Informazioni relative agli atomi di azoto coinvolti nella protonazione sono state ottenute registrando spettri $^1\text{H-NMR}$ di una soluzione $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ del legante in una miscela acqua deuterata/metanolo deuterato (50:50, v.v) e analizzando la variazione di chemical shift dei segnali al variare del pH. La zona aromatica risulta molto complessa a causa della sovrapposizione dei segnali relativi alla fenantrolina e al naftalene. Le variazioni dei chemical shift sono comunque piuttosto piccole e non danno grandi informazioni. Trascurando perciò i segnali relativi agli atomi di idrogeno aromatici, i segnali caratteristici nello spettro $^1\text{H-NMR}$ sono attribuibili ai gruppi CH_2 delle catene poliamminiche e ai due gruppi benzilici Bn(1) e Bn(2) (Fig. 8.4).

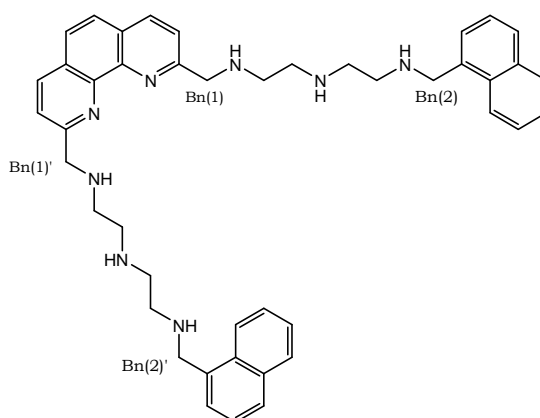


Fig. 8.4 -Gruppi considerati nell'analisi dei segnali $^1\text{H-NMR}$.

Nella Fig. 8.5 sono riportate le variazioni dei chemical shift dei segnali del legante **L7** in funzione del pH.

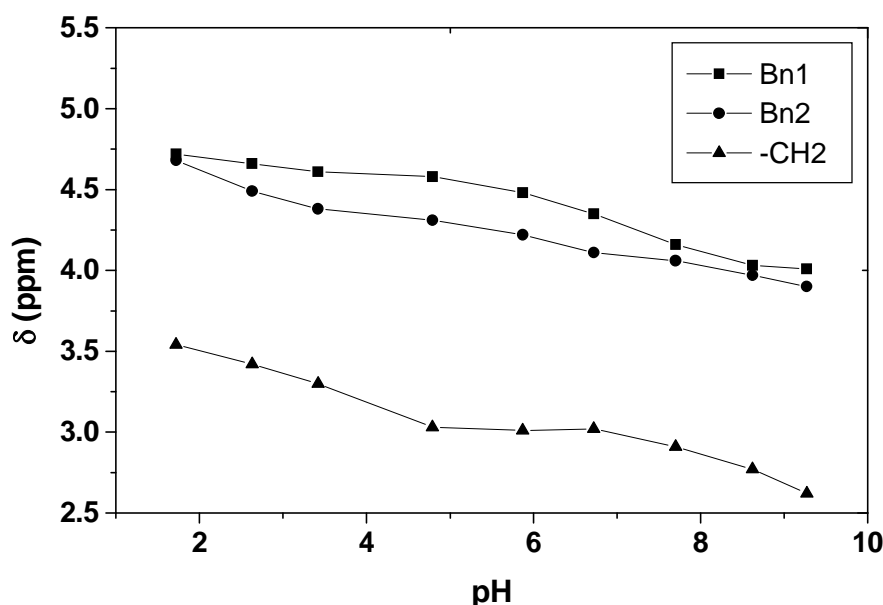


Fig. 8.5- Chemical shift $^1\text{H-NMR}$ dei segnali dei protoni di **L7** in funzione del pH a 298.1 K in $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ (50:50, v:v).

I segnali relativi ai gruppi CH_2 ($\delta = 3.53, 3.43$ ppm a pH 1.72) subiscono uno spostamento verso campi bassi passando da pH 10 a pH 7 per poi raggiungere un plateau fino a pH 5 circa; al di sotto di tale valore è possibile osservare un ulteriore spostamento verso campi bassi andando verso soluzioni acide. Anche i segnali relativi agli atomi di carbonio benilici legati al gruppo fenantrolinico (Bn1) ed ai gruppi naftalenici (Bn2) risentono di un progressivo spostamento verso campi bassi al decrescere del pH, con un maggiore effetto osservabile per il segnale dell'atomo legato al gruppo naftalenico nel campo di pH 8-5 dove si formano le specie triprotonata e tetraprotonata di **L7**. In base a questi dati è possibile ritenere che i primi gruppi amminici ad essere protonati, fino alla formazione della specie $[\text{LH}_2]^{2+}$ siano principalmente quelli centrali delle catene alifatiche, pur essendo coinvolti nella protonazione, probabilmente mediante formazione di legami a H, anche i gruppi amminici più vicini ai gruppi fenantrolinico e naftalenici. Questi ultimi gruppi amminici, e soprattutto quelli vicini ai gruppi naftalenici, risentono in maniera particolare della successiva

protonazione fino alla formazione della specie $[LH_4]^{4+}$ (Fig. 8.3 e 8.4), mentre la formazione di questa specie non è risentita in maniera apprezzabile dai gruppi amminici centrali alle catene alifatiche. Si può ritenere che nella specie $[LH_4]^{4+}$ ci sia una maggiore localizzazione dei protoni acidi sui gruppi amminici vicini ai gruppi aromatici, mentre siano meno coinvolti i gruppi amminici centrali. Per valori di pH inferiori a 5 si osserva poi un coinvolgimento di tutti i gruppi amminici alifatici con la formazione delle specie $[LH_5]^{5+}$.

La protonazione del legante è stata studiata anche mediante misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche. Gli spettri di assorbimento del legante registrati a diversi valori di pH, risultano caratterizzati dalla sovrapposizione delle bande di assorbimento dell'unità fenantrolina e delle due unità naftalene e non presentano grosse differenze al variare del pH. Sono stati anche registrati spettri di emissione di fluorescenza a diversi valori di pH di una soluzione del legante $5 \cdot 10^{-6}$ M in acqua-etanolo 50:50, v:v, eccitando il campione a 295 nm. Gli spettri registrati sono riportati in Fig. 8.6.

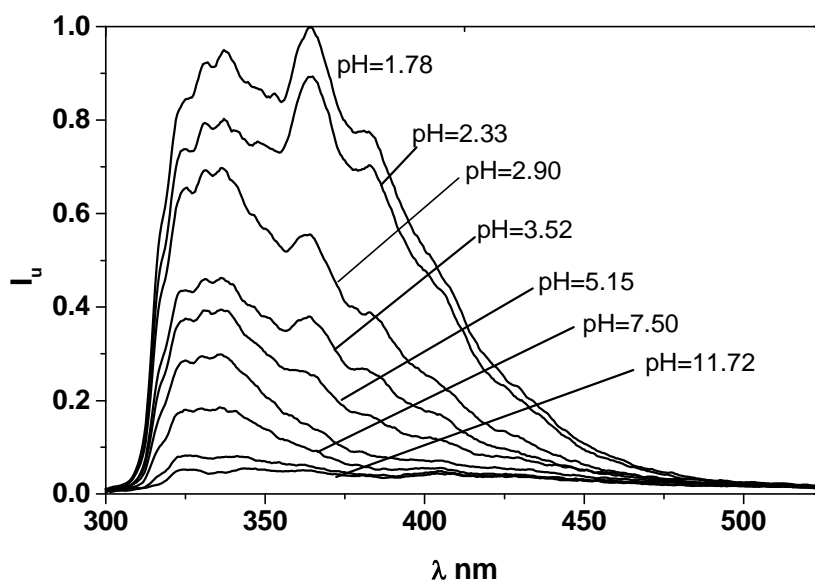


Fig.8.6- Spettri di emissione in fluorescenza registrati a diversi pH ($H_2O/EtOH$ (50:50,v:v), $[L] = 5 \cdot 10^{-6}$ M), 298.1 K, $\lambda_{ecc} = 295$ nm).

Possiamo notare come l'intensità di fluorescenza del legante sia fortemente influenzata dal pH. Le due bande di emissione riconoscibili a pH acido sono associate al naftalene (325 nm) e alla fenantrolina (365 nm). Con l'aumento del pH diminuisce la loro intensità di fluorescenza fino a spegnersi totalmente a pH basico. In Fig. 8.7 è riportato l'andamento delle intensità di fluorescenza in funzione del pH sovrapposto al diagramma di distribuzione delle specie del legante **L7**.

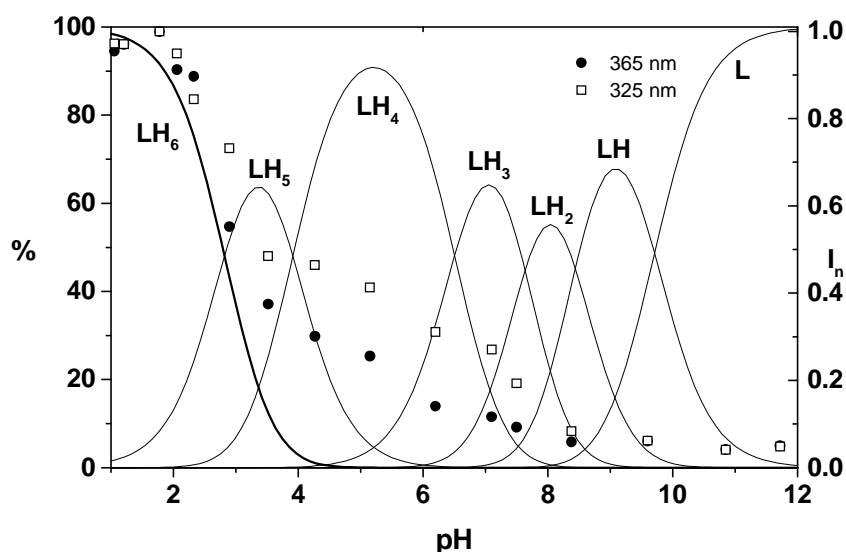


Fig. 8.7- Andamento dell'emissione in fluorescenza di **L7** a 325 nm e 365 nm in funzione del pH sovrapposto al diagramma di distribuzione delle specie $[LH_n]^{n+}$ in $H_2O/EtOH$ (50:50, v:v), $[L] = 5 \cdot 10^{-6}$ M.

Si osserva un fenomeno di quenching di fluorescenza di entrambi i fluorofori fino a pH 8, dove si ha la formazione della specie LH_3^{3+} . Il quenching di fluorescenza è un fenomeno che si manifesta quando gli atomi di azoto delle catene alifatiche non sono protonati e conseguentemente i loro doppietti solitari possono dare fenomeni di trasferimento di carica spengendo i fluorofori. I gruppi amminici più efficienti nel dare quenching dei fluorofori sono quelli più vicini agli stessi. A questo proposito si può ritenere confermata l'ipotesi che i primi atomi di azoto a protonarsi siano effettivamente quelli centrali nelle catene poliamminiche in quanto entrambi i fluorofori risultano spenti nella specie $[LH_2]^{2+}$. Solo con i successivi stadi di

protonazione si osserva una riduzione del fenomeno di quenching con comparsa di emissione, in particolare per il naftalene. Ciò è in accordo con le informazioni ottenute con le misure $^1\text{H-NMR}$ che indicavano una maggiore localizzazione dei protoni acidi sugli atomi di azoto prossimi ai gruppi aromatici nella specie $[\text{LH}_4]^{4+}$. Il forte aumento di intensità di emissione di fluorescenza che si individua in corrispondenza della formazione della specie pentaprottonata può essere attribuito ad una forte localizzazione dei protoni acidi sugli atomi vicini ai gruppi aromatici in $[\text{LH}_5]^{5+}$. La piccola riduzione di intensità a pH fortemente acidi è da attribuire alla protonazione degli atomi di azoto della fenantrolina.

8.3. Complessazione dei metalli

Nel caso delle misure effettuate per studiare la complessazione di Cu(II) e Pb(II) si è osservata la precipitazione dei complessi metallici per valori di pH superiori a 7. Per questo, nel caso di questi ioni metallici, le misure potenziometriche sono state limitate al campo di pH 2.5-7, mentre per la protonazione del legante e per la complessazione di Zn(II) e Cd(II) il campo di pH studiato è stato 2.5-10.5. In Tabella 8.2 sono riportate le costanti di stabilità dei complessi di **L7** con Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} e Pb^{II} determinate per via potenziometrica in soluzione $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, v.v).

Tabella 8.2- Costanti di stabilità dei complessi metallici di **L7** con Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} e Pb^{II} determinate per via potenziometrica in soluzione $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, v.v), 298.1 K.

Equilibrio	Log K			
	Zn(II)	Cd(II)	Cu(II)	Pb(II)
$\text{L} + \text{M}^{2+} = [\text{LM}]^{2+}$	15.96(9)	14.1(1)		11.6(1)
$\text{L} + \text{M}^{2+} + \text{H}^+ = [\text{LMH}]^{3+}$			21.7(1)	
$[\text{LM}]^{2+} + \text{H}^+ = [\text{LMH}]^{3+}$	6.97(9)	7.9(1)		8.21(9)
$[\text{LMH}]^{3+} + \text{H}^+ = [\text{LMH}_2]^{4+}$	5.99(5)	5.72(9)	7.16(7)	6.91(9)
$[\text{LMH}_2]^{4+} + \text{H}^+ = [\text{LMH}_3]^{5+}$	3.50(5)	4.61(5)	4.76(3)	5.97(5)
$[\text{LMH}_3]^{5+} + \text{H}^+ = [\text{LMH}_4]^{6+}$	3.50(5)			
$[\text{LM}]^{2+} + \text{OH}^- = [\text{LM(OH)}]^+$	2.4(1)			

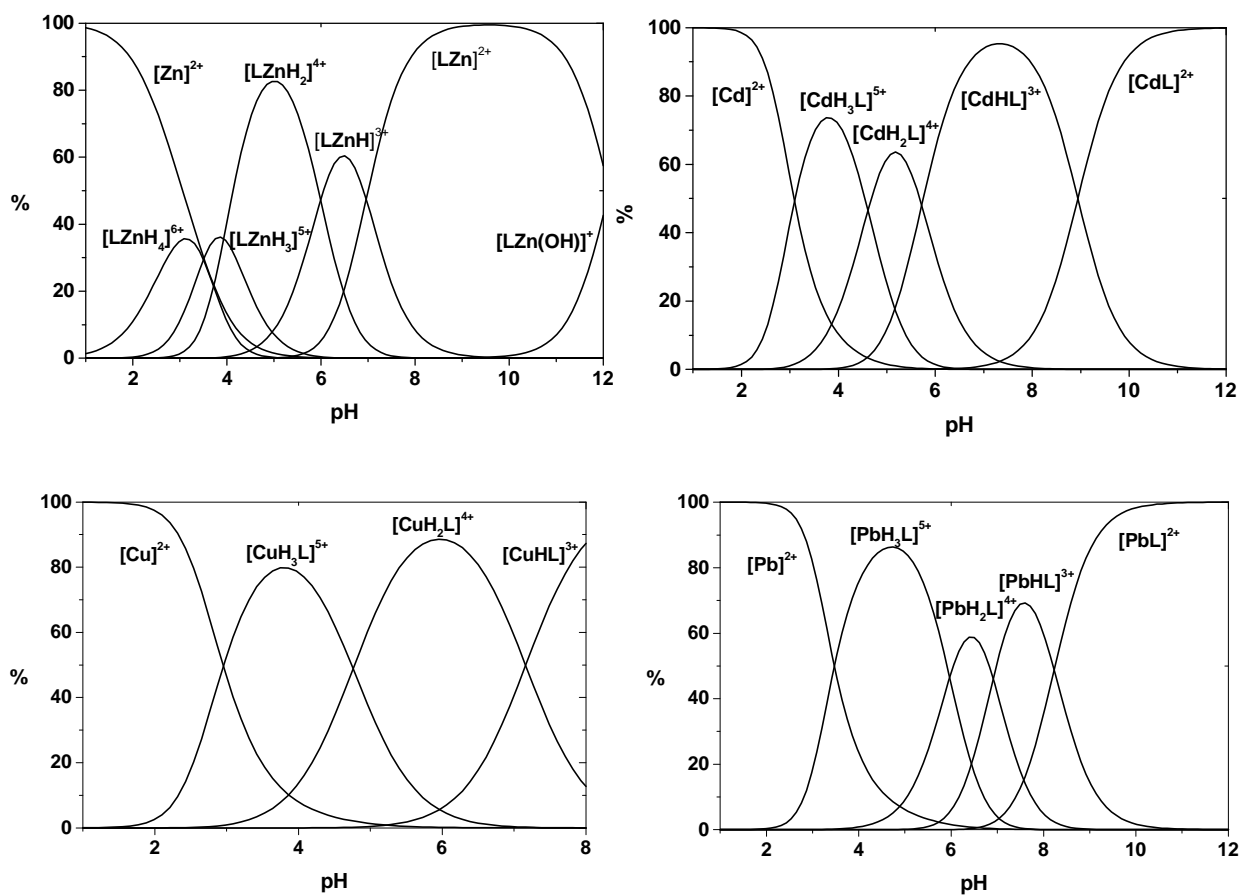


Fig. 8.8- Diagrammi di distribuzione delle specie complesse di **L7** con Zn^{II} , Cd^{II} , Cu^{II} e Pb^{II} in soluzione $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, v.v), 298.1 K.

E' stato osservato per leganti simili a **L7** che il gruppo fenantrolinico è sempre coinvolto nella coordinazione dello ione metallico. Ciò si verifica anche nel caso di **L7** come dimostrato da misure ^1H NMR effettuate aggiungendo quantità crescenti di metallo a soluzioni del legante a determinati valori di pH. Come si può notare dalla Tabella 8.2, la costante di stabilità del complesso $[\text{ZnL}]^{2+}$ ($\log K = 15.96$) è considerevolmente maggiore della costante di stabilità del complesso $[\text{Zn}(\text{phen})]^{2+}$ ($\log K = 6.55$).³ Ciò sta ad indicare che il legante non coinvolge soltanto il gruppo fenantrolinico nella coordinazione dello ione metallico, ma si ha anche partecipazione degli atomi di azoto delle catene poliamminiche alifatiche. Lo stesso si può notare anche nei casi di $\text{Cd}(\text{II})$ e $\text{Pb}(\text{II})$. Nel caso di $\text{Cu}(\text{II})$ è stata osservata precipitazione del complesso per valori di pH superiori a 8. Per questo motivo non è stato

possibile determinare la costante di stabilità della specie $[\text{CuL}]^{2+}$, ma è stata osservata solo la formazione di complessi protonati. Come mostrato in Fig. 8.8, $[\text{ZnL}]^{2+}$ è la specie complessa principale in un ampio campo di pH (7.5-12). In soluzioni fortemente basiche questo complesso dà luogo alla formazione della specie monossidrillata, mentre per valori più bassi di pH si formano molte specie protonate, fino ad una specie tetraprotonata. Le costanti di equilibrio relative alle reazioni di addizione di successivi ioni H^+ al complesso $[\text{ZnL}]^{2+}$ (Tabella 8.2) sono confrontabili con i valori delle costanti di protonazione successiva del legante libero (Tabella 8.1), a parità di carica positiva sul complesso e sul legante protonato in assenza di ione metallico, indicando che alcuni atomi di azoto delle catene poliamminiche alifatiche non sono coinvolti nella coordinazione o sono, al massimo, solo debolmente coordinati. Lo stesso comportamento si nota nel caso dei metalli Cd(II) , Cu(II) e Pb(II) . Come mostrato dal diagramma di distribuzione, $[\text{CdL}]^{2+}$ è la specie complessa più importante a valori di pH superiori a 9, dove diventa l'unica specie presente in soluzione. Per valori di pH inferiori (6-9) la specie principale in soluzione è il complesso monoprotonato, che arriva ad essere quasi l'unica specie in soluzione (> 90%) attorno pH 7.5. In soluzioni più acide si formano i complessi diprotonato e triprotonato, la cui abbondanza decresce con il grado di protonazione. Per quanto riguarda il Cu(II) , le specie complesse più importanti sono la monoprotوناتa e la diprotوناتa. Quest'ultima raggiunge il suo massimo di formazione (ca. 85%) attorno pH 6. In soluzioni più acide si forma anche la specie triprotوناتa con un massimo di formazione del 40% attorno pH 4.5. Come mostrato dal diagramma di distribuzione in Fig 8.8, $[\text{PbL}]^{2+}$ è la specie complessa più importante per valori di pH di poco superiori a 8, diventando l'unica specie presente in soluzione a pH maggiore di 10. Per valori di pH inferiori a 8 i complessi monoprotوناتo, diprotوناتo e triprotوناتo diventano le specie principali in soluzione.

L'interazione del legante con gli ioni metallici è stata studiata anche mediante misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche. Gli spettri di assorbimento UV-vis dei complessi a vari valori di pH sono molto simili a quelli del legante libero e, pertanto, non danno informazioni sulla

coordinazione del metallo. Contrariamente, gli spettri di emissione di fluorescenza dei complessi a vari valori di pH, danno informazioni interessanti. In Fig. 8.9 sono riportati alcuni spettri di emissione in fluorescenza a vari valori di pH per il sistema **L7**:Zn(II) 1:1.

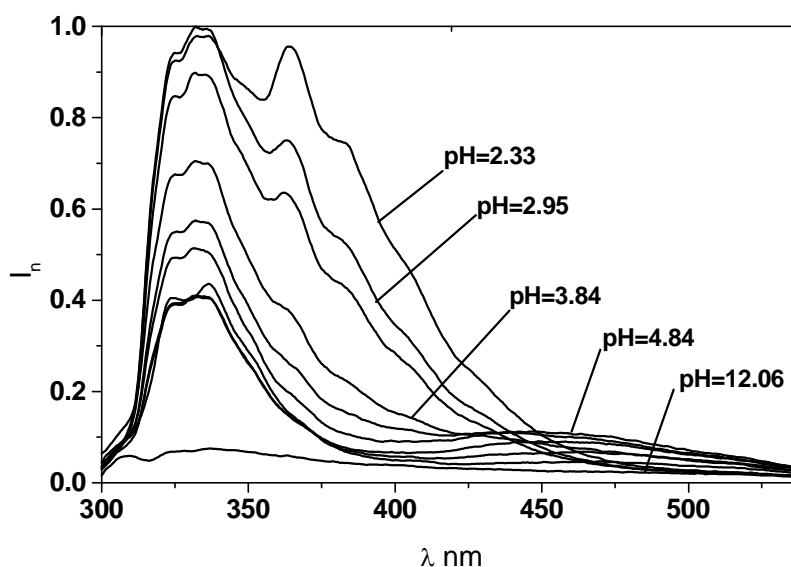


Fig. 8.9- Spettri di emissione in fluorescenza relativi al sistema **L7**/Zn(II) (1:1) a diversi valori di pH misurati in soluzione H₂O/EtOH (50:50, v:v) a 298.1 K. [L] = 5 · 10⁻⁶ M.

Per valori di pH superiori a 5, lo spettro del complesso mostra quasi esclusivamente la banda di emissione dovuta ai gruppi naftalenici (325 nm) mentre la banda della fentrolina è praticamente assente. Entrambe le bande evidenziano un incremento sostanziale dell'emissione in soluzioni più acide (pH < 5) come atteso in conseguenza della formazione di legante libero dovuta alla dissociazione del complesso a questi valori di pH. Concordemente, quando tutto il complesso è dissociato si ripristina lo spettro del legante libero. Un aspetto molto interessante di questi spettri di emissione del complesso è la presenza di una banda slargata e senza struttura centrata attorno a 480 nm che non è presente negli spettri del legante libero. Bande di emissione di questo tipo sono comunemente dovute alla formazione di ecciplessi, cioè alla formazione di addotti fra gruppi aromatici, mediante interazioni π -stacking, che solitamente sono accompagnate dal quenching dell'emissione da parte dei due gruppi interagenti. La banda a 480 nm

scompare in soluzione acida, quando il complesso si dissocia per rigenerare il legante libero e l'emissione di fluorescenza dovuta alle bande della fenantrolina e del naftalene aumenta di intensità. Queste caratteristiche di emissione suggeriscono che, a seguito della coordinazione dello ione metallico, il gruppo fenantrolinico ed uno dei due gruppi naftalenici diano luogo ad un addotto mediante interazioni π -stacking, il quale sarebbe responsabile dell'emissione a 480 nm e del quenching, quasi totale, della fenantrolina. Anche il gruppo naftalenico coinvolto nell'interazione di π -stacking risulterebbe spento, mentre il secondo gruppo naftalenico non coinvolto nell'interazione di stacking sarebbe responsabile della modesta emissione osservata a 325 nm in soluzione a $\text{pH} > 5$. Ciò suggerisce che solo una delle due catene poliamminiche alifatiche sia pienamente coinvolta nella coordinazione dello ione metallico, cioè quella recante il gruppo naftalenico che forma l'ecciplesso con la fenantrolina, mentre dell'altra catena poliamminica almeno due atomi donatori, probabilmente quelli più vicini al gruppo naftalenico, non sarebbero coordinati al metallo. A tale proposito, è interessante notare che la banda a 480 nm subisce un aumento di intensità in corrispondenza della formazione della specie complessa $[\text{ZnH}_2\text{L}]^{4+}$ (Fig. 8.10).

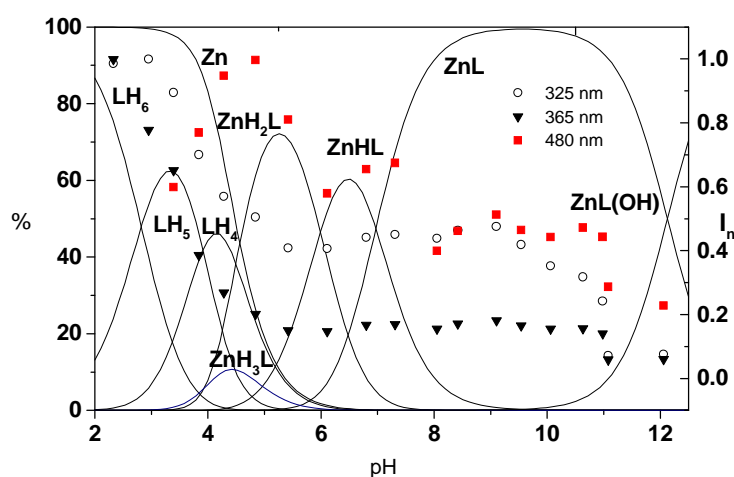


Fig. 8.10- Andamento dell'emissione in fluorescenza del sistema **L7**/Zn(II) (a $\lambda_{\text{em}} = 325$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 365$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm) in funzione del pH sovrapposto al diagramma di distribuzione delle specie in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, v:v), $[\text{L}] = 5 \cdot 10^{-6}$ M.

Considerando che i gruppi amminici liberi possono produrre il quenching dell'emissione di fluorescenza in leganti simili, mediante un meccanismo di trasferimento elettronico dalla loro coppia solitaria al fluoroforo eccitato, l'incremento di intensità di emissione osservato con la formazione della specie $[\text{ZnH}_2\text{L}]^{4+}$ può essere proprio attribuito alla protonazione di due gruppi amminici che, non essendo coinvolti nella coordinazione dello ione metallico, potevano utilizzare le loro coppie elettroniche solitarie per attivare il suddetto meccanismo di quenching.

Si riscontra un simile andamento degli spettri di emissione di fluorescenza nel caso del sistema **L7**:Cd(II) 1:1. In questo caso si nota la presenza di una nuova banda di emissione a 460 nm. In Fig. 8.11 è mostrato un confronto tra gli spettri di emissione dei sistemi L7, L7:Zn(II) 1 :1, L7:Cd(II) 1:1 a uno stesso valore di pH.

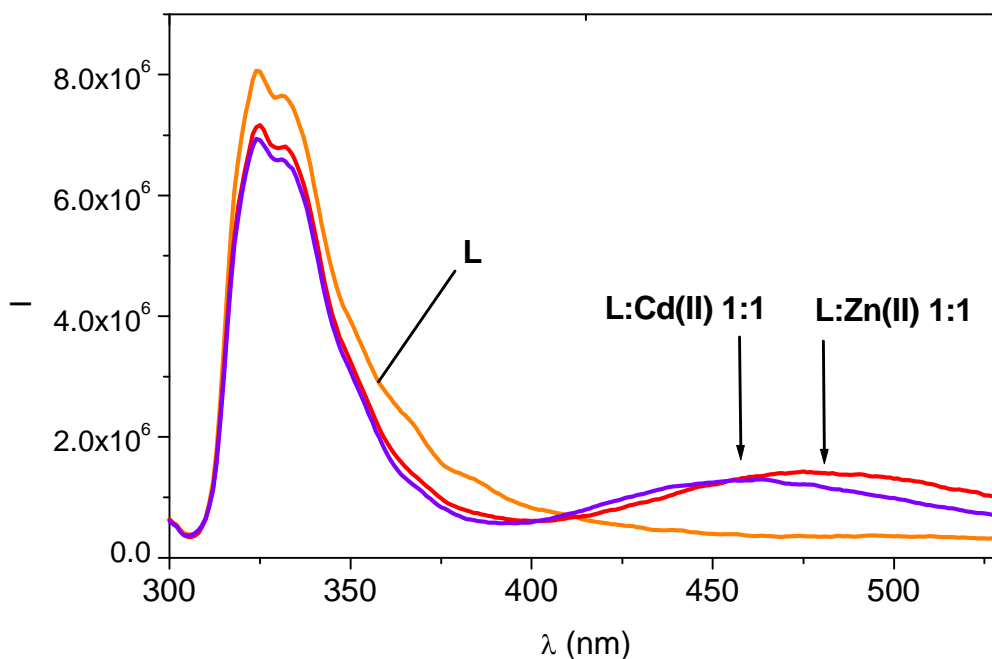


Fig. 8.11- Confronto tra gli spettri di emissione di fluorescenza dei sistemi L7, L7:Zn(II) 1 :1, L7:Cd(II) 1:1 a pH=6.1.

La diversa lunghezza d'onda di emissione dell'ecciplesso per i due complessi è imputabile a una diversa conformazione del legante attorno al metallo.

Come si può notare dalla variazione dell'intensità di emissione in funzione del pH (Fig. 8.12), nel complesso $[\text{CdL}]^{2+}$ e nella sua forma monoprotonata $[\text{CdHL}]^{3+}$ i fluorofori fenantrolina e naftalene sono spenti.

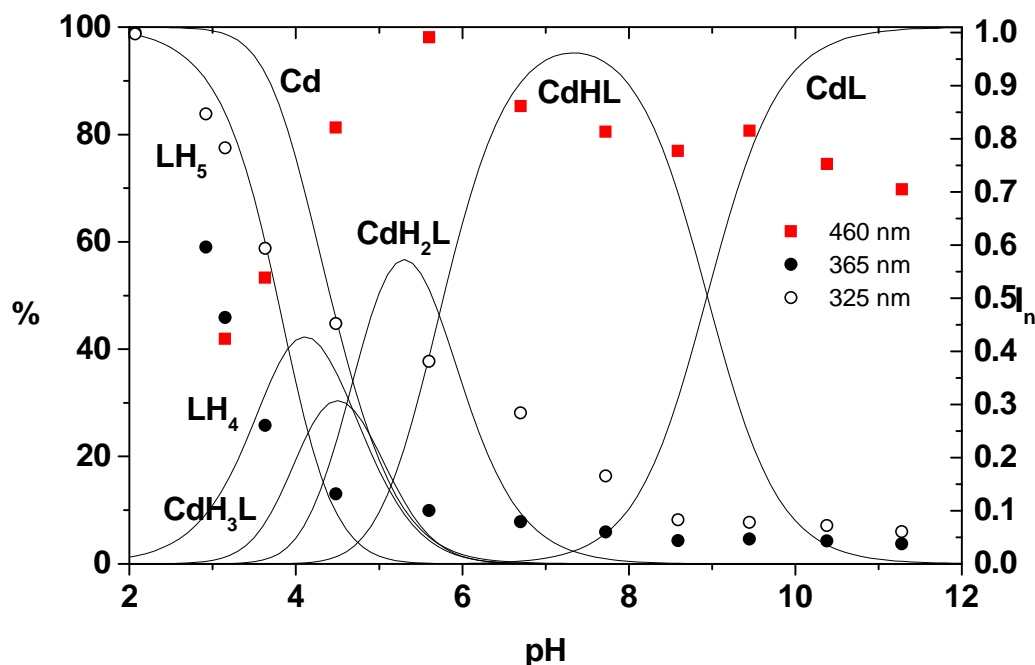


Fig. 8.12 Andamento dell'emissione in fluorescenza del sistema **L7**/Cd(II) (a $\lambda_{em} = 325$ nm, $\lambda_{em} = 365$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm) in funzione del pH sovrapposto al diagramma di distribuzione delle specie in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, v:v), $[\text{L7}] = [\text{Cd}^{2+}] = 5 \cdot 10^{-6}$ M.

Per questi gruppi fluorofori si osserva emissione di fluorescenza solo con la formazione della specie diprotonata $[\text{CdH}_2\text{L}]^{4+}$ e limitatamente alla banda a 325 nm tipica del gruppo naftalenico. L'intensità di emissione a 325 nm aumenta considerevolmente per valori di pH inferiori a 4, e parallelamente si osserva la comparsa dell'emissione a 365 nm tipica della fenantrolina, in conseguenza della presenza di legante libero dovuta alla dissociazione del complesso attesa a tali valori di pH.

Nel caso dello ione Pb(II), i gruppi fluorofori sono invariabilmente spenti su tutto il campo di pH in cui il complesso è formato (Fig. 8.13), come atteso per questo metallo pesante. Per lo ione Cu(II) si può notare che solo la banda di emissione intorno a 325 nm, tipica del naftalene, dà luogo ad una certa emissione, coincidente con la formazione della specie $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$.

Ciò è abbastanza sorprendente poiché Cu(II) è un tipico ione metallico di transizione che produce quenching degli stati eccitati di simili molecole leganti, operando mediante un meccanismo che coinvolge transizioni d-d. Nell'ipotesi che anche per Cu(II) si formi un complesso con struttura analoga a quella proposta per Zn(II), possiamo pensare che lo ione Cu(II) determini il quenching totale dell'ecciplesso formato dalla fenantrolina coordinata e da un naftalene, mentre non sia in grado di dare quenching del rimanente gruppo naftalenico che si trova a maggior distanza dal metallo. Quando i due atomi di azoto non coordinati si protonano, per dare $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$, questo gruppo naftalenico può dare origine ad emissione.

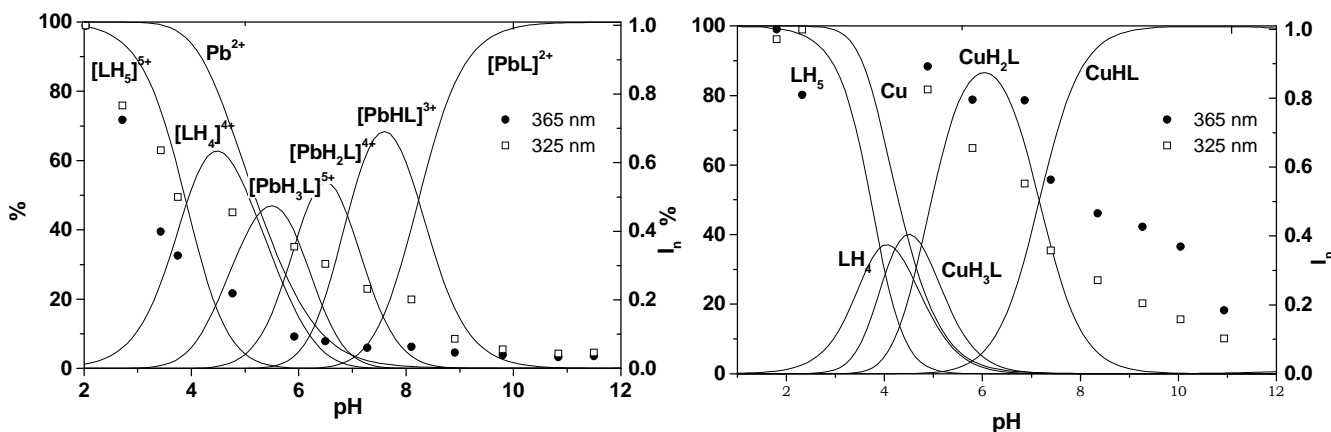


Fig. 8.13- Andamento dell'emissione in fluorescenza del sistema **L7**/Pb(II) e **L7**/Cu(II) (a $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 365 \text{ nm}$) in funzione del pH sovrapposto al diagramma di distribuzione delle specie in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, v:v), $[\text{L}] = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Per i sistemi **L7**/Zn(II) e **L7**/Cd(II) che mostrano le bande di emissione della specie ecciplesso, sono stati condotti studi in dipendenza dalla temperatura in soluzione $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (50:50, v:v), a $\text{pH}=6.1$ mantenuto fisso con buffer universale. Sono stati perciò registrati spettri di emissione di fluorescenza in un range di temperatura 15°C - 50°C raggiungibile con questa miscela di solventi. Nel caso del legante **L7** si può notare una diminuzione dell'intensità della banda di emissione delle unità naftalene a 325 nm , in accordo con quanto previsto per le molecole di tipo aromatico. Nel caso dei complessi

con Zn(II) e Cd(II) si osserva anche la diminuzione di intensità di emissione di fluorescenza della banda dell'ecciplesso (Fig. 8.14).

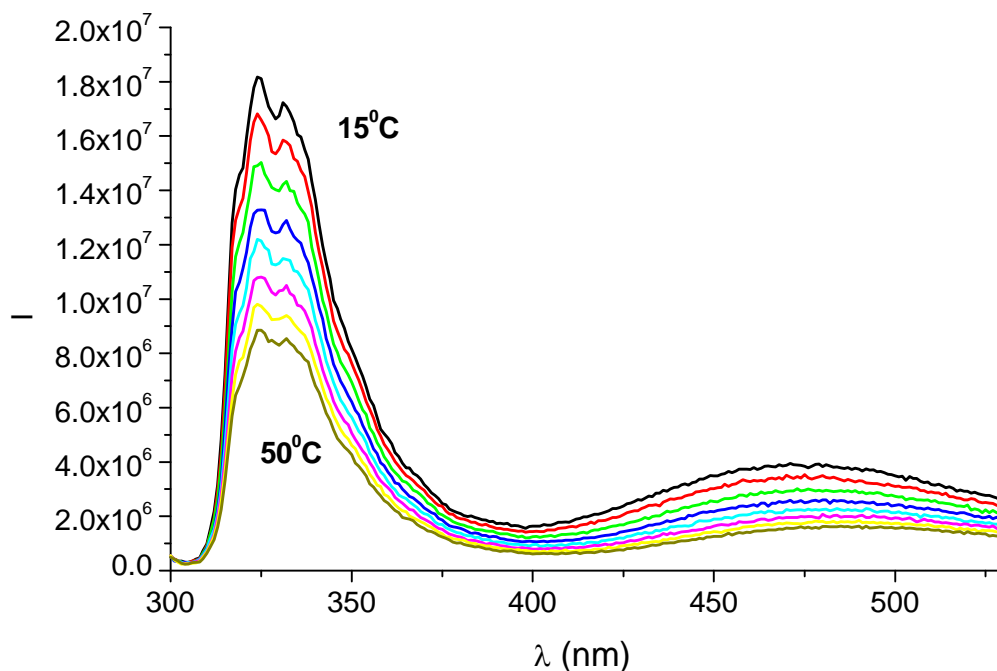


Fig. 8.14- Spettri di emissione di fluorescenza per il sistemi **L7**/Cd(II) a pH=6.1 registrati a diverse temperature.

Attraverso studi di dipendenza dalla temperatura del rapporto fotostazionario (I_E/I_M) tra le intensità dell'ecciplesso e del monomero è stato possibile determinare l'energia di attivazione per la formazione dell'ecciplesso (E_a) (Fig. 8.15). Tramite una opportuna modifica della Teoria di Stevens-Ban,⁴ infatti è stato calcolato il valore di $E_a=14.32$ kJ/mol per il sistema **L7**/Cd(II).

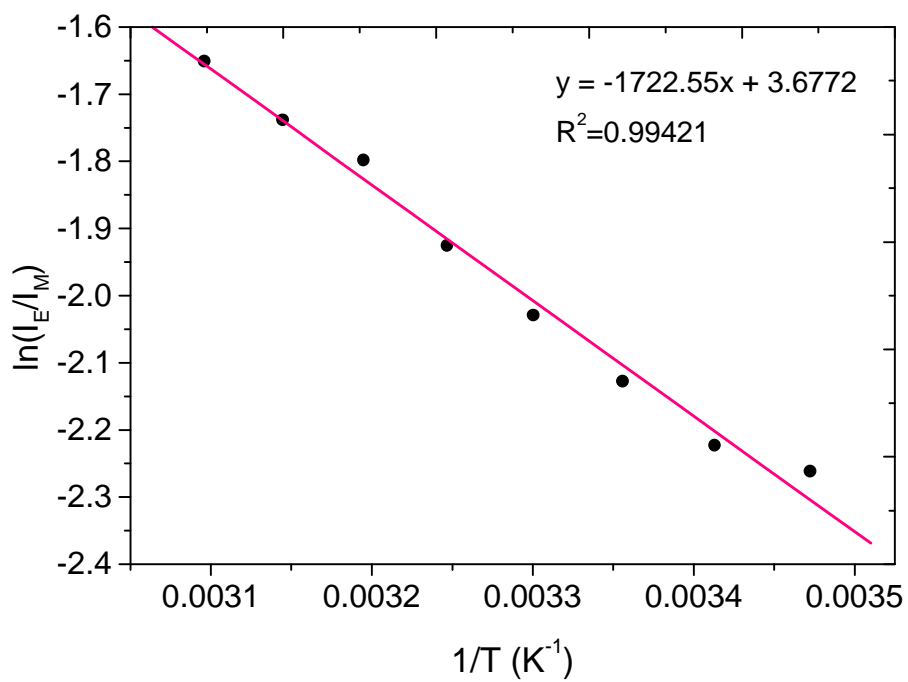


Fig 8.15- Plot $\ln(I_E/I_M)$ vs $1/T$ per il sistema **L7**/Cd(II).

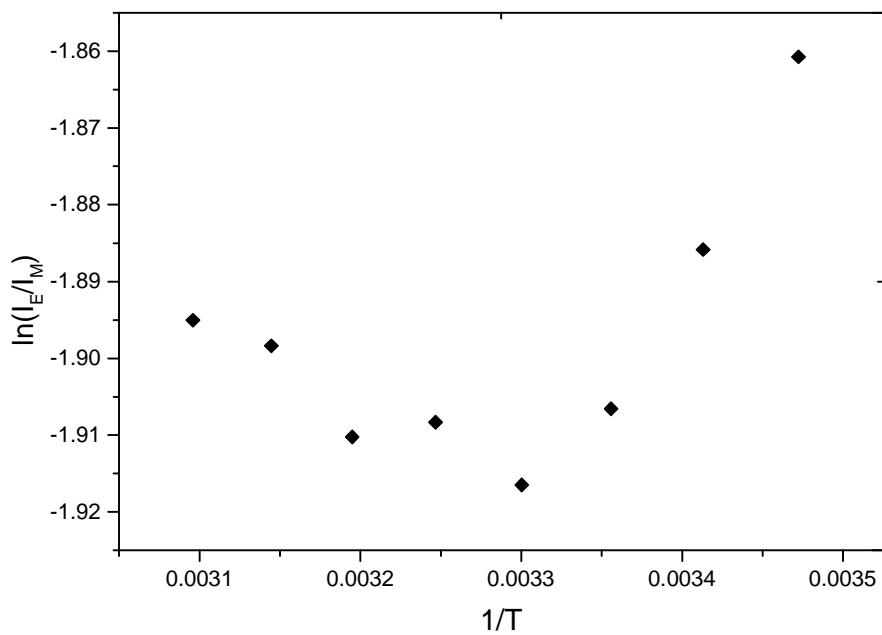


Fig 8.16- Plot $\ln(I_E/I_M)$ vs $1/T$ per il sistema **L7**/Zn(II).

Come si può notare in Fig 8.16, in questo caso non è possibile calcolare l'energia di attivazione dell'ecciplesso perché non si è in presenza di un tipico plot di Stenvens-Ban. In questo caso siamo in presenza di un complesso la cui dipendenza dalla temperatura può essere più complicata del semplice equilibrio tra un monomero e un eccimero.

Sono stati eseguiti calcoli di molecular modeling per approfondire lo studio su questi due complessi utilizzando una simulazione implicita del solvente. In entrambi i casi, come si può notare in Fig. 8.17, si ottiene un conformero a più bassa energia completando la sfera di coordinazione del metallo con una molecola di acqua.

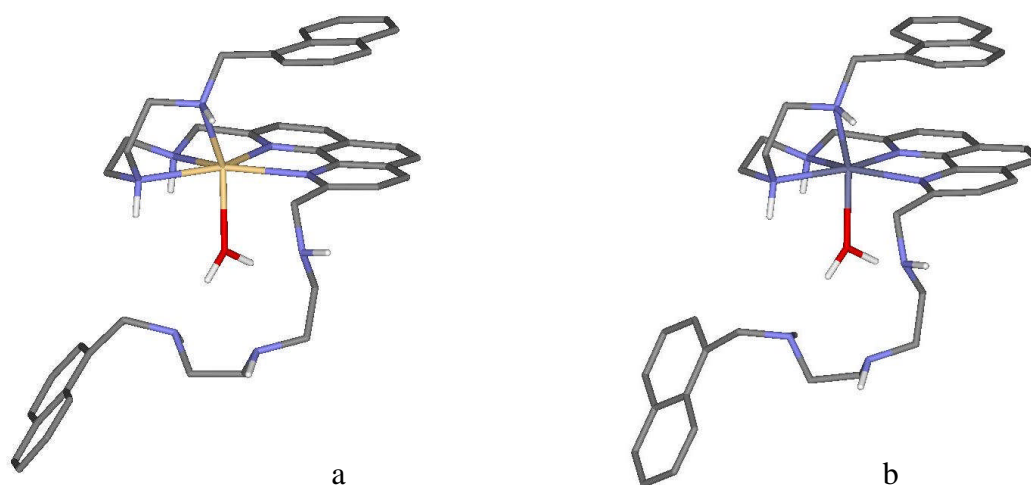


Fig. 8.17- Conformeri per i sistemi **L7**/Cd(II) (a) e **L7**/Zn(II) (b).

Per entrambi i sistemi una catena poliamminica è completamente coinvolta nella coordinazione dello ione metallico, mentre l'altra catena è libera di muoversi in soluzione. La conformazione ottenuta conferma la presenza di una sovrapposizione tra l'unità fenantrolina e una unità naftalene, anche se il calcolo è stato effettuato con il sistema allo stato fondamentale e non allo stato eccitato. La geometria globale è molto simile. Si deve precisare che nel caso di Cd(II) è stato ottenuto anche il conformero in cui la sfera di coordinazione del metallo non è completata con l'aggiunta di una molecola di

acqua e la differenza di energia è di circa 1 Kcal/mole (Fig. 8.18). Per cui è ragionevole supporre che entrambe le specie siano presenti in soluzione.

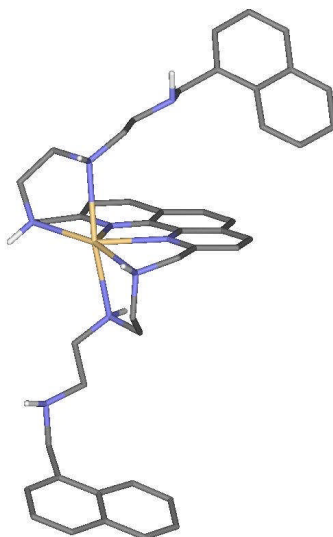


Fig. 8.18- Conformer per il sistema **L7**/Cd(II) in cui la sfera di coordinazione del metallo non è completata da una molecola di acqua.

Si può ipotizzare che la differenza di emissione della banda di ecciplesso a 460 nm per Cd(II) e a 480 nm per Zn(II) sia dovuta essenzialmente a due motivi. Il primo può essere ricondotto a una diversa porzione di sovrapposizione delle unità fenantrolina e naftalene nei due complessi. Il secondo è riconducibile alla copresenza in soluzione per il complesso di Cd(II) di due specie con diversa conformazione con una evidente differenza di sovrapposizione delle unità fenantrolina e naftalene.

8.4. Conclusioni

Il legante **L7** progettato per avere la possibilità di interagire con il DNA con due diverse unità eteroaromatiche (naftalene e fenantrolina), si comporta come una vera e propria macchina molecolare, il cui movimento è promosso dalla coordinazione dello ione metallico. In particolare nel caso di Cd(II) e Zn(II) il legante funziona anche come chemosensore selettivo, capace di segnalare la presenza dell'avvenuta coordinazione attraverso l'emissione di una nuova banda di emissione diagnostica della formazione di un ecciplesso

nello stato eccitato del sistema. Per il complesso con Zn(II) sarà interessante vedere se il sistema sarà in grado di interagire con il DNA attraverso interazioni di intercalazione e se, portando lo ione Zn(II) in prossimità della catena polinucleotidica, sarà capace di promuovere il cleavage idrolitico.

8.5. Bibliografia

1. (a) V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo and J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2000**; (b) P. R. Ashton, R. Ballardini, V. Balzani, S. E. Boyd, A. Credi, M. T. Gandolfi, M. Gómez-López, Sayeedha Iqbal, D. Philp, J. A. Preece, L. Prodi, H. G. Ricketts, J. F. Stoddart, M. S. Tolley, M. Ventin, A. J. P. White and D. J. Williams, *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3,152; (c) R. A. Bissell, E. Córdova, A. E. Kaifer and J. F. Stoddart, *Nature*, **1994**, 369, 133; (d) R. Ballardini, V. Balzani, M. T. Gandolfi, L. Prodi, M. Venturi, D. P. Philp, H. G. Ricketts and J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 1301; V. Balzani, M. Gómez-López and J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, **1988**, 31, 405; S. Nishizawa, M. Watanabe, T. Uchida and N. Teramae, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**,141.
2. Bencini A., Bianchi A., Lodeiro C., Masotti A., Jorge Parola A., Pina F., Valtancoli B. *Chem. Comm.* **2000**,1639-1640
3. IUPAC, Stability Constants Database, Academic Software: Yorks (UK), **2000**.
4. Stevens, B.; Ban, M.I.; *Trans. Faraday Soc.* **1964**, 1515.

9. Sintesi e studio di un nuovo legante macrociclico contenente l'unità acridina e dei suoi complessi con Cu(II).¹

9.1. Introduzione

L'unità acridina è un noto gruppo intercalante.² La sua struttura eteroaromatica estesa è in grado di inserirsi tra coppie di basi del DNA. A seguito della intercalazione con il DNA il suo spettro di assorbimento e di emissione subisce notevoli variazioni che permettono di monitorare l'entità dell'interazione e ricavarne i parametri termodinamici e cinetici. Nell'ottica di ottenere sistemi metallo-intercalanti per il DNA, è stato sintetizzato il nuovo legante **L3** (Fig. 9.1), che contiene una poliammina ciclica e una unità acridina.

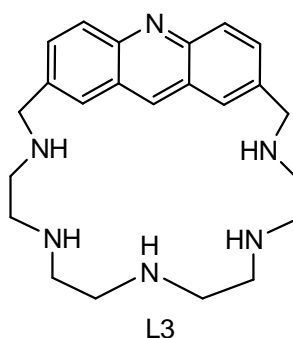


Fig. 9.1- Rappresentazione del legante **L3**.

L'unità acridina è capace di interagire con substrati aromatici attraverso π -stacking³ e intercalazione, mentre la catena poliamminica protonabile può interagire con il polianione attraverso interazioni di tipo elettrostatico. La catena poliamminica potrà coordinare uno o due ioni metallici, ad esempio Cu(II) in grado di promuovere il cleavage ossidativi del DNA. Inoltre,

inserendo l'unità acridina nel macrociclo si ottiene una struttura rigida nella quale lo ione metallico risulta coordinativamente insaturo e quindi in grado di interagire a sua volta con substrati. Sistemi analoghi sono stati sintetizzati per studiarne l'interazione con substrati anionici e acidi nucleici.³ Attualmente, si trovano pochi studi riguardanti l'interazione con cationi metallici e solo nel caso dello ione Zn(II).^{3c,d} Per il momento il lavoro si è limitato alla sintesi e lo studio dell'interazione del legante con lo ione Cu(II). Nel presente capitolo sono riportati solo i dati essenziali. Per informazioni più dettagliate si rimanda all'articolo in appendice.

9.2. Complessazione di Cu(II) in soluzione acquosa

La complessazione di Cu(II) da parte di **L3** è stata studiata mediante misure potenziometriche in soluzioni acquose (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K). In Tabella 9.1 sono riportate le specie formate e le corrispondenti costanti di stabilità, mentre e in Fig 9.2. è riportato il diagramma di distribuzione dei complessi calcolato con un rapporto molare Cu(II)/**L3** 2:1.

Tabella 9.1- Costanti di formazione dei complessi di Cu(II) con **L3** (NMe₄Cl 0.1M, 298.1K

Equilibrio	logK
$L + Cu^{2+} = [CuL]^{2+}$	11.0(1)
$[CuL]^{2+} + H^+ = [CuHL]^{3+}$	8.1(1)
$[CuHL]^{3+} + H^+ = [CuH_2L]^{4+}$	5.8(1)
$[CuH_2L]^{4+} + H^+ = [CuH_3L]^{5+}$	4.6(1)
$[CuH_3L]^{5+} + H^+ = [CuH_4L]^{6+}$	2.9(1)
$2L + 4Cu^{2+} + 4H_2O = [Cu_4L_2(OH)_4]^{4+} + 4H^+$	12.1(1)

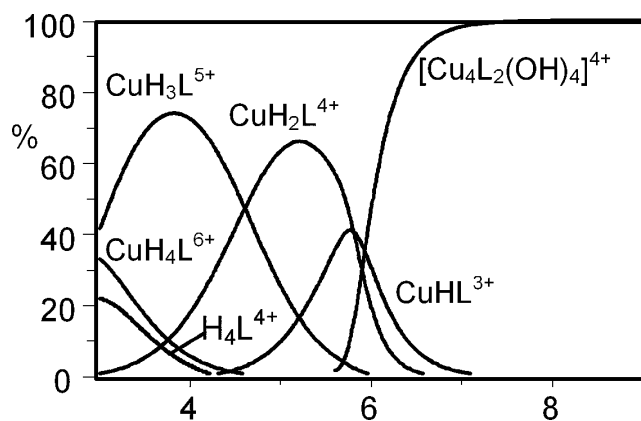


Fig. 9.2- Distribuzione delle specie complesse di **L3** ($\text{Cu(II)} = 2 \cdot 10^{-3}\text{M}$, $[\text{L3}] = 1 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 298.1K, NMe_4Cl 0.1M)

Si può notare che il complesso $[\text{CuL}]^{2+}$ può legare fino a quattro protoni acidi dando luogo alle specie complesse protonate $[\text{CuLH}_x]^{(x+2)2+}$. Come atteso, la rigidità dell'unità acridina impedisce a tutti gli atomi della poliammina di legarsi al catione e si hanno complessi 1:1 protonati a pH acidi. Poiché la costante di formazione della specie mononucleare $[\text{CuL}]^{2+}$ è simile a quella trovata per il complesso mononucleare di Cu(II) con etilendiammina ($\log K = 10.60$),⁵ si può supporre che solo due degli atomi di azoto donatori siano legati al metallo. Gli altri gruppi amminici potrebbero coordinare un secondo ione metallico. D'altra parte, le misure potenziometriche mostrano come a pH neutro si abbia la formazione della specie complessa tetranucleare $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ che è l'unica specie presente nella regione di pH alcalino (Fig. 9.2). È stato visto che le eventuali specie dinucleari $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_x]^{(4-x)+}$ o $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{OH})_x]^{(4-x)+}$ non sono presenti. Sono stati registrati spettri UV-vis in soluzione acquosa contenente Cu(II) e **L3** in rapporto molare 2:1 a diversi valori di pH (Fig. 9.3), ed è stato visto che essi sono caratterizzati da una singola banda centrata a circa 690 nm da pH 3 a pH 5.5. Nel range di pH 5.6-7, la formazione della specie $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ è accompagnata da un notevole blu-shift della banda (ca. 130nm) suggerendo la presenza di un più forte campo dei leganti operante sullo ione metallico. Lo spettro non subisce variazioni da pH 7.0 a pH 11.0, in accordo con la presenza di una unica specie in soluzione in questo range di pH.

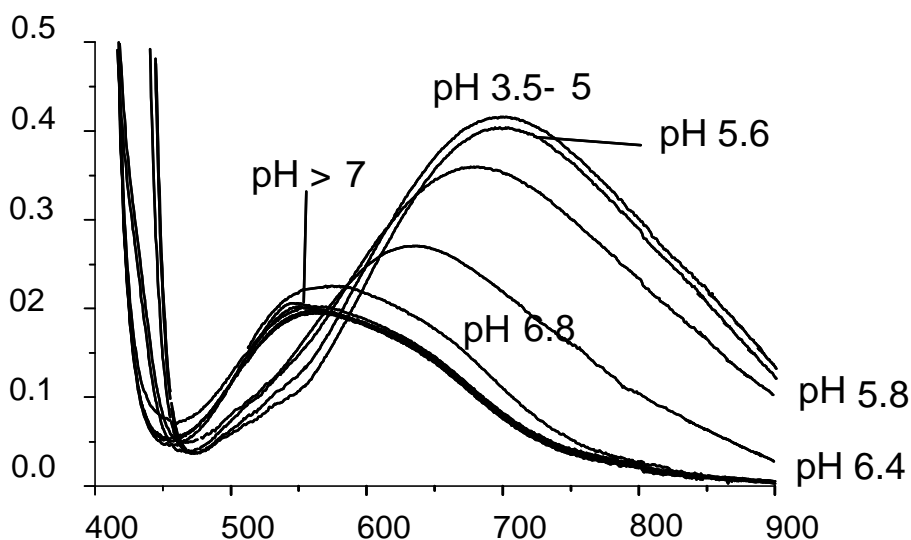


Fig. 9.3- Spettri UV-vis di **L3** in presenza di due equivalenti di Cu(II) a diversi valori di pH ($[Cu(II)] = 1 \cdot 10^{-2} M$, $[L3] = 5 \cdot 10^{-3} M$, 298.1K, NMe_4Cl 0.1M).

Ovviamente le misure potenziometriche e spettrofotometriche non sono sufficienti per ipotizzare la presenza dello ione $[Cu_4L_2(OH)_4]^{4+}$. La lenta evaporazione di una soluzione acquosa neutra contenente **L3** e $Cu(NO_3)_2$ in rapporto molare 1:2 ha portato alla cristallizzazione del complesso $[Cu_8L_4(\mu-OH)_8(\mu-NO_3)_3](NO_3)_5 \cdot 32H_2O$ che contiene i clusters tetranucleari $[Cu_4L_2(\mu-OH)_8(\mu-NO_3)_x]^{(4-x)+}$ composti da due unità macrocicliche $[Cu_2L]^{4+}$ legate insieme da quattro ponti idrossido e anioni nitrato dando una struttura globale metallo-macrociclica. Una simile struttura ciclica può essere proposta per le specie $[Cu_4L_2(OH)_4]^{4+}$ osservate in soluzione acquosa (Fig. 9.4).

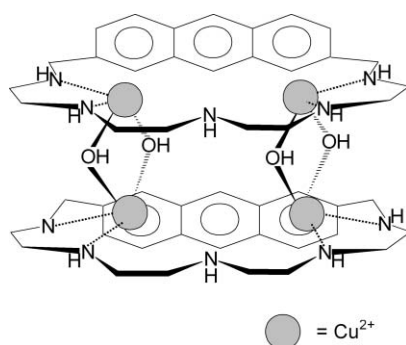


Fig. 9.4- Struttura proposta per il complesso $[Cu_4L_2(OH)_4]^{4+}$ (eventuali molecole di acqua legate ai centri metallici sono omesse).

9.3. Struttura cristallina di $[\text{Cu}_8\text{L}_4(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_3](\text{NO}_3)_5 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$

La struttura cristallina mostra che questo composto è costituito da due diversi cationi tetranuclearari, $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-NO}_3)_3]^{3+}$ (**a**) e $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-NO}_3)_2]^{2+}$, anioni nitrato e molecole di acqua. Le rappresentazioni ORTEP dei due complessi sono riportate in Fig. 9.5 mentre le lunghezze di legame e gli angoli dell'intorno coordinativo dei metalli sono riportate in Tabella 9.2.

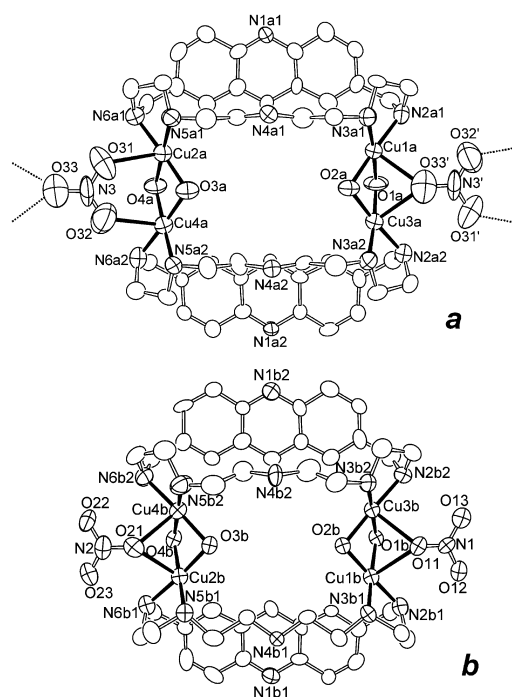


Fig. 9.5- Rappresentazioni ORTEP dei complessi **a** e **b**. Sono omissi anioni nitrato e molecole di acqua non legati al centro metallico.

Tabella 9.2- Lunghezze (Å) e angoli (°) di legame per l'intorno coordinativo del metallo in $[\text{Cu}_8\text{L}_4(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_3](\text{NO}_3)_5 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$.

unità a		unità b	
Cu1a-O1a	1.951(8)	Cu1b-O1b	1.949(7)
Cu1a-O2a	1.924(7)	Cu1b-O2b	1.963(7)
Cu1a-N2a1	2.04(1)	Cu1b-N2b1	2.04(1)
Cu1a-N3a1	2.000(9)	Cu1b-N3b1	1.96(1)
Cu1a-O33'	2.46(1)	Cu1b-O11	2.609(8)
Cu2a-O3a	1.894(8)	Cu2b-O3b	1.958(7)
Cu2a-O4a	1.960(9)	Cu2b-O4b	1.954(8)

Cu2a-N5a1	2.03(1)	Cu2b-N5b1	1.99(1)
Cu2a-N6a1	2.06(1)	Cu2b-N6b1	1.971(9)
Cu2a-O31	2.52(1)	Cu2b-O21	2.57(1)
Cu3a-O1a	1.945(8)	Cu3b-O1b	1.992(8)
Cu3a-O2a	1.944(8)	Cu3b-O2b	1.925(7)
Cu3a-N2a2	2.03(1)	Cu3b-N2b2	2.000(9)
Cu3a-N3a2	2.00(1)	Cu3b-N3b2	1.98(1)
Cu3a-O33'	2.48(1)	Cu3b-O11	2.482(8)
Cu4a-O3a	1.912(9)	Cu4b-O3b	1.929(7)
Cu4a-O4a	1.994(8)	Cu4b-O4b	1.975(9)
Cu4a-N5a2	1.99(1)	Cu4b-N5b2	1.97(1)
Cu4a-N6a2	1.99(1)	Cu4b-N6b2	1.998(9)
Cu4a-O32	2.49(1)	Cu4b-O21	2.493(9)
Cu1a-O1a-Cu3a	91.5(3)	Cu1b-O1b-Cu3b	88.9(3)
Cu1a-O2a-Cu3a	92.3(3)	Cu1b-O2b-Cu3b	90.5(3)
Cu2a-O3a-Cu4a	96.4(3)	Cu2b-O3b-Cu4b	88.0(3)
Cu2a-O4a-Cu4a	91.8(3)	Cu2b-O4b-Cu4b	86.8(3)

Codici di simmetria: ' = 0.5 - x, y - 0.5, -z

I complessi **a** e **b** mostrano caratteristiche strutturali simili. Entrambi i complessi sono formati da due subunità [Cu₂L] legati da gruppi idrossido e anioni nitrato che si trovano a ponte tra due ioni Cu(II) di diverse unità [Cu₂L]. In entrambi i metallomacro cicli **a** e **b**, ogni ione Cu(II) è coordinato da due gruppi amminici del macrociclo vicini, due anioni idrossido e un atomo di ossigeno di un nitrato con una risultante geometria piramidale quadrata distorta. In **a** due ioni Cu(II) (Cu1a e Cu3a) sono legati da un nitrato monodentato (O33'), mentre Cu2a e Cu4a sono legati da un nitrato bidentato (O31 e O32). Le distanze tra due μ-OH legati agli ioni Cu(II) sono 2.760(2) Å per la coppia Cu1a-Cu3a e 2.701(2) Å Cu2a-Cu4a. In **b** entrambi gli anioni nitrato si comportano come leganti monodentati con un singolo atomo di ossigeno legato a due metalli (O11 e O21). Sia in **a** che in **b**, le unità acridina sono disposte quasi perpendicolari al piano definito dalla catena

pentaamminica del macrociclo. Viceversa, le due unità macrocicliche legate da due core $(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}_2$, definiscono una cavità idrofila di dimensioni $5.7 \times 6.2 \text{ \AA}$ in **a** e $5.5 \times 5.3 \text{ \AA}$ in **b**. I complessi **a** e **b** danno luogo a due diversi motivi strutturali nell'impaccamento cristallino, dovuto al diverso comportamento coordinativo degli anioni nitrato a ponte nei due metallomacrocicli (Fig.9.6).

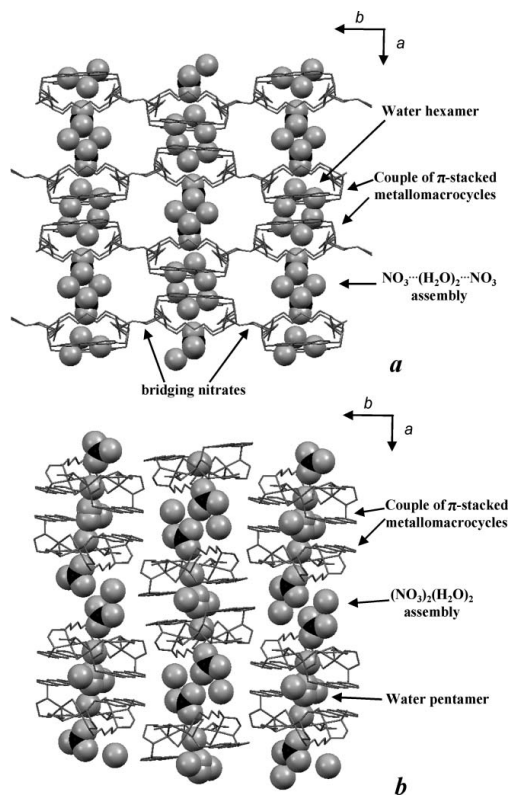


Fig. 9.6- Rappresentazione degli strati basati su **a** e **b**.

Infatti, mentre in **b** i due ossigeni di ogni nitrato monodentato non danno un ulteriore legame coordinativo, in **a** gli anioni nitrato sono usati per connettere due coppie di core $(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}_2$ tra metallomacrocicli adiacenti. Le unità **a**, legate da anioni nitrato a ponte, crescono lungo l'asse *b* come infinite catene a zig-zag. Inoltre due unità acridina per ogni complesso **a** della catena, sono accoppiate attraverso interazioni face-to-face π -stacking (distanza tra i piani di due acridine accoppiate: 3.4 \AA). Si ha così una disposizione di colonne parallele composte da coppie di metallomacrocicli affacciati lungo l'asse *a*. Anche nel caso di **b** si ha una crescita di coppie di metallomacrocicli affacciati lungo l'asse *a*. Infine gli strati basati su **a** e **b** si alternano lungo l'asse *c*, dando luogo a una griglia regolare di quattro tipi di

canali che crescono lungo l'asse *a*, riempiti con molecole di acqua o anioni nitrato legati da interazioni via legame a idrogeno per dare quattro diversi tipi di motivi di catene monodimensionali. Nel caso dei motivi basati su **a** il canale monodimensionale è riempito da cluster di sei molecole di acqua alternati da coppie di ioni nitrato legati a due molecole di acqua da interazioni via legame a idrogeno. Nei motivi basati su **b**, i canali che passano attraverso i metallomacro cicli **b** sono riempiti da sequenze ripetitive di pentameri di acqua che si incrociano con coppie di anioni nitrato e molecole di acqua, associate via legame a idrogeno. Da notare che gli esameri in **a** e i pentameri in **b** sono racchiusi dalle cavità formate da metallomacro cicli accoppiati via π -stacking (Fig. 9.7).

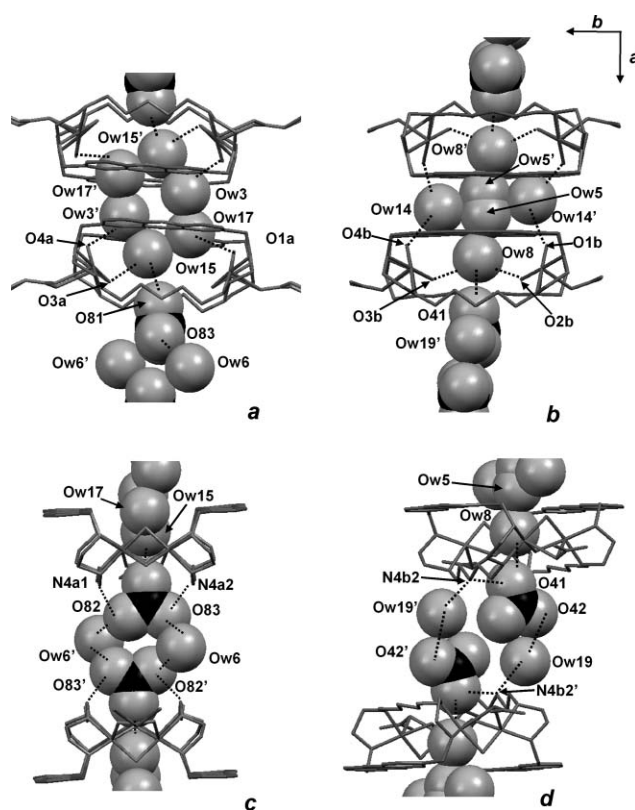


Fig. 9.7- Zoom dei cluster esamerici (a) e pentamerici (b) racchiusi dalle cavità formate da metallomacro cicli accoppiati via π -stacking e dei motivi $\text{NO}_3 \cdots (\text{H}_2\text{O}) \cdots \text{NO}_3$ (c) e $(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ che collegano due cluster adiacenti nei complessi **a** e **b**.

I macrocicli e i loro complessi sono stati largamente usati⁶ come blocchi per la costruzione di strutture contenenti canali o cavità per ospitare molecole di acqua; tuttavia i casi di catene di molecole di acqua o cluster incapsulati

nelle cavità di metallomacrocicli sono molto rari. Pertanto l'organizzazione di catene passanti attraverso le cavità di metallomacrocicli assemblati, mostrate dai cluster dei complessi **a** e **b**, rappresenta a tutti gli effetti una novità. Come mostrato in Fig. 9.8, le colonne basate su **a** e **b** allineate lungo l'asse *a*, danno luogo a ulteriori canali (c e d) riempiti da catene formate rispettivamente da molecole di acqua singole o da anioni nitrato e molecole di acqua associati via legame a idrogeno. In particolare i canali c sono riempiti da sequenze di quattro molecole di acqua indipendenti dal punto di vista cristallografico, mentre i canali d contengono dimeri di molecole di acqua legate attraverso l'idrogeno alternati a singoli anioni nitrato disordinati.

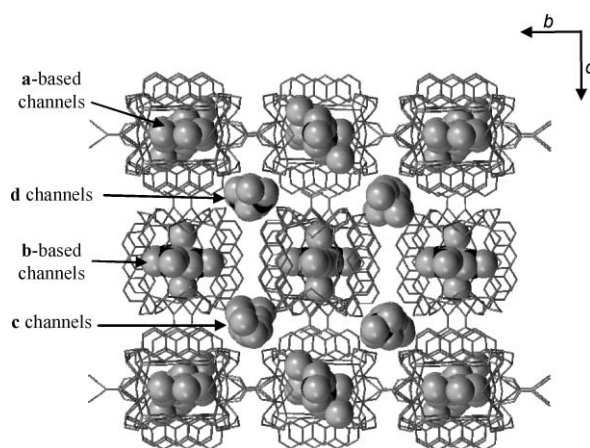


Fig. 9.8- Rappresentazione del crystal packing lungo l'asse *a* che mostra quattro diversi tipi di canali di acqua.

9.4. Conclusioni

La rigidità dell'unità acridina presente nel legante **L3** impedisce a tutti gli atomi di azoto della catena poliamminica di legarsi a un singolo ione metallico. Poiché i due ioni metallici Cu(II) coordinati da **L3** non possono essere connessi da anioni idrossido a ponte, si ha la formazione del metallomacrocilo $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4]^{4+}$ dove ogni Cu(II) interagisce contemporaneamente con un secondo metallo di una diversa unità $[\text{Cu}_2\text{L}]$ attraverso anioni idrossido a ponte. La tendenza delle acridine a dare addotti affacciati attraverso interazioni π -stacking porta alla formazione allo stato solido dei metallomacrocili $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_x]^{(4-x)+}$ caratterizzati da cavità idrofiliche dove possono incapsularsi esameri o pentameri di molecole di

acqua. Il core $(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}_2$ gioca un ruolo importante nell'assembly di questi cluster di acqua, che viene stabilizzato attraverso interazioni di tipo legame a idrogeno con i ponti idrossido.

9.5. Bibliografia

1. Bartoli, S.; Bazzicalupi, C.; Biagini, S.; Borsari L.; Bencini, A.; Faggi, E.; Giorgi, C.; Sangregorio, C.; Valtancoli, B., *Dalton Trans.* **2009** 1223-1230
2. Blake, A.; Peacocke, A.R. *Biopolymers* 1968, 6, 1225-1253.
3. (a) S. C. Zimmerman, C. R. Lamberson, M. Cory and T. A. Fairley, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 6805. (b) S. Rossiter, R. A. Mathews and J. R. Morrow, *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, 101, 925. (c) E. Kikuta, R. Matsubara, N. Katsube, T. Koike and E. Kimura, *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 82, 239; E. Kikuta, R. Matsubara, N. Katsube, T. Koike and E. Kimura, *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 2479; (d) E. Kimura, T. Ikeda, S. Aoki and M. Shionoya, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1998**, 3, 259.
4. Biver, T.; Secco, F.; Tiné, M.R.; Venturini, M.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C. *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98, 1531
5. P. Paoletti, *Pure Appl. Chem.*, **1984**, 56, 491.
6. (a) P. S. Lakshminarayanan, E. Suresh and P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 13132; (b) J. L. Atwood, L. J. Barbour and A. Jerga, *PNAS*, **2002**, 99, 4837; (c) P. K. Thallapally, G. O. Lloyd, J. L. Atwood and L. J. Barbour, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**, 44, 3848; (d) J. L. Atwood, L. J. Barbour, T. J. Ness, C. L. Raston and P. L. Raston, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 7192; (e) J. van Eerden, M. Skowronska-Ptasinska, P. D. J. Grootenhuis, S. Harkema and D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 700; (f) T. Aree, I. Us'on, B. Schulz, G. Reck, H. Hoier, G. M. Scheldrick and W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 3321; (g) R. D. Bergougnant, A. Y. Robin and K. M. Fromm, *Cryst. Growth Des.*, **2005**, 5(5), 1691; (h) C. Tedesco, I. Immediata, L. Gregoli, L. Vitigliano, A. Immirzi and P. Neri, *Cryst. Eng. Comm.*, **2005**, 7, 449; (i) O. Nimz, K. Geßler, I. Us'on and W. Saenger, *Carbohydr. Res.*, **2001**, 336, 141; (j) A. C. Warden, M. Warren, M. T. Heam and L. Spiccia, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 6936; (k) T. Aree, H. Hoier, B. Schulz, G. Reck and W. Saenger, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 323(1-4), 244; (l) V. Sidorov, F. W. Kotch, G. Abdrakhmanova, R. Mizani, J. C. Fettinger and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2267.

10. Interazione di macrocicli contenenti atomi donatori misti e la subunità 1,10-fenantrolina con specifici metalli di transizione e post-transizione: riconoscimento e estrazione liquido-liquido.¹

10.1. Introduzione

Da diversi anni esiste un crescente interesse nel design e nella sintesi di sistemi macrociclici sempre più sofisticati che differiscono nella forma, architettura, flessibilità e arrangiamento di gruppi strutturali, con l'intento di controllare la forza, la selettività e la dinamica del processo di legame tra il legante macrociclico e una varietà di substrati cationici, anionici, neutri, organici e inorganici. In particolare, il design di nuove strutture macrocicliche capaci di riconoscere selettivamente ioni metallici è di vitale importanza nei campi della chimica analitica e della chimica delle separazioni,² e molti sistemi macrociclici hanno trovato applicazione come selettivi estrattori/ionofori per metalli di transizione e post-transizione in diversi solventi di estrazione e in studi di trasporto attraverso membrana. Sviluppando nuovi sistemi macrociclici, è possibile modulare il loro grado di interazione di tipo "host-guest" con il substrato, cambiando la natura "hard-soft" e la disposizione dei siti di legame modificando la flessibilità del recettore. In questo contesto sono state studiate le proprietà coordinative di **L1** e **L2** nei confronti degli ioni Cu^{II}, Zn^{II}, Pb^{II}, Cd^{II}, Hg^{II} e Ag^I in soluzione acquosa con misure potenziometriche e titolazioni ¹H-NMR in CD₃CN/D₂O 4:1 (v/v). I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli già raccolti in lavori precedenti,³ circa le proprietà coordinative degli stessi ioni metallici e le proprietà di estrazione liquido-liquido da parte di un gruppo di analoghi leganti macrociclici contenenti atomi donatori misti L^A-L^C, L^D, L^E (Fig. 10.1).

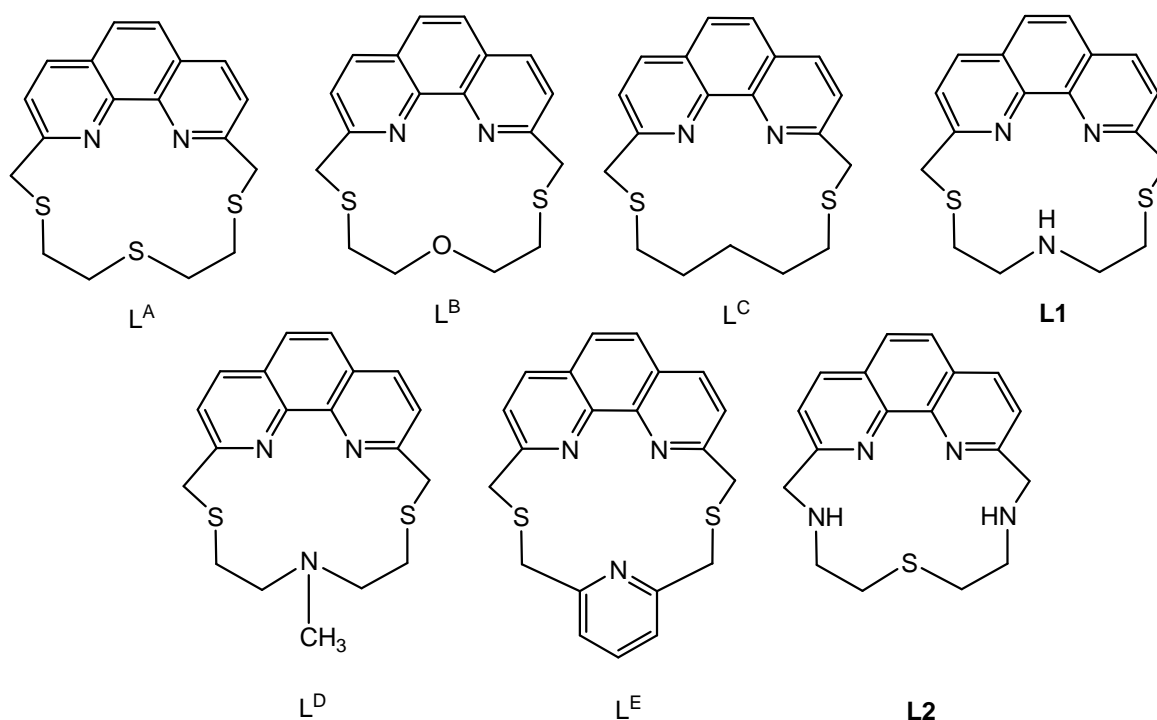


Fig. 10.1- Rappresentazione del gruppo di leganti.

Questi leganti contengono tutti la subunità 1,10-fenantrolina ma hanno solo S/O/N (aromatico) come gruppi donatori nella restante parte dell'anello e quindi sono meno solubili in acqua rispetto a **L1** e **L2**. Il lavoro si colloca quindi all'interno di un progetto più esteso che riguarda lo studio della combinazione delle proprietà chimico-fisiche e coordinative dell'unità fenantrolina con quelle dei tioeteri corona, per testare il potenziale di questi macrocicli come agenti complessanti e come estrattori selettivi nei confronti di ioni metallici "soft", importanti a livello industriale. Infatti, nonostante studi in soluzione di MeCN dimostrino la non efficacia dei leganti L^A - L^C come chemosensori fluorescenti specifici e selettivi, alcuni di essi sono estremamente sensibili alla presenza di Cu^{II} (L^A) o Ag^{I} (L^B , L^C , L^D) in presenza di altri metalli nei processi di trasporto attraverso membrane organiche.³ Per esempio L^A e L^C sono stati utilizzati con successo come ionofori neutri nella costruzione di elettrodi iono-selettivi supportati su PVC (ISEs) per la determinazione analitica e la separazione di Cu^{II} e Ag^{I} , rispettivamente. Nel presente capitolo sono riportati i risultati più importanti, per maggiori dettagli si rimanda all'articolo in appendice.

10.2. Protonazione di L1 e L2

La protonazione dei leganti è stata effettuata mediante misure potenziometriche in soluzioni acquose (NMe₄NO₃ 0.1M, 298.1K). I risultati sono riportati in Tabella 10.1 e in Fig. 10.2.

Tabella 10.1- Costanti di protonazione (logK) dei leganti **L1** e **L2**

Equilibrio	Log K ^(a)	
	L1	L2
$L + H^+ = [LH]^+$	8.3(1)	8.65(1)
$[LH]^+ + H^+ = [LH_2]^{2+}$	2.3(1)	7.34(1)
$[LH_2]^{2+} + H^+ = [LH_3]^{3+}$		1.94(2)

(a) I valori in parentesi sono le deviazioni standard sull'ultima cifra significativa

L2 può legare fino a tre protoni in soluzione acquosa. I primi due step di protonazione, essendo le prime due costanti di protonazione più alte di quelle riportate per la protonazione della 1,10-fenantrolina (logK=4.96),⁴ interessano i gruppi amminici secondari della catena alifatica. Il terzo step di protonazione coinvolge gli atomi di azoto della fenantrolina e avviene solo a pH nettamente acido. Per **L1**, le due costanti di protonazione si riferiscono alla protonazione del singolo gruppo amminico alifatico a valori di pH alcalini e alla protonazione dell'unità fenantrolina a pH nettamente acido.

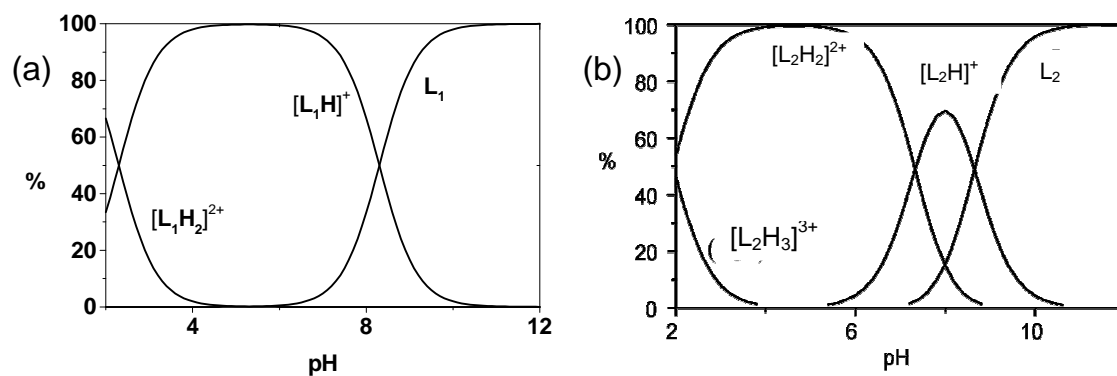


Fig. 10.2- Diagramma di distribuzione delle specie protonate di **L1** (a) e **L2** (b)

(1·10⁻³M, NMe₄NO₃ 0.1 M, 298.1K).

10.3. Complessazione dei metalli

E' stato effettuato uno studio di complessazione di Cu^{II}, Zn^{II}, Pb^{II}, Cd^{II} e Hg^{II} da parte di **L1** e **L2** attraverso titolazioni potenziometriche in soluzione acquosa in un range di pH 2.5-10.5 (Cu^{II} e Cd^{II} con **L1**, e Zn^{II}, Pb^{II}, Cd^{II} con **L2**) o 2.5-7.0 (Cu^{II} con **L2**). In questo ultimo caso la precipitazione di idrossocomplessi a pH debolmente alcalino, impedisce lo studio del sistema nella regione alcalina di pH. I complessi di Hg^{II} con entrambi i leganti sono completamente formati anche a pH 2.5 in soluzione di NMe₄NO₃ 0.1 M e si può solo stimare che la loro costante di formazione sia superiore a 15 e 17 unità logaritmo per [Hg(**L1**)]²⁺ e [Hg(**L2**)]²⁺, rispettivamente. Comunque, è stato possibile determinare le costanti di formazione dei complessi 1:1 di **L1** e **L2** con Hg^{II}, in soluzioni NMe₄Cl 0.1 M grazie alla presenza in queste soluzioni dell'equilibrio di complessazione di Hg^{II} con lo ione cloruro. Non è stato possibile estendere lo studio alla regione alcalina a causa della precipitazione delle specie idrossocomplesse. Infine, non è stato possibile studiare la complessazione di Zn^{II} e Pb^{II} con **L1** e di Ag^I con **L1** e **L2** a causa della precipitazione dei complessi già a pH acido. Le costanti di stabilità dei complessi formati sono riportate in tabella 10.2, mentre in Fig. 10.3 sono riportati i diagrammi di distribuzione dei complessi di Zn^{II} e Cd^{II} con **L2**.

Tabella 10.2- (a) NMe₄NO₃ 0.1 M, (b) NMe₄Cl 0.1 M, (c) la scarsa solubilità dei complessi impedisce lo studio potenziometrico di questi sistemi, (d) la precipitazione di idrossocomplessi a pH debolmente alcalino impedisce lo studio di questi sistemi nella regione di pH alcalino

Equilibrio	LogK					
	Cu ^{IIa}	Zn ^{IIa}	Cd ^{IIa}	Pb ^{IIa}	Hg ^{IIa}	Hg ^{IIb}
M ²⁺ + L1 = [M(L1)] ²⁺	10.9(1)	c	11.2(1)	c	>15	21.3(1)
[M(L1)] ²⁺ + OH ⁻ = [M(L1)(OH)] ⁺	4.7(1)		3.54(1)			d
M ²⁺ + L2 = [M(L2)] ²⁺	15.21(2)	11.09(1)	13.00(1)	13.46(1)	>17	23.7(1)
[M(L2)] ²⁺ + H ⁺ = [M(H L2)] ³⁺		3.76(2)				
[M(L2)] ²⁺ + OH ⁻ = [M(L2)(OH)] ⁺	d	4.66(3)	2.67(2)	3.07(1)		d

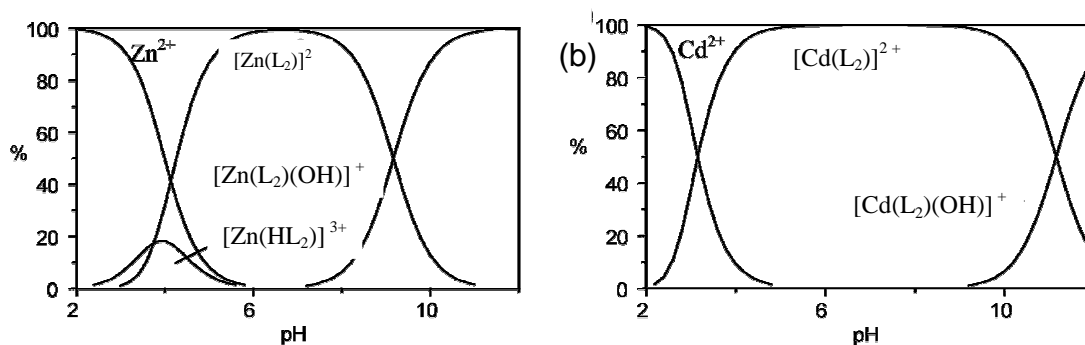


Fig. 10.3- Diagrammi di distribuzione per i sistemi $Zn^{II}/L2$ e $Cd^{II}/L2$ in acqua $[M^{II}]=[L2]=1 \cdot 10^{-3}M; I=0.1M$.

L2 forma complessi stabili con tutti i metalli studiati. Nel caso di Zn^{II} e Cd^{II} , la complessazione del metallo avviene a valori di pH acidi ed è seguita dalla deprotonazione delle molecole di acqua coordinate a dare le specie monoidrosso-complesse $[ML2(OH)]^+$ nella regione di pH alcalini. La capacità di coordinazione dei diversi metalli da parte di **L2** vista in termini di costanti di stabilità aumenta nell'ordine $Zn^{II} < Cd^{II} \approx Pb^{II} < Cu^{II} < Hg^{II}$. Hg^{II} forma i complessi più stabili grazie alla sua alta affinità verso atomi donatori quali zolfo e azoto. La maggiore stabilità dei complessi con Cu^{II} rispetto ai d^{10} Zn^{II} , Cd^{II} e Pb^{II} può essere semplicemente ricondotta all'effetto stabilizzante CFSE per lo ione d^9 Cu^{II} . Meno usuale è la più bassa stabilità dei complessi di Zn^{II} rispetto a quelli di Cd^{II} e Pb^{II} . Il confronto tra le proprietà coordinative dei due leganti è limitato dal fatto che solo nel caso di **L1** si possono determinare le costanti di stabilità con Cu^{II} , Cd^{II} e Hg^{II} . Consultando la Tabella 10.2 si può comunque notare una notevole diminuzione di stabilità dei complessi di Cu^{II} , Cd^{II} e Hg^{II} passando da **L2** a **L1**. Questo può essere spiegato con la generale minore affinità degli atomi donatori zolfo per questi metalli rispetto agli atomi donatori amminici. La complessazione di **L1** e **L2** è stata anche studiata mediante titolazioni 1H -NMR aggiungendo aliquote crescenti di un sale del metallo a miscele CD_3CN/D_2O 4:1 (v/v) di legante a $pD=7.0$ a $25^\circ C$ per definire la stechiometria dei complessi formati in soluzione. Gli spettri 1H -NMR di **L1** e **L2** mostrano tre segnali per i protoni dell'unità fenantrolina (due doppietti e un singoletto) e un secondo set di tre segnali per il frammento alifatico (un singoletto attribuibile al gruppo

metilenico vicino alla fenantrolina e due tripletti per la catena etilenica) ognuno integrante per quattro protoni in accordo con la simmetria C_{2v} mediata nella scala dei tempi. La complessazione influenza pesantemente gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sia per **L1** che per **L2**. Nel caso di Zn^{II} e Hg^{II} per entrambi i leganti, l'aggiunzione di 0.25 eq. di ione metallico provoca già la comparsa di un nuovo set di segnali che può essere attribuita alla formazione dei corrispondenti complessi che interscambiano lentamente con il legante libero nella scala dei tempi NMR. I nuovi segnali sono spostati a campi più bassi di 0.05-0.2ppm rispetto a quelli del legante libero osservati nelle stesse condizioni. Mentre i segnali dei protoni della fenantrolina nei complessi sono definiti e ben distinguibili (Fig. 10.4a), i segnali dei protoni alifatici dei complessi sono in genere non strutturati, slargati e parzialmente sovrapposti a quelli del legante libero. Questo giustifica la presenza in soluzione di diversi conformeri che interscambiano con tempi di vita simili alla scala dei tempi degli esperimenti ^1H . Aggiungendo aliquote crescenti di Zn^{II} o Hg^{II} si ha un progressivo aumento di intensità dei segnali della fenantrolina corrispondenti ai complessi metallici formati e una progressiva diminuzione delle intensità delle risonanze del legante. Ad un rapporto molare 1:1 metallo-legante, scompare completamente il set dei segnali del legante e lo spettro mostra solo i segnali dei complessi metallici. Questi dati sono in accordo con la formazione di complessi stabili 1:1 tra i leganti e Zn^{II} o Hg^{II} . Nel caso di Cd^{II} , Pb^{II} e Ag^{I} e per entrambi i leganti, l'aggiunzione di aliquote crescenti di questi ioni metallici porta al progressivo spostamento a campi bassi dei segnali ^1H fino a un rapporto molare 1:1 (Fig. 10.4b). Una ulteriore aggiunta di metallo non provoca variazioni nello spettro. Questo suggerisce la formazione di complessi metallici mononucleari con un veloce interscambio con il legante libero in soluzione (la alta stabilità dei complessi e la bassa solubilità di **L1** e **L2** e dei loro complessi metallici impedisce una determinazione delle costanti di stabilità dei complessi usando titolazioni $^1\text{H-NMR}$ a valori di pD fisso). I segnali dei protoni alifatici risultano spostati e slargati dopo complessazione metallica.

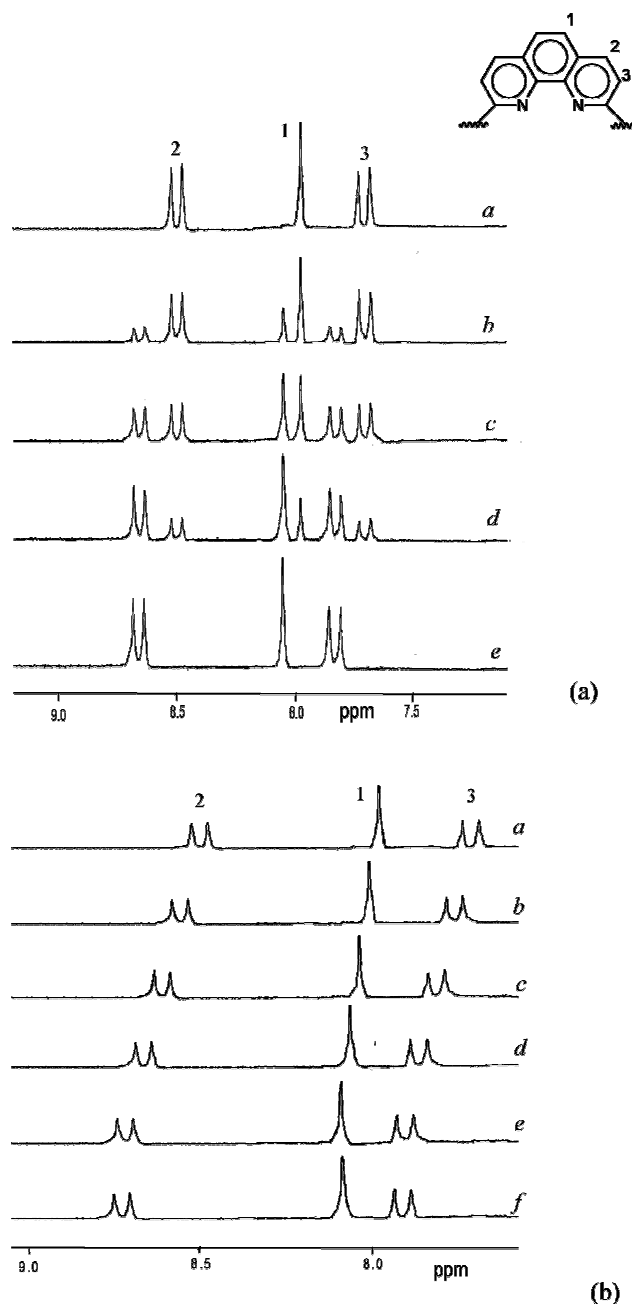


Fig 10.4- (a) Spettri ¹H-NMR di **L2** in presenza di aliquote crescenti di Hg^{II} in CD₃CN/D₂O 4:1 (v/v) a pD=7.0 [rapporti molarì Hg^{II}/**L2**: (a) 0.0, (b) 0.25, (c) 0.50, (d) 0.75, (e) 1.0]. (b) Spettri ¹H-NMR di **L2** in presenza di aliquote crescenti di Pb^{II} in CD₃CN/D₂O 4:1 (v/v) a pD=7.0 [rapporti molarì Pb^{II}/**L2**: (a) 0.0, (b) 0.25, (c) 0.50, (d) 0.75, (e) 1.0, (f) 1.25].

La scarsa solubilità dei complessi non ha permesso di effettuare studi ¹H-NMR a bassa temperatura. Isolando i complessi allo stato solido e registrando gli spettri di questi in CD₃CN a 25°C si possono notare in alcuni casi dei pattern di segnali per la parte alifatica più complessi, in generale slargati. La cosa suggerisce che in questo solvente si ha una diminuzione della simmetria

del legante mediata nel tempo, a seguito della complessazione metallica. In particolare i complessi 1:1 di Hg^{II} e Cd^{II} con **L1** e Zn^{II} e Ag^{I} con **L2** mostrano due gruppi di segnali distinti per i protoni alifatici dei frammenti etilenici, ognuno integrante quattro protoni. Nei casi di Ag^{I} e Zn^{II} con **L1** si osservano o un unico segnale slargato o due segnali che integrano due e sei protoni rispettivamente. Per il complesso 1:1 con Pb^{II} e **L1** si osservano tre gruppi di segnali, due integranti due protoni e uno integrante quattro protoni. Nel caso di Pb^{II} e **L2** vi sono quattro gruppi di segnali integranti due protoni ciascuno. Per quanto riguarda i protoni metilenici mentre nel caso dei complessi di Zn^{II} , Cd^{II} e Ag^{I} con **L1** e Ag^{I} con **L2** si nota un unico singoletto che integra quattro protoni, nei casi di Pb^{II} e Hg^{II} con **L1** e Zn^{II} , Pb^{II} e Hg^{II} con **L2** si nota un sub-spettro di tipo AB che suggerisce che a seguito della complessazione i protoni si dispongono in posizioni non equivalenti (sopra e sotto il piano dell'unità fenantrolina).

10.4. Estrazione liquido-liquido

I leganti L^{A} -**L2** sono stati testati come estrattori per estrazione liquido-liquido di una serie di metalli (Cu^{II} , Zn^{II} , Ag^{I} , Cd^{II} , Hg^{II} , Pb^{II}). L'intento era quello di verificare l'effetto dei diversi atomi donatori nei leganti macrociclici nel processo di riconoscimento di ioni metallici. Gli studi di estrazione in solvente da parte di **L2** sono stati fallimentari a causa della formazione di precipitati all'interfase acquosa/organica. Questo può essere ricondotto alla più alta solubilità in acqua di **L2** rispetto a tutti gli altri leganti. In Fig. 10.5 mostra un riassunto del comportamento estrattivo di L^{A} - L^{E} nei confronti di Ag^{I} , Cu^{II} e Zn^{II} . Si può osservare una diminuzione dell'efficienza di estrazione nell'ordine $\text{Ag}^{\text{I}} > \text{Cu}^{\text{II}} > \text{Zn}^{\text{II}}$.

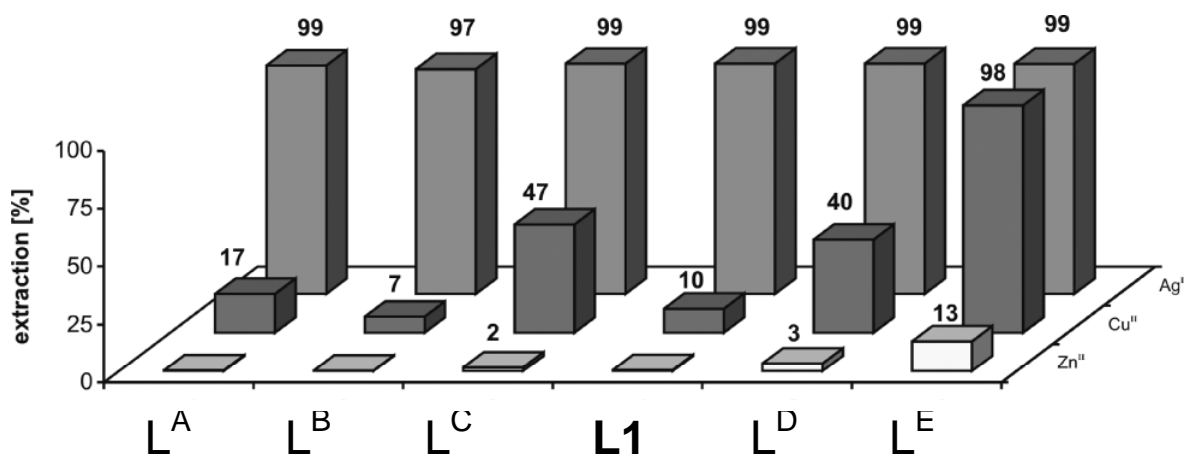


Fig. 10.5- Estrazione di Ag^I, Cu^{II} e Zn^{II} da parte di L^A-L^E, [Mⁿ⁺]=1·10⁻⁴M, [NaClO₄]=5·10⁻³M, pH=6.1, [L]= 1·10⁻³M in CHCl₃, tempo di agitazione 30 min, T=21±1°C.

Si può notare che tutti i leganti mostrano una estrazione quasi quantitativa di Ag^I (97-99%); in questo caso, i diversi gruppi di atomi donatori nelle unità macrocicliche non hanno alcuna influenza. Nel caso del Cu^{II}, invece, si nota una influenza da parte degli atomi donatori. L' estrazione del Cu^{II} aumenta nell'ordine L^B<L¹<L^A< L^D< L^C<L^E. Confrontando con L^C (estrazione del Cu^{II} 47%), si può vedere che la presenza di un atomo donatore in più nella catena alifatica del macrociclo, provoca una diminuzione del potere estrattivo nell'ordine di ammina terziaria (L^D, 40%), zolfo (L^A, 17%), ammina secondaria (L¹, 10%), ossigeno (L^B, 7%). E' interessante osservare come l'introduzione della subunità piridina nella catena macrociclica provochi un aumento dell'estrazione del Cu^{II} fino al 98% (L^E, Fig. 10.5). Nel caso dello Zn^{II}, solo L^E mostra una apprezzabile efficienza estrattiva (13%). Per approfondire lo studio sulle capacità estrattive di L^A -L^E, sono stati condotti anche esperimenti in competizione con una miscela equimolare di Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II} e Pb^{II} (ognuno 1·10⁻⁴M, leganti 1·10⁻³M in CHCl₃). In accordo con gli esperimenti su singolo ione metallico, si nota una certa affinità per Cu^{II}, mentre Pb^{II}, Cd^{II} e Zn^{II} sono solo debolmente estratti e nell'ordine Pb^{II}> Cd^{II}> Zn^{II} (Fig. 10.6).

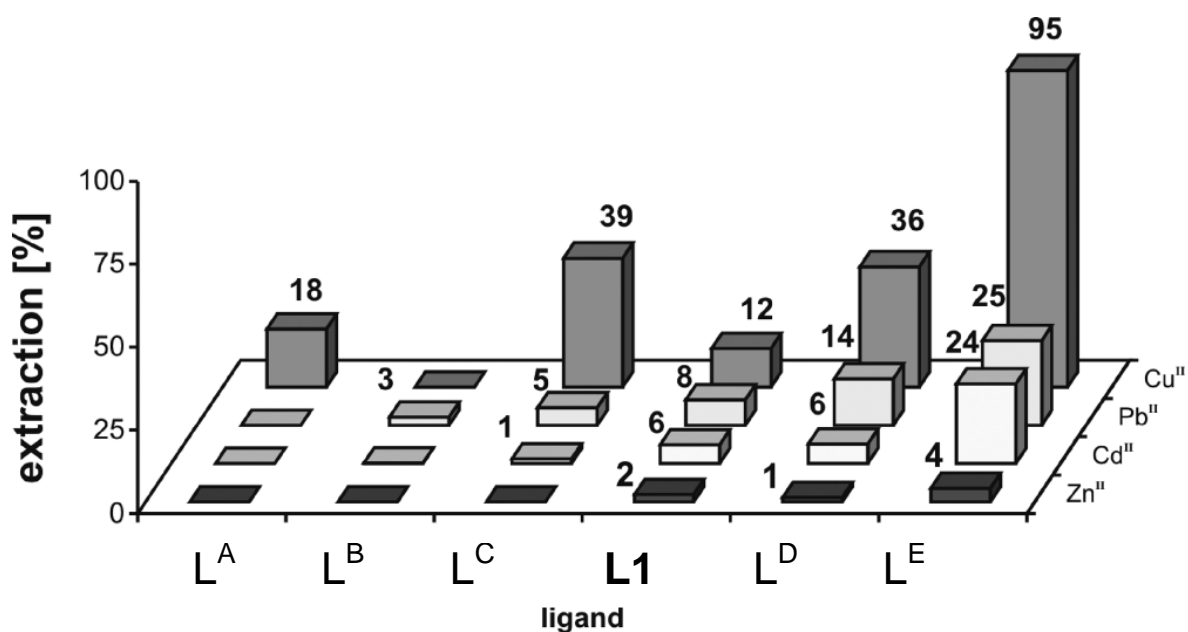


Fig 10.6-Estrazione in competizione di Zn^{II}, Cd^{II}, Pb^{II} e Cu^{II} da loro miscela da parte di L^A–L^E. [Mⁿ⁺]=1·10⁻⁴M, [NaClO₄]=5·10⁻³M, pH=6.1, [L]= 1·10⁻³M in CHCl₃, tempo di agitazione 30 min, T=21±1°C.

Nel caso di Cd^{II} e Pb^{II}, si vede che la presenza di un atomo donatore azoto (appartenente a gruppo amminico o a piridina) aiuta l'estrazione di questi metalli. La maggiore estrazione di Cd^{II} (24%) e di Pb^{II} (25%) si ha con il legante contenente l'unità piridina L^E. Sono stati condotti altri esperimenti competitivi tra coppie di ioni per verificare la selettività di estrazione tra ioni chimicamente simili (Ag^I/ Hg^{II}) o importanti da un punto di vista industriale (Ag^I/ Cu^{II}). In questo caso lo studio è stato effettuato a pH acido (pH=3.1) per diminuire l'estrazione di Ag^I. La Fig. 10.7 mostra i risultati di questo esperimento competitivo insieme a quelli ottenuti per estrazione a singolo ione di Ag^I nelle stesse condizioni.

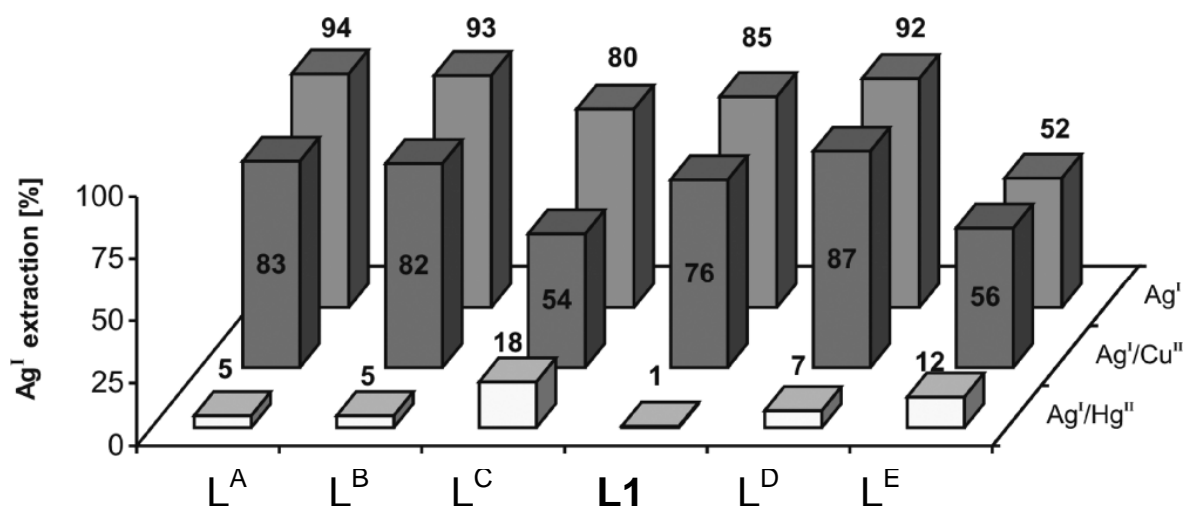


Fig. 10.7- Estrazione di Ag^I da parte di L^A -L^E in presenza di Hg^{II} e Cu^{II} . [Mⁿ⁺]=1·10⁻⁴M, [NaClO₄]=5·10⁻³M , pH=3.1, [L]= 1·10⁻⁴M in CHCl₃, tempo di agitazione 30 min, T=21±1°C.

L'ordine di estrazione di Ag^I da parte dei leganti appare il seguente: L^A ≈ L^B ≈ L^D > **L1** > L^C > L^E . La presenza di Cu^{II} o Hg^{II} causa una diminuzione dell'estrazione di Ag^I. Comunque l'estrazione di Ag^I è abbastanza favorita in presenza di Cu^{II} ma non in presenza di Hg^{II}. Queste informazioni possono essere utili per le nuove tecnologie impiegate nella separazione e purificazione dell'argento. In effetti l'utilizzo di membrane artificiali contenenti ionofori neutri per la estrazione selettiva di Ag^I, incontra notevoli problemi a causa delle interferenze con ioni di metalli pesanti che causano un aumento del tempo di trasporto. ³ Dalla Fig. 10.7 si può notare come sia possibile effettuare una estrazione selettiva di Ag^I rispetto al Cu^{II} con i leganti L^A, L^B, **L1** e L^D. Non solo **L1**, ma anche L^A e L^B possono essere considerati come buoni candidati ionofori per l'estrazione selettiva di Hg^{II}, elemento tossico e nocivo dal punto di vista ambientale, da soluzioni acquose contenenti Ag^I.

10.5. Conclusioni

Sono state studiate le proprietà complessometriche di **L1** e **L2** nei confronti di diversi ioni metallici e le loro capacità estrattive liquido-liquido sono state

confrontate con una famiglia di leganti macrociclici analoghi contenenti la subunità fenantrolina. Lo studio ha dimostrato che i risultati possono variare in particolari casi, per cui il comportamento osservato non riflette necessariamente l'affinità intrinseca di uno ione metallico per uno specifico macrociclo. I sistemi molecolari basati su macrocicli spesso non soddisfano al ruolo di ionofori specifici così come erano stati progettati, per cui è necessario testare la loro abilità come recettori nei processi di riconoscimento molecolare in diverse situazioni sperimentali utilizzando diverse tecniche e approcci analitici.

10.6. Bibliografia

1. Aragoni, M.C.; Arca, M.; Bencini, A.; Biagini S.; Blake, A.J.; Caltagirone, C.; Demartin, F.; De Filippo, G.; Devillanova F.A.; Garau, A.; Gloe, K.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Valtancoli, B.; Wenzel, M. *Inorg. Chem.* **2008** 47, 8391-8404
2. Zoltov, Y.A. *Macrocyclic Compounds in Analytical Chemistry*. Ed Wiley & Sons; New York, **1997**; ISBN 0-471-17262-6.
3. (a) Aragoni, M.C.; Arca, M.; Demartin, F.; Devillanova F.A.; Isaia, F.; Garau, A.; Lippolis, V.; Jalali, F.; Papke, U.; Shamsipur, M.; Tei, L.; Yari, A.; Verani, G. *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 6623.(b) Ferriera, E. S.; Garau, A.; Lippolis, V.; Pereira, C.M.; Silva, F.J.; *Electroanal. Chem.* **2006**, 587, 155.(c) Arca, M.; Azimi, G.; Demartin, F.; Devillanova F.A.; Escriche, L.; Garau, A.; Isaia, F.; Kivekas, R.; Lippolis, V.; Muns, V.; Perra, A.; Shamsipur, M.; Sportelli, L.; Yari, A.; *Inorg. Chim. Acta* **2005**, 238, 2403.(d) De Filippo, G.; Demartin, F.; Garau, A.; Lippolis, V.; Yari, A.; Shokrollahi, A.; Shamsipur, M. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, 351, 801.(e) Shamsipur, M.; Hashemi, O.R.; Lippolis, V. *J. Membr. Sci.* **2006**, 282, 322.
4. Condiike, G.; Martell, A.E.; *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1969**, 31, 2455.

11. Conclusioni

La ricerca chimica sta mostrando un crescente interesse nell'ottenimento di molecole altamente specializzate progettate per svolgere particolari funzioni. In campo biomedico la necessità di ottenere nuovi farmaci antitumorali spinge verso la sintesi e lo studio di sostanze in grado di interagire con il DNA (dette recettori molecolari). Tra di esse, grande interesse è focalizzato sui cosiddetti metallo-recettori, complessi di metalli di transizione con molecole aromatiche o eteroaromatiche estese. La particolarità di tali composti risiede nella sinergia tra i loro componenti. L'unità legante, se opportunamente strutturata, permette il riconoscimento selettivo di particolari sequenze bersaglio nel DNA, legandosi ad esso principalmente mediante interazioni con la molecola nelle scanalature della doppia elica (*groove binding*) o mediante *intercalazione* del residuo eteroaromatico tra le coppie di basi. Il metallo, una volta in prossimità del substrato, può indurre la rottura della catena polinucleotidica attraverso reazioni redox, talvolta fotoindotte (foto-cleavage), oppure di idrolisi. In quest'ottica sono stati sintetizzati diversi tipi di leganti poliamminici contenenti unità eteroaromatiche per studiarne le proprietà di interazione con il DNA. Per alcuni di essi sono state preliminarmente indagate le capacità coordinative nei confronti di alcuni metalli.

Ad esempio, investigando le loro capacità coordinative nei confronti di ioni metallici è stato visto che il legante **L4**, contenente l'unità eteroaromatica biperidile, è capace di coordinare e segnalare selettivamente Cd^{II} rispetto a Zn^{II} e Pb^{II} . Al contrario, per **L5**, contenente l'unità eteroaromatica

fenantrolina, si hanno complessi non emissivi. Questo conferma che nel design di chemosensori fluorescenti piccole variazioni dei parametri strutturali possono influenzare le proprietà di selettività degli stessi.

Per il legante **L6**, che presenta due unità fenantrolina legate da due catene propilamminiche, le due unità eteroaromatiche si trovano a una distanza tale che, in particolari condizioni di protonazione (ad esempio nella specie diprotonata $[LH_2]^{2+}$, possono dare interazione di π - π stacking. La presenza di questa conformazione in soluzione è ben evidenziata dalla notevole resa quantica della specie $[LH_2]^{2+}$. La coordinazione dello ione Zn(II) da parte del legante porta alla formazione di specie mono e binucleari il cui effetto è un unusuale quenching di emissione di fluorescenza. Pertanto il legante L6 è risultato essere un interessante chemosensore per lo ione Zn(II) in soluzione. Sarà altrettanto interessante studiarne le proprietà di interazione con il DNA, da solo e in presenza di ioni Zn(II) per testarne l'efficacia come metallo-intercalante. Le due unità fenantrolina si possono infatti inserire tra coppie di basi del polinucleotide e la particolare architettura del legante permetterebbe di inserirsi come una pinza nel DNA determinandone notevoli modificazioni strutturali .

Il legante **L7** progettato per avere la possibilità di interagire con il DNA con due diverse unità eteroaromatiche (naftalene e fenantrolina), si comporta come chemosensore selettivo per Cd(II) e Zn(II) in quanto è capace di segnalare la presenza dell'avvenuta coordinazione attraverso l'emissione di una nuova banda di emissione diagnostica della formazione di un ecciplesso nello stato eccitato del sistema. Per il complesso con Zn(II) sarà interessante vedere se il sistema sarà in grado di interagire con il DNA attraverso interazioni di intercalazione e se, portando lo ione Zn(II) in prossimità della catena polinucleotidica, sarà capace di promuovere il cleavage idrolitico.

Per altri leganti sono state studiate le proprietà come recettori polifunzionali per anioni fosforici sia inorganici (fosfati) che di importanza biologica (ATP, ADP, CTP, TTP, GTP). E' stato visto che la coordinazione selettiva richiede la presenza di siti di interazione multipla per il substrato, il che, per i nucleotidi, si traduce in termini di siti di interazione con il residuo zuccherino o con la base nucleica. In particolare, il riconoscimento base-selettivo si può

ottenere con interazioni di π -stacking con sistemi aromatici incorporati nel recettore. Confrontando le capacità coordinative di **L8-L10** nei confronti di substrati anionici è stato visto che i due recettori **L8** e **L9** risultano più preorganizzati rispetto a **L10** e, in particolare, **L9** risulta anche un ottimo chemosensore per ATP in soluzione acquosa. Infatti il legante **L9**, contenente una unità fenantrolina e una catena pentaamminica, è in grado di riconoscere selettivamente ATP tra i quattro nucleotidi trifosfato. Inoltre l'ottenimento di cristalli adatti a risoluzione tramite raggi X dell'addotto tra il legante **L9** e il substrato TTP, ha permesso di ottenere interessanti informazioni strutturali.

Molto interessante è risultata anche l'attività di un altro tipo di legante macrociclico contenente una unità bipyridile e una catena pentaamminica (**L11**). Il suo complesso dinucleare di Zn(II) si comporta come chemosensore fluorescente nei confronti di UpU selettivamente riconosciuto rispetto a ApA, GpG o CpC in sequenze esaribonucleotidiche. La risposta è raziometrica ed è permessa dalla formazione di un addotto in soluzione con stechiometria 1:1 in cui ogni ione metallico agisce come sito di legame per l'atomo di azoto deprotonato di una singola funzione imidica. La particolare struttura di questo addotto dà luogo alla formazione di una nuova banda di emissione a 440 nm diagnostica della formazione di un ecciplesso in soluzione.

Per altri sistemi è stato completamente caratterizzato il loro processo di interazione con il DNA. La prima famiglia completamente studiata è costituita da tre complessi di Ru²⁺ (**L13-L14-L15**). I complessi recano un macrociclo poliamminico, in grado di coordinare un secondo ione (es. Cu²⁺, potenzialmente capace di provocare la rottura della catena polinucleotidica). Inoltre la sfera di coordinazione del rutenio è completata da diversi residui eteroaromatici: il primo contiene due gruppi bipyridile, il secondo due dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina), il terzo un gruppo bipyridile e uno dppz. Per via potenziometrica sono state determinate le specie presenti in soluzione a pH fisiologico sia in assenza che in presenza di Cu²⁺. Per via spettrofotometrica e spettrofluorimetrica, è stata indagata la loro interazione con il DNA. Dai risultati raccolti il complesso **L13** non mostra nessuna interazione apprezzabile tra polinucleotide e ciclo poliamminico. Al contrario i

complessi **L14** e **L15** mostrano un'interazione complessa (sia da soli, sia in presenza di Cu^{2+}). Le titolazioni di fluorescenza si sono mostrate più efficienti per le valutazioni quantitative. Dall'analisi del tratto iniziale dell'isoterma di binding per mezzo dell'equazione di Hildebrand & Benesi non semplificata è possibile determinare il valore della costante di equilibrio per l'interazione tra DNA e complesso di rutenio in assenza o in presenza dello ione Cu^{2+} . Si può affermare che ambedue i complessi interagiscono con il DNA naturale, interazione che ha luogo quando esistono in soluzione quantità comparabili di complesso e di polinucleotide (concentrazione in coppie di basi). In queste condizioni sperimentali l'interazione più plausibile è una intercalazione in accordo con le proprietà note in letteratura, circa il residuo dppz, con il fenomeno di diminuzione di assorbimento di luce (ipocromismo) e di aumento della banda di fluorescenza del complesso (dato dall'allontanamento di molecole di solvente che provocano un quenching di segnale emesso, al momento dell'intercalazione). Approfondendo lo studio con misure cinetiche è stato visto che si tratta di una intercalazione parziale, a causa dell'elevato ingombro sterico dei complessi. Solo il sistema in cui è presente un solo residuo dppz, in assenza di ione rame nel macrociclo, presenta fenomeni di cooperatività. Il complesso **L15**, meno ingombrante, può trovarsi ad occupare lungo il DNA posizioni più vicine, tanto vicine che non è più trascurabile una interazione complesso/compleso alla base della cooperatività. Tale ipotesi è in corso di conferma attraverso calcoli teorici. Le costanti di equilibrio dei sistemi in presenza di uno ione rame sono significativamente inferiori a quanto ottenuto nel caso del complesso di rutenio tal quale, infatti la ridotta affinità è in accordo con la aumentata rigidità del sistema quando questo viene a coordinare lo ione metallico. Sono ancora in corso studi per verificare se i complessi **L14** e **L15** hanno la capacità di produrre alterazioni consistenti della struttura secondaria del polinucleotide tal quali o uniti a Cu^{2+} .

E' stata inoltre realizzata la sintesi del nuovo complesso di Pt(II) **L16**, contenente una unità proflavina, dalle note proprietà intercalanti. Il complesso presenta interazione con DNA mediante meccanismo bifasico dipendente dal rapporto di concentrazioni tra complesso e DNA: un primo

modo di interazione esterna e un secondo modo intercalativo. Successivamente si verifica una reazione lenta di attacco del platino alle nucleobasi (adenina, guanina) mediante un processo con semivita di circa 60h. Questo ultimo processo è circa 10 volte più lento dell'analogo processo presentato dal cis-Pt , ma è comunque dello stesso ordine di grandezza di processi simili che coinvolgono l'interazione covalente di farmaci antitumorali contenenti Pt(II) con i polinucleotidi.

Sviluppi futuri al presente lavoro di tesi saranno il completamento degli studi di interazione dei metallo-recettori con i substrati biologici, lo studio delle reazioni di attivazione del DNA (rottura ossidativa o idrolitica) e l'esecuzione di prove in vivo dell'attività di questi metallo-recettori su famiglie di cellule cancerose

Appendice

ATP Recognition and sensing with a phenanthroline-containing polyammonium receptor†

Carla Bazzicalupi, Silvia Biagini, Andrea Bencini,* Enrico Faggi, Claudia Giorgi, Irene Matera and Barbara Valtancoli

Received (in Cambridge, UK) 31st July 2006, Accepted 29th August 2006

First published as an Advance Article on the web 13th September 2006

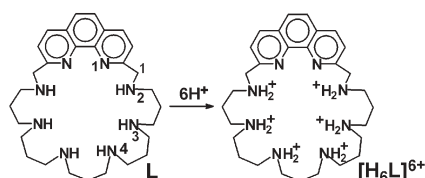
DOI: 10.1039/b611031b

A new polyammonium receptor is able to selectively recognise and sense ATP among triphosphate nucleotides, thanks to ATP-induced quantitative quenching of its fluorescence emission.

There is a growing interest in the design of fluorogenic receptors able to recognise and signal analytes in aqueous solutions,¹ due to their potential use in medicinal and environmental chemistry. ATP is undoubtedly one of the preferred targets, due to its basic role as a center for chemical energy storage and transfer in the bioenergetics of all living organisms. Polyammonium receptors containing fluorogenic units are often chosen as chemosensors for anionic analytes, including ATP,^{2–7} since their ability to give charge–charge interactions with anionic species may lead to the formation of stable host–guest complexes in aqueous solutions. Selective coordination, however, requires also the incorporation of sites capable of interactions with the sugar moiety or the nucleic base.^{8–13}

Although many fluorogenic synthetic systems able to recognise and signal ATP have been reported,^{2–13} in most cases they act as selective chemosensors for ATP with respect to the less charged ADP, AMP or inorganic phosphate anions. Selective recognition and sensing of ATP over the other triphosphate nucleotides is a much more difficult goal, due to the similar charge gathered on the nucleotides; in fact, only one example of a chemosensor able to selectively sense GTP over ATP has been recently reported.⁴

The new phenanthroline-containing macrocycle L (Scheme 1) protonates in aqueous solutions affording polyammonium cations of the type $[H_xL]^{x+}$ ($x = 1–6$). The protonation constants of the



Scheme 1

Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, Via della Lastruccia 3, 50019, Sesto Fiorentino, Firenze, Italy. E-mail: andrea.bencini@unifi.it; Fax: +39 055 4573364; Tel: +39 055 4573371

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details for L synthesis, potentiometric and spectroscopic measurements and MD simulations, protonation constants of L, formation constants of the adducts with ATP, ADP, AMP, GTP, CTP and TTP, distribution diagrams for each system L–nucleotide, CIS values for the receptor–nucleotide complexes, atomic coordinates for the lowest energy conformers of adducts with ATP and CTP. See DOI: 10.1039/b611031b

receptor range between 10.14 and 6.9 log units, higher than those reported for 1,10-phenanthroline ($\log K = 4.96$).¹⁴ As already reported for other phenanthroline-containing polyamines,¹⁵ protonation takes place on the aliphatic amine groups, while the phenanthroline nitrogens, less basic than amine groups, are not protonated in our experimental conditions. The hexaprotonated receptor $[H_6L]^{6+}$ is the prevalent species in solution for $\text{pH} \leq 7$ (Fig. 1) and displays the typical fluorescence emission band of phenanthroline at 365 nm. Deprotonation of $[H_6L]^{6+}$ to give less protonated forms leads to a complete quenching of the emission (Fig. 1), due to the presence of deprotonated amine groups which can quench the emission through an electron transfer process. In particular, ¹H NMR spectra recorded at different pH values show that deprotonation of the $[H_6L]^{6+}$ cation to give the $[H_5L]^{5+}$ and $[H_4L]^{4+}$ ones implies release of acidic protons from the benzylic nitrogens N2, adjacent to phenanthroline. In fact, a marked upfield shift (*ca.* 0.8 ppm) of the signal of the benzylic methylene groups H1, adjacent to N2, accompanies deprotonation of $[H_6L]^{6+}$ to form the $[H_5L]^{5+}$ and $[H_4L]^{4+}$ species (see inset of Fig. 1). Therefore, in the $[H_5L]^{5+}$ and $[H_4L]^{4+}$ cations the fluorescence emission is quenched by the benzylic amine groups N2, through an electron transfer process to the excited phenanthroline. Of course, protonation of these nitrogens in the hexaprotonated receptor $[H_6L]^{6+}$ leads to renewal of the fluorescence emission. In the cations with protonation degree lower than 4, however, the N3 and N4 nitrogens may also contribute to the quenching process.

Protonation of the receptor enables L to form stable complexes with anionic forms of triphosphate nucleotides ATP, GTP, CTP or TTP as well as with ADP and AMP. A potentiometric study

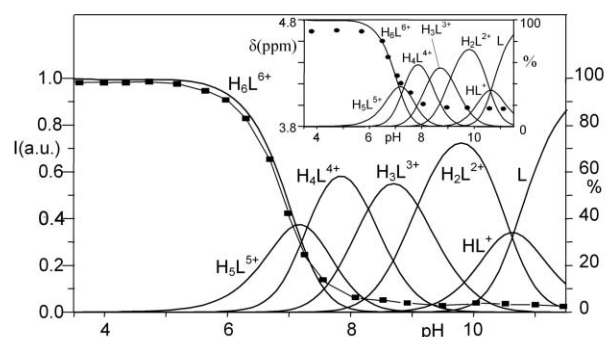


Fig. 1 pH dependence of the fluorescence emission at 365 nm (—■—, left y axis) and distribution diagrams of the protonated species of L (solid lines, right y axis). Inset: pH dependence of chemical shift of the benzylic protons H1 (—●—) superimposed on the species distribution of L (0.1 M NMe₄Cl, [L] = 2.5 × 10^{−5} M).

shows that all nucleotides forms stable 1 : 1 complexes of the type $[H_xLA]^{(x-4)+}$ (see ESI†).

The comparison between the binding constants of nucleotides to the protonated forms of the receptor, however, is complicated by the remarkably different acid–base characteristics of the substrates, and by the presence of overlapping protonation equilibria involving both receptor and anions in the same pH range. This problem can be conveniently overcome by considering a competitive system containing receptor and nucleotides in equimolar concentrations and calculating the overall percentages of the different complexed anions over a wide pH range.¹⁶ Plots of the percentages vs. pH produce species distribution diagrams from which the binding ability of the receptor can be interpreted in terms of selectivity. Fig. 2 displays the plot obtained for a competitive system containing L, ATP, CTP, TTP and GTP in equimolar ratio; the formation of ATP adducts with L prevails over a wide pH range, *i.e.*, ATP is selectively bound with respect to the other triphosphate nucleotides. For instance at pH 6, 80% of ATP is complexed, while CTP, the most competitive substrate for ATP complexation with L, is complexed at less than 15%.

A similar plot can be also obtained for a competitive system containing ATP, ADP and AMP. In this case, ATP is selectively complexed in the pH range 2–9 in a percentage greater than 90% (see ESI, Figure S7†).

³¹P Spectra recorded on solutions containing the nucleotides and the receptor in a 1 : 1 molar ratio show remarkable downfield shifts of the ³¹P signals of the P_γ and P_β phosphorus atoms of the phosphate chain with respect to the nucleotides in the absence of the receptor, indicating the formation of strong salt bridges between the anionic triphosphate moiety and the ammonium groups of the receptor. Complexation is also accompanied by upfield shifts of the ¹H signals of the nucleobases and the phenanthroline of the receptor (see Fig. 3 for ATP), suggesting the presence of π -stacking interactions between the nucleobases and the heteroaromatic unit of the receptor.

ATP shows the most relevant complexation-induced chemical shifts (CIS) in both ³¹P and ¹H NMR spectra (see ESI, Table S6 and S7†). This would confirm the presence of an overall stronger interaction of ATP with the receptor with respect to the other nucleotides. Among the other triphosphate nucleotides, CTP, the most competitive nucleotide toward ATP, displays the highest CIS values for the ³¹P signals (3.8 and 1.2 ppm for the P_γ and P_β phosphorus atoms) and the lowest one in the ¹H signals for its aromatic protons (−0.28 and −0.20 ppm), suggesting the

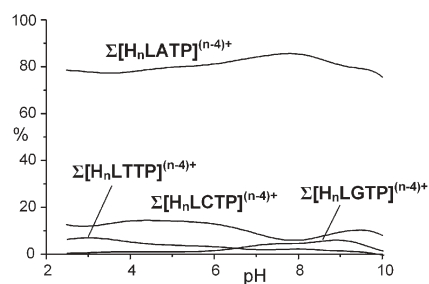


Fig. 2 Overall percentages of L complexed species with ATP, CTP, TTP or GTP as a function of pH in a competitive system containing L, ATP, CTP, TTP and GTP in equimolar ratio ($[L] = [ATP] = [CTP] = [TTP] = [GTP] = 1 \times 10^{-4}$ M).

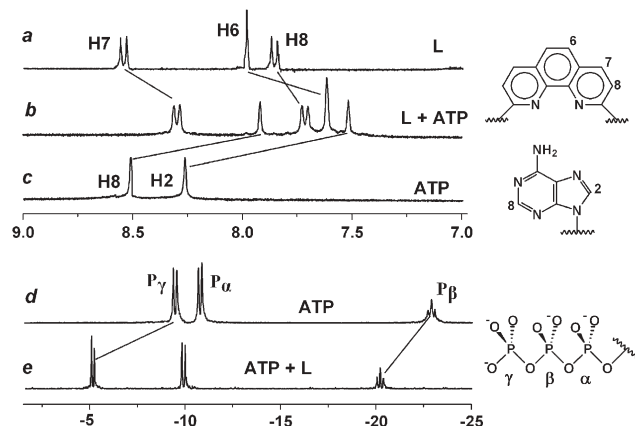


Fig. 3 ¹H NMR spectra (aromatic region) of L (a), ATP in the presence of L (1 : 1 molar ratio) (b), ATP (c) and ³¹P NMR spectra of ATP (d) and ATP in the presence of L (1 : 1 molar ratio) (e).

formation of rather strong charge–charge contacts and weak π -stacking interactions with the receptor.

Spectrofluorimetric measurements show that the receptor can act as effective chemosensor for ATP in aqueous solutions. In fact, addition of increasing amounts of ATP to a solution of L at pH 6 leads to a linear decrease of the fluorescence emission of L. As shown in Fig. 4, the fluorescence of L is completely quenched in the presence of 1 eq. ATP. ADP and AMP give a slight decrease of the fluorescence emission of the receptor (max 10% in the presence of a tenfold excess of ADP). Triphosphate nucleotides also produce a decrease of the fluorescence emission. In this case, however, the quenching effect is only partial even in the presence of a large excess of CTP, GTP or TTP. As shown in the inset of Fig. 4, the larger effect (a fluorescence emission decrease of *ca.* 30%) is observed in the presence of an excess of CTP. Therefore, in the present receptor phenanthroline is not only used for ATP selective binding, thanks to its ability to give strong π -stacking interaction with the nucleobase, but also as signalling unit for this substrate.

To clarify the binding mode of nucleotides, we carried MD calculations on the adducts between $[H_6L]^{6+}$ and ATP or CTP, the most competitive substrate for ATP coordination by L, exploring the potential energy surface by means of simulated annealing. In all the sampled conformers the receptor assumes a folded conformation, with an almost perpendicular disposition between phenanthroline and the aliphatic polyamine chain. Both ATP and CTP display a bent conformation, with the nucleobase–sugar

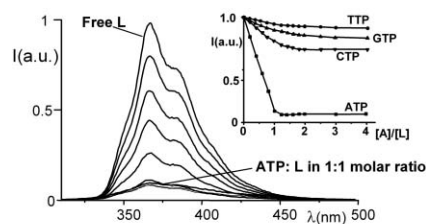


Fig. 4 Fluorescence emission spectra of L in the presence of increasing amounts of ATP at pH 6 (λ_{exc} 270 nm, NMe_4Cl 0.1 M, 298.1 K, $[L] = 2.5 \times 10^{-5}$). Inset: fluorescence intensity at 365 nm in the presence of increasing amounts of ATP, TTP, GTP or CTP.

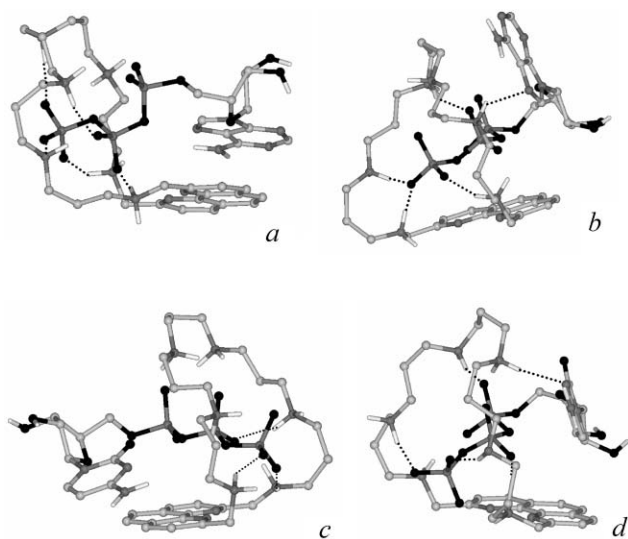


Fig. 5 Low energy conformers of the adducts between $[H_6L]^{6+}$ and ATP in the A (a) and B (b) families and between $[H_6L]^{6+}$ and CTP in the A (c) and B (d) families. Only hydrogen bonds with N–H···O distances lower than 2 Å are reported.

torsion in a *syn* form, which allows the simultaneous interaction of the nucleobases and of the triphosphate chain with the receptor, the terminal γ -phosphate group being encapsulated within the macrocyclic cavity. In both ATP and CTP complexes, the different conformers can be grouped in two different families (herein called A and B), which differ in the interaction mode of the nucleobase with the receptor. The low energy conformers of each family for the ATP and CTP complexes are shown in Fig. 5. In the A family, the most populated for the ATP complex (70%) and the less populated one for CTP (35%), adenine and cytosine interact with the phenanthroline unit *via* π -stacking. The adenosine of ATP, however, gives a stronger π -stacking interaction than cytidine of CTP; while adenine lies above phenanthroline (interplanar distance 3.6 Å) and assumes an almost parallel disposition with respect to the phenanthroline plane (Fig. 5a), cytidine displays a smaller “overlap” with phenanthroline and the plane of cytidine is bent *ca.* 26° with respect to the phenanthroline one (Fig. 5c). The bent conformation of the nucleotides allows the formation of hydrogen bonding interactions of the γ -phosphate groups of both ATP and CTP with the benzylic nitrogens.

The low energy conformer in the B family, the most populated for the CTP complex (65%) and the less populated one for ATP (30%), shows hydrogen bonding interactions between the N7 donor of adenine (Fig. 5b) or the N3 nitrogen of cytosine (Fig. 5d) with an ammonium group of the aliphatic chain of $[H_6L]^{6+}$. Thanks to its smaller dimensions, cytidine can assume a spatial position closer to the macrocyclic cavity than adenine. This determines a different disposition of the triphosphate moiety with respect to the aliphatic chain of the receptor. In fact, the γ -phosphate of CTP is pushed away from the benzylic ammonium groups and cannot give hydrogen bonding interactions with them, while the γ -phosphate of ATP can give a couple of strong hydrogen bonds with these nitrogens.

Therefore, while ATP gives hydrogen bonds with the benzylic ammonium groups in both the A and B families, CTP forms hydrogen bonds with these nitrogens only in the less populated A family.

These results are in accord with the observed high stability of the ATP complexes as well as with the observed complete quenching of the fluorescent emission of phenanthroline in the ATP complex.

In the case of ATP, the nucleotide can assume a conformation suitable to give simultaneously strong π -stacking, charge-charge and hydrogen bonding contacts, which reinforce the overall substrate-receptor interaction. At the same time, in the case of ATP the hydrogen bonding P–O[−]···H₂N⁺ interactions strongly involve the protonated benzylic nitrogens; this can lead to partial transfer of an acidic proton from the benzylic amines N2 to the phosphate chain. Deprotonation of the N2 nitrogens in the $[H_6L]^{6+}$ cation leads to the observed fluorescence quenching.

In conclusion, the present polyammonium receptor represents a unique system simultaneously able not only to selectively recognise ATP over GTP, TTP and CTP, but also to signal ATP through a quantitative quenching of its fluorescence emission.

Notes and references

- (a) L. Fabbri, M. Licchelli, G. Rabaioli and A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **105**, 85; (b) V. Amendola, M. Bonizzoni, D. Esteban-Gomez, L. Fabbri, M. Licchelli, F. Sancenon and A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 1451; (c) R. Martinez-Mañez and F. Sancenon, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 4419; (d) B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, 2002, Wiley-VCH, Weinheim; (e) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher and T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1515; (f) J. L. Sessler and J. M. Davis, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 989; (g) P. D. Beer and P. A. Gale, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 486; (h) M. D. Best, S. L. Tobey and E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **240**, 3; (i) J. L. Sessler, S. Camiolo and P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **240**, 17; (j) P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **240**, 191.
- M. E. Padilla-Tosta, J. M. Lloris, R. Martinez-Mañez, T. Pardo, J. Soto, A. Benito and M. D. Marcos, *Inorg. Chem. Commun.*, 2000, **3**, 45.
- M. S. Vickers, K. S. Martindale and P. D. Beer, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 2784.
- J. Y. Kwon, N. J. Singh, H. N. Kim, S. K. Kim, K. S. Kim and J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8892.
- M. T. Albenda, M. A. Bernardo, E. Garcia-España, M. L. Godino-Salido, S. V. Luis, M. J. Melo, F. Pina and C. Soriano, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1999, 2545.
- A. M. Costero, J. Sanchis, S. Gil, V. Sanz and J. A. G. Williams, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 2848.
- Z. Kejik, K. Zaruba, D. Michalik, J. Sebek, J. Dian, S. Pataridis, K. Volka and V. Kral, *Chem. Commun.*, 2006, 1533.
- Supramolecular Chemistry of Anions*, ed. A. Bianchi, E. Garcia-España and K. Bowman-James, Wiley-VCH, New York, 1997.
- M. W. Hosseini, A. J. Blaker and J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 3896.
- J. A. Aguilar, E. Garcia-España, J. A. Guerrero, S. V. Luis, J. M. Llinares, J. F. Miravet, J. A. Ramirez and C. Soriano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 2237.
- F. P. Schmidtchen and M. Berger, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1809.
- A. V. Elisev and H. J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 6081.
- H. Fuuta, D. Magda and J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 978.
- G. Condike and A. E. Martell, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1969, **31**, 2455.
- C. Bazzicalupi, A. Bencini, V. Fusi, G. Giorgi, P. Paoletti and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 941; A. Bencini, M. A. Bernardo, A. Bianchi, V. Fusi, G. Giorgi, F. Pina and B. Valtancoli, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1999, 1911.
- A. Bianchi and E. Garcia-España, *J. Chem. Educ.*, 1999, **76**, 1727.

A dizinc complex for selective fluorescence sensing of uridine and uridine-containing dinucleotides†

Carla Bazzicalupi,^a Andrea Bencini,^{*a} Laura Bussotti,^b Emanuela Berni,^a Silvia Biagini,^a Enrico Faggi,^a Paolo Foggi,^{*bc} Claudia Giorgi,^a Andrea Lapini,^a Agnese Marcelli^b and Barbara Valtancoli^a

Received (in Cambridge, UK) 29th November 2006, Accepted 31st January 2007

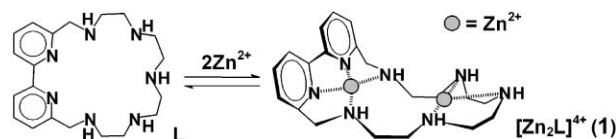
First published as an Advance Article on the web 12th February 2007

DOI: 10.1039/b617453a

A dizinc complex with a polyamine macrocycle is able to selectively bind and sense uridine (U) as well as the uridine-containing ribodinucleotides U(3'–5')pU and U(3'–5')pA, thanks to an exciplex emission arising from a π -stacked complex involving the dipyridine unit and Zn(II)-bound uridine moieties.

There is a current interest in the design of luminescent molecular chemosensors for metabolites in aqueous solutions, due to their potential application in medicinal as well as in analytical chemistry.¹ As one of the approaches to develop luminescent chemosensors, synthetic metal complexes containing fluorogenic units have been successfully used for signaling of a variety of substrates, such as amino acids or carboxylic acids.^{2–8} Early work by Kimura has shown that Zn(II) complexes with cyclen-based polyamine ligands can selectively bind thymine- or uracil-containing nucleosides or oligonucleotides, such as TpT, over the corresponding substrates with different nucleobases.⁹ This selectivity was attributed to the imide function –CO–NH–CO– of thymine or uracil which can easily deprotonate upon coordination to Zn(II).^{9,10} On the other hand, fluorogenic metal complexes able to sense specific nucleosides or dinucleotides are still unknown.

Recently, we reported that ligand L, which contains a pentaamine chain linking the 6,6' positions of a 2,2'-dipyridine moiety, can form a stable dinuclear Zn(II) complex in aqueous solution (**1** in Scheme 1).¹¹ In this complex the two metals may behave as separated docking sites for substrates. At the same time, the dinuclear complex displays an emission band at 330 nm, due to the Zn(II)-bound dipyridine fluorophore. Therefore, complex **1** is a promising chemosensor for substrates containing two separated binding units, such as dinucleotides.



Scheme 1

Actually, addition of increasing amounts of uridiny(3'–5') uridine (UpU) to an aqueous solution of complex **1** at slightly alkaline pH values leads to a decrease of the fluorescence emission at 330 nm and to a new intense, non-structured and red-shifted emission band with a maximum at 445 nm (Fig. 1a). The fluorescence emission intensity at 445 nm increases linearly up to 0.9 : 1 UpU to **1** molar ratio, to achieve a constant value for molar ratios greater than 1.2 (Fig. 1b), indicating the formation of a stable 1 : 1 adduct between UpU and the dimetal complex.

This exciplex type emission is likely to be due to a π -stacking complex in the excited state, involving dipyridine and Zn(II)-bound UpU. On the other hand, while the excitation spectrum at pH 8.6 recorded at 330 nm is coincident with the absorption spectrum, the excitation spectrum recorded at 445 nm is slightly red shifted, as expected from a ground state association between Zn(II)-bound dipyridine and deprotonated uracil. Time resolved fluorescence measurements with $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm at pH 8.6 recorded around

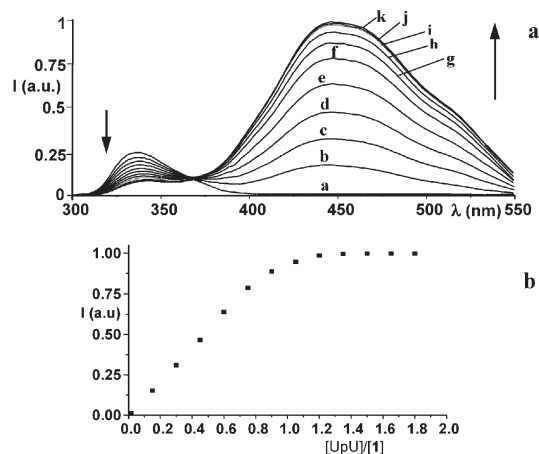


Fig. 1 (a) Fluorescence emission spectra of **1** in the presence of increasing amounts of UpU at pH 8.6 (UpU/**1** molar ratio: 0 (a), 0.15 (b), 0.30 (c), 0.45 (d), 0.60 (e), 0.75 (f), 0.90 (g), 1.05 (h), 1.2 (i), 1.35 (j), 1.5 (k)). (b) Fluorescence emission intensity at 445 nm recorded on solutions containing **1** and increasing amounts of UpU at pH 8.6 ($[I] = [UpU] = 2.5 \cdot 10^{-5}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, 298.1 K).

^aDepartment of Chemistry, University of Florence, Via della Lastruccia 3, 50019-Sesto Fiorentino, Firenze, Italy.

E-mail: andrea.bencini@unifi.it; Fax: +39-055-5773364;

Tel: +39-055-5773371

^bEuropean Laboratory for non-Linear Spectroscopy (LENS),

University of Florence, Via N. Carrara 1, 50019-Sesto Fiorentino,

Firenze, Italy. E-mail: foggi@lens.unifi.it; Fax: +39-055-4572451;

Tel: +39 055 4572494

^cDepartment of Chemistry, University of Perugia, Via Elce di Sotto 8, 06100 Perugia, Italy

† Electronic supplementary information (ESI) available: Stability constants of the Zn(II) complexes; experimental details for potentiometric and fluorimetric experiments; fluorescence emission spectra of UpU, UpA and U in the presence of complex **1** at different pH values; fluorescence emission spectra of **1** in the presence of increasing amounts of UpA; fluorescence emission spectra of **1** in the presence of increasing amounts of 5'-AAUUA-3'; ¹H NMR spectra of U in the presence of complex **1** at different pH values. See DOI: 10.1039/b617453a

445 nm as well as around 540 nm (central wavelengths) show a monoexponential decay (lifetime 1.4 ns), suggesting the presence of a unique π -stacked complex in the excited state.[‡]

Addition of the 3'-5' ribodinucleotides ApA, GpG or CpC to solutions of **1**, instead, does not give any effect on its fluorescence emission, even in the presence of large excess (1 : 30) of these substrates.

The exciplex emission is strongly pH-dependent. As shown in Fig. 2a, the intensity of the emission at 445 nm increases from neutral pH to pH 8.8 and then decreases at more alkaline pH values, giving rise to a bell-shaped profile.

Actually, a potentiometric study on UpU coordination to **1** shows that UpU binding occurs at slightly acidic pH values and is accompanied by release of an acidic proton to give a $[1 \cdot \text{UpU}(\text{H}_{-1})]$ adduct, as expected considering deprotonation of the imine group of one uracil moiety upon metal coordination.[§] The release of a further acidic proton is then observed at slightly alkaline pH values, due to metal-assisted deprotonation of the second uracil unit of UpU to give a $[1 \cdot \text{UpU}(\text{H}_{-2})]$ complex (Fig. 2a).

Fig. 2a shows that the exciplex emission is given by the $[1 \cdot \text{UpU}(\text{H}_{-2})]$ complex, which contains two Zn(II)-bound deprotonated uracil moieties, while the $[1 \cdot \text{UpU}(\text{H}_{-1})]$ complex does not display exciplex emission. This emission is likely to be due to metal-assisted formation of an array of three heteroaromatic units fixed at close distances (Fig. 2b), which leads to π -stacking pairing between uracil and dipyridine. In $[1 \cdot \text{UpU}(\text{H}_{-1})]$ either the single Zn(II)-bound uracil is anchored on the metal not coordinated to dipyridine, far from the fluorogenic center, or it assumes a spatial disposition unable to give a π -stacking interaction with dipyridine strong enough to lead to the exciplex emission.

The observed quenching of the exciplex emission above pH 10 is due to binding of hydroxide anions to complex **1**; this leads to the formation of a $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$ complex and consequent detachment of UpU from the dizinc complex.

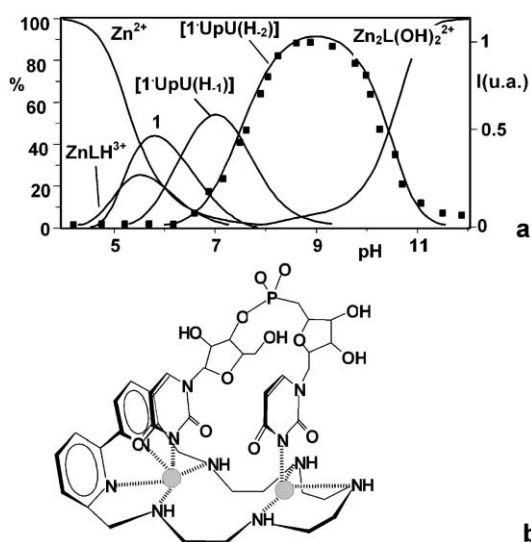


Fig. 2 (a) Emission intensity at 445 nm (■, right y axis) at different pH values and distribution curves of the complexes (solid curves, left y axis) for a system containing **1** and UpU in equimolar ratio (both $2.5 \cdot 10^{-5}$ M). (b) Proposed structure for the $[1 \cdot \text{UpU}(\text{H}_{-2})]$ complex.

In the case of CpC, ApA and GpG no interaction with **1** is detected by means of potentiometric measurements, in agreement with the fact that no exciplex emission is observed in presence of these substrates.

To shed further light on the structural and photophysical features of the UpU complexes, we analyzed the binding ability of **1** toward nucleosides and the ribodinucleotide uridyl(3'-5') adenosine (UpA), which contains a single uracil moiety.

Similarly to UpU, complex **1** is also able to selectively bind uridine (U) over adenosine (A), cytidine (C) and guanine (G). Potentiometric measurements show that binding of a first U unit takes place at acidic pH values and is accompanied by release of an acidic proton, as expected considering metal-assisted deprotonation of the nucleobase to form a $[1 \cdot \text{U}(\text{H}_{-1})]$ species (Fig. 3c). A second deprotonated uridine is then coordinated to give a $[1 \cdot [\text{U}(\text{H}_{-1})]_2]$ complex.[§] U binding was also confirmed by ¹H NMR spectra recorded on solutions containing U and **1** at different pH values, which show that the signals of both the aromatic protons of U and dipyridine are remarkably upfield shifted upon formation of the $[1 \cdot [\text{U}(\text{H}_{-1})]_2]$ adduct at slightly alkaline pH values (Fig. S3, ESI,[¶] due to π -stacking interactions involving these units. No interaction was found between **1** and A, G or C either by potentiometry or by ¹H NMR measurements.

A similar coordination behavior was also observed in the case of UpA, with the formation of a 1 : 1 $[1 \cdot \text{UpA}(\text{H}_{-1})]$ and a 2 : 1 $[1 \cdot [\text{UpA}(\text{H}_{-1})]_2]$ complex, containing respectively one and two deprotonated UpA moieties.[§] Adenosine does not show any tendency to deprotonate and/or to bind to complex **1** and, therefore, the assembly of these complexes would involve deprotonation and binding to Zn(II) of the uracil moiety of UpA.

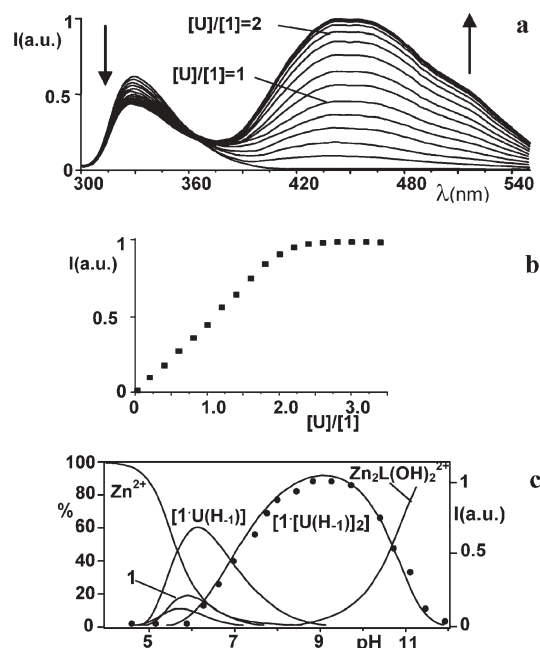


Fig. 3 (a) Fluorescence spectra and (b) emission intensity of **1** at 440 nm in presence of increasing amounts of U at pH 9. (c) Emission intensity at 440 nm (●, right y axis) as a function of pH compared to the distribution curves of the complexes (solid curves, left y axis) for a system containing **1** and U in 1 : 2 molar ratio ($[1] = 2.5 \cdot 10^{-5}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, 298.1 K).

As in the case of UpU, a pH-dependent exciplex emission with a maximum at 440 nm is observed in the presence of uridine or UpA (see Fig. 3 for uridine and ESI, Fig. S4, for UpA).

In the case of uridine, (Fig. 3b), the emission intensity at 440 nm at pH 9 increases linearly with U concentration up to a 1.8 : 1 molar ratio between U and **1** and reaches a constant value for molar ratios greater than 2.4, confirming the formation of a stable 2 : 1 adduct. The only emissive species, however, are the [1·U(H₋₁)₂] (Fig. 3c) and [1·UpA(H₋₁)₂] (see Fig. S6, ESI) complexes; the emission intensity, in fact, increases with the formation of these 2 : 1 complexes from pH 6 to 9 and then decreases above pH 10, where hydroxide binding to **1** leads to disruption of the adducts.

This result confirms that metal-assisted formation of an assembly involving two metal-bound uracil moieties is indeed necessary to give a π -stacked exciplex complex. In contrast, the fluorescence emission of **1** is not affected by the presence of the mononucleosides G, A or C, as expected considering that these substrates do not interact with the complex.

Once again, the decay of the exciplex emission is fitted by a single exponential, in accord with the presence of a unique π -stacking complex; the measured lifetimes around 440 nm of the [1·U(H₋₁)₂] and [1·UpA(H₋₁)₂] complexes (750 and 300 ps, respectively) are smaller than that observed for the [1·UpU(H₋₂)] complex (1.4 ns). The observed higher value for the UpU complex is in accord with the presence in [1·UpU(H₋₂)] of a more "rigid" and stable π -stacked assembly involving the two uracil units and dipyrindine, probably due to the presence of a linker between the two uracil moieties of UpU.‡

Complex **1** represents a potential chemosensor for the UpU sequence in polyribonucleotides. Actually, addition of the UpU-containing hexaribonucleotide 5'-AAUUA-3' to a solution of **1** at pH 8.6 gives rise to the formation of a new emission band at ca. 440 nm (see ESI, Fig. S7). In contrast, the emission spectrum of **1** is not affected by the presence of the hexaribonucleotides 5'-AAUUA-3' or 5'-AAAUA-3', which contain respectively two U units separated by two A nucleotides and a single U unit. Therefore, the band at 440 nm observed in the case of 5'-AAUUA-3' can be reasonably ascribed to binding of complex **1** to the UpU sequence of this hexanucleotide, in a similar fashion to that proposed for the [1·UpU(H₋₂)] complex.

Notes and references

‡ The emission decay was analysed in the spectral intervals 300–375 nm, 410–470 nm and 500–575 nm. We determined a lifetime in the interval 300–375 nm of 650 ps for complex **1**. For the adducts of **1** with the different substrates, the emission decay recorded around 330 nm shows two contributions, ascribable respectively to the exciplex emission and to a fast component due to the dipyrindine emission, similar to or shorter than that found for the exciplex emission. The presence of the component corresponding to the exciplex emission introduces a large uncertainty in determining the value of the dipyrindine one. Therefore, it is not possible to obtain reliable values for the lifetimes at 330 nm and to make a quantitative comparison between the value of the dipyrindine emission decay in free complex **1** and in its adducts.

§ Addition constants (log *K*) of deprotonated UpU, U and UpA to **1**: **1** + UpU(H₋₁) = [1·UpU(H₋₁)], log *K* = 8.0; [1·UpU(H₋₁)] = [1·UpU(H₋₂)] + H⁺, p*K*_a = 8.1; **1** + U(H₋₁) = [1·U(H₋₁)], log *K* = 8.1; [1·U(H₋₁)] + U(H₋₁) = [1·[U(H₋₁)₂]], log *K* = 7.2; **1** + UpA(H₋₁) = [1·UpA(H₋₁)], log *K* = 6.1; [1·UpA(H₋₁)] + UpA(H₋₁) = [1·[UpA(H₋₁)₂]], log *K* = 4.9.

¶ (a) Observed upfield shifts at pH 9: U, 0.38 (H6), 0.43 (H5) ppm; dipyrindine, 0.24 (H4), 0.37 (H5), 0.38 (H6) ppm. In the case of the U signals, deprotonation of the nucleobase upon metal binding also contributes to the observed upfield shifts. Deprotonation of unbound U, in fact, leads to a 0.15 and 0.13 ppm upfield shift of the H6 and H5 signals (see ESI). (b) UpU and UpA binding by **1** could not be analyzed by ¹H NMR, due to a marked fluxionality of the spectra.

- Selected reviews: (a) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, G. Rabaioli and G. A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **105**, 85–108; (b) V. Amendola, M. Bonizzoni, D. Esteban-Gomez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, F. Sancenon and A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 273–299; (c) R. Martínez-Mañez and F. Sancenón, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 3081–3093; (d) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci (née Hussey), P. E. Kruger and F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 3094–3117; (e) B. T. Nguyen and E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 3118–3127; (f) M. D. Best, S. L. Tobey and E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **240**, 3–15; (g) R. Martínez-Mañez and F. Sancenon, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 4419–4476; (h) P. D. Beer and S. R. Bayly, *Top. Curr. Chem.*, 2005, **255**, 125–162; (i) F. Pina, M. A. Bernardo and E. Garcia-España, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2000, 2143–2157; (j) A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher and T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1515–1566; (k) J. L. Sessler and J. M. Davis, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 989–997; (l) P. D. Beer and P. A. Gale, *Angew. Chem.*, 2001, **40**, 486–616; (m) J. L. Sessler, S. Camiolo and P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **240**, 17–55.
- H. Miyaji, H.-K. Kim, E.-K. Sim, C.-K. Lee, W.-S. Cho, J. L. Sessler and C.-H. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12510–12512.
- (a) L. Fabbrizzi, F. Foti and A. Taglietti, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 2603–2606; (b) M. Boiocchi, M. Bonizzoni, L. Fabbrizzi, G. Piovani and A. Taglietti, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 1962–1965; (c) M. A. Hortala, L. Fabbrizzi, N. Marcotte, F. Stomeo and A. Taglietti, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 20–21.
- (a) B. Garcia-Acosta, X. Albiach-Marti, E. Garcia, L. Gil, R. Martinez-Manez, K. Rurack, F. Sancenon and J. Soto, *Chem. Commun.*, 2004, 774–775; (b) F. Sancenon, R. Martinez-Manez and J. Soto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1416–1419.
- (a) M. D. Pratt and P. D. Beer, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 11227–11238; (b) P. D. Beer, M. R. Sambrook and D. Curiel, *Chem. Commun.*, 2006, 2105–2117.
- (a) M. D. Best and E. V. Anslyn, *Chem.–Eur. J.*, 2003, **9**, 51–57; (b) S. L. Tobey and E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 14807–14815; (c) L. A. Cabell, M. D. Best, J. J. Lavigne, S. E. Schneider, D. M. Perreault, M.-K. Monahan and E. V. Anslyn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, 315–323.
- (a) S. Aoki, D. Kagata, M. Shiro, K. Takeda and E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 13377–13390; (b) S. Aoki, M. Zulkefeli, M. Shiro, K. Takeda and E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 9129–9139.
- S. Yamaguchi, I. Yoshimura, T. Kohira, I. Tamaru and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 11835–11841.
- (a) S. Aoki and E. Kimura, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 769–787; (b) M. Shionoya, E. Kimura and M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6730–6737; (c) M. Shionoya, T. Ikeda, E. Kimura and M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 3848–3859; (d) E. Kimura, M. Kikuchi, H. Kitamura and T. Koike, *Chem.–Eur. J.*, 1999, **5**, 3113–3123.
- Q. Wang and H. Loennberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10716–10728.
- (a) C. Lodeiro, A. J. Parola, F. Pina, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, A. Masotti, C. Giorgi and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 2968–2975; (b) C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, P. Fornasari, C. Giorgi and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 6255–6265.

Interaction of Mixed-Donor Macrocycles Containing the 1,10-Phenanthroline Subunit with Selected Transition and Post-Transition Metal Ions: Metal Ion Recognition in Competitive Liquid–Liquid Solvent Extraction of Cu^{II}, Zn^{II}, Pb^{II}, Cd^{II}, Ag^I, and Hg^{II}

M. Carla Aragoni,[†] Massimiliano Arca,[†] Andrea Bencini,[‡] Silvia Biagini,[‡] Alexander J. Blake,[§] Claudia Caltagirone,[†] Francesco Demartin,^{||} Greta De Filippo,[†] Francesco A. Devillanova,[†] Alessandra Garau,[†] Karsten Gloe,[⊥] Francesco Isaia,[†] Vito Lippolis,^{*,†} Barbara Valtancoli,[‡] and Marco Wenzel[⊥]

Dipartimento di Chimica Inorganica ed Analitica, Università degli Studi di Cagliari, S.S. 554 Bivio per Sestu, 09042 Monserrato (CA), Italy, Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy, School of Chemistry, The University of Nottingham, University Park, NG7 2RD Nottingham, U.K., Dipartimento di Chimica Strutturale e Stereochimica Inorganica, Università di Milano, Via G. Venezian 21, 20133 Milano, Italy, and TU Dresden, Department of Chemistry, D-01062 Dresden, Germany

Received March 27, 2008

Two new mixed aza-thia crowns 5-aza-2,8-dithia[9]-(2,9)-1,10-phenanthrolinephane (**L**⁴) and 2,8-diaza-5-thia[9]-(2,9)-1,10-phenanthrolinephane (**L**⁷) have been synthesized and characterized. The coordination behavior of **L**⁴ and **L**⁷ toward the metal ions Cu^{II}, Zn^{II}, Pb^{II}, Cd^{II}, Hg^{II}, and Ag^I was studied in aqueous solution by potentiometric methods, in CD₃CN/D₂O 4:1 (v/v) by ¹H NMR titrations and in the solid state. The data obtained were compared with those available for the coordination behavior toward the same metal ions of structurally analogous mixed donor macrocyclic ligands **L**¹–**L**³, **L**⁵, **L**⁶: all these contain a phenanthroline subunit but have only S/O/N(aromatic) donor groups in the remaining portion of the ring and are, therefore, less water-soluble than **L**⁴ and **L**⁷. The complexes [Cd(NO₃)₂(**L**⁵)], [Pb(**L**⁷)](ClO₄)₂ · 1/2 MeCN, [Pb(**L**⁴)](ClO₄)₂ · MeCN, and [Cu(**L**⁷)](ClO₄)₂ · 3/2 MeNO₂ were characterized by X-ray crystallography. The efficacy of **L**¹–**L**⁷ in competitive liquid–liquid metal ion extraction of Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II}, Pb^{II}, Ag^I, and Hg^{II} was assessed. In the absence of Hg^{II}, a clear extraction selectivity for Ag^I was observed in all systems investigated.

Introduction

Following the pioneering work of the 1987 Nobel Prize winners C. J. Pedersen, D. J. Cram, and J.-M. Lehn, macrocyclic chemistry has developed into one of the most active areas of chemical science with implications for a wide variety of fields: the development of some fundamental aspects of “Supramolecular Chemistry” such as “molecular recognition”, “host-guest interactions”, and the design of sensors and smart artificial “molecular devices” is intimately

linked to the study of macrocyclic chemistry.^{1–4} Increasingly sophisticated macrocyclic systems differing in molecular shape, architecture, flexibility, arrangement of structural groups, binding sites, and reactive functions continue to be designed and synthesized with the aim of achieving control over the strength, selectivity, and dynamics of the binding processes between the macrocyclic ligands and a variety of cationic, anionic, neutral, organic, and inorganic substrates.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: lippolis@unica.it. Phone: +39 0706754467. Fax: +39 0706754456.

[†] Università degli Studi di Cagliari.

[‡] Università degli Studi di Firenze.

[§] The University of Nottingham.

^{||} Università di Milano.

[⊥] TU Dresden.

(1) *Macrocyclic Chemistry, Current Trends and Future Perspectives*; Gloe, K., Ed.; Springer: New York, 2005; ISBN 1–4020–3364–8.

(2) *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *148*, 201; **2001**, 222; and **2000**, 205; Theme Issue: “Macrocyclic Chemistry”, “Metallo-supramolecular Chemistry”, and “Luminescent Sensors” respectively.

(3) *Molecular Devices and Machines, A Journey into the Nanoworld*; Balzani, V., Credi, A., Venturi, M., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003; ISBN 3–527–30506–8.

(4) *J. Mat. Chem.* **2005**, *15*; Theme Issue: “Fluorescent Sensors”.

In particular, the design of novel macrocyclic chemical structures capable of specific and effective molecular recognition of metal ions is of vital importance to broad areas of analytical chemistry and separation science,⁵ and many macrocyclic systems have been employed as selective extractants/ionophores for transition and post-transition metal ions in a range of solvent extraction and bulk membrane transport studies.

When the substrates are metal ions, the most obvious and common parameter to evaluate recognition is the thermodynamic stability (formation constant) of metal ion complexes: this parameter mainly depends on the geometry of the ligand, the binding sites that it contains, and on the nature and stereoelectronic preferences of the metal ion. In the case of macrocyclic ligands, size complementarity between the metal ion and the ring cavity of the ligand is also an operational criterion to predict and evaluate preferential binding and recognition. One consideration has been fundamental to the development of macrocyclic chemistry: it is possible to confer on the appropriate macrocyclic ligand the potential for a very high degree of “host-guest” interaction

with the target substrate, either by changing the “hard-soft” nature and disposition of the binding sites or by modifying the flexibility of the macrocycle.

For example, because of the specific complexing abilities of crown ethers toward hard Group I and II metal ions, these ligands have been used as neutral carriers for the construction of PVC-based ion selective electrodes (ISEs) for alkali and alkaline earth metal cations and for performing selective separations.^{5–7} On the other hand, thioether macrocycles have come to great prominence in the past decade because of their selective coordination properties toward soft transition metal ions, and coinage metals in particular,^{8,9} and numerous analytical applications have appeared.^{5,10–13} In between these two classes of compounds, many mixed-donor host macrocyclic chemical structures, also featuring rigid subunits in the chelating ring, have been designed and synthesized for a variety of guest compounds, and successfully used for analytical, sensing and separation purposes.^{1–5,14–38}

In this context we have been engaged for the past decade in the development of a new class of mixed N/O/S-donor macrocycles featuring a phenanthroline (phen) subunit as an integral part of the macrocyclic structure (Figure 1). Our initial aim was to combine the physicochemical and coordinating properties of phen with those of aliphatic thioether crowns and to test the potential of these cyclic phenanthroline derivatives as efficient complexing agents and selective extractants for environmental and industrial important “soft” metal ions and as fluorescent sensors for their detection in solution. In previous papers we reported on the coordination chemistry of this type of macrocycles toward Ni^{II}, Pd^{II}, Pt^{II}, Rh^{III}, Ru^{II} (L¹, L²),^{39–41} Pb^{II}, Cd^{II}, Hg^{II}, Cu^{II} (L¹-L³),^{42–44} and Ag^I (L¹-L³, L⁵)⁴⁵ in solution (MeCN, EtOH) and/or in the solid state. We documented the ability of these macro-

- (5) *Macrocyclic Compounds in Analytical Chemistry*; Zolotov, Y. A., Ed.; Wiley & Sons: New York, 1997; ISBN 0-471-17262-6.
- (6) Izatt, R. M.; Clark, G. A.; Bradshaw, J. S.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J. *Sep. Purif. Methods* **1986**, *15*, 21.
- (7) Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1593.
- (8) Blake, A. J.; Schröder, M. *Adv. Inorg. Chem.* **1990**, *35*, 1.
- (9) Reid, G.; Schröder, M. *Chem. Soc., Rev.* **1990**, *19*, 239.
- (10) Saito, K.; Taninaka, I.; Muratami, S.; Muramatsu, A. *Talanta* **1998**, *46*, 1187.
- (11) Shamsipur, M.; Mashhadizadeh, M. H. *Sep. Purif. Technol.* **2000**, *20*, 147.
- (12) Mashhadizadeh, M. H.; Shamsipur, M. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *381*, 111.
- (13) Gupta, V. K.; Jain, S.; Khurana, U. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 478.
- (14) *The Chemistry of Macrocyclic Ligands Complexes*; Lindoy, L. F., Ed.; Cambridge University Press: New York, 1986; ISBN 0-521-25261-X.
- (15) Casabò, J.; Teixidor, F.; Escriche, L.; Viqas, C.; Pérez-Jiménez, C. *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 238.
- (16) Tamayo, A.; Lodeiro, C.; Escriche, L.; Casabò, J.; Covelo, B.; Gonzalez, P. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8105.
- (17) Blake, A. J.; Bencini, A.; Caltagirone, C.; De Filippo, G.; Dolci, L. S.; Garau, A.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Mariani, P.; Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccaroni, N.; Wilson, C. *Dalton Trans.* **2004**, 2771.
- (18) Shamsipur, M.; Poursaberi, T.; Rezapour, M.; Ganjali, M. R.; Mousavi, M. F.; Lippolis, V.; Montesu, D. R. *Electroanal.* **2004**, *16*, 1336.
- (19) Shamsipur, M.; Hosseini, M.; Alizadeh, K.; Alizadeh, N.; Yari, A.; Caltagirone, C.; Lippolis, V. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *533*, 17.
- (20) Ishikawa, J.; Sakamoto, H.; Mizuno, T.; Otomo, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 3071.
- (21) Masuda, Y.; Zhang, Y.; Yan, C.; Li, B. *Talanta* **1998**, *46*, 203.
- (22) Siswanta, D.; Nagtsuka, K.; Yamada, H.; Kumakura, K.; Hisamoto, H.; Sichi, K.; Toshima, K.; Suzuki, K. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4166.
- (23) Casabò, J.; Escriche, L.; Alegret, S.; Jaime, C.; Pérez-Jiménez, C.; Mestres, L.; Rijs, J.; Molins, E.; Miravittles, C.; Teixidor, F. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 1893.
- (24) Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 1327.
- (25) Sugihara, H.; Hiratani, K. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *148*, 285.
- (26) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 941.
- (27) Bencini, A.; Bernardo, M. A.; Bianchi, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Pina, F.; Valtancoli, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, *11*, 1911.
- (28) Bang, K. S.; Nielsen, M. B.; Zubarev, R.; Becher, J. *Chem. Commun.* **2000**, 215.
- (29) Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Masotti, A.; Paoletti, P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7686.
- (30) Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Valtancoli, B. *J. Inclusion Phenom.* **2001**, *41*, 87.
- (31) Pugliesi, A.; Tenaglia, M.; Annunziata, R.; Bologna, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2947.
- (32) Bencini, A.; Berni, E.; Bianchi, A.; Fornasari, P.; Giorgi, C.; Lima, J. C.; Lodeiro, C.; Melo, M. J.; de Melo, J. S.; Parola, A. J.; Pina, F.; Pina, J.; Valtancoli, B. *Dalton Trans.* **2004**, 1934.
- (33) Bencini, A.; Bianchi, A.; Lodeiro, C.; Masotti, A.; Parola, A. J.; Pina, F.; de Melo, J. S.; Valtancoli, B. *Chem. Commun.* **2000**, 1639.
- (34) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Masotti, A.; Valtancoli, B.; Roque, A.; Pina, F. *Chem. Commun.* **2000**, 561.
- (35) Glenney, M. W.; Lacombe, M.; Love, J. B.; Blake, A. J.; Lindoy, L. F.; Luckay, R. C.; Gloe, K.; Antoniolli, B.; Wilson, C.; Schröder, M. *New J. Chem.* **2006**, *12*, 1755.
- (36) Vasilescu, I. M.; Bray, D. J.; Clegg, J. K.; Lindoy, L. F.; Meehan, G. V.; Wei, G. *Dalton Trans.* **2006**, 5115.
- (37) Price, J. R.; Fainerman-Melnikova, M.; Fenton, R. R.; Gloe, K.; Lindoy, L. F.; Rambusch, T.; Skelton, B. W.; Turner, P.; White, A. H.; Wichmann, K. *Dalton Trans.* **2004**, 3715.
- (38) Gasperov, V.; Galbraith, S. G.; Lindoy, L. F.; Rumbel, B. R.; Skelton, B. W.; Tasker, P. A.; White, A. H. *Dalton Trans.* **2005**, 139.
- (39) Arca, M.; Blake, A. J.; Casabò, J.; Demartin, F.; Devillanova, F. A.; Garau, A.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Kivekas, R.; Muns, V.; Schröder, M.; Verani, G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 1180; and refs therein.
- (40) Blake, A. J.; Devillanova, F. A.; Garau, A.; Harrison, A.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Tiwary, S. K.; Schröder, M.; Verani, G.; Whittaker, G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 4389; and refs therein.
- (41) Blake, A. J.; Caçote, M. H. M.; Devillanova, F. A.; Garau, A.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Pereira, C. M.; Silva, F.; Tei, L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 1816.
- (42) Aragoni, M. C.; Arca, M.; Demartin, F.; Devillanova, F. A.; Isaia, F.; Garau, A.; Lippolis, V.; Jalali, F.; Papke, U.; Shamsipur, M.; Tei, L.; Yari, A.; Verani, G. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 6623.
- (43) Ferreira, E. S.; Garau, A.; Lippolis, V.; Pereira, C. M.; Silva, F. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *587*, 155.

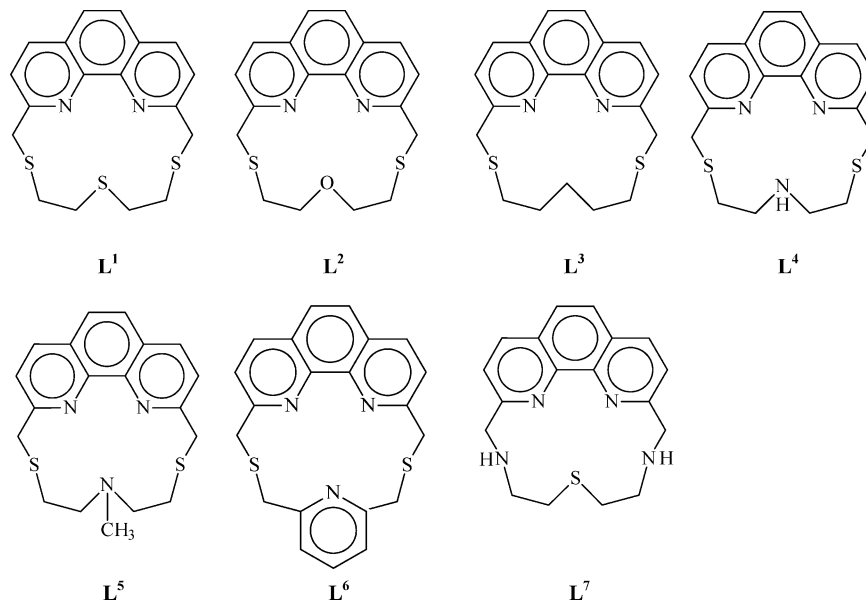


Figure 1. Summary of Ligands.

cyclic ligands to behave as selective ionophores for target guest metal ion species, which is strongly determined by the medium in which the “host-guest” interaction takes place (solution or bulky organic membranes).

For example, solution studies in MeCN demonstrated the inability of these ligands (in particular L^1 – L^3) to work as selective and specific fluorescent chemosensors for heavy transition and post-transition metal ions (Pb^{II} , Cd^{II} , Hg^{II}),⁴² and the formation constants evaluated for the 1:1 complexes between L^1 – L^3 , L^5 and Pb^{II} , Cd^{II} , Hg^{II} , Cu^{II} , and Ag^I in MeCN are of the same order of magnitude.^{42–45} Nevertheless, and despite the undifferentiated affinity of these ligands for the metal ions considered, some of them are extremely sensitive to the presence of Cu^{II} (L^1)⁴⁶ or Ag^I (L^2 , L^3 , L^5)^{47–51} in the presence of other metal ions in transport processes across organic membranes. For example, L^1 and L^3 have been successfully used as neutral ionophores in the construction of PVC-based ion-selective electrodes (ISEs) for analytical detection and separation of Cu^{II} and Ag^I , respectively. Following these studies, here we report the synthesis and the coordination properties toward Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , Pb^{II} , Hg^{II} , and Ag^I in aqueous solution and in the solid state of two new members of this family of macrocyclic ligands, namely L^4 and L^7 , both characterized by secondary amino groups

in the aliphatic portion of the ring. These two ligands have been synthesized to expand the family of homologous macrocycles made by us to include more hydrophilic members. We also set out to compare all of them as ionophores for metal ions using a liquid–liquid extraction technique which has not previously been applied to this kind of macrocycles. Indeed, we report here on the efficacy of L^1 – L^7 in experiments involving competitive liquid–liquid solvent extraction of Cu^{II} , Zn^{II} , Pb^{II} , Cd^{II} , Hg^{II} , and Ag^I which were performed for Zn^{II} and Ag^I using a radiotracer technique.

Experimental Section

All melting points are uncorrected. Microanalytical data were obtained using a Fisons EA CHNS-O instrument ($T = 1000$ °C). ESI mass spectra were obtained on a MS spectrometer HP 5989A using the direct insertion probe (DIP). 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian VXR300 or a Varian VXR400 spectrometer, and peak positions are reported relative to TMS. The IR spectrum of the complex $[Cd(NO_3)_2(L^5)]$, required by one Referee, was recorded on a NICOLET 5700 FT-IR spectrophotometer. DMF was dried over $MgSO_4$ and freshly distilled under reduced pressure. 2,9-Bis(chloromethyl)-1,10-phenanthroline (**1**),⁵² *N*-*t*-butoxycarbonyl-bis(3-thioethyl)amine (**2**),⁵³ *N,N'*-bis(*p*-tolylsulphonyl)bis(2-aminoethyl)sulfide-*N,N'*-disodium salt (**3**),⁵⁴ L^1 – L^3 ,^{39,42} L^5 ,⁴⁴ and L^6 were prepared according to the reported procedures.⁵⁵ Other solvents and starting materials were purchased from commercial sources where available. **Caution!** Most of the reported metal complexes were isolated in the solid state as perchlorate salts. We have worked extensively with these complexes on a small scale without any incident. Despite these observations,

- (44) Arca, M.; Azimi, G.; Demartin, F.; Devillanova, F. A.; Escriche, L.; Garau, A.; Isaia, F.; Kivekas, R.; Lippolis, V.; Muns, V.; Perra, A.; Shamsipur, M.; Sportelli, L.; Yari, A. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, 238, 2403.
- (45) De Filippo, G.; Demartin, F.; Garau, A.; Lippolis, V.; Yari, A.; Shokrollahi, A.; Shamsipur, M. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, 358, 801.
- (46) Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Mousavi, M. F.; Ganjali, M. R.; Lippolis, V.; Garau, A.; Tei, L. *Talanta* **2001**, 55, 1047.
- (47) Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Ghasemi, Z.; Ganjali, M. R.; Lippolis, V.; Garau, A. *Sep. Purif. Technol.* **2002**, 28, 141.
- (48) Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Lippolis, V.; Garau, A.; De Filippo, G.; Ganjali, M. R.; Yari, A. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 462, 225.
- (49) Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Ganjali, M. R.; Mousavi, M. F.; Lippolis, V.; Garau, A. *Electroanalysis* **2002**, 14, 1691.
- (50) Shamsipur, M.; Kazemi, S. Y.; Azimi, G.; Madaeni, S. S.; Lippolis, V.; Garau, A.; Isaia, F. *J. Membr. Sci.* **2003**, 215, 87.
- (51) Shamsipur, M.; Hashemi, O. R.; Lippolis, V. *J. Membr. Sci.* **2006**, 282, 322.

- (52) Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, 18, 599.
- (53) Chartres, J. D.; Groth, A. M.; Lindoy, L. F.; Lowe, M. P.; Meehan, G. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3444.
- (54) Hart, S. M.; Boeyens, J. C. A.; Michael, J. P.; Hancock, R. D. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1983**, 1601.
- (55) Shamsipur, M.; Hosseini, M.; Alizadeh, K.; Mousavi, M. F.; Garau, A.; Lippolis, V.; Yari, A. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 276.

the unpredictable behavior of perchlorate salts necessitates extreme care in handling.

Synthesis of *N*-*t*-butoxycarbonyl 5-Aza-2,8-dithia[9]-(2,9)-1,10-phenanthroline (4). A solution of 2,9-bis(chloromethyl)-1,10-phenanthroline (**1**) (0.58 g, 2.09 mmol) and *N*-*t*-butoxycarbonyl-bis(3-thioethyl)amine (**2**) (0.49 g, 2.06 mmol) in 50 mL of dry dimethylformamide (DMF) was added under N₂ over a period of 15 h to a stirred suspension of Cs₂CO₃ (1.30 g, 3.99 mmol) in 180 mL of dry DMF at 55 °C. The resultant mixture was stirred at this temperature for a further 24 h and then for another 24 h at room temperature. The DMF was removed under reduced pressure, the residue taken up in CH₂Cl₂ (100 mL), and the organic extract washed with water, dried, and concentrated under vacuum. The resulting brown residue was purified by flash-chromatography on silica gel using a mixture of CH₂Cl₂-CH₃OH (9.5:0.5 v/v ratio) as eluent to give 0.45 g (49% yield) of **4** as a pale white product. Mp 148–150 °C. Elem. Anal. found. (calcd for C₂₃H₂₇N₃O₂S₂): C, 62.3 (62.6); H, 6.5 (6.2); N, 9.4 (9.5); S, 14.5 (14.5)%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 1.42 (s, 9H), 2.69–2.74 (m, 4H), 3.41–3.51 (m, 4H), 4.19 (s, 4H), 7.75 (d, 2H, *J* = 8.4), 7.85 (s, 2H), 8.43 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ 27.31, 28.41, 36.51, 47.93, 80.18, 122.91, 127.03, 128.68, 137.79, 145.43, 155.24, 157.23.

Synthesis of 5-Aza-2,8-dithia[9]-(2,9)-1,10-phenanthroline (L⁴). Trifluoroacetic acid (20 mL) was added to a solution of *N*-*t*-butoxycarbonyl 5-aza-2,8-dithia[9]-(2,9)-1,10-phenanthroline (**4**) (0.67 g, 1.52 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL), and the resulting solution was stirred at room temperature under N₂ for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue taken up in water. The pH value was adjusted to 14 by adding 6 M NaOH and the product extracted into CH₂Cl₂. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give a white solid (0.35, 67% yield). Mp. 138 °C. Elem. Anal. found. (calcd for C₁₈H₁₉N₃S₂): C, 63.2 (63.3); H, 5.8 (5.6); N, 12.0 (12.3); S, 18.9 (18.8)%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.97 (s, 1H, CH₂NHCH₂), 2.68–2.73 (m, 4H, SCH₂CH₂N), 3.26–3.34 (m, 4H, SCH₂CH₂N), 4.17 (s, 4H, ArCH₂S), 7.57 (d, 2H, *J* = 8.4), 7.76 (s, 2H), 8.22 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 27.60 (SCH₂CH₂N), 36.16 (ArCH₂S), 47.10 (SCH₂CH₂N), 123.12, 126.03, 127.73, 137.70, 144.43, 157.59 (aromatic carbons). MS (ESI): *m/z* 341 ([C₁₈H₁₉N₃S₂]⁺).

Synthesis of 2,8-Bis(p-tolylsulphonyl)-2,8-diaza-5-thia[9]-(2,9)-1,10-phenanthroline (5). A solution of 2,9-bis(chloromethyl)-1,10-phenanthroline (**1**) (1.45 g, 5.2 mmol) in 50 mL of dry DMF was added under N₂ over a period of 5 h to a stirred suspension of *N,N'*-bis(p-tolylsulphonyl)bis(2-aminoethyl)sulfide-*N,N'*-disodium salt (**3**) (2.45 g, 5.2 mmol) in 100 mL of dry DMF heated to 105 °C. The resultant solution was stirred at this temperature for a further 24 h, cooled, and volume reduced to 50 mL. The mixture was poured into ice water, and the resulting precipitate collected by filtration and dissolved in CHCl₃ (100 mL). The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and reduced under vacuum to give a yellow solid which was recrystallized from CHCl₃-MeOH to give **5** as light yellow solid (2.47 g, 75% yield). Mp. 180 °C with decomposition. Elem. Anal. found. (calcd for C₃₂H₃₂N₄O₄S₃): C, 60.4 (60.7); H, 4.9 (5.1); N, 9.0 (8.9); S, 14.8 (15.2)%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.42 (s, 6H), 2.85–2.93 (m, 4H), 3.44–3.52 (m, 4H), 4.77 (s, 4H), 7.30 (d, 4H, *J* = 8.0), 7.69–7.76 (m, 6H), 7.82 (s, 2H), 8.26 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 21.47, 30.78, 49.79, 53.86, 123.79, 126.49, 126.94, 128.0, 129.82, 137.01, 137.40, 143.47, 144.87, 156.15.

Synthesis of 2,8-Diaza-5-thia[9]-(2,9)-1,10-phenanthroline (L⁷). 2,8-Bis(p-tolylsulphonyl)-2,8-diaza-5-thia[9]-(2,9)-1,10-phenanthroline (**5**) (2.3 g, 3.6 mmol) was added to a solution of HBr in acetic acid (33%, 87 mL) and phenol (5.8 g, 61 mmol), and the solution was stirred at 75 °C for 48 h. A further portion of HBr in acetic acid (33%, 44 mL) was added, and the mixture stirred at 75 °C for a further 24 h. The reaction mixture was cooled, toluene was added, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken up in CH₂Cl₂ (60 mL) and water (60 mL). The aqueous layer was separated, washed three times with CH₂Cl₂, and reduced under vacuum to a volume of about 5 mL. The solid obtained was recrystallized from EtOH-diethyl ether (3:1, v:v) and a white solid of formula L⁷·3HBr·H₂O was obtained (1.0 g, 48% yield). This solid was taken up in water, the pH of the solution adjusted to 11 by adding 6 M KOH, and the product extracted into CHCl₃. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give a white solid (0.35 g, 64% yield). Mp. 125 °C. Elem. Anal. found. (calcd for C₁₈H₂₀N₄S): C, 66.3 (66.6); H, 6.2 (6.2); N, 16.9 (17.3); S, 9.6 (9.9)%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.05 (t, 4H, *J* = 6.4 Hz, NCH₂CH₂S), 3.49 (t, 4H, *J* = 6.4 Hz, NCH₂CH₂S), 4.64 (s, 4H, ArCH₂N), 7.47 (s, 2H), 7.50 (d, 2H, *J* = 8.4), 8.10 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 29.92 (NCH₂CH₂S), 47.42 (NCH₂CH₂S), 50.98 (Ar-CH₂N), 122.40, 126.40, 128.08, 138.20, 143.15, 151.24 (aromatic carbons). MS (ESI): *m/z* 324 ([C₁₈H₂₀N₄S]⁺).

Synthesis of Metal Complexes. 1:1 metal complexes of L⁴ and L⁷ with Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II}, Pb^{II}, Hg^{II}, and Ag^I have been synthesized by following a standard procedure which involves the mixing of the appropriate metal salt and the ligand (L⁴ or L⁷) in 1:1 molar ratio in MeCN or MeOH and the isolation of the product as crystals or powder from the reaction mixture stirred for a few hours at room temperature, or under reflux, by diffusion of vapors of Et₂O or evaporation of the solvent. Synthetic details including analytical data for the isolated complexes have been deposited as Supporting Information. As representative examples, the full synthetic procedures for the preparation of [Pb(L⁴)](ClO₄)₂·MeCN, [Cd(NO₃)₂(L⁵)], [Cu(L⁷)](ClO₄)₂·³/₂MeNO₂, [Pb(L⁷)](ClO₄)₂·¹/₂MeCN, which were also characterized by X-ray diffraction analysis, are reported below.

Synthesis of [Pb(L⁴)](ClO₄)₂·MeCN. A solution of Pb(ClO₄)₂·3H₂O (0.027 g, 0.059 mmol) in MeCN was added to a solution of L⁴ (0.020 g, 0.059 mmol) in MeCN (10 mL). The solution was stirred at room temperature under N₂ for 3 h. Colorless crystals were obtained by diffusion of Et₂O vapor into the reaction mixture (0.035 g, yield 74%). Elem. Anal. found (calc for C₂₀H₂₂Cl₂N₄O₈PbS₂): C, 30.8 (30.5); H, 2.5 (2.8); N, 6.8 (7.1); S, 7.9 (8.1)%. ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 2.52–2.62 (m, 2H), 2.89–3.11 (m, 4H), 3.31–3.38 (m, 2H), 4.65 (d, 2H, *J* = 17.6 Hz), 4.81 (d, 2H, *J* = 18.8 Hz), 8.10 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 8.22 (s, 2H), 8.84 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz). Electronic spectrum (MeCN): λ/nm (ε/M⁻¹ cm⁻¹): 206 (44360), 232 (36100), 273 (20760), 301sh (9930).

Synthesis of [Cd(NO₃)₂(L⁵)]. A solution of Cd(NO₃)₂·4H₂O (0.016 g, 0.052 mmol) in MeCN was added to a solution of L⁵ (0.020 g, 0.056 mmol) in MeCN (10 mL). The solution was stirred at room temperature under N₂ for 3 h. The white solid obtained was dissolved in MeNO₂ and light yellow crystals were obtained by diffusion of Et₂O vapor into the solution (0.015 g, yield 45%). Elem. Anal. found (calcd for C₁₉H₂₁CdN₅O₆S₂): C, 38.7 (38.6); H, 3.8 (3.6); N, 11.6 (11.8); S, 10.5 (10.8)%. ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 1.49 (s, 3H, -CH₃), 2.44–2.55 (m, 4H), 2.72–2.79 (m, 2H), 2.87–2.98 (m, 2H), 4.49 (d, 2H, *J* = 18.4 Hz), 4.76 (d, 2H,

$J = 18.0$ Hz), 8.06 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 8.26 (s, 2H), 8.81 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz). Electronic spectrum (MeCN): λ/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 206 (37860), 232 (35460), 277 (22550), 297 sh (10020). IR spectrum (KBr disk): 3059w, 3014w, 2954w, 2913w, 2878w, 1616m, 1593s, 1533m, 1497s, 1384s, 1304s, 1206m, 1170m, 1105m, 1079m, 1037m, 986m, 892s, 856m, 816w, 786m, 721m cm^{-1} .

Synthesis of $[\text{Cu}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3/2 \text{MeNO}_2$. A solution of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.018 g, 0.060 mmol) in EtOH was added to a solution of L^7 (0.020 g, 0.062 mmol) in EtOH (10 mL). The solution was stirred at room temperature under N_2 for 1 h. The light blue solid obtained was dissolved in MeNO_2 , and blue crystals were obtained by diffusion of Et_2O vapor into the solution (0.025 g, yield 59%). Elem. Anal. found (calcd for $\text{C}_{19.5}\text{H}_{24.5}\text{Cl}_2\text{CuN}_{5.5}\text{O}_{11}\text{S}$): C, 34.8 (34.5); H, 3.4 (3.6); N, 11.3 (11.4); S, 5.0 (4.7)%. Electronic spectrum (MeCN): λ/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 214 (25420), 227sh (22130), 271 (18650), 299sh (7870), 605 (72.9).

Synthesis of $[\text{Pb}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 1/2 \text{MeCN}$. $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.028 g, 0.061 mmol) in MeOH was added to a solution of L^7 (0.020 g, 0.062 mmol) in MeOH (10 mL). The solution was stirred at reflux under N_2 for 2 h. The white solid obtained was dissolved in MeCN and colorless crystals were obtained by slow evaporation at room temperature (0.039 g, yield 83%). Elem. Anal. found (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{21.5}\text{Cl}_2\text{N}_{4.5}\text{O}_8\text{PbS}$): C, 30.5 (30.4); H, 2.7 (2.9); N, 8.1 (8.4); S, 4.1 (4.3)%. ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ 3.03–3.11 (m, 2H), 3.60–3.66 (m, 2H), 3.76–3.81 (m, 2H), 4.21–4.27 (m, 2H), 4.72–4.88 (m, 4H), 8.09 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 8.23 (s, 2H), 8.83 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz). Electronic spectrum (MeCN): λ/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 205 (37460), 232 (32140), 280 (21210), 300sh (9710).

Potentiometric Measurements. All pH measurements ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$) employed for the determination of ligand protonation and metal complex stability constants were generally carried out in degassed 0.1 M NMe_4NO_3 aqueous solution at 298.1 ± 0.1 K by means of conventional titration experiments under an inert atmosphere to avoid carbonation of solutions during titration.²⁶ In the case of Hg^{II} complexation, potentiometric measurements were also performed in degassed 0.1 M NMe_4Cl aqueous solutions at 298.1 ± 0.1 K. The combined Ingold 405 S7/120 electrode was calibrated as a hydrogen concentration probe by titrating known amounts of HCl with CO_2 -free NMe_4OH solutions and determining the equivalent point by Gran's method⁵⁶ which allows one to determine the standard potential E° and the ionic product of water [$\text{p}K_w = 13.83(1)$ and $13.73(1)$ at 298.1 ± 0.1 K in 0.1 M NMe_4NO_3 and 0.1 M NMe_4Cl , respectively]. At least three measurements (with about 100 data points for each) were performed for each system over the pH range 2.0–11.0. In all experiments the ligand concentration $[\text{L}]$ was about 1×10^{-3} M. In the complexation experiments the metal ion concentration was $[\text{M}^{\text{II}}] = 0.8[\text{L}]$ ($\text{L} = \text{L}^4, \text{L}^7$). The computer program HYPERQUAD⁵⁷ was used to calculate the equilibrium constants from e.m.f. data. For the determination of the stability constants of the Hg^{II} complexes, the stability of the Hg^{II} complexes with chloride were taken from ref 58.

^1H NMR Titrations. ^1H NMR titrations were carried out by addition of increasing amounts of perchlorate or nitrate salts of the different metals to a 1×10^{-3} M solution of the ligands in a $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ 4:1 (v/v) mixture at $\text{pD} = 7.0$ and 25°C . The pD of the solutions was adjusted to 7.0 by the additions of small volumes of 0.01 M DCl or NaOD. Peak positions are reported relative to TMS.

Liquid–Liquid-Extraction. The liquid–liquid extraction experiments were performed at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ in microcentrifuge tubes (2 mL) by means of mechanical overhead shaking. The phase ratio $V_{(\text{org})}/V_{(\text{w})}$ (500 μL each) was 1:1. In general a shaking time of 30 min was chosen, because the equilibrium was reached in this period. In the aqueous phase the initial metal ion concentration was 1×10^{-4} M. To keep the ionic strength constant NaClO_4 was added in concentration of 5×10^{-3} M. The pH of the aqueous solution was adjusted using citric acid/NaOH and 4-morpholinoethanesulfonic acid (MES)/NaOH buffer solution. The equilibrium pH was measured by using an InLab micro pH electrode. CHCl_3 was used as organic phase, and a ligand concentration of 1×10^{-3} M was used. In the competitive Ag^{I} extraction experiments with various metal ions a ligand concentration of 1×10^{-4} M was used. After the extraction, all samples were centrifuged, and the phases separated. The distribution of Ag^{I} and Zn^{II} was detected in both phases radiometrically by γ -radiation of $^{110\text{m}}\text{Ag}$ and ^{65}Zn in a NaI (TI) scintillation counter (Cobra II/Canberra-Packard). The concentrations of Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , Pb^{II} , and Hg^{II} in the single and multielement experiments were detected only by determination of the metal content in the water phase using the ICP-OES technique (ICP-OES-Optima 4300DV, Perkin-Elmer).

The easily accessible experimental parameter in liquid–liquid extraction systems are the distribution ratio (D_M), the quotient of the metal concentrations in the organic and aqueous phase, or the percentage extraction ($E\%$): $D_M = C_{\text{M}(\text{org})}/C_{\text{M}(\text{w})}$; $E[\%] = 100 \times D_M/(D_M + 1)$, respectively.⁵⁹

Crystallography. A summary of the crystal data and refinement details for the compounds discussed in this paper is given in Table 1. Only special features of the analyses are mentioned here. The single-crystal data for $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{L}^5)]$, $[\text{Pb}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 1/2 \text{MeCN}$, $[\text{Pb}(\text{L}^4)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{MeCN}$, and $[\text{Cu}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3/2 \text{MeNO}_2$ were collected at room temperature on a Bruker SMART CCD diffractometer using graphite-monochromated Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) via ω scans. Data sets were corrected for Lorentz-polarization effects and for absorption (Table 1). All structures were solved by direct methods using SHELXS 97⁶¹ and completed by iterative cycles of full-matrix least-squares refinement and ΔF synthesis using SHELXL 97.⁶² All non-H atoms were refined anisotropically. All H atoms were placed in calculated positions and refined using a riding model. The acetonitrile molecule in $[\text{Pb}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 1/2 \text{MeCN}$ was found to be disordered about a 2-fold axis. A structural model with this molecule ordered could be achieved by refining the structure in the space group $P\bar{1}$, corresponding to the primitive cell with $a = 12.772(1)$, $b = 12.794(1)$, $c = 15.243(2)$ Å, $\alpha = 83.37(1)$, $\beta = 83.99(1)$, $\gamma = 87.32(1)^\circ$ and containing two independent $[\text{Pb}(\text{L}^7)]^{2+}$ cations and four independent ClO_4^- anions in the asymmetric unit. However, because most of the structure conforms to the space group $C2/c$, the only exception being the acetonitrile molecule, the description in this setting was preferred, in view of a more favorable observation/parameters ratio. The structure of $[\text{Pb}(\text{L}^4)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{MeCN}$ was affected by non-merohedral twinning which was treated by producing a SHELXL

(56) Gran, G. *Analyst (London)* **1952**, *77*, 661.

(57) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 807.

(58) Smith, R. M.; Martell, A. M. *NIST Stability Constants Database*, version 4.0; National Institute of Standards and Technology: Washington, DC, 1997.

(59) Stephan, H.; Juran, S.; Antonioli, B.; Gloe, K. In *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* Schalley, Ch., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006; pp 79–103; ISBN 3-527-31505-5.

(60) *SADABS, Area-Detector Absorption Correction Program*; Bruker AXS, Inc.: Madison, WI, 2003.

(61) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr. Sect. A* **1990**, *46*, 467; *SHELXS* 86–97.

(62) Sheldrick, G. M. *SHELXL 97*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1998.

Table 1. Crystallographic Data for [Cd(NO₃)₂(L⁵)], [Pb(L⁴)](ClO₄)₂·MeCN, [Pb(L⁷)](ClO₄)₂·¹/₂MeCN, and [Cu(L⁷)](ClO₄)₂·³/₂MeNO₂

	[Cd(NO ₃) ₂ (L ⁵)]	[Pb(L ⁴)](ClO ₄) ₂ ·MeCN	[Pb(L ⁷)](ClO ₄) ₂ · ¹ / ₂ MeCN	[Cu(L ⁷)](ClO ₄) ₂ · ³ / ₂ MeNO ₂
formula	C ₁₉ H ₂₁ CdN ₅ O ₆ S ₂	C ₂₀ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O ₈ PbS ₂	C ₃₈ H ₄₃ Cl ₄ N ₉ O ₁₆ Pb ₂ S ₂	C ₃₉ H ₄₉ Cl ₄ Cu ₂ N ₁₁ O ₂₂ S ₂
crystal system	trigonal	triclinic	monoclinic	monoclinic
space group	R $\bar{3}$ (No. 148)	P $\bar{1}$ (No. 1)	C2/c (No. 15)	P2 ₁ /n (No. 14)
M.W.	591.93	788.63	1502.11	1356.89
a /Å	41.363(8)	11.353(2)	18.496(2)	15.423(3)
b /Å	41.363(8)	15.405(2)	17.650(2)	10.812(2)
c /Å	8.056(2)	15.708(3)	15.243(2)	32.708(7)
α /deg	90.00	67.219(2)	90.00	90.00
β /deg	90.00	89.697(2)	98.75(1)	99.080(10)
γ /deg	120.00	87.778(2)	90.00	90.00
V /Å ³	11936(4)	2530.9(7)	4918.2(1)	5385.8(18)
Z	18	4	4	4
T /K	294(2)	150(2)	294(2)	294(2)
D _c /g cm ⁻³	1.482	2.070	2.029	1.668
μ/mm ⁻¹	1.021	7.097	7.217	1.154
unique reflections, R _{int}	5227, 0.055	10763, 0.095	4872, 0.092	15696, 0.039
observed reflections [I > 2σ(I)]	4164	7639	2924	8867
absorption correction	SADABS ⁶⁰	SADABS ⁶⁰	SADABS ⁶⁰	SADABS ⁶⁰
T _{min} , T _{max}	0.807, 1.000	0.028, 1.000	0.511, 1.000	0.725, 1.000
R ₁	0.0869	0.0756	0.0588	0.0693
wR ₂ [all data]	0.249	0.242	0.097	0.224

HKLF 5 file: the twin law was (1 -0.064 0.017/0 -1 0/0 0 -1) and the twin fraction refined to 0.130(2). Perchlorate anions were seriously affected by disorder which was modeled using alternative atom sites and refined with distance, angle, and similarity restraints; oxygen atoms in the disordered perchlorate anions were refined isotropically. Similarity restraints were also applied between the two independent L⁴ molecules. One of the three MeNO₂ molecules in the asymmetric unit of [Cu(L⁷)](ClO₄)₂·³/₂MeNO₂ was found to exhibit disorder. The disorder was modeled without restraints (a model with restraints offering no advantage) by considering the carbon atom fully occupied and by splitting the nitrogen and oxygen atoms into two components and setting the occupancy of each disordered site to 0.5. No H atoms were placed on the carbon atom of the disordered MeNO₂ molecule.

Results and Discussion

Synthesis and Coordination Properties in Solution. The strategy adopted in the synthesis of L⁴ and L⁷ very much resembles that used for the preparation of L¹-L³ and L⁵ and L⁶ (Figure 2)^{39,42,44,55} A cyclization reaction performed under high dilution conditions between 2,9-bis(chloromethyl)-1,10-phenanthroline (1)⁵² and *N*-*t*-butoxycarbonyl-bis(3-thioethyl)amine (2, for L⁴),⁵³ or *N,N'*-bis(*p*-tolylsulfonyl)bis(2-aminoethyl)sulfide-*N,N'*-disodium salt (3, for L⁷),⁵⁴ in DMF, followed by deprotection of the secondary nitrogen atom(s), affords the required macrocyclic ligands, L⁴ and L⁷ with overall yields of 33 and 48%, respectively.

The key feature of these two ligands, in contrast to the others shown in Figure 1, is the presence of secondary nitrogen atoms in the macrocyclic framework: this renders the two compounds sufficiently soluble in water to allow a potentiometric study of their protonation and complexation to metal ions in this solvent. For L¹-L³ and L⁵ solution studies of their complexation properties toward Pb^{II}, Cd^{II}, Hg^{II}, Cu^{II}, and Ag^I using spectrophotometric, fluorimetric, and conductometric measurements were only possible in MeCN because of their insolubility in water (Supporting Information, Table S1).^{42,45} The formation of 1:1 metal complexes was observed for all combinations of ligand and metal ion considered, with stability constants of the same

order of magnitude.^{42,45} The formation of 1:2 metal-to-ligand complexes was only observed in solution with Pb^{II} (L³), Hg^{II} (L¹, L²), and Cd^{II} (L², L³), and the X-ray crystal structure of [Pb(L³)₂][ClO₄]₂·2MeCN was determined.⁴²

Ligand protonation and complex formation of L⁴ and L⁷ with Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II}, Pb^{II}, and Hg^{II} were investigated by means of potentiometric measurements in aqueous solutions (NMe₄NO₃ 0.1 M, 298.1 K) in the pH range 2.5–10.5 (Cu^{II} and Cd^{II} with L⁴, and Zn^{II}, Cd^{II} and Pb^{II} with L⁷) or 2.5–7.0 (Cu^{II} with L⁷). In this latter case, precipitation of hydroxo-

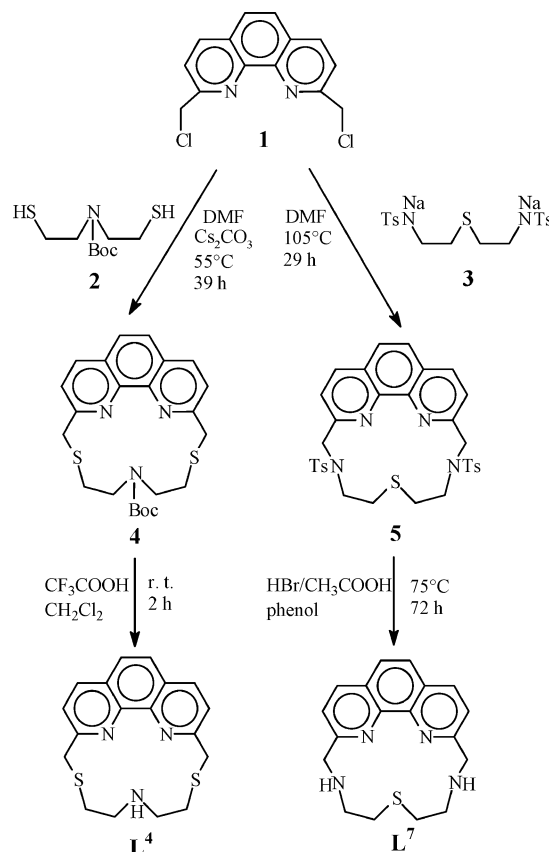


Figure 2. Reagents and experimental conditions for the synthesis of L⁴ and L⁷.

Table 2. Protonation Constants of **L**⁴ and **L**⁷ and Stability Constants of Their Metal Complexes in Water (NMe₄NO₃ 0.1 M or NMe₄Cl 0.1 M, 298.1 K)

reaction	log K					
	L ⁴		L ⁷			
$L + H^+ \rightleftharpoons (HL)^+$	8.3(1)					8.65(1)
$(HL)^+ + H^+ \rightleftharpoons (H_2L)^{2+}$	2.3(1)					7.34(1)
$(HL)^{2+} + H^+ \rightleftharpoons (H_3L)^{3+}$						1.94(2)

reaction	log K					
	Cu ^{IIa}	Zn ^{IIa}	Cd ^{IIa}	Pb ^{IIa}	Hg ^{IIa}	Hg ^{IIb}
$M^{2+} + L^4 \rightleftharpoons [M(L^4)]^{2+}$	10.9(1)	c	11.2(1)	c	> 15	21.3(1)
$[M(L^4)]^{2+} + OH^- \rightleftharpoons [M(L^4)(OH)]^+$	4.7(1)		3.54(1)			d
$M^{2+} + L^7 \rightleftharpoons [M(L^7)]^{2+}$	15.21(2)	11.09(1)	13.00(1)	13.46(1)	> 17	23.7(1)
$[M(L^7)]^{2+} + H^+ \rightleftharpoons [M(HL^7)]^{3+}$		3.76(2)				
$[M(L^7)]^{2+} + OH^- \rightleftharpoons [M(L^7)(OH)]^+$	d	4.66(3)	2.67(2)	3.07(1)		d

^a NMe₄NO₃ 0.1 M. ^b NMe₄Cl 0.1 M. ^c The low solubility of the Zn^{II} and Pb^{II} complexes with **L**⁴ does not allow the potentiometric study of these systems. The same happened for the complexes of Ag^I with both **L**⁴ and **L**⁷. ^d Precipitation at slightly alkaline pH values of hydroxo-complexes does not allow the study of the system in the alkaline pH region.

complexes at slightly alkaline pH values precluded the study of the system in the alkaline pH region. The Hg^{II} complexes with both ligands were completely formed even at pH 2.5 in a 0.1 M NMe₄NO₃ aqueous solution and therefore their formation constants could only be estimated as higher than 15 and 17 log units for [Hg(**L**⁴)]²⁺ and [Hg(**L**⁷)]²⁺, respectively. However, it was possible to determine the formation constants of the 1:1 Hg^{II} complexes with **L**⁴ and **L**⁷ in 0.1 M NMe₄Cl solutions because of the presence in these solutions of competitive complexation equilibria of Hg^{II} with the chloride ion. The study of these systems at alkaline pH values was not possible because of precipitation of hydroxo-complexes. Finally, Zn^{II} and Pb^{II} complexation with **L**⁴ and Ag^I complexation with **L**⁴ and **L**⁷ could not be studied by potentiometry because of complex precipitation at acidic pH values. Protonation constants and stability constants of the complexes formed are reported in Table 2, while Figure 3 shows the distribution diagram for the protonated forms of **L**⁷ and for the Zn^{II} and Cd^{II} complexes with **L**⁷ (the distribution diagram for the protonated form of **L**⁴, for the Cu^{II} and Cd^{II} complexes with **L**⁴, for the Cu^{II} and Pb^{II} complexes with **L**⁷, and for the Hg^{II} complexes with **L**⁴ and **L**⁷ are supplied as Supporting Information, Figure S1, Figure S2 and Figure S3, respectively).

L⁷ can bind up to three protons in aqueous solution. The first two protonation constants are far higher than that reported for the protonation of 1,10-phenanthroline alone (log K = 4.96),⁶³ suggesting that the first two protonation steps occur on the secondary amine groups in the aliphatic chain. The first protonation constant, however, is lower than those generally found for protonation of secondary amine groups in macrocyclic polyamines (9–10 log units),⁶⁴ probably because of the electron-withdrawing effect exerted by the heteroaromatic unit, which reduces the proton binding ability of the adjacent aliphatic amine groups. The third protonation step involves the phenanthroline nitrogen atoms and occurs only at strongly acidic pH (Figure 3a), as their basicity is reduced by the presence of two already protonated amine groups in the molecule. Similar considerations apply to **L**⁴,

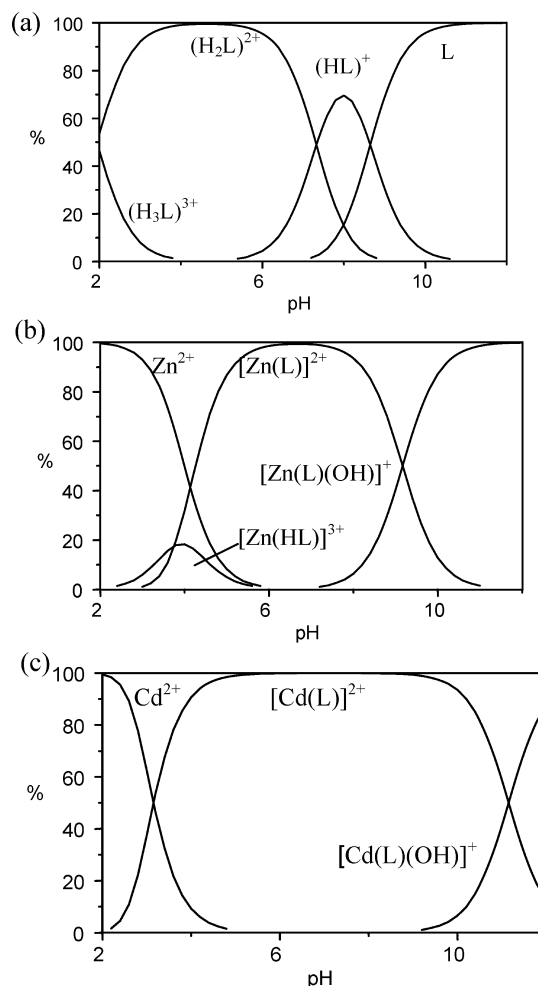


Figure 3. Distribution diagrams for the systems H⁺/**L**⁷ (a), Zn^{II}/**L**⁷ (b), and Cd^{II}/**L**⁷ (c) in water ([M^{II}] = [L⁷] = 1 × 10⁻³ M, 298.1 K; I = 0.1 M).

where the values of the two protonation constants account respectively for protonation of the single aliphatic amine group at alkaline pH values and of the phenanthroline unit in the acidic pH region.

On passing to metal complexation, **L**⁷ forms stable complexes with all the metal ions under investigation. As shown in Figure 3b and 3c for Zn^{II} and Cd^{II} complexation, respectively, metal complexation occurs at acidic pH values

(63) Condikey, G.; Martell, A. E. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1969**, *31*, 2455.

(64) Bencini, A.; Bianchi, A.; Garcia-España, E.; Micheloni, M.; Ramirez, J. A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *188*, 97.

and is followed by deprotonation of coordinated water molecules to give the monohydroxo-complex species $[\text{ML}^7(\text{OH})]^+$ in the alkaline pH region. In the case of Cu^{II} , precipitation at alkaline pH prevents the study of the formation of hydroxo-complexes. Zn^{II} displays the highest tendency to form a monohydroxo-complex, as would be expected from the higher acidity of this ion with respect to Cd^{II} and Pb^{II} .

The binding ability of L^7 toward the different metals can be seen in the values of the stability constants which increase in the order $\text{Zn}^{\text{II}} < \text{Cd}^{\text{II}} \approx \text{Pb}^{\text{II}} < \text{Cu}^{\text{II}} < \text{Hg}^{\text{II}}$. As is generally found for complexes with polyamine ligands,⁵⁸ Hg^{II} forms the most stable complex because of its high affinity for nitrogen and sulfur donor atoms. At the same time, the fact that the observed stability of the complex with Cu^{II} is higher than those with the d^{10} Zn^{II} , Cd^{II} , and Pb^{II} cations can be simply related to the stabilizing effect of CFSE for the d^9 Cu^{II} ion. In contrast, the lower stability of the Zn^{II} complex with respect to the Cd^{II} and Pb^{II} ones is less usual because polyamine ligands often show a similar binding ability toward these metals. This experimental result could simply be ascribed to the presence within the macrocyclic framework of the “soft” sulfur donor, which generally displays a higher binding affinity toward the softer Cd^{II} and Pb^{II} cations. However, a better size match between the macrocyclic cavity and the larger Cd^{II} and Pb^{II} ions could also contribute to the higher stability of their complexes with respect to Zn^{II} . This hypothesis is supported by the higher binding ability toward Cd^{II} and Pb^{II} displayed by the ligand 2,5,8-triaza[9]-(2,9)-1,10-phenanthroline, where a secondary amine group replaces the sulfur donor of L^7 ($\log K = 16.15$,⁶⁵ 17.30,⁶⁶ and 18.70⁶⁷ for the Zn^{II} , Cd^{II} , and Pb^{II} complexes with this ligand).

The extent of the comparison between the binding ability of L^7 and L^4 is limited by the fact that only the stability constants for the Cu^{II} , Cd^{II} , and Hg^{II} complexes with L^4 can be determined. The data in Table 2, however, show a dramatic decrease in the stability of the Cu^{II} , Cd^{II} , and Hg^{II} complexes on passing from L^7 to L^4 . This behavior can reasonably be ascribed to the general lower affinity of sulfur donors for these metals with respect to amine donors. It is noteworthy that the decrease in stability is considerably greater in the case of Cu^{II} complexation ($\log K = 15.21$ and 10.9 for the formation of the Cu^{II} complexes with L^7 and L^4 , respectively) than for Cd^{II} and Hg^{II} complexation (for instance, $\log K = 13.00$ and 11.2 for the formation of the Cd^{II} complexes with L^7 and L^4 , respectively); this observation can be rationalized, once again, by considering the softer characteristics of Cd^{II} and Hg^{II} ; in fact, it is expected that the replacement of an amine group of L^7 with a softer sulfur donor in L^4 would lead to a less pronounced decrease in stability in the case of the softer Cd^{II} and Hg^{II} metal ions.

Metal complexations of L^4 and L^7 were also followed by means of ^1H NMR titrations carried out by adding increasing amounts of a metal salt to a solution of the ligand in a $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ 4:1 (v/v) mixture at $\text{pD} = 7.0$ and 25°C , with the aim to ascertain the stoichiometry of the complexes formed in solution. Unfortunately, it was not possible to perform ^1H NMR titrations in D_2O because of the very low solubility of all complexes in this medium. Conversely, the $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ 4:1 (v/v) mixture ensured simultaneously solubility of the ligands and no precipitation of the complexes during titrations. However, the highest concentration achieved for the ligands was only 1×10^{-3} M.

The ^1H NMR spectra of L^4 and L^7 alone display a set of three signals for the protons belonging to the phenanthroline moiety (two doublets and a singlet) and a second set of three signals for the aliphatic fragment (a singlet that can be assigned to the methylene groups adjacent to the phenanthroline moiety and two triplets for the ethylenic chains) each integrating for four protons, in agreement with a C_{2v} time-averaged symmetry in solution. Complexation strongly affects the ^1H NMR spectral features of both L^4 and L^7 . In the case of Zn^{II} and Hg^{II} and for both ligands, addition of 0.25 equiv of these metal ions already causes the appearance of a new set of signals, which can be attributed to the formation of the corresponding complexes slowly interchanging with the free ligands on the NMR time scale. The new signals are generally shifted downfield by 0.05–0.2 ppm with respect to those of the free ligands observed under the same conditions (see Supporting Information, Table S2 for a list of the ^1H chemical shifts of the complexes). While the signals of the phenanthroline protons in the complexes are sharp and clearly distinguishable from those in the ligands during titrations (see Figure 4a for the system $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{L}^7$), the signals of the aliphatic protons of the complexes are generally unstructured, broad, and partially superimposed either on the signals of the free ligands or on the signal from HOD at 3.88 ppm. These features might indicate the presence in solution of interchanging conformers, probably differing slightly in the conformation adopted by the aliphatic chains around the metal cations and characterized by lifetimes similar to the time scale of the ^1H experiments. The signals in the aromatic region do not seem to be affected by this interconversion process.

Addition of increasing amounts of Zn^{II} or Hg^{II} leads to a progressive increase in the intensity of the phenanthroline signals corresponding to the metal complexes formed and to a simultaneous decrease in the intensity of the resonances of the ligands. At a 1:1 metal-to-ligand molar ratio, the set of resonances of the free ligands disappears completely, and the spectra show only the signals of the metal complexes. Further addition of metal ions does not change these spectral features. These data account for the formation of stable 1:1 complexes between the ligands and Zn^{II} and Hg^{II} .⁶⁸

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

(66) Bencini, A.; Bianchi, A.; Fornasari, P.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *Polyhedron*. **2002**, *21*, 1329.

(67) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *Dalton Trans.* **1999**, 393.

(68) The high stability of the complexes and the low solubility of L^4 , L^7 and their metal complexes prevents a reliable determination of the stability constants of the complexes by using ^1H NMR titrations at a fixed pD value.

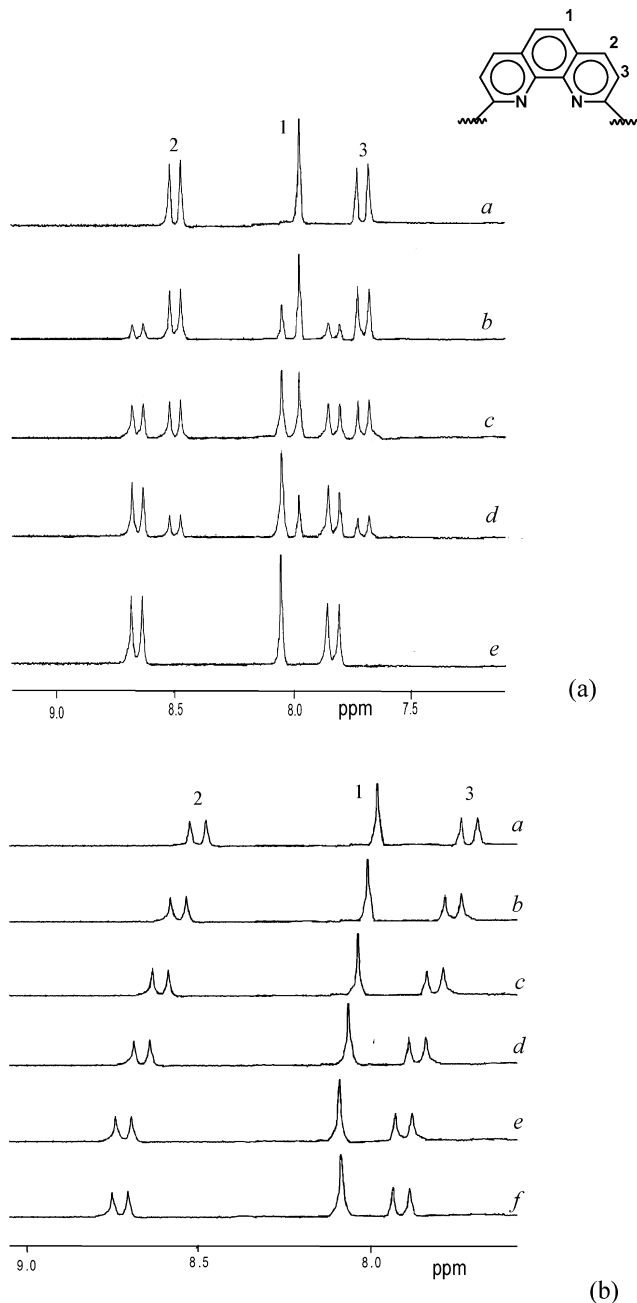


Figure 4. (a) ^1H NMR spectra of L^7 in the presence of increasing amounts of Hg^{II} in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ 4:1 (v/v) at $\text{pD} = 7.0$ [$\text{Hg}^{\text{II}}/\text{L}^7$ molar ratio: 0.0 (a), 0.25 (b), 0.50 (c), 0.75 (d), 1.0 (e)]. (b) ^1H NMR spectra of L^7 in the presence of increasing amounts of Pb^{II} at $\text{pD} = 7.0$ [$\text{Pb}^{\text{II}}/\text{L}^7$ molar ratio: 0.0 (a), 0.25 (b), 0.50 (c), 0.75 (d), 1.0 (e), 1.25 (f)]; $[\text{L}^7] = 1 \times 10^{-3}$ M, 298.1 K.

In the case of Cd^{II} , Pb^{II} , and Ag^{I} , and for both ligands, addition of increasing amounts of these metal cations leads a progressive downfield shift of the ^1H signals up to a 1:1 metal-to-ligand molar ratio (see Figure 4b for the system $\text{Pb}^{\text{II}}/\text{L}^7$). Further addition of the metals does not change the spectra. This suggests the formation of mononuclear metal complexes which are undergoing fast exchange with the free ligands in solution.⁶⁸ The signals of the aliphatic protons shift and broaden upon metal complexation. Unfortunately, the low solubility of the complexes did not allow an NMR study at lower temperatures.

On the other hand, the ^1H NMR spectra of the 1:1 metal-to-ligand complexes isolated in the solid state and recorded in CD_3CN solution at 25 °C (where the solubility for some of the complexes was lower than 1×10^{-3} M) in some cases showed more complex patterns of generally broad signals in the aliphatic region which might suggest a lowering, in this medium, of the time-averaged symmetry of the ligands upon metal complexation (see Experimental Section and Supporting Information).

In particular, the 1:1 complexes of Hg^{II} and Cd^{II} with L^4 , and the 1:1 complexes of Zn^{II} and Ag^{I} with L^7 present two distinct groups of signals for the aliphatic protons of the ethylenic fragments, each integrating for four protons. This feature is not observed in the ^1H NMR spectrum of the 1:1 complex of Ag^{I} with L^4 , where only one very broad signal was recorded, or in the spectrum of the 1:1 complex of Zn^{II} with L^4 , where the two observed multiplets integrate for two and six protons, respectively. The 1:1 complex of Pb^{II} with L^4 presents instead three distinct groups of signals for the ethylenic fragments, two integrating for two protons each, and one for four protons. Interestingly, for the 1:1 complex of Pb^{II} with L^7 four distinct multiplets are observed in the ^1H NMR spectrum for the same aliphatic fragments with each integrating as two protons. As far as the methylenic protons close to the phenanthroline moiety are concerned, the 1:1 complexes of Zn^{II} , Cd^{II} , and Ag^{I} with L^4 , and the 1:1 complex of Ag^{I} with L^7 show only one singlet, integrating as four protons, in the ^1H NMR spectra recorded in CD_3CN at 25 °C. The complexes of Pb^{II} and Hg^{II} with L^4 , Zn^{II} , Pb^{II} , and Hg^{II} with L^7 show an AB subspectrum for the methylenic protons adjacent to the aromatic moiety, suggesting that they assume inequivalent dispositions (above and below the plane of the phenanthroline moiety) as a consequence of complexation.

All these features have already been observed in the ^1H NMR spectra recorded in CD_3CN at 25 °C for the 1:1 complexes of Pd^{II} , Pt^{II} , Rh^{III} , and Ru^{II} with L^1 and L^2 isolated in the solid state.³⁹ Unfortunately, for solubility reasons, it was not possible to record ^1H NMR spectra in CD_3CN at different temperatures for the complexes with L^4 and L^7 isolated in the solid state.

Crystal Structures of $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{L}^5)]$, $[\text{Pb}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \frac{1}{2}\text{MeCN}$, $[\text{Pb}(\text{L}^4)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{MeCN}$, and $[\text{Cu}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \frac{3}{2}\text{MeNO}_2$. The complexation ability of L^1 – L^3 (the most studied among the ligands shown in Figure 1) toward many transition and post-transition metal ions in the solid state has been already widely investigated. It is mainly 1:1 metal complexes that have been isolated and structurally characterized:^{39–42,44} in these, the ligands commonly adopt a folded conformation, with the aliphatic chain of the ring tilted over the plane containing the phenanthroline unit, while attempting to encapsulate (in the cases of L^1 and L^2) the metal ions in a square-based pyramidal stereochemistry within their cavity. Depending on the stereoelectronic requirements of the metal ions considered, *pseudo*-octahedral or square-based pyramidal coordinations can be achieved by interaction of counteranions or solvent molecules at the coordination sites not occupied by the donor atoms of the macrocycles. The

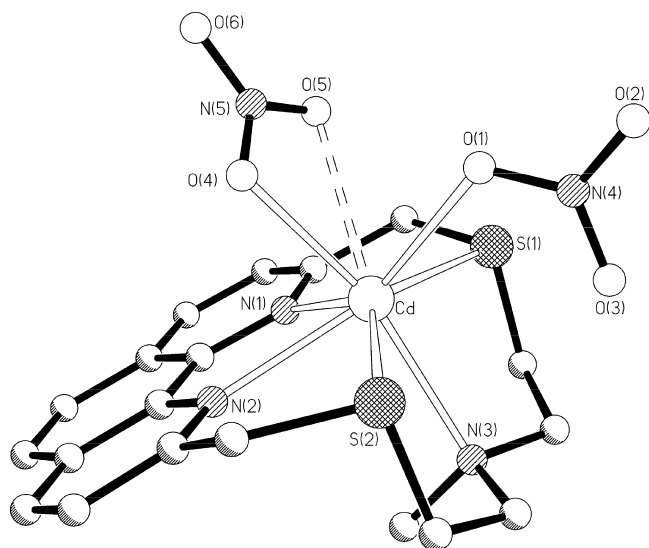


Figure 5. View of $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{L}^5)]$ with the numbering scheme adopted. Hydrogen atoms are omitted for clarity.

structure of the Cu^{I} complex $[\text{Cu}(\text{L}^1)(\text{Cl})(\text{PPh}_3)]^{44}$ is quite remarkable in that none of the S-donors in the aliphatic chain of the macrocycle is coordinated to the metal center. A distorted tetrahedral coordination sphere at the Cu^{I} center is achieved via the two N-donors of L^1 , a chloride ligand, and a PPh_3 ligand. On the other hand, only one complex with a 1:2 metal to ligand stoichiometry has been crystallographically characterized: $[\text{Pb}(\text{L}^3)_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{MeCN}^{42}$ features the metal center sandwiched between two symmetry-related molecules of L^3 with an overall $[4\text{N} + 4\text{S}]$ eight-coordination.

With L^4 and L^7 , 1:1 metal complexes of Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , Pb^{II} , Hg^{II} , and Ag^{I} were isolated in the solid state (see Supporting Information); crystals suitable for X-ray structural analysis were only obtained for the complexes $[\text{Pb}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \frac{1}{2}\text{MeCN}$, $[\text{Pb}(\text{L}^4)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{MeCN}$, and $[\text{Cu}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \frac{3}{2}\text{MeNO}_2$. We also report here the crystal structure of $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{L}^5)]$, only the second example of a complex with L^5 to be structurally characterized, the first being $[\text{Ag}(\text{L}^5)]\text{BF}_4^{45}$.

In $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{L}^5)]$ an overall $\text{N}_3\text{S}_2\text{O}_3$ eight-coordination is apparently achieved at the metal center via the five donor atoms of the macrocyclic ligand and three O-donors, deriving respectively from one terminal asymmetrical bidentate and one monodentate NO_3^- ion (Figure 5, Table 3). The metal center is slightly displaced by 0.33 \AA out of the mean plane defined by the atoms N(1), N(2), S(1), and S(2) toward the NO_3^- ligands. The coordination environment can be described as monocapped *pseudo*-octahedral if the asymmetrical bidentate nitrate ligand is considered to formally occupy the apical position of a *pseudo*-octahedron, the other being occupied by the tertiary amino group [N(3)] from L^5 . The conformation adopted by L^5 in this complex is very similar to that observed in the square-pyramidal complex cation $[\text{Ag}(\text{L}^5)]^{+45}$ and characteristic of other macrocycles of this type having the aliphatic portion of the ring folded over the phenanthroline unit. Bond distances are comparable to those observed in the complex $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{L}^3)]^{42}$ in which, however, only the two S-donors are present in the aliphatic portion of the ring, and the two nitrate groups are almost

Table 3. Selected Bond Distances (\AA) and Angles (deg) for $[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2(\text{L}^5)]^a$

Cd—N(1)	2.411(6)	Cd—S(2)	2.726(4)
Cd—N(2)	2.455(6)	Cd—O(1)	2.478(8)
Cd—N(3)	2.540(9)	Cd—O(4)	2.431(9)
Cd—S(1)	2.696(3)	Cd—O(5)	2.725(11)
N(1)—Cd—N(2)	68.7(2)	N(2)—Cd—O(4)	75.4(2) [107.5(4)]
N(1)—Cd—N(3)	93.5(3)	N(3)—Cd—S(1)	77.0(2)
N(1)—Cd—S(1)	72.6(2)	N(3)—Cd—S(2)	76.1(2)
N(1)—Cd—S(2)	139.4(2)	N(3)—Cd—O(1)	110.7(3)
N(1)—Cd—O(1)	140.7(2)	N(3)—Cd—O(4)	161.3(3) [150.0(4)]
N(1)—Cd—O(4)	92.3(3) [71.9(4)]	S(1)—Cd—S(2)	138.9(1)
N(2)—Cd—N(3)	90.3(2)	S(1)—Cd—O(1)	83.0(2)
N(2)—Cd—S(1)	138.3(2)	S(1)—Cd—O(4)	121.7(2) [73.7(4)]
N(2)—Cd—S(2)	72.2(2)	O(1)—Cd—O(4)	74.7(3) [71.9(4)]
N(2)—Cd—O(1)	138.1(3)	O(4)—Cd—O(5)	48.32(1)

^a Where two values are reported, the first refers to the bond distances and angles involving O(4), and the second to the bond distances and angles involving O(5) (Figure 3).

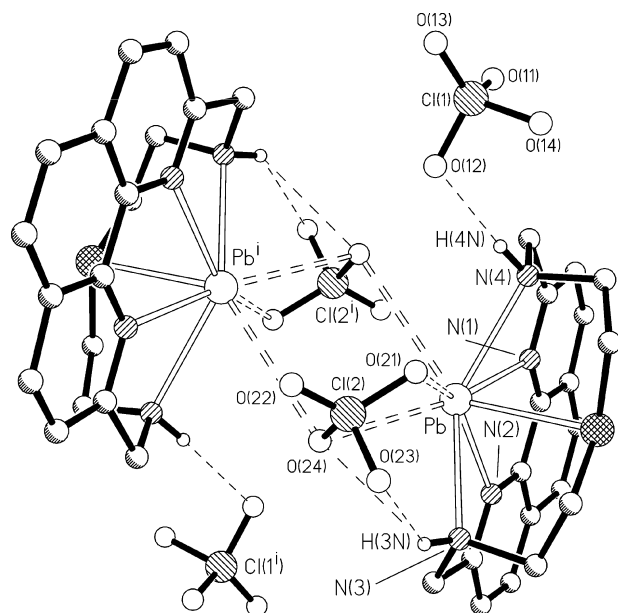


Figure 6. View of the dimeric units in $[\text{Pb}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \frac{1}{2}\text{MeCN}$ with the adopted numbering scheme. Hydrogen atoms, except those on the secondary amino groups are omitted for clarity. $\text{H}(3\text{N}) \cdots \text{O}(23)$ $3.36(2) \text{ \AA}$, $\text{N}(3) - \text{H}(3\text{N}) \cdots \text{O}(23)$ $143.1(7)^\circ$; $\text{H}(3\text{N}) \cdots \text{O}(24)$ $2.60(1)$, $\text{N}(3) \cdots \text{O}(24)$ $3.19(1) \text{ \AA}$, $\text{N}(3) - \text{H}(3\text{N}) \cdots \text{O}(24)$ $123.9(6)^\circ$; $\text{H}(4\text{N}) \cdots \text{O}(12)$ $2.25(2)$, $\text{N}(4) \cdots \text{O}(12)$ $3.15(2) \text{ \AA}$, $\text{N}(4) - \text{H}(4\text{N}) \cdots \text{O}(12)$ $175.9(7)^\circ$; $i = \frac{3}{2} - x, \frac{3}{2} - y, 1 - z$.

symmetrically bidentate to give a distorted cubic $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4$ environment.

In $[\text{Pb}(\text{L}^7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot \frac{1}{2}\text{MeCN}$ each $[\text{Pb}(\text{L}^7)]^{2+}$ cation is arranged about a center of symmetry and forms a dimeric pair with a symmetry related counterpart via two terdentate perchlorate bridging anions, as shown in Figure 6. The bridging perchlorato ligands are anchored to the $[\text{Pb}(\text{L}^7)]^{2+}$ cations via bifurcated H-bonds involving one of the secondary nitrogen atoms of the aliphatic portion of L^7 [N(3)]. The other NH group [N(4)] is hydrogen bonded to a further perchlorato ion. The bonds to the donor atoms are evenly distributed about the N_4SO_3 eight-coordination sphere but some are significantly longer than others (Table 4). In particular, the donor atoms from the macrocyclic unit are more strongly coordinated to the metal centers with distances in the ranges $2.492(9) - 2.495(6)$, $2.661(10) - 2.701(10)$, and $2.806(3) \text{ \AA}$ for the $\text{Pb}-\text{N}_{\text{phen}}$, $\text{Pb}-\text{N}_{\text{amino}}$, and the $\text{Pb}-\text{S}_{\text{thioether}}$

Table 4. Selected Bond Distances (Å) and Angles (deg) for [Pb(L⁷)](ClO₄)₂·¹/₂MeCN]

Pb–N(1)	2.495(6)	Pb–S	2.806(3)
Pb–N(2)	2.492(9)	Pb–O21	3.062(11)
Pb–N(3)	2.701(10)	Pb–O24	3.190(8)
Pb–N(4)	2.661(11)	Pb ⁱ –O24	3.358(9)
N(1)–Pb–N(2)	65.2(3)	N(3)–Pb–N(4)	137.6(3)
N(1)–Pb–N(3)	122.3(2)	N(3)–Pb–S	70.5(2)
N(1)–Pb–N(4)	64.8(3)	N(4)–Pb–S	69.9(2)
N(1)–Pb–S	80.7(2)	S–Pb–O(21)	81.7(1)
N(2)–Pb–N(3)	62.1(3)	S–Pb–O(24)	113.5(1)
N(2)–Pb–N(4)	125.6(3)	Pb–O(24)–Pb ⁱ	95.0(1)
N(2)–Pb–S	82.1(2)		

$$^i = {}^3/2 - x, {}^3/2 - y, 1 - z.$$

bonds, respectively. The O-donors of the perchlorate ions are at rather longer distances, ranging from 3.062(11) [Pb–O(21)] to 3.358(9) Å [Pbⁱ–O(24)] (Figure 6, Table 4) and, being significantly longer than those normally found for O-donating counter-anions coordinated to lead(II), they are better considered as long contacts.⁴² In fact, they are also longer than the sum of the Shannon ionic radius of eight-coordinate lead(II) (1.29 Å)⁶⁹ and the van der Waals radius of oxygen (1.50 Å).⁷⁰ This structural feature might be indicative of the presence of a stereochemically active 6s² lone pair positioned in the coordination hemisphere left free by the macrocyclic ligand. In [Pb(L⁷)]²⁺ the metal center is “perching” above the macrocyclic cavity of L⁷, which assumes the usual folded conformation, rather than “nesting” within it, and is displaced 0.60 Å out of the mean plane defined by the atoms N(1), N(2), N(3), and N(4) toward the O-donor manifold of the perchlorate anions. The structural features of each binuclear system in [Pb(L⁷)](ClO₄)₂·¹/₂MeCN are reminiscent of those observed in [Pb(L¹)](ClO₄)₂·¹/₂H₂O in which two bidentate perchlorate ions and a water molecule bridge two symmetry related [Pb(L¹)]²⁺ units and the metal center achieves overall nine-coordination via a further perchlorate ion acting as monodentate ligand.⁴²

On passing from L⁷ to L⁴ a mononuclear lead(II) complex is obtained. In [Pb(L⁴)](ClO₄)₂·MeCN two independent [Pb(L⁴)]²⁺ cations are present in the asymmetric unit. In each cation the metal center interacts with an acetonitrile molecule and two perchlorate ligands in the hemisphere left free by the N₃S₂-donating macrocyclic ligand. Unfortunately, because of severe disorder, the positions of the perchlorate oxygen atoms can only be considered approximate and probably do not describe the full range of anion orientations. Consequently, we feel the exact coordination number achieved at the metal center cannot be given (Figure S4 in the Supporting Information). A similar mononuclear lead(II) complex is obtained with the pentadentate L² in [Pb(L²)](ClO₄)₂·MeNO₂; in this case nine-coordination is achieved at the metal center via a nitromethane molecule and one terminal bidentate and one monodentate ClO₄[−] ion.⁴²

Two independent complex units (A and B) are present in the asymmetric unit of [Cu(L⁷)](ClO₄)₂·³/₂MeNO₂. In unit A (Figure 7a, Table 5), an overall *pseudo*-octahedral

coordination sphere is achieved at the Cu(II) center, similar to that observed in the cation [Cu(L²)(ClO₄)]⁺,⁴⁴ by interaction of a monodentate perchlorate ligand at the coordination site left free by the macrocyclic ligand, which acts as a pentadentate N₄S-donor by assuming the usual folded conformation. In unit B (Figure 7b, Table 5), no interaction of a perchlorate ligand with the metal ion is observed, which, therefore, lies within a distorted square-based pyramidal coordination environment imposed by the macrocyclic ligand. Pairs of [Cu(B)(L⁷)]²⁺ cations related by crystallographic inversion centers interact with each other via S⋯S contacts of 3.529(2) Å (Figure 7c). The resulting dimers interact with two adjacent cations [Cu(A)(L⁷)(ClO₄)]⁺ via weak π-π interactions of about 3.5 Å between the phenanthroline moieties to give the tetramers shown in Figure 7c. An intricate network of H-bonds involving these tetramers, perchlorate ligands, and MeNO₂ molecules contribute to the crystal packing. Examples of hydrogen bonding involving metal complex units and perchlorate anions are shown in Figures S5–S7 in the Supporting Information.

Liquid–Liquid Extraction Studies. The macrocyclic ligands L¹–L⁷ were tested as extractants for liquid–liquid extraction of a series of metal ions showing typical borderline (Cu^{II}, Zn^{II}) or soft (Ag^I, Cd^{II}, Hg^{II}, Pb^{II}) acid character. The aim of the studies was to verify the effects of the different donor atoms within the macrocyclic ligands on the metal ion recognition process under the experimental conditions determined by this technique. The solvent extraction studies for L⁷ were unsuccessful because of the formation of precipitate at the aqueous/organic interfaces in all experiments performed. This behavior could be related to a high water solubility of L⁷ as compared to that of the other ligands. Another experimental problem was related to the Hg^{II} determination using the ICP-OES technique. In most cases the inconsistent intensity changes of the three specific Hg-emission lines prevented the reproducible determination of the concentration of Hg^{II}, obviously caused by matrix effects. Only in the case of L³ were reproducible measurements possible, and a high extraction yield (>60% Hg^{II}) has been observed under the applied experimental conditions.

Figure 8 shows a summary of the extraction behavior of L¹–L⁶ toward Ag^I, Cu^{II}, and Zn^{II} in single ion experiments under comparable experimental conditions. A decrease in the extraction efficiency of L¹–L⁶ is observed in the order Ag^I > Cu^{II} > Zn^{II}. All ligands show a nearly quantitative Ag^I extraction (97–99%) under the experimental conditions used; in this respect, it appears that the different donor sets in the macrocyclic frameworks of L¹–L⁶ do not exert any detectable influence. In the case of the extraction of Cu^{II}, a significant influence from the donor set of the ligands is observed instead. The Cu^{II} extraction increases in the ligand order L² < L⁴ < L¹ < L⁵ < L³ < L⁶. As compared to L³ [47% Cu^{II} extraction], the presence of an additional donor atom in the aliphatic portion of the macrocyclic ligand causes a decrease in the Cu^{II} extraction power in the order tertiary amine (L⁵, 40%) > sulfur (L¹, 17%) > secondary amine (L⁴, 10%) > oxygen (L², 7%). Interestingly, the introduction of a pyridine subunit in the macrocyclic framework causes

(69) Shannon, R. D. *Acta Crystallogr., Sect A* **1976**, *32*, 751.

(70) Pauling, L. *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1960.

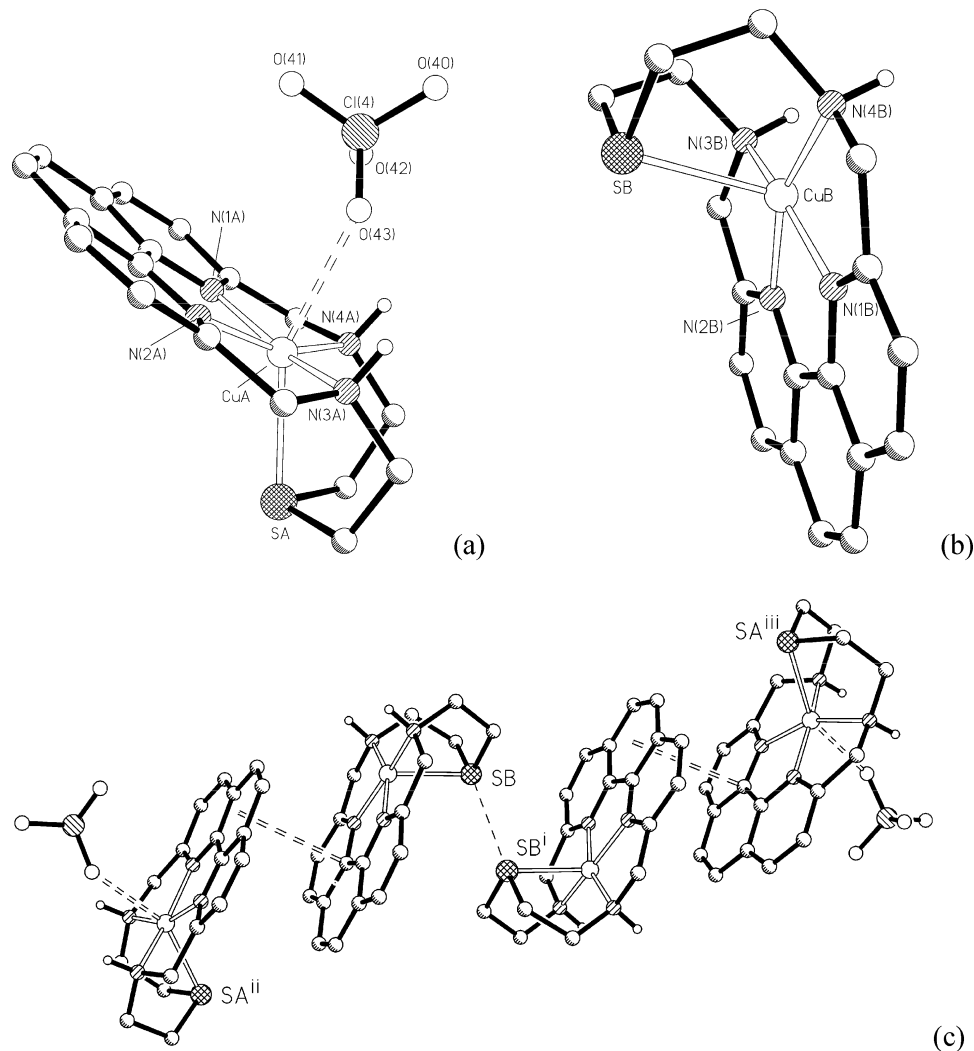


Figure 7. (a) View of the independent $[\text{Cu}(\text{L}7)(\text{ClO}_4)]^+$ cation (unit **A**) in $[\text{Cu}(\text{L}7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3/2\text{MeNO}_2$ with the atomic numbering scheme adopted; (b) view of the $[\text{Cu}(\text{L}7)]^{2+}$ cation (unit **B**) in $[\text{Cu}(\text{L}7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3/2\text{MeNO}_2$ with the atomic numbering scheme adopted; (c) partial view of the packing diagram in $[\text{Cu}(\text{L}7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3/2\text{MeCN}$ showing dimers of $[\text{Cu}(\text{B})(\text{L}7)]^{2+}$ interacting via $\pi \cdots \pi$ stacking with $[\text{Cu}(\text{A})(\text{L}7)(\text{ClO}_4)_2]^+$ cations. Hydrogen atoms, perchlorate anions, and nitromethane molecules are omitted for clarity; $i = 1 - x, 1 - y, -z$; $ii = x, 1 + y, z$; $iii = -x, 1 - y, -z$.

Table 5. Selected Bond Distances (Å) and Angles (deg) for $[\text{Cu}(\text{L}7)](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3/2\text{MeNO}_2^a$

CuA—N(1A)	1.946(3) [1.939(3)]	CuA—N(4A)	2.088(4) [2.076(3)]
CuA—N(2A)	1.949(3) [1.935(3)]	CuA—SA	2.522(1) [2.505(1)]
CuA—N(3A)	2.067(4) [2.084(3)]	CuA—O(43)	2.649(1)
N(1A)—CuA—N(2A)	80.5(2) [81.2(1)]	N(2A)—CuA—O(43)	84.0(1)
N(1A)—CuA—N(3A)	157.5(2) [159.6(1)]	N(3A)—CuA—N(4A)	117.2 (2) [117.7(1)]
N(1A)—CuA—N(4A)	79.5(2) [79.4 (1)]	N(3A)—CuA—SA	84.7 (1) [86.4(1)]
N(1A)—CuA—SA	113.2(1) [107.1(1)]	N(3A)—CuA—O(43)	79.4(1)
N(1A)—CuA—O(43)	88.0(1)	N(4A)—CuA—SA	84.5(1) [85.5(1)]
N(2A)—CuA—N(3A)	79.7(2) [79.9(1)]	N(4A)—CuA—O(43)	84.2(1)
N(2A)—CuA—N(4A)	157.1(2) [158.6(1)]	SA—CuA—O(43)	153.7(1)
N(2A)—CuA—SA	113.7(1) [108.9(1)]		

^a Where two values are reported, the first refers to the bond distances and angles in the independent unit **A**, and the second to the bond distances and angles in the independent unit **B** (Figure 5).

an enhancement of the Cu^{II} extraction up to 98% (**L**⁶, see Figure 8). In the case of the extraction of Zn^{II} , only **L**⁶ shows a significant ability to transfer this metal ion from the aqueous to the organic phase (13%).

To investigate the extraction ability of **L**¹–**L**⁶ toward dipositive metal ions more in detail, competitive extraction experiments from an equimolar mixture of Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , and Pb^{II} ions (each 1×10^{-4} M in water, ligands 1×10^{-3} M in CHCl_3) were also carried out. Such experiments allow

us to study the selectivity of the extraction system and to establish the mutual influence of the species in solution. According to single metal ion extraction experiments, **L**¹–**L**⁶ show a pronounced affinity for Cu^{II} whereas Pb^{II} , Cd^{II} , and Zn^{II} are only slightly extracted following the order $\text{Pb}^{\text{II}} > \text{Cd}^{\text{II}} > \text{Zn}^{\text{II}}$ (Figure 9). The observed Cu^{II} extraction for **L**¹, **L**³–**L**⁶ in competitive experiments is very similar to the measured extraction in the single metal ion investigation (Figure 8). The results obtained for Cd^{II} and Pb^{II} indicate

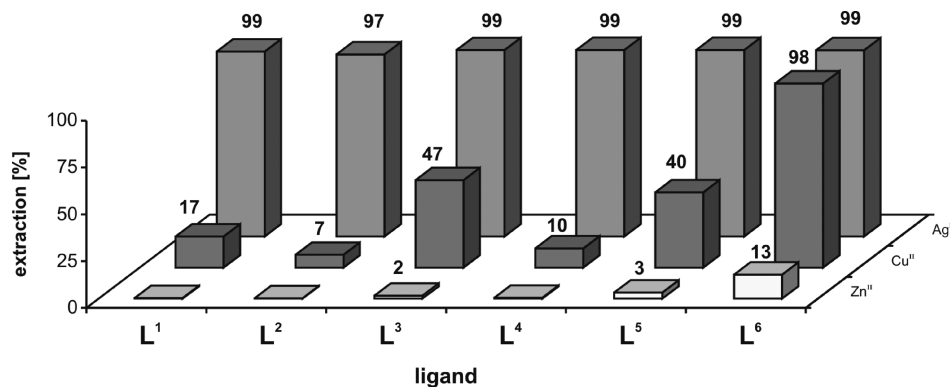


Figure 8. Extraction of Zn^{II}, Cu^{II}, and Ag^I by L¹-L⁶. [Mⁿ⁺] = 1 × 10⁻⁴ M, [NaClO₄] = 5 × 10⁻³ M, pH 6.1 (MES/NaOH buffer); [L] = 1 × 10⁻³ M in CHCl₃; shaking time 30 min; T = 21 ± 1 °C.

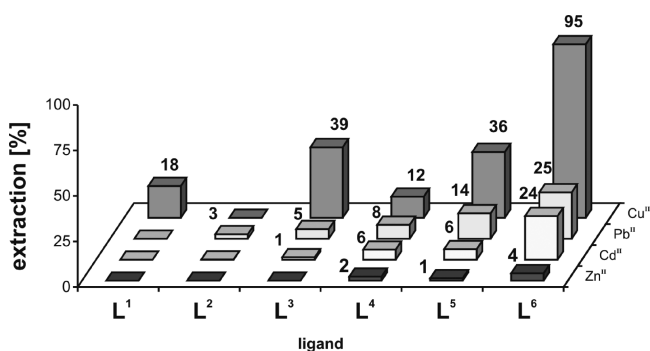


Figure 9. Competitive extraction of Zn^{II}, Cd^{II}, Cu^{II}, and Pb^{II} from their mixtures by L¹-L⁶. [Mⁿ⁺] = 1 × 10⁻⁴ M, [NaClO₄] = 5 × 10⁻³ M, pH 6.1 (MES/NaOH buffer); [L] = 1 × 10⁻³ M in CHCl₃; shaking time 30 min; T = 21 ± 1 °C.

that a nitrogen donor atom in the aliphatic portion of the ring (either as an amine group or a pyridine subunit) helps to achieve a reasonable extraction of these metals. The highest extraction of 24% (Cd^{II}) and 25% (Pb^{II}) is achieved with the pyridyl containing ligand L⁶ (Figure 9). By analogy with the single metal ion extraction experiments, all ligands show only a low affinity for Zn^{II}.

To probe the metal ion selectivity in more detail and to find discrimination factors for metal ion pairs which are chemically similar (Ag^I/Hg^{II}) or industrially important (Ag^I/Cu^{II}), competitive extraction experiments were also carried out using aqueous solutions containing equimolar concentrations of these metal ions (1 × 10⁻⁴ M in water) and CHCl₃ solutions of the ligands (1 × 10⁻⁴ M in CHCl₃).⁷¹ The distribution of Ag^I between the two phases was assessed radiometrically by γ -radiation of ^{110m}Ag in a NaI (TI) scintillation counter (Cobra II/Canberra-Packard).⁵⁹ A pH value of 3.1 was chosen for the water solutions to decrease the Ag^I extraction to reasonable values. Figure 10 shows the results obtained in these competitive extraction experiments together with the results obtained for single ion extraction of Ag^I under comparable conditions.

Generally, in comparison with the results in Figure 8, a significant decrease of the Ag^I extraction is observed, especially in the case of L⁶, caused by the lower pH (3.1 vs 6.1) and the lower ligand concentration (1 × 10⁻⁴ M vs 1 ×

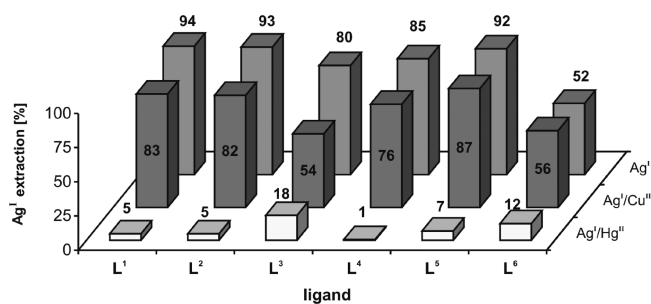


Figure 10. Percentage extraction of Ag^I alone by L¹-L⁶ and in the presence of Hg^{II} and Cu^{II}. [Mⁿ⁺] = 1 × 10⁻⁴ M, [NaClO₄] = 5 × 10⁻³ M, pH 3.1 (citric acid/NaOH buffer); [L] = 1 × 10⁻⁴ M in CHCl₃; shaking time 30 min; T = 21 ± 1 °C.

10⁻³ M) according to the following graded extraction order for Ag^I: L¹ ~ L² ~ L⁵ > L⁴ > L³ > L⁶. The presence of Cu^{II} and especially of Hg^{II} causes a further decrease of the Ag^I extraction which suggests a strong mutual influence on the extraction of these metal ions. However, the extraction of Ag^I is still favored in the presence of Cu^{II} but not in the presence of Hg^{II}. In the case of the metal ion pair Ag^I/Hg^{II} the significantly lower extraction power for Ag^I suggests that the binding and extraction of Hg^{II} is favored. All this could represent valuable information relevant to technologies for the separation and purification of silver. The silver content of environmental samples is drastically increasing because of the increasing use of silver compounds and silver-containing preparations in industry and medicine. The use of artificial membranes containing neutral ionophores in Ag^I-specific separation procedures often suffers from problems such as interference from some transition and heavy metal ions, partial bleeding of the ionophore in the aqueous phases, and long transport time.^{50,51}

The extraction results shown in Figure 10 point to effective separation possibilities for Ag^I over Cu^{II} with the ligands L¹, L², L⁴, and L⁵. Furthermore, these data indicate that not only L⁴ but also L¹ and L² could possibly be considered as good candidate ionophores for the selective extraction of Hg^{II}, a toxic element of particular environmental concern, from water solutions in the presence of Ag^I.

Conclusions

This manuscript describes the results achieved by a wide-ranging study concerned with metal ion recognition using

(71) Wu, G.; Jiang, W.; Lamb, J. D.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6538.

phenanthroline containing macrocyclic ligands and employing different conditions and techniques. Apart from the intrinsic interest in the coordination chemistry of the ligands presented, the study demonstrates that results can vary with both the latter in particular instances, and hence, the observed behavior does not necessarily reflect the intrinsic metal ion affinity inherent in the design of a given macrocycle. While this has been recognized for some time, we reckon the message is worth reinforcing. Macrocyclic-based molecular systems often do not accomplish properly the role of the specific ionophore for which they were initially designed, and it is therefore essential to test their ability as receptors in molecular recognition processes in different chemical situations and employing different techniques for different analytical purposes.

Acknowledgment. We thank the “Regione Autonoma della Sardegna”, the Università degli Studi di Cagliari, and the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support.

Supporting Information Available: Synthetic details including analytical data for the isolated 1:1 metal complexes of L^4 and L^7 . Stepwise Formation Constants of Pb^{II} , Cd^{II} , Hg^{II} , Cu^{II} with L^1 - L^3 and of Ag^I with L^1 - L^3 , and L^5 in MeCN at 25 °C, calculated by fitting the Fluorescence/Molar Ratio data (Table S1); 1H chemical shifts ($\Delta\delta$, ppm) of L^4 and L^7 observed in the presence of 1 equiv of metal ions in CD_3CN/H_2O 4:1 (v/v) mixtures (pD = 7.0) at 25 °C (Table S2); distribution diagrams for the systems H^+/L^4 (a), Cu^{II}/L^4 (b) and Cd^{II}/L^4 (c) in water 0.1 M NMe_4NO_3 (Figure S1); distribution diagrams for the systems Cu^{II}/L^7 (a) and Pb^{II}/L^7 (b) in water 0.1 M NMe_4NO_3 (Figure S2); distribution diagrams for the systems Hg^{II}/L^4 (a) and Hg^{II}/L^7 (b) 0.1 M NMe_4Cl water solutions (Figure S3); views of the two independent $[Pb(L^4)]^{2+}$ complex cationic units in $[Pb(L^4)](ClO_4)_2 \cdot MeCN$ (Figure S4); partial views of selected features of the H-bonding network in $[Cu(L^7)](ClO_4)_2 \cdot 3/2 MeNO_2$ (Figures S5, S6, S7); crystallographic data in CIF format. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

IC800548P

Cu(II) complexation with an acridine-containing macrocycle. Assembly of water cluster chains within the cavity of tetranuclear metallomacrocycles†

Stefania Bartoli, Carla Bazzicalupi, Silvia Biagini, Lucia Borsari, Andrea Bencini,* Enrico Faggi, Claudia Giorgi, Claudio Sangregorio and Barbara Valtancoli

Received 29th August 2008, Accepted 28th October 2008

First published as an Advance Article on the web 5th January 2009

DOI: 10.1039/b815040k

The synthesis and characterisation of a new macrocyclic compound (L), composed of a pentamine chain linking the 2,7 positions of an acridine moiety, is reported. Cu(II) complexation was studied by means of potentiometric, UV-vis and EPR measurements in aqueous solutions. This study reveals that the ligand forms a stable tetranuclear complex with an overall $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ stoichiometry in aqueous solution. The crystal structure of the $[\text{Cu}_8\text{L}_4(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_3](\text{NO}_3)_5 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$ complex, isolated from neutral aqueous solution, shows that it is formed by tetranuclear clusters $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-NO}_3)_x]^{(4-x)+}$ ($x = 1$ or 2), composed of two $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ macrocyclic units linked together by four bridging hydroxide and nitrate anions to give an overall metallomacrocyclic structure. Magnetic measurements shows that the hydroxide-bridged Cu(II) ions are ferromagnetically coupled. Inspection of the crystal packing shows that couples of metallomacrocycles are paired by π -stacking interactions between acridine moieties, giving rise to an internal hydrophilic cavity where hexameric or pentameric water clusters are enclosed. The coupled metallomacrocycles assume a columnar disposition growing along the a axis, giving rise to channels passing through the cavities of the metallomacrocycles; these channels are filled by chains of 5- or 6-membered water clusters linked together by $[\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}]_2$ units.

Introduction

Metal complexes, including those with macrocyclic systems, have been widely used to assemble solid state metal–organic frameworks (MOFs) containing isolated cavities, channels or sheets, where guest species can be hosted. These functional materials are promising tools for a variety of applications, such as separation, gas storage, catalysis, sensing, magnetism and ion exchange.¹ Among different host species, water-based structural motifs² are often found in the cavities or channels formed by MOFs and, actually, water clusters with finite motifs, including dimers,³ tetramers,⁴ pentamers,⁵ hexamers,⁶ heptamers,⁷ octamers,^{6d,8} decamers,^{4b,9} dodecamers^{7c,10} and assemblies with even higher numbers of hydrogen bonded water molecules¹¹ have been recently found in metal–organic solid state structures. MOFs containing infinite water motifs, such as 1D chains,^{7c,12} helices,^{7a,13} columns¹⁴, pipes¹⁵ and 2D layers^{7c,16} have been also characterised by X-ray crystallography.

The most common approach to build up extended organised structures is to employ appropriate bridging ligands, which give rise upon metal complexation to polymeric networks containing cavities or channels where water assemblies can be hosted. In this context, macrocyclic ligands can be also used for the assembly of supramolecular assemblies both in solution and in the solid state. In fact, appropriately designed macrocycles can offer preorganised coordination geometries to the metals, influencing their ability to act as anchoring points for guest species. At the same time, macrocyclic compounds can be able to include within their cavity two or more metal cations, kept at a fixed, or almost fixed, distance. Once again, an appropriate modulation of the macrocyclic structure can lead to polynuclear complexes where, depending on the intermetallic distance, the metals can act as cooperative or independent binding sites. Finally, binding moieties or functional groups able to interact with substrates through weak forces (hydrogen bonding, π -stacking interactions *etc.*) can be inserted within the cyclic backbone in order to assemble supramolecular assemblies held by multiple forces. These features have been used to construct metal-based frameworks containing, in the solid state, channels or cavities with the appropriate dimension and hydrophilic characteristics to host water clusters or infinite water motifs.^{3c,12c,14,15b,16,17}

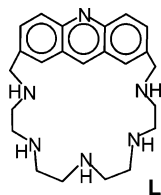
We have recently reported on the synthesis and metal binding properties of polyamine macrocycles containing rigid heteroaromatic units, such as phenanthroline, dipyrindine or terpyridine, as integral part of macrocyclic frameworks.¹⁸ It was shown that the rigidity of these units does not allow all amine groups to bind to the metal cations. In consequence, the coordination sphere of the coordinated metals is not fulfilled by the donor atoms of the ligand

Department of Chemistry, University of Florence, Via della Lastruccia 3, 50019-Sesto Fiorentino, Firenze, Italy. E-mail: andrea.bencini@unifi.it

† Electronic supplementary information (ESI) available: UV-vis spectra of the Cu(II) complex at different pH values (Fig. S1); theoretical and experimental titration curves for the system Cu(II)–L with different ligand and metal concentrations (Fig. S2); σ^2 (variance of weighted square residuals) values for the titration curves relative to the system Cu(II)–L (Table S1); protonation constants of the ligand (Table S2); intermetallic distances in the **a** and **b** complexes (Table S3); hydrogen bonding distances involving the water molecules and/or nitrate anions in the **a**-based, **b**-based, **c** and **d** water channels (Tables S4–S9). CCDC reference number 672391. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/b815040k

and therefore the metal cations possess binding sites available for the coordination of exogenous substrates.

We have now synthesized the new ligand L, which contains an acridine moiety inserted within a polyamine cyclic structure (Scheme 1). Polyamine macrocycles containing acridine moieties within their cyclic backbone^{19,20} or as pendant arms^{21,22} have been synthesized in order to analyse either their binding properties toward anionic substrates^{19a,d-j} or interaction^{19b,c} with nucleic acids.²⁰⁻²² However, their binding ability towards metal cations has been almost neglected and only Zn(II) coordination with a tetraazamacrocycle with an acridine side arm has been investigated.²²



Scheme 1 Ligand drawing.

In principle, the large and rigid acridine moiety can lead to a remarkably strained macrocyclic structure. At the same time, the acridine nitrogen is located outside the macrocyclic cavity and cannot be used for the coordination of encapsulated metals. These characteristics could give complexes where only a few amine nitrogen donors can be involved in metal coordination. Actually, these structural characteristics lead to the assembly of a Cu(II)-based metallomacrocycle, constituted by two dinuclear $[\text{Cu}_2\text{L}]$ complexes held together by bridging hydroxide anions. Acridine and its derivatives are also known for their ability to interact *via* π -stacking with aromatic substrates.¹⁹⁻²² In the present case, this property is used to assemble, in the solid state, couples of stacked metallomacrocycles, giving rise to a hydrophilic cavity where hexameric or pentameric water clusters can be hosted.

Results and discussion

Cu(II) complexation in aqueous solution

Cu(II) complexation was first studied by means of potentiometric measurements in aqueous solutions. Table 1 lists the species formed and the corresponding stability constants, while Fig. 1 reports a distribution diagram of the complexes calculated with a Cu(II) : L 2 : 1 molar ratio.

The protonation constants of the ligand are in the range generally observed for polyamine compounds²³ and they are given within the ESI (Table S2).[†] Table 1 clearly shows that the

Table 1 Formation constant of the Cu(II) complexes with L (NMe₄Cl 0.1 M, 298.1 K)

Equilibrium	log K
$\text{L} + \text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons [\text{CuL}]^{2+}$	11.0(1)
$[\text{CuL}]^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuHL}]^{3+}$	8.1(1)
$[\text{CuHL}]^{3+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$	5.8(1)
$[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$	4.6(1)
$[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuH}_4\text{L}]^{6+}$	2.9(1)
$2\text{L} + 4\text{Cu}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+} + 4\text{H}^+$	12.2(1)

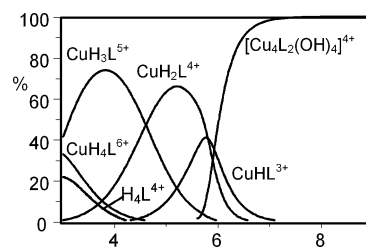


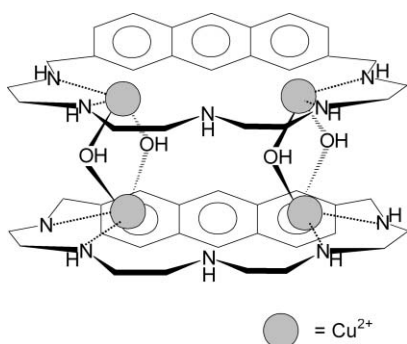
Fig. 1 Distribution of the complexed species of L (Cu(II) = 2×10^{-3} M, [L] = 1×10^{-3} M, 298.1 K, 0.1 M NMe₄Cl).

$[\text{CuL}]^{2+}$ complex can bind up to four acidic protons, giving rise to $[\text{CuH}_x]^{(x+2)+}$ protonated complexes ($x = 1-4$). As expected, the rigidity of the acridine moiety does not allow all the polyamine donors to bind to a single metal cation and facile protonation occurs on the unbound nitrogens affording protonated 1 : 1 complexes at acidic pH values (Fig. 1). Actually, the formation constant of the mononuclear $[\text{CuL}]^{2+}$ complex is similar to that found for the 1 : 1 complex with ethylenediamine (log $K = 10.60$ for the equilibrium $\text{Cu}^{2+} + \text{en} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{en})]^{2+}$),²⁴ suggesting that only two nitrogen donors are bound to the metal. The remaining amine groups can be therefore available for the coordination of a second metal cation. On the other hand, potentiometric measurements show the formation at neutral pH of a tetranuclear $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ complex, which is the unique species present in solution in the alkaline pH region (Fig. 1). The eventual presence of dinuclear complexes of the type $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_x]^{(4-x)+}$ or $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{OH})_x]^{(4-x)+}$ ($x = 0-4$) was also checked. However, data treatment with the program HYPERQUAD²⁵ rules out the formation of these species.

UV-vis spectra recorded on aqueous solutions containing Cu(II) and L in 2 : 1 molar ratio at different pH values are featured by a single band, centered at *ca.* 690 nm from pH 3 to 5.5 (see ESI, Fig. S1[†]). In the pH range pH 5.6–7, a marked blue-shift of this band (*ca.* 130 nm) accompanies the formation of the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ species, suggesting the presence of a stronger ligand field operating on the metal cations in the latter species. The spectra do not show significant changes from pH 7.0 to 11 (a single band at *ca.* 560 nm, with $\epsilon = 38 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), in keeping with the presence of a unique species in solution in this pH range.

Clearly, the potentiometric and spectrophotometric data do not allow us to infer structural hypotheses on the observed $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ assembly. On the other hand, slow evaporation of a neutral aqueous solution containing L and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ in 1 : 2 molar ratio leads to crystallisation of the complex $[\text{Cu}_8\text{L}_4(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_3](\text{NO}_3)_5 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$ (see below), which contains tetranuclear clusters $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-NO}_3)_x]^{(4-x)+}$ ($x = 1$ or 2), composed by two $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ macrocyclic units linked together by four bridging hydroxide and nitrate anions and affording an overall metallomacrocycle structure. A similar cyclic structure can be proposed for the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ species observed in aqueous solution (Scheme 2) in the absence of nitrate. Actually, nitrate interaction with the Cu(II) complexes with L was not detected either by potentiometric titrations or spectrophotometric measurements, even working in the presence of a ten-fold excess of NaNO_3 , in keeping with the generally observed weak binding ability of nitrate for Cu(II) in aqueous solutions.

Of note, the UV-vis spectra of the solid compound and of the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ complex in aqueous solution are similar (in both



Scheme 2 Sketch of the proposed structure for the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ complex (water molecules eventually bound to the metal centres are omitted).

cases a single band with a maximum at *ca.* 560 nm). Furthermore, the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ complex in solution is EPR silent at X-band (*ca.* 9.4 GHz) both at room temperature and 150 K. The same behaviour was observed in the solid sample and is consistent with a large zero-field split (ZFS) $S = 1$ ground state, arising from a strong ferromagnetic coupling between pairs of hydroxo-bridged copper ions. This interpretation is supported by the temperature dependence of the magnetic susceptibility of the solid sample. In Fig. 2 the χT product *vs.* *T* curve per tetramer unit is reported: at room temperature χT is $2.64 \text{ cm}^3 \text{ mol K}^{-1}$, consistent with two $S = 1$ with $g_{\text{ave}} = 2.29$. Below *ca.* 120 K χT decreases on lowering temperature reaching $2.22 \text{ cm}^3 \text{ mol K}^{-1}$ at 2.5 K, indicating the presence of both antiferromagnetic interactions and of ZFS of the ground triplet state.

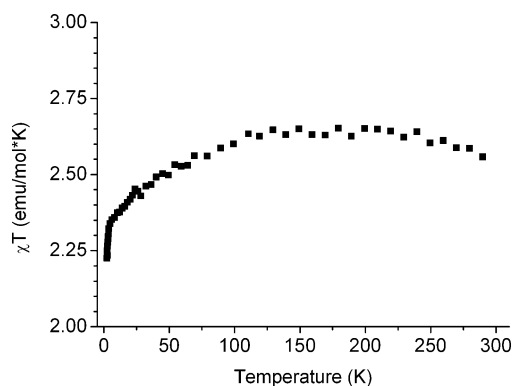


Fig. 2 Temperature dependence of the χT product per tetramer unit of the solid sample. Data were obtained with an applied field of 0.1 Oe.

These similar spectroscopic features of the complex in solution and in the solid state support the hypothesis that the $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2$ assemblies observed in the solid state are also retained in aqueous solution.

The unusual assembly of a cyclic $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ units in solution is probably favoured by presence of the rigid acridine moiety, which imposes enough strain to divide the macrocyclic cavity of *L* into two separated binding subunits (in the $[\text{Cu}_2\text{L}]$ macrocyclic moieties the two metals are separated by a distance greater than 8 Å). Only a couple of adjacent nitrogen donors are likely to be involved in the coordination of a single Cu(II), leaving free binding sites on the metal which can be used to coordinate exogenous species. Actually, in the case of Cu(II) complexes with

small bidentate ligands, such as ethylenediamine, the free binding sites are used by the metal ion for the coordination of a second ligand molecule, affording 1:2 complexes. This arrangement cannot be achieved in the case of the sterically hindered $[\text{Cu}_2\text{L}]$ complex. This fact, together with the marked tendency of Cu(II) to form Cu–OH complexes, can favour the formation of a $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2$ assembly. At the same time, the large distance between the Cu(II) ions in each $[\text{Cu}_2\text{L}]$ complex subunits rules out the possibility that hydroxide anions could bridge the two metals enclosed within the cavity of the ligand. These structural features favour the formation of the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ cyclic structure, which allows the four Cu(II) to achieve a more saturated coordination sphere, thanks to the simultaneous formation of four Cu–OH–Cu bridges.

Crystal structure of $[\text{Cu}_8\text{L}_4(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_3](\text{NO}_3)_5 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$

The crystal structure shows that this compound is composed of two different tetranuclear cations, $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-NO}_3)]^{3+}$ (**a**) and $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-NO}_3)_2]^{2+}$ (**b**), nitrate anions and water molecules. ORTEP representations of the two complexes are reported in Fig. 3, while bond lengths and angles for the metal coordination environments are given in Table 2.

Complexes **a** and **b** show similar structural features. As shown in Fig. 3, both complexes are formed by two $[\text{Cu}_2\text{L}]$ subunits, linked by hydroxide and nitrate anions bridging two Cu(II) ions of different $[\text{Cu}_2\text{L}]$ moieties. In both metallomacrocycles **a** and **b**, each Cu(II) ion is coordinated by two adjacent amine groups

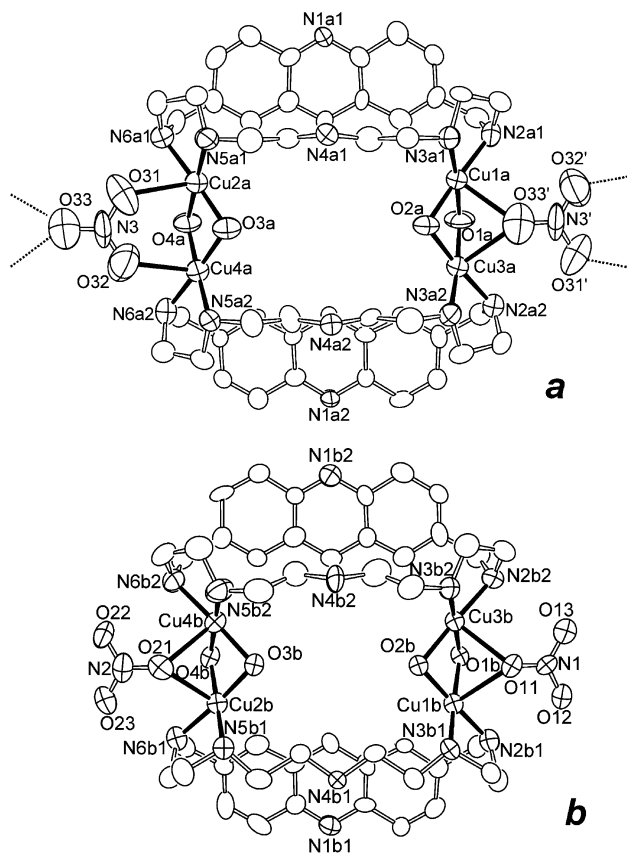


Fig. 3 ORTEP drawing of the **a** and **b** complexes. Nitrate anions and water molecules not bound to the metals are omitted.

Table 2 Bond distances (Å) and angles (°) for the metal coordination environments in $[\text{Cu}_4\text{L}_8(\mu\text{-OH})_8(\mu\text{-NO}_3)_3](\text{NO}_3)_5 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$

a unit		b unit	
Cu1a–O1a	1.951(8)	Cu1b–O1b	1.949(7)
Cu1a–O2a	1.924(7)	Cu1b–O2b	1.963(7)
Cu1a–N2a1	2.04(1)	Cu1b–N2b1	2.04(1)
Cu1a–N3a1	2.000(9)	Cu1b–N3b1	1.96(1)
Cu1a–O33'	2.46(1)	Cu1b–O11	2.609(8)
Cu2a–O3a	1.894(8)	Cu2b–O3b	1.958(7)
Cu2a–O4a	1.960(9)	Cu2b–O4b	1.954(8)
Cu2a–N5a1	2.03(1)	Cu2b–N5b1	1.99(1)
Cu2a–N6a1	2.06(1)	Cu2b–N6b1	1.971(9)
Cu2a–O31	2.52(1)	Cu2b–O21	2.57(1)
Cu3a–O1a	1.945(8)	Cu3b–O1b	1.992(8)
Cu3a–O2a	1.944(8)	Cu3b–O2b	1.925(7)
Cu3a–N2a2	2.03(1)	Cu3b–N2b2	2.000(9)
Cu3a–N3a2	2.00(1)	Cu3b–N3b2	1.98(1)
Cu3a–O33'	2.48(1)	Cu3b–O11	2.482(8)
Cu4a–O3a	1.912(9)	Cu4b–O3b	1.929(7)
Cu4a–O4a	1.994(8)	Cu4b–O4b	1.975(9)
Cu4a–N5a2	1.99(1)	Cu4b–N5b2	1.97(1)
Cu4a–N6a2	1.99(1)	Cu4b–N6b2	1.998(9)
Cu4a–O32	2.49(1)	Cu4b–O21	2.493(9)
Cu1a–O1a–Cu3a	91.5(3)	Cu1b–O1b–Cu3b	88.9(3)
Cu1a–O2a–Cu3a	92.3(3)	Cu1b–O2b–Cu3b	90.5(3)
Cu2a–O3a–Cu4a	96.4(3)	Cu2b–O3b–Cu4b	88.0(3)
Cu2a–O4a–Cu4a	91.8(3)	Cu2b–O4b–Cu4b	86.8(3)

Symmetry code: ' = 0.5 – x, y – 0.5, –z

of the macrocycle, two bridging hydroxide anions and one nitrate oxygen atom in a resulting distorted square pyramidal geometry. In **a** a couple of Cu(II) ions (Cu1a and Cu3a) are bridged by a monodentate nitrate (O33' in Fig. 3a), while the Cu2a–Cu4a couple is linked by a bridging bidentate nitrate (O31 and O32). In consequence, the coordination polyhedra of Cu1a and Cu3a share the face defined by O1a, O2a and O33', while those of Cu2a and Cu4a share the single O3a–O4a edge. The distances between $\mu\text{-OH}$ bridged Cu(II) ions are 2.760(2) Å for the Cu1a–Cu3a couple and 2.701(2) Å for the Cu2a–Cu4a one, while the distances between the two Cu(II) ions coordinated by the same macrocyclic subunit are 8.263(2) Å for Cu1a–Cu2a and 8.278(2) Å for Cu3a–Cu4a.

In **b** both nitrate anions behave as monodentate ligands, with a single oxygen atom bridging the two metals (O11 and O21 in Fig. 3b). The square-pyramidal coordination polyhedra of each couple of adjacent Cu(II) ions share a face (O1b–O2b–O11 for the Cu1b–Cu3b couple and O3b–O4b–O21 for the Cu2b–Cu4b one).

The distances between the two $\mu\text{-OH}$ bridged Cu(II) ions and the Cu(II) ions belonging to the same macrocyclic units are almost equal to the corresponding distances in **a** (see ESI, Table S3†).

In both **a** and **b**, the acridine moieties are almost perpendicular to the mean planes defined by the pentamine chains of the macrocycle. Conversely, the two macrocyclic units linked by the two $(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}_2$ cores define a hydrophilic cavity of approximate dimension 5.7×6.2 Å in **a** and 5.5×5.3 Å in **b**.

An inspection of the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_x(\mu\text{-NO}_3)_x]^{(4-x)+}$ cluster structures can provide some hints to interpret the observed magnetic behavior. Even if the presence of a complex pattern of many different interaction pathways hampers any reasonable fit of the magnetic data, a qualitative interpretation can be attempted. Indeed the magneto-structural correlation in di- μ -hydroxo-copper(II) dimers has been extensively investigated in the past three decades²⁶ and

the type and magnitude of the magnetic interaction has been found to linearly depend on the Cu–O–Cu bond angle (θ), being ferromagnetic for θ values lower than 97.5° .²⁷ Moreover deviation from planarity (hinge distortion) of the Cu_2O_2 units were also reported to displace the exchange coupling constant towards ferromagnetic values.²⁸ A strong ferromagnetic interaction between the hydroxo bridged ions should then be expected in our case considering the reduced values of the angles at the Cu–OH–Cu bridges, which range from 91.5° to 96.4° in tetranuclear cations **a** and from 86.8° to 90.5° in **b** and the strong deviation from planarity exhibited by all the hydroxo-bridged Cu couples (the hinge distortion ranges between 40° and 50°). Weaker antiferromagnetic interactions with different magnitude can then be operative between the $S = 1$ states either through the nitrate bridge in clusters **b**, or mediated by the polyamine macrocyclic ligand.

Complexes **a** and **b** give rise to two structural motifs in the crystal packing, due to the different coordination behaviour displayed by the bridging nitrate anions in the two metallomacrocycles (Fig. 4). In fact, while in **b** two oxygens of each monodentate nitrate anion do not give further coordination bonds, in **a** the nitrate anions are used to connect two couples of $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2$ cores belonging to adjacent metallomacrocycles (Fig. 3a and 4a). The **a** units, linked by metal-bridging nitrate anions, give rise to infinite zig-zag chains growing along the *b* axis. Furthermore, the two acridine

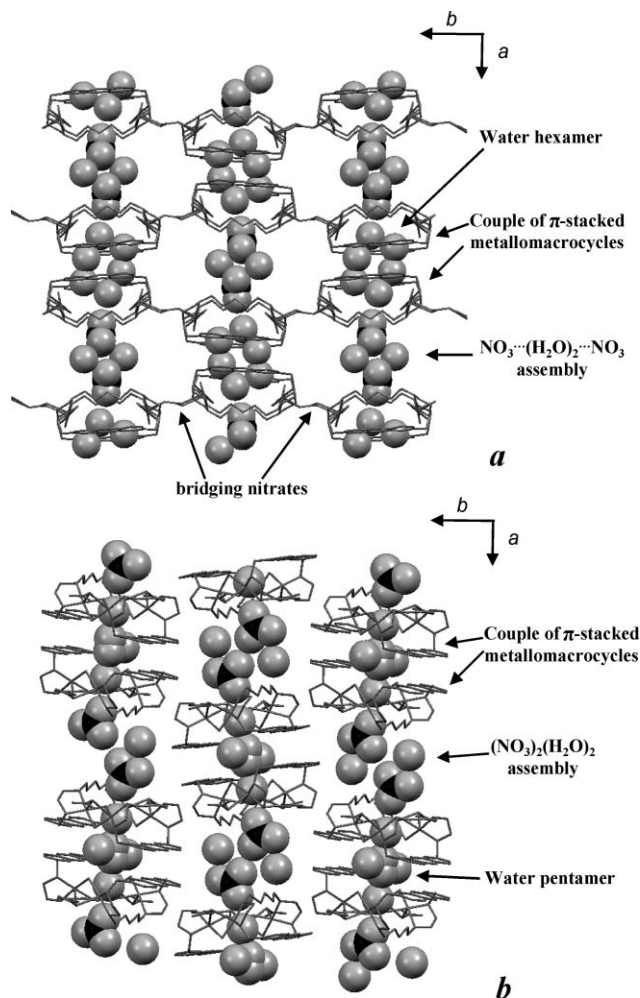


Fig. 4 View of the **a**-based and **b**-based sheets.

moieties of each **a** complex of a chain are coupled *via* face-to-face π -stacking interactions with symmetry-related acridine moieties of a metallomacrocycle belonging to an adjacent chain (distance between the planes of the coupled acridine units 3.4 Å). This results in a parallel disposition of columns composed by couples of stacked metallomacrocycles along the *a* axis. The columns are joined by NO₃⁻ bridges to form a final 2D sheets of **a** units parallel to the *ab* plane (Fig. 4a).

In the case of the **b** complex, couples of metallomacrocycles, paired by π -stacking interactions between acridine moieties, assume a columnar disposition growing along the *a* axis. The parallel disposition of these columns gives rise, once again, to a sheet of **b** units lying the *ab* plane (Fig. 4b).

Finally, **a**-based and **b**-based sheets alternate along the *c* axis, giving rise to a regular array of four different types of channels, which grow along the *a* axis, filled by water molecules and/or nitrate anions associated *via* hydrogen bonding to give four different motifs of 1D chains. The crystal structure, however, shows also the presence of water molecules and nitrate anions not enclosed in these channels. These latter are not associated in chain-like structures and in some cases are affected by disorder and/or high thermal motion.

As shown in Fig. 4, two channels pass through the columns formed respectively by the cavities of the **a** and **b** metallomacrocy- cles. In the case of the **a**-based motif, the 1D channel is filled by six-membered clusters of water molecules alternated with couples of nitrate ions bridged by two water molecules, held by typical hydrogen bonds (Fig. 4a). Each cluster is constituted by six symmetry related water molecules (Ow3, Ow15 and Ow17) associated *via* strong O–H...O interactions (average O...O distance 2.73 Å, see Table S4 for details†). As already observed in other water hexamers,²⁹ the centrosymmetric cluster adopts a ice-like chair conformation.

Similarly, the **b**-based columns along the *a* axis give rise to channels passing through the **b** metallomacrocy- cles and filled by repeated sequences of crosswise water pentamers and couples of nitrate anions and water molecules (Fig. 4b), associated *via* hydrogen bonding. In the pentameric cluster, the water molecule connecting the four vertices is distributed over two equally populated sites (Ow5 and Ow5'); the averaged O...O distance between hydrogen bonding associated water molecules is 2.77 Å (see Table S5 for details†).

Of note, the hexameric clusters in **a** and pentameric ones in **b** are enclosed within the cavity formed by a couple of π -stacked metallomacrocy- cles, shielded from hydrogen bonding contacts with external water molecules or nitrates (Fig. 5a and 5b). Conversely, the assembly of the clusters seems to be favoured by a series of hydrogen bond contacts with the hydroxide anions of the Cu₂(μ -OH)₂ units [O4a...Ow3' (1 - *x*, 1 - *y*, -*z*) 2.88(2) Å, O3a...Ow15 2.86(1) Å, O1a...Ow17 2.84(2) Å for the water hexamer in **a** and O3b...Ow8 3.01(1) Å, O2b...Ow8 2.91(1) Å, O1b...Ow14' (2 - *x*, 1 - *y*, 1 - *z*) 2.89(1) Å, O4b...Ow14 2.91(1) Å for the water pentamer in **b**], which actually constitute two side-walls of the channel (Fig. 5a and 5b). The hexameric clusters in **a** are joined together by couples of nitrate anions bridged by two water molecules (Fig. 5c). These NO₃... (H₂O)₂...NO₃ assemblies lie outside the cavities defined by two π -stacked metallomacrocy- cles and display hydrogen bond contacts between the nitrate oxygens O82 and O83 and the nitrogen atoms (N4a1 and N4a2) not

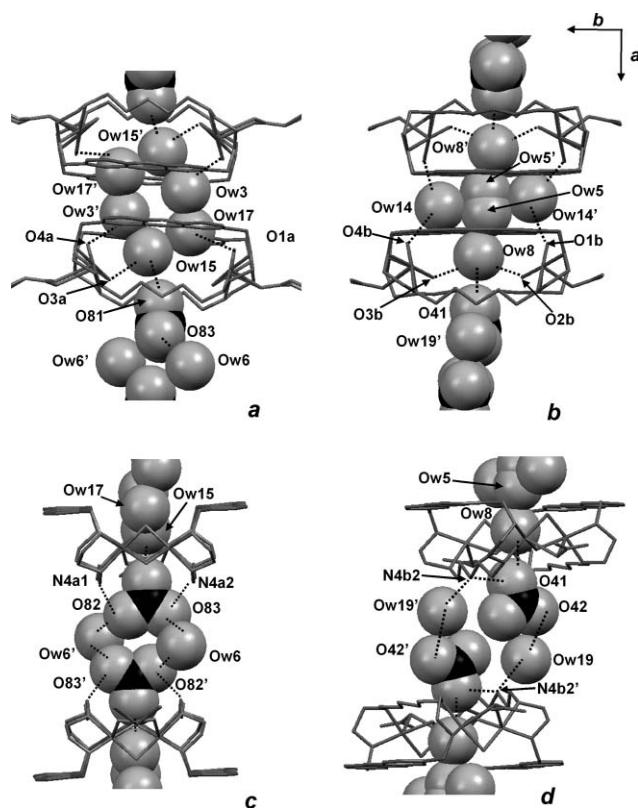


Fig. 5 Enlarged views of the hexameric (a) and pentameric (b) clusters enclosed within the cavity generated by π -stacked metallomacrocy- cles and of the NO₃... (H₂O)₂...NO₃ (c) and (NO₃)₂(H₂O)₂ (d) motifs connecting two adjacent clusters in the **a** and **b** complexes.

involved in metal coordination belonging to the two pentamine chain of the metallomacrocycle (see ESI, Table S5†). Finally, the water molecules Ow6 and Ow6', which bridge the nitrate groups, show hydrogen bonding contacts with external waters and nitrates (not shown in Fig. 5).

Similarly to the water hexamers, the pentameric clusters are linked *via* hydrogen bonding by (NO₃)₂(H₂O)₂ subunits located outside the metallomacrocycle cavities (Fig. 5d). A nitrate oxygen (O41) and a water oxygen (Ow19') also display hydrogen bond interactions with the unbound nitrogen of the pentamine chain N4b2 (see ESI, Table S7†).

Macrocy- cles³⁰ and their complexes^{3c,12c,14,15b,16,17} have been widely used as building blocks for the assembly of networks containing channels or cavities able to host different water motifs; however, the cases of water chains or clusters enclosed within the cavities of metallomacrocy- cles are still rather rare.^{9,12a,14} In this respect, the organisation in chains passing through the cavity of self- assembled metallomacrocy- cles, shown by the clusters in the **a** and **b** complexes, represents a novel feature.

As shown in Fig. 6, the **a**-based and **b**-based columns aligned along the *a* axis give rise to two additional channels (**c** and **d** in Fig. 6), filled respectively by chains formed by water molecules only or by nitrate anions and water molecules associated *via* hydrogen bonding. In particular, the **c** channels are filled by repeated sequences of four crystallographically independent water molecules (Ow2, Ow22, Ow32 and Ow1, Ow1 being distributed over two sites) in a zig-zag fashion. The mean distance between two

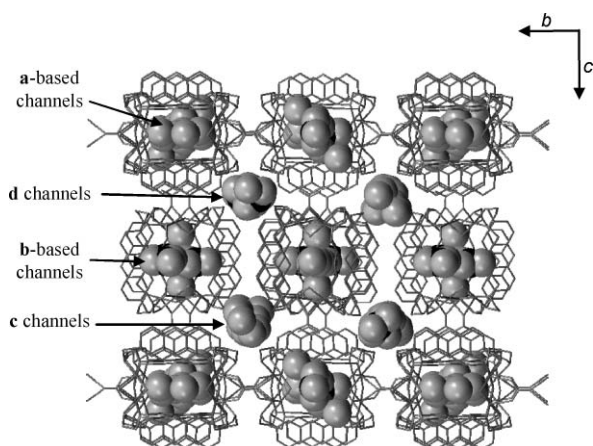


Fig. 6 View of the crystal packing along the *a* axis, displaying the four different types of water channels.

adjacent water molecule is 2.92 Å. The **d** channels contain dimers of hydrogen bonded water molecules (Ow26, Ow29) alternated to a single disordered nitrate anion (N7[−]) (see ESI, Table S8[†]).

Concluding remarks

Acridine is a large and rigid heteroaromatic unit, well known for its ability to interact *via* π -stacking with aromatic units. These characteristics seem to determine the coordination properties of **L** toward Cu(II). In fact, the presence of the rigid acridine moiety within the cyclic backbone of **L** stiffens the macrocyclic structure, which results in the division to two well-separated binding moieties. In consequence, only a couple of nitrogen donors can be involved in the binding of a single metal cation. Furthermore, Cu(II) has a marked tendency to form $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_x$ cores ($x = 1\text{--}3$). In this case, the two metals enclosed within the cavity of **L** cannot “communicate” together through the coordination of bridging hydroxide anions. This leads to the formation of the $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4]^{4+}$ metallomacrocyclic, where each Cu(II) simultaneously interacts with a second metal of a different $[\text{Cu}_2\text{L}]$ subunit through two bridging hydroxide anions. Conversely, the tendency of acridine to give π -stacked adducts leads to the formation in the solid state of dimeric assemblies of $[\text{Cu}_4\text{L}_2(\mu\text{-OH})_4(\mu\text{-NO}_3)_x]^{(4-x)+}$ metallomacrocycles, characterised by a hydrophilic cavity where water hexamers or pentamers are enclosed. Of note, the $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2$ cores play an important role also in the assembly of these water clusters, which appears to be stabilised mainly through hydrogen bonding interactions with the bridging hydroxide.

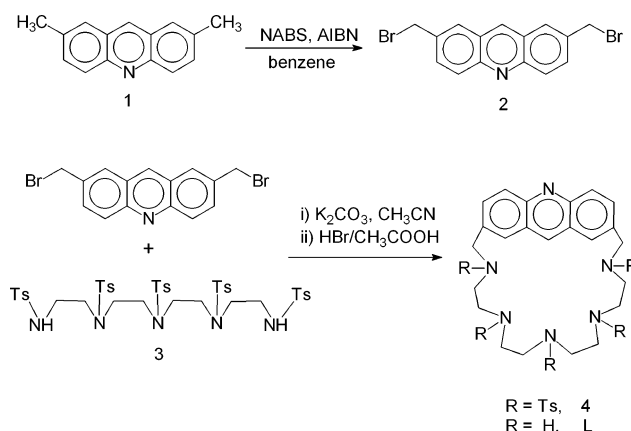
Experimental

General methods

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian VXR 300 MHz instrument. UV-vis spectra at different pH values were collected on 0.1 M NMe_4Cl aqueous solutions by using a Perkin-Elmer Lambda 25 instruments. The pH was adjusted by small additions of 1 M NMe_4OH or HCl solutions.

Synthesis of ligand **L** and its Cu(II) complex

Ligand **L** was synthesised by reaction of 2,7-dibromomethylacridine (**2**) with 1,4,7,10,13-pentatosyl-1,4,7,10,13-pentaazatridecane³¹ (**3**). The resulting tosylated macrocycle **4** was deprotected in HBr/ CH_3COOH mixture. 2,7-Dimethylacridine (**1**) was synthesized as previously described.^{19d} A sketch of the synthetic procedure is reported in Scheme 3.



Scheme 3

2,7-Dibromomethylacridine (2). A suspension of **1** (4.21 g, 2.03×10^{-2} mol), α,α' -aza bis(isobutyro)nitrile (0.67 g, 4.8×10^{-3} mol) and N-bromosuccinimide (7.59 g, 4.26×10^{-2} mol) in benzene (170 cm^3) was refluxed for 5 h. The resulting suspension was cooled at room temperature, filtered and the resulting solution was vacuum evaporated to give an orange powder. The solid was dissolved in CHCl_3 (100 cm^3) and extracted with a solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 M (4 \times 50 cm^3), with a solution of Na_2CO_3 (3 \times 50 cm^3) and finally with a solution of NaCl (1 \times 50 cm^3). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and the solvent was then evaporated under reduced pressure. The solid residue was recrystallized from CHCl_3 . Yield: 2.30 g (6.30×10^{-3} mol; 31%). Anal. calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{Br}_2\text{N}$: C, 49.35; N, 3.84; H, 3.04%. Found: C, 49.3; N, 3.8; H, 3.0%. ¹H-NMR (CDCl_3): δ (ppm) 8.73 (s, 1H), 8.26 (d, 2H), 8.01 (s, 2H), 7.86 (d, 2H), 2.63 (s, 4H). ¹³C-NMR (CDCl_3): δ (ppm) 136.87, 135.76, 132.51, 130.43, 127.84, 126.53, 33.53, 30.02.

2,5,8,11,14-Pentatosyl-2,5,8,11,14-pentaaza[15]-(2,7)-acridinophane (4). A suspension of **2** (2.30 g, 6.30×10^{-3} mol) in dry CH_3CN (200 cm^3) was added dropwise over a period of 4 h to a refluxing and vigorously stirred suspension of **3** (6.05 g, 6.30×10^{-3} mol) and K_2CO_3 (16.0 g, 6.3×10^{-2} mol) in dry CH_3CN (100 cm^3).

After the addition was completed, the solution was refluxed for additional 5 h. The resulting suspension was filtered and the solution was vacuum evaporated to give a crude oil, which was purified by column chromatography on neutral alumina (activity II/III, CH_2Cl_2 /ethylacetate, 8:1 v/v as eluent). The eluted fractions were collected and evaporated to dryness, affording **4** as a white solid compound. Yield: 2.27 g (1.95×10^{-3} mol 31%). Anal. calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{S}_5\text{O}_{10}$: C, 59.88; H, 5.37; N, 7.22%. Found: C, 59.8; H, 5.4; N, 7.1%.

2,5,8,11,14-Pentaaza[15]-cyclo(2,7)-acridinophane hexahydrobromide (L-6HBr). Compound **4** (1.16 g, 1×10^{-3} mol) and

phenol (13.2 g, 0.140 mol) were dissolved in a 33% HBr/CH₃COOH mixture (120 cm³). The reaction mixture was kept under stirring at 90° C for 24 h until a precipitate was formed. The solid was filtered out and washed several times with CHCl₂. The hexahydrobromide salt was recrystallized from an EtOH–water 3 : 1 mixture, yield 0.63 g (7.2 × 10⁻⁴ mol, 72%). Anal. calcd for C₂₃H₃₂N₆·6HBr: C, 31.46; N, 9.57; H, 4.36%. Found: C, 31.4; N, 9.5; H, 4.3%. ¹H-NMR (D₂O, pH = 2.30): δ (ppm) 9.86 (s, 1H), 8.67 (s, 2H), 8.42 (d, 2H), 8.22 (d, 2H) 4.69 (s, 4H), 3.12 (d, 4H), 2.94 (d, 4H), 2.79 (d, 4H), 2.74 (d, 4H). ¹³C-NMR (D₂O, pH = 2.30): δ (ppm) 151.87, 140.8, 139.23, 133.77, 129.21, 126.41, 121.67, 50.32, 43.75, 43.16, 42.86, 40.05.

[Cu₈L₄(μ-OH)₈(μ-NO₃)₃](NO₃)₅·32H₂O. A solution of Cu(NO₃)₂·3H₂O (11.6 mg, 0.048 mmol) in water (5 cm³) was slowly added to an aqueous solution (10 cm³) containing L·6HBr (21.5 mg 0.024 mol). The pH was adjusted to 7.0 with 0.01 M NaOH. Blue crystals of the complex suitable for X-ray analysis were obtained by slow evaporation of the resulting solution at room temperature. Yield 16.5 mg (84%). Anal. calcd for C₉₂H₂₀₀Cu₈N₃₂O₆₄: C, 33.62; N, 13.64; H, 6.13%. Found: C, 33.0; N, 13.4; H, 6.3%.

Potentiometric measurements

All the pH metric measurements (pH = -log[H⁺]) were carried out in degassed 0.1 mol dm⁻³ NMe₄Cl aqueous solutions, at 298.1 K by using equipment and procedures which have been already described.³² The combined Ingold 405 S7/120 electrode was calibrated as a hydrogen concentration probe by titrating known amounts of HCl with CO₂-free NMe₄OH solutions and determining the equivalent point by the Gran's method³³ which allows the determination of the standard potential *E*^o, and the ionic product of water (p*K*_w = 13.73(1) at 298.1 K in 0.1 mol dm⁻³ NMe₄Cl). Protonation constants of L ligands are supplied in Tables S1.† In the experiments to determine the stability of the Cu(II) complexes with L the ligand concentration was varied from 5 × 10⁻⁴ to 5 × 10⁻³ M, while the Cu(II) concentration was varied in the range 4 × 10⁻⁴ to 9 × 10⁻³ M. At least three measurements (about 150 data points each one) were performed for each system in the pH range 2.5–10.5 and the relevant e.m.f. data were treated by means of the computer program HYPERQUAD.²⁵ In the HYPERQUAD program the sum of the weighted square residuals on the observed emf values is minimized. The weights were derived from the estimated errors in emf (0.2 mV) and titrant volume (0.002 cm³). The most probable chemical model was selected by following a strategy based on the statistical inferences applied to the variance of the residuals, σ². This parameter represents a measure of the precision of the fit between the experimental and theoretical titration curves. The sample standard deviation should be 1, in the absence of systematic errors and when a corrected weighting scheme is used. However, the agreement is considered good for standard deviation values smaller than 3 (σ² < 9).²⁵ The σ² values for each titration curve and for the overall set of curve are reported within the ESI (Table S1).†

EPR and magnetic measurements

X-Band EPR spectra were recorded on a Bruker Elexsys E500 spectrometer equipped with a liquid N₂ (ER4131VT) cryostat.

Magnetic susceptibility was measured with an applied field of 0.1 T on a Cryogenic S600 Squid magnetometer.

X-Ray structure determination

Prismatic blue crystals of [Cu₈L₄(μ-OH)₈(μ-NO₃)₃](NO₃)₅·32H₂O suitable for X-ray diffraction analysis were used for room temperature data collection on a diffractometer equipped with a CCD detector (Bruker). Data acquisition, reduction and absorption correction were performed using SMART, SAINT and SADABS programs.³⁴ Loss of intensity was observed during data collection, probably due to loss of solvent molecules, which did not allow us to obtain completeness higher than 85%. Attempts to obtain a data collection with higher completeness, both at room and low temperature (*T* = 150 K), were unsuccessful.

The structure was solved by means of direct methods of SIR97 program,³⁵ and refined by SHELXL.³⁶ Anisotropic displacement parameters were used for all non-hydrogen atoms, with the exception of the disordered water molecules which were refined with partial population parameters and isotropic thermal factors. Hydrogen atoms were introduced in calculated positions and refined using a riding model. No hydrogen atoms for the solvent water molecules were found in the Δ*F* map. Only reflections up to the resolution limit of 0.95 Å were used, due to the limited number of observed reflections at high θ values.

Disorder and/or thermal motion affect some nitrate anions and water molecules (in particular those not organised in chain-like structures), which show high values for the anisotropic displacement parameters. Double positions were found for one nitrate anion (N7, O71, O72, O73 and N7', O71', O72', O73', population parameters = 0.5) and for two water molecules (Ow1 and Ow1', population parameters = 0.7 and 0.3, respectively; Ow6 and O6, population parameters = 0.6 and 0.4, respectively). Ten water molecules (Ow2, Ow4, Ow5, Ow26, Ow30, Ow33, Ow34, Ow35, Ow36, Ow37) were refined using a value of 0.5 for the occupation factor.

Crystal data. C₉₂H₂₀₀Cu₈N₃₂O₆₄, *M* = 3287.16, monoclinic, space group *P*2₁/*a* (*Z* = 4), *a* = 19.647(1) Å, *b* = 28.417(2) Å, *c* = 26.741(1) Å, β = 96.067(5)°, *V* = 14846(1) Å³, *T* = 298 K, λ = 1.5418 Å, μ(Cu-Kα) = 2.079 mm⁻¹, 52059 reflections measured, 15340 unique reflections (*R*_{int} = 0.096) which were used in all calculations, final *R*₁ = 0.0795 (1794 refined parameters and 6102 reflections with *I* > 2σ(*I*)) and *wR*₂ = 0.2542 (all data).

References

- (a) P. Mahata and S. Natarajan, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 1250; (b) X. Lin, A. J. Blake, C. Wilson, X. M. Sun, N. R. Champness, M. W. George, P. Hubberstey, P., R. Mokaya and M. Schröder, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10745; (c) B. D. Chandler, D. T. Cramb and G. K. H. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10403; (d) A. G. Wong-Foy, A. J. Matzger and O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3494; (e) G. Ferey, C. M. Draznieks, C. Serre, F. Millange, J. Dutour, S. Surble and L. Margiolaki, *Science*, 2005, **309**, 2040; (f) C. N. R. Rao, S. Natarajan and R. Vaidhyanathan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 1466; (g) X. H. Bu, M. L. Tong, H. C. Chang, S. Kitagawa and S. R. Batten, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 192.
- For a classification of water clusters: L. Infantes and S. Motherwell, *Cryst. Eng. Commun.*, 2002, **4**, 454.
- (a) X. Luan, Y. Wang, L. Zhou, X. Cai, C. Zhou and Q. Shi, *J. Mol. Struct.*, 2005, **750**, 58; (b) S. Manikumari, V. Shivaiah and S. K. Das,

- Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 6953; (c) D. K. Chand and P. K. Bharadwaj, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 5050.
- 4 (a) P. S. Lakshminarayanan, D. K. Kumar and P. Ghosh, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 7540; (b) N.-H. Hu, Z.-G. Li, J.-W. Xu, H.-Q. Jia and J.-J. Niu, *Cryst. Growth Des.*, 2007, **7**, 15; (c) P. Mahata and S. Natarajan, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 1250; (d) L.-Q. Xiong, C.-M. Qi, H. Yu and S.-W. Liang, *Acta Cryst.*, 2007, **C63**, m117-m119; (e) G. Beobide, O. Castillo, A. Luque, U. Garcia-Couceiro, J. P. Garcia-Teran and P. Roman, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 5367.
- 5 J.-P. Zhang, Y.-Y. Lin, X.-C. Huang and X.-M. Chen, *Cryst. Growth Des.*, 2006, **6**, 519.
- 6 (a) U. Mukhopadhyay and I. Bernal, *Cryst. Growth Des.*, 2006, **6**, 363; (b) I. Bernal and J. L. Bear, *J. Chem. Cryst.*, 2002, **32**, 485; (c) Y.-P. Wu, C.-J. Wang, Y.-Y. Wang, P. Liu, W.-P. Wu, Q.-Z. Shi and S.-M. Peng, *Polyhedron*, 2006, **25**, 3533; (d) S. K. Ghosh and P. K. Bharadwaj, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2005, 4880; (e) R. D. Bergougnant, A. Y. Robin and K. M. Fromm, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 10751; (f) K.-M. Park, R. Kuroda and T. Iwamoto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1993, **32**, 3771; (g) B. Zhao, P. Cheng, X. Chen, C. Cheng, W. Shi, D. Liao, S. Yan and Z. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3012; (h) U. Mukhopadhyay and I. Bernal, *Cryst. Growth Des.*, 2005, **5**, 1687.
- 7 (a) S. Zang, Y. Su, C. Duan, Y. Li, H. Zhu and Q. Meng, *Chem. Commun.*, 2006, 4997; (b) F.-Q. Wang, X.-J. Zheng, Y.-H. Wan, C.-Y. Sun and Z.-M. Wang, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 2956; (c) J.-P. Zhang, Y.-Y. Lin, X.-C. Huang and X.-M. Chen, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 3150.
- 8 (a) N. SeethaLekshmi and V. R. Pedireddi, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2400; (b) D.-S. Li, Y.-Y. Wang, X.-J. Luan, P. Liu, C.-H. Zhou, H.-R. Ma and Q.-H. Shi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2005, 2678; (c) X.-Q. Song, W. Dou, W.-S. Liu and J.-X. Ma, *Inorg. Chem. Commun.*, 2007, **10**, 419.
- 9 L. J. Barbour, G. Orr and J. L. Atwood, *Nature*, 1998, **393**, 671.
- 10 (a) S. Neogi, G. Savitha and P. K. Bharadwaj, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 3771; (b) M. S. Deshpande, A. S. Kumbhar, V. G. Puranik and K. Selvaraj, *Cryst. Growth Des.*, 2006, **6**, 743; (c) H.-H. Song and B.-Q. Ma, *Cryst. Eng. Commun.*, 2007, **9**, 625.
- 11 (a) Y. Chi, K. Huang, S. Zhang, F. Cui, Y. Xu and C. Hu, *Cryst. Growth Des.*, 2007, **7**, 2449 [(H₂O)₂₀, (H₂O)₂₆]; (b) S. K. Ghosh and P. K. Bharadwaj, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 6887 (hexadecamer); (c) S. K. Ghosh, J. Ribas, M. S. E. Fallah and P. K. Bharadwaj, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 3856 (tetradecamer); (d) M. S. Deshpande, A. S. Kumbhar, V. K. Puranik and K. Selvaraj, *Cryst. Growth Des.*, 2006, **6**, 743 (tetradecamer).
- 12 (a) Neogi and P. K. Bharadwaj, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 816; (b) B.-C. Tzeng, B.-S. Chen, H.-T. Yeh, G.-H. Lee and S.-M. Peng, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 1087; (c) H.-J. Kim, H.-J. Jo, J. Kim, S.-Y. Kim, D. Kim and K. Kim, *Cryst. Eng. Commun.*, 2005, **7**, 417.
- 13 (a) Z. Fei, D. Zhao, T. J. Geldbach, R. Scopelliti, P. J. Dyson, S. Antonijeivic and G. Bodenhausen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 5720; (b) C. Biswas, M. G. B. Drew and A. Ghosh, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 4513.
- 14 J. W. Ko, K. S. Min and M. P. Su, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 2151.
- 15 (a) V. Shivaiah, T. Chatterjee, K. Srinivasu and S. K. Das, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, 231; (b) V. Gasperov, S. G. Galbraith, L. F. Lindoy, B. R. Rumbel, B. W. Skelton, P. A. Tasker and A. H. White, *Dalton Trans.*, 2005, 139; (c) R. Murugavel, P. Kumar, M. G. Walawalkar and R. Mathialagan, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 6828.
- 16 S. P. Gavrish, Y. D. Lampeca, P. Lightfoot and H. Pritzkow, *Dalton Trans.*, 2007, 4708.
- 17 (a) T.-T. Luo, L.-Y. Hsu, C.-C. Su, C.-H. Ueng, T.-C. Tsai and K.-L. Lu, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 1532; (b) K. S. Min and M. P. Suh, *Chem. Eur. J.*, 2001, **7**, 303; (c) J.-G. Mao, Z. Wang and A. Clearfield, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 3713; (d) H. J. Choi and M. P. Suh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 15844.
- 18 (a) A. Bencini, A. Bianchi, V. Fusi, C. Giorgi, A. Masotti and P. Paoletti, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 7686; (b) C. Lodeiro, A. J. Parola, F. Pina, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, A. Masotti and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 2968; (c) C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, P. Fornasari, C. Giorgi and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 6255; (d) C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, A. Danesi, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, J. C. Lima, F. Pina and M. A. Bernardo, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 5134; (e) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, A. Danesi, C. Giorgi, C. Lodeiro, F. Pina, S. Santarelli and B. Valtancoli, *Chem. Commun.*, 2005, 2630; (f) C. Bazzicalupi, S. Biagini, A. Bencini, E. Faggi, C. Giorgi, I. Matera and B. Valtancoli, *Chem. Commun.*, 2006, 4087; (g) C. Bazzicalupi, A. Bencini, L. Bussotti, E. Berni, S. Biagini, E. Faggi, P. Foggi, C. Giorgi, A. Lapini, A. Marcelli and B. Valtancoli, *Chem. Commun.*, 2007, 1230; (h) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, A. Danesi, E. Faggi, C. Giorgi, S. Santarelli and B. Valtancoli, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 2630; (i) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, E. Faggi, C. Giorgi, S. Santarelli and B. Valtancoli, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2240.
- 19 (a) P. Cudic, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, M. Cesario and T. Prange, *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, 2479; (b) M. Jourdan, J. Garcia Julian, J. Lhomme, M.-P. Teulade-Fichou, J.-P. Vigneron and J.-M. Lehn, *Biochemistry*, 1999, **38**, 14205; (c) H. Fenniri, M. W. Hosseini and J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 786; (d) M.-P. Teulade-Fichou, J.-P. Vigneron and J.-M. Lehn, *Supramol. Chem.*, 1995, **5**, 139; (e) H. Fenniri, M. W. Hosseini and J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 786; (f) M. W. Hosseini, A. J. Blacker and A. J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 3896; (g) M. W. Hosseini, A. J. Blacker and A. J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1988, 596.
- 20 S. C. Zimmerman, C. R. Lamberson, M. Cory and T. A. Fairley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 6805.
- 21 C. S. Rossiter, R. A. Mathews and J. R. Morrow, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 925.
- 22 (a) E. Kikuta, R. Matsubara, N. Katsube, T. Koike and E. Kimura, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **82**, 239; E. Kikuta, R. Matsubara, N. Katsube, T. Koike and E. Kimura, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, 2479; (b) E. Kimura, T. Ikeda, S. Aoki and M. Shionoya, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1998, **3**, 259.
- 23 A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-España, M. Micheloni and J. A. Ramirez, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **188**, 97.
- 24 P. Paoletti, *Pure Appl. Chem.*, 1984, **56**, 491.
- 25 P. Gans, A. Sabatini and V. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 807.
- 26 (a) W. E. Hatfield, *Magneto-Structural Correlations in Exchange Coupled Systems*, D. Reidel, Dordrecht, 1985, p. 555; (b) R. D. Willet, *Magneto-Structural Correlations in Exchange Coupled Systems*, D. Reidel, Dordrecht, 1985, p. 389; (c) D. Gatteschi, O. Kahn, O. Eds, *NATO ASI Series C 140*, Reidel Publ., Dordrecht, Holland, 1983.
- 27 V. H. Crawford, H. W. Richardson, J. R. Wasson, D. J. Hodgson and W. E. Hatfield, *Inorg. Chem.*, 1976, **15**, 2107.
- 28 (a) E. Ruiz, P. Alemany, S. Alvarez and J. Cano, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 3683; (b) E. Ruiz, P. Alemany, S. Alvarez and J. Cano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 1297.
- 29 B. K. Saha and A. Nangia, *Chem. Commun.*, 2007, 1825.
- 30 (a) P. S. Lakshminarayanan, E. Suresh and P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13132; (b) J. L. Atwood, L. J. Barbour and A. Jerga, *PNAS*, 2002, **99**, 4837; (c) P. K. Thallapally, G. O. Lloyd, J. L. Atwood and L. J. Barbour, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 3848; (d) J. L. Atwood, L. J. Barbour, T. J. Ness, C. L. Raston and P. L. Raston, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 7192; (e) J. van Eerden, M. Skowronska-Ptasinska, P. D. J. Grootenhuis, S. Harkema and D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 700; (f) T. Aree, I. Usón, B. Schulz, G. Reck, H. Hoier, G. M. Scheldrick and W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 3321; (g) R. D. Bergougnant, A. Y. Robin and K. M. Fromm, *Cryst. Growth Des.*, 2005, **5**(5), 1691; (h) C. Tedesco, I. Immediata, L. Gregoli, L. Vitigliano, A. Immirzi and P. Neri, *Cryst. Eng. Commun.*, 2005, **7**, 449; (i) O. Nimz, K. Gebler, I. Usón and W. Saenger, *Carbohydr. Res.*, 2001, **336**, 141; (j) A. C. Warden, M. Warren, M. T. Heam and L. Spiccia, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 6936; (k) T. Aree, H. Hoier, B. Schulz, G. Reck and W. Saenger, *Carbohydr. Res.*, 2000, **323**(1-4), 244; (l) V. Sidorov, F. W. Kotch, G. Abdrakhmanova, R. Mizani, J. C. Fettinger and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 2267.
- 31 A. Bencini, M. I. Burguete, E. Garcia-España, E., S. V. Luis, J. F. Miravet and C. Soriano, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 4749.
- 32 A. Bencini, A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, E. Garcia-España and M. A. Nino, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1991, 1171.
- 33 G. Gran, *Analyst (London)*, 1952, **77**, 661; F. J. Rossotti and H. Rossotti, *J. Chem. Educ.*, 1965, **42**, 375.
- 34 *Bruker Molecular Analysis Research Tool V 5.625*, Bruker AXS, Madison, WI, USA, 1997-2000.
- 35 A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Casciarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, G. Polidori and R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.*, 1999, **32**, 115.
- 36 G. M. Sheldrick, *SHELX-97*, Göttingen, 1997.

Polyamine Receptors Containing Dipyridine or Phenanthroline Units: Clues for the Design of Fluorescent Chemosensors for Metal Ions

Carla Bazzicalupi, Andrea Bencini,* Silvia Biagini, Antonio Bianchi,* Enrico Faggi, Claudia Giorgi, Melania Marchetta, Federico Totti, and Barbara Valtancoli^[a]

Dedicated to the Centenary of the Italian Chemical Society

Abstract: The synthesis of the macrocyclic receptor L1, which contains a tetraamine chain linking the 6,6'-positions of a 2,2'-dipyridine moiety, is reported. Its basicity properties and complexation features toward Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II} and Pb^{II} have been studied in aqueous solutions by means of potentiometric, UV/Vis spectroscopy and fluorescence emission measurements and compared with those of ligand L2, in which a 1,10-phenanthroline moiety replaces the dipyridine unit of L1. In metal coordination, L1 shows a marked selectivity toward Cd^{II} over Zn^{II} and Pb^{II}. The crystal structures of its metal complexes shows that L1 possesses a preferential tetradentate binding site for metal cations, composed of the dipyridine unit and the two adjacent ben-

zylic amine groups. This binding site has the proper dimension and conformation to selectively coordinate the Cd^{II} ion, as confirmed by DFT calculations carried out on the complexes. This coordinative zone is lost in L2. The rigidity of phenanthroline does not allow the simultaneous binding of both the benzylic amine groups to Zn^{II} and Cd^{II} and, in fact, one benzylic amine is not coordinated to these metal cations. The fluorescence emission properties of the L1 and L2 complexes are strongly pH dependent. Only the Zn^{II} and Cd^{II} complexes with L1 display fluores-

cence emission at neutral pH. This feature is related to the formation in solution at pH 7 of emissive protonated complexes of the type [M(H_xL)]^{(2+x)+} (x=1–3), in which all the nitrogen donors are involved in metal or proton binding. The emissive characteristics of these protonated complexes are confirmed by the fluorescence emission spectra collected on the [Zn(HL1)Br][ClO₄]₂ and [Cd(HL1)Br][ClO₄]₂ solid compounds dissolved in CH₃CN. Conversely, the Zn^{II} and Cd^{II} complexes with L2 are not emissive; in fact, they contain a benzylic amine group not involved in metal or proton binding that can quench the fluorescence emission of the fluorophore, thanks to a photo-induced electron-transfer process.

Keywords: chelates • fluorescence • host–guest systems • macrocycles • sensors

Introduction

There is current interest in the development of luminescent chemosensors for analytes in aqueous solution because of

their potential use in medicinal or analytical chemistry.^[1] In particular, metal cations are one of the most targeted substrates due to their biological and environmental relevance.^[1–21] The most common approach to the realisation of synthetic chemosensors is the design of molecules consisting of a binding and a signalling unit separated by a spacer (conjugate chemosensors) and a number of chemosensors of this type for different metal ions have been recently achieved. Among possible binding units, polyamine macrocycles are undoubtedly versatile receptors for metal cations.^[22–26] In fact, depending on their structural features, they can form stable metal chelates in aqueous solution and/or act as selective complexing agents for metal cations.^[11,12] From this point of view, polyamines are known for their ability to form stable complexes with metal cations of environmental or toxicological relevance, such as Cd^{II} or Pb^{II}. Fi-

[a] Dr. C. Bazzicalupi, Prof. A. Bencini, Dr. S. Biagini, Prof. A. Bianchi, Dr. E. Faggi, Dr. C. Giorgi, Dr. M. Marchetta, Dr. F. Totti, Prof. B. Valtancoli
Department of Chemistry
University of Florence
Via della Lastruccia 3
50019 Sesto Fiorentino, Firenze (Italy)
Fax: (+39)0554573364
E-mail: andrea.bencini@unifi.it
antonio.bianchi@unifi.it

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200900283>.

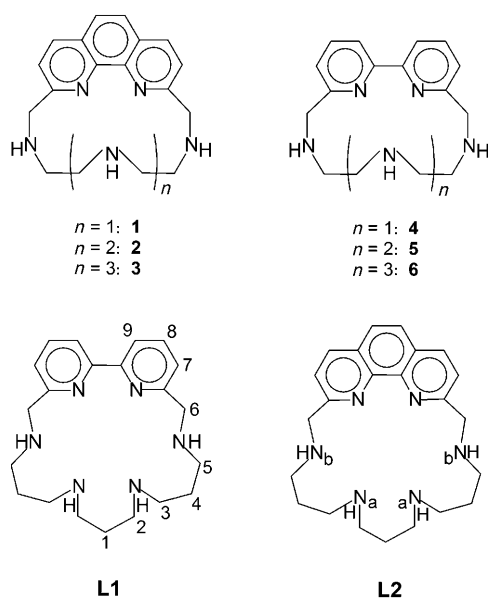
nally, the insertion of hydrophilic polyamine units within a structure containing a fluorogenic unit, most often a hydrophobic moiety, can ensure the resulting receptor of good solubility in aqueous media, a relevant condition for the achievement of molecular chemosensors for analytes of biological or environmental interest. Therefore, polyamines represent, in principle, optimal candidates for the synthetic assembly of chemosensors for metal cations. On the other hand, polyamines are also double-faced ligands: if they give stable complexes with many toxic metal cations, they often present scarce selectivity. For instance, polyamines generally form complexes with Zn^{II} , Cd^{II} and Pb^{II} with a similar stability in aqueous solutions.^[22,23] Furthermore, the ability of a chemosensor to bind and signal a selected metal cation depends on the characteristics of the medium in which the chemosensor is used, such as temperature and pH. In particular, the sensing ability of polyamine-based receptors can be strongly pH dependent.^[8–10,13,15,17] In fact, polyamines can easily protonate in aqueous solution. Protonation of polyamine groups competes with the process of metal complexation and often leads to the formation in solution of protonated metal complexes, in which acidic protons and metal cations in solution are simultaneously bound to the receptors. Even if a number of polyamine-based fluorescent chemosensors have been recently synthesised,^[1] the possible formation in solution of protonated complexes and the effect of protonation on the ability of the receptors in metal sensing have been scarcely investigated.^[8–10]

We have recently reported on the metal binding and sensing ability of a series of macrocyclic ligands consisting of a phenanthroline or a dipyrindine unit and a polyamine chain containing amine groups separated by ethylenic chains, such as **1–6** in Scheme 1.^[9,27] It was found that these receptors generally show scarce thermodynamic selectivity among the

Zn^{II} , Cd^{II} and Pb^{II} triad. In this paper we extend this study to similar phenanthroline- or dipyrindine-based polyazamacrocycles containing amine groups separated by propylenic chains (L1 and L2 in Scheme 1). At a first glance, this structural modification may appear to be of marginal relevance to determine the binding and sensing ability of the receptors. On the other hand, it is known that the replacement of ethylenic chains with propylenic ones may affect the selectivity pattern of polyamine ligands toward transition and post-transition metals, due to the higher flexibility of the ligands as well as to the larger coordination bite displayed by amine donors separated by the longer propylenic chains.^[28] Conversely, amine groups linked by propylenic chains are characterised by a stronger basicity in aqueous solution with respect to amines joined by ethylenic links.^[29] Finally, it is known that dipyrindine and phenanthroline display a similar binding feature toward metal cations,^[30] although the possible rotation of the two rings of dipyrindine around the 2,2'-bond makes dipyrindine slightly less rigid than phenanthroline. In principle, this latter structural feature could also influence the coordination features and emission properties of cyclic ligands containing these units, such as L1 and L2. The aim of the present paper is to demonstrate that apparently slight structural differences, such as the presence of propylenic chains instead of ethylenic ones or the replacement of a phenanthroline unit with a dipyrindine moiety, can strongly influence the selectivity and sensing properties of molecular chemosensors, focusing our attention on the coordination of Zn^{II} , Cd^{II} and Pb^{II} , which often form complexes with similar stability with polyamine receptors, and of Cu^{II} , as representative examples of transition-metal cations.

Results and Discussion

Protonation of the receptors: Since protonation of polyamine receptors is competitive with the process of metal complexation, we preliminarily carried out a study of the basicity properties of L1 and L2 by coupling potentiometric, spectrophotometric and fluorimetric measurements in aqueous solutions. The protonation constants of L2 have been previously determined in the course of a study of anion binding by L2 and its Zn^{II} complex,^[31] whereas the protonation equilibria of L1 have been potentiometrically determined in this study. The basicity constants of both ligands are reported in Table 1.



Scheme 1. Drawing of the receptors with the atom numbering used in the NMR spectroscopy experiments.

Table 1. Protonation constants of L1 and L2 (298 K, 0.1 M NMe_4NO_3).

Equilibrium	Log K	
	L1	L2 ^[a]
$L + H^+ = [HL]^+$	9.94(1) ^[b]	10.39
$[HL]^+ + H^+ = [H_2L]^{2+}$	8.96(2)	9.01
$[H_2L]^{2+} + H^+ = [H_3L]^{3+}$	7.03(2)	7.35
$[H_3L]^{3+} + H^+ = [H_4L]^{4+}$	5.95(2)	6.02

[a] From ref. [31]. [b] Values in parentheses are standard deviations on the last significant figure.

Receptors L1 and L2 display similar protonation features. As shown in Table 1, both ligands can bind up to four acidic protons in the pH range investigated (2.5–10.5) with similar protonation constants. Of note, the protonation constants are higher than those observed for the corresponding protonation equilibria in phenanthroline-containing macrocycle **2**,^[27g] in which the amine groups are separated by ethylenic chains; this is in agreement with the larger +I inductive effect exerted on amine groups by propylenic chains and with the higher flexibility of L1 and L2, which allow a better minimisation of the electrostatic repulsion between positive charges in the polyprotonated forms of the receptors.^[29] All of the protonation constants of L1 and L2 are also higher than those reported for 2,2'-dipyridine or 1,10-phenanthroline ($\log K = 4.42$ and 4.96, respectively),^[30] which suggests that the heteroaromatic nitrogen atoms are not directly involved in the process of proton binding in aqueous solutions, at least in the pH range investigated. However, slow evaporation of a 0.1 M HCl aqueous solution containing NaClO₄ leads to crystallisation of the [(H_{4.5}L2)(H₂O)_{0.5}Cl_{0.5}][ClO₄]₄·2H₂O salt, which contains L2 in both its tetra- and pentaprotonated forms (see the Supporting Information for its crystal structure, Figure S1). This points out that the phenanthroline nitrogen atoms can be involved in proton binding at least in strongly acidic conditions.

A punctual analysis of the successive protonation steps of L1 and L2 can be carried out by recording ¹H NMR spectra at different pH values. The ¹H NMR spectrum of L1 at pH 12, in which the free amine predominates in solution, is featured by a set of nine signals, six for the aliphatic methylene protons and three for the aromatic protons; this is in keeping with a time-averaged C_{2v} symmetry, which is preserved throughout all the pH range investigated. As shown in Figure 1, formation of the mono- and diprotonated species of the ligand, [HL1]⁺ and [H₂L1]²⁺, in the pH range 11–8 is accompanied by a marked downfield shift of the signals of the methylene protons H1, H2 and H3, adjacent to N_a of the amine groups, which indicates that the first two protonation steps occur on the central nitrogen atoms of the tetraamine chain. The higher proton affinity of the N_a nitrogen atoms, in comparison with those of N_b, can be ascribed to the electron-withdrawing effect of the heteroaromatic unit on the adjacent N_b amine groups. A similar behaviour was also found for L2.^[31] Therefore, both ligands feature a preferential binding zone for protons, that is, the central amine groups of the aliphatic chain, located far from the heteroaromatic units. The two successive protonation steps take place on N_b of the benzylic amine groups, as testified by the downfield shift observed for the resonances of H5 and H6 below pH 8, where the [H₃L]³⁺ and [H₄L]⁴⁺ species are formed. The resonances of the heteroaromatic protons do not show significant shifts in the pH range 12–2, indicating that protonation of dipyrindine does not occur in this pH range.

This fact is confirmed by analysis of the UV spectra of L1 and L2 recorded in aqueous solutions at different pH values. In fact, their spectra are not pH dependent and are almost

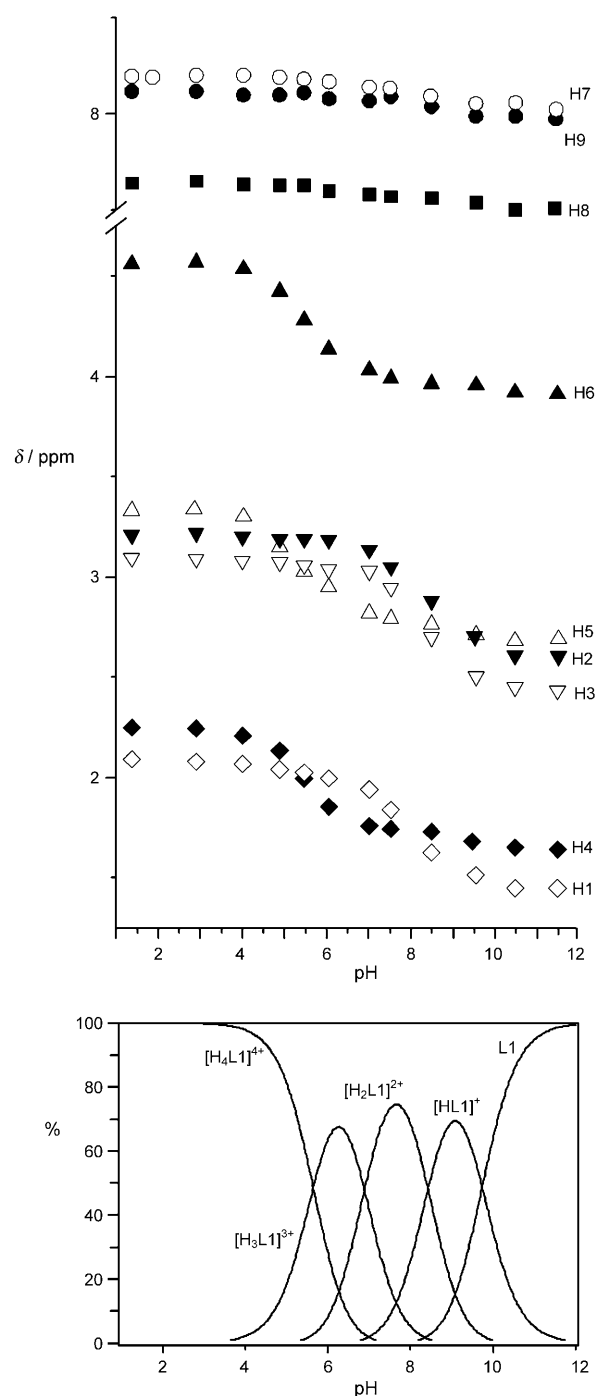


Figure 1. Top: pH dependence of the ¹H NMR spectroscopic signals of L1. Bottom: A distribution diagram of its protonated species (298 K, 0.1 M NMe₄NO₃).

equal to those of unprotonated 2,2'-dipyridine and 1,10-phenanthroline even at strongly acidic pH values (pH 2), whereas it is known that protonation of 2,2'-dipyridine^[9d,27a,d] and 1,10-phenanthroline^[32] is accompanied by remarkable redshifts of their absorption bands at 290 and 270 nm, respectively. Conversely, the emission spectra of L2 are strongly pH dependent. As shown in Figure 2, the receptor is not emissive in alkaline aqueous solutions and shows the typical

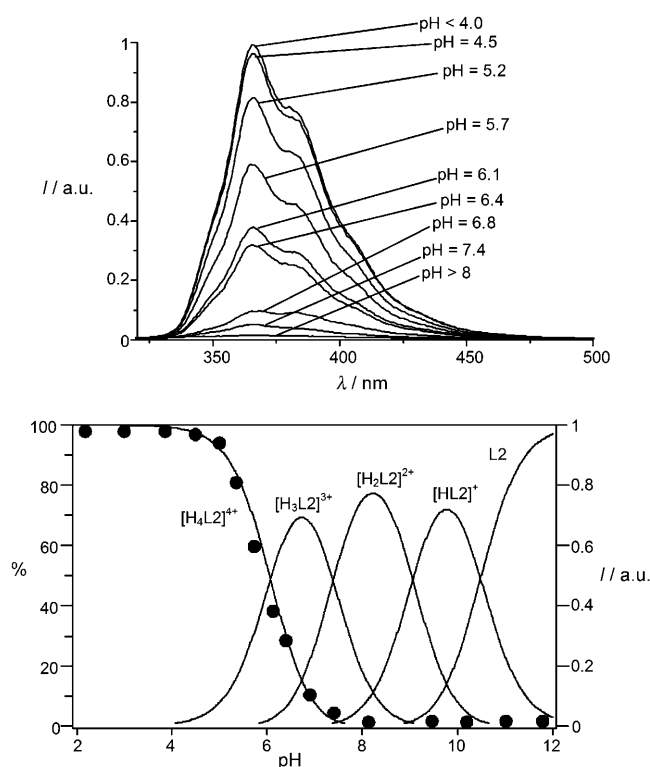


Figure 2. Top: Emission spectra of L2 at selected pH values. Bottom: pH dependence of its emission intensity at 366 nm (298 K, $\lambda_{exc}=280$ nm, 0.1 M NMe_4NO_3).

emission of phenanthroline only at acidic pH values, that is, upon protonation of the $[\text{H}_3\text{L}_2]^{3+}$ species to give the $[\text{H}_4\text{L}_2]^{4+}$ one. This effect can be attributed to the presence, in $[\text{H}_3\text{L}_2]^{3+}$, of an unprotonated benzylic amine group (N_6 in Scheme 1). In fact, as already observed in other phenanthroline-containing polyamine ligands,^[9e,f] the lone pair of the benzylic nitrogen atoms, located close to phenanthroline, can efficiently quench the fluorescence emission of the fluorophore through an electron-transfer process. Finally, protonation of all amine groups of the aliphatic chain below pH 7 makes the lone pairs no longer available for the photoinduced electron-transfer (PET) process and gives rise to a consequent renewal of the fluorescence emission of phenanthroline.

Differently from L2, L1 displays a weak fluorescent emission even at acidic pH values, in keeping with the scarcely emissive nature of unprotonated 2,2'-dipyridine.^[27a,d]

Metal complexation—structural characteristics of the complexes in the solid state: Crystals suitable for X-ray analysis of the protonated complexes $[\text{Cu}(\text{HL1})(\text{ClO}_4)][\text{ClO}_4]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**a**), $[\text{Zn}(\text{HL1})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (**b**), $[\text{Cd}(\text{HL1})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (**c**) and $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L1})\text{Br}][\text{ClO}_4]_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**d**) were obtained by slow evaporation of slightly acidic aqueous solutions containing L1 and the appropriate metal salt in the presence of an excess of NaClO_4 . Selected distances and angles for the metal coordination environments are listed in Table 2.

Table 2. Bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for the metal coordination environments in $[\text{Cu}(\text{HL1})(\text{ClO}_4)][\text{ClO}_4]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**a**), $[\text{Zn}(\text{HL1})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (**b**), $[\text{Cd}(\text{HL1})\text{Br}][\text{ClO}_4]_2$ (**c**) and $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L1})\text{Br}][\text{ClO}_4]_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**d**).

	a	b	c	d
	Cu1 (X=O5)	Zn1 (X=Br2)	Cd1 (X=Br1)	Pb1 (X=Br1)
M–X	2.414(6)	2.366(2)	2.577(1)	2.841(1)
M–N1	1.925(4)	2.11(1)	2.341(6)	2.509(8)
M–N2	1.955(6)	2.140(9)	2.349(5)	2.518(8)
M–N3	2.037(4)	2.145(9)	2.354(5)	2.760(8)
M–N6	2.041(5)	2.148(9)	2.350(6)	2.722(7)
X–M–N6	89.8(2)	107.6(2)	103.3(1)	77.1(2)
X–M–N2	100.0(2)	112.3(2)	114.0(1)	85.9(2)
X–M–N3	91.1(2)	103.2(3)	99.6(1)	87.8(2)
X–M–N1	103.3(2)	113.0(3)	114.8(1)	82.4(2)
N6–M–N2	162.3(2)	136.3(3)	132.6(2)	128.9(2)
N6–M–N3	113.5(2)	111.4(3)	131.2(2)	157.4(2)
N6–M–N1	83.1(2)	75.7(3)	70.5(2)	64.8(2)
N2–M–N3	81.3(2)	76.4(3)	71.1(2)	65.5(2)
N2–M–N1	80.3(2)	72.8(4)	67.7(2)	65.4(2)
N3–M–N1	158.3(2)	139.1(3)	134.3(2)	130.5(2)

The crystal structures of **a**, **b**, **c**, and **d** are composed of $[\text{Cu}(\text{HL1})(\text{ClO}_4)]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{HL1})\text{Br}]^{2+}$, $[\text{Cd}(\text{HL1})\text{Br}]^{2+}$ and $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L1})\text{Br}]^{3+}$ complexed cations, perchlorate anions and, in the cases of **a** and **d**, water molecules. The **a**, **b** and **c** complexes feature similar metal coordination environments and overall ligand conformations (Figure 3a,b and c). In all these cases, the metal is coordinated by the two nitrogen atoms of dipyrindine, N1 and N2, and by the amine donors N3 and N6, adjacent to the heteroaromatic unit. The remaining two amine groups (N4 and N5) are not coordinated, one of them being protonated. A perchlorate oxygen atom (O5 in **a**) or a bromide anion (Br2 in **b**, Br1 in **c**) complete the coordination sphere of the metal cations. The resulting coordination geometry can be best described as a distorted square pyramid, in which the four nitrogen atoms define the basal plane (maximum deviation from the mean plane 0.184(5) \AA for N2 in **a**, 0.034(9) \AA for N1 and N2 in **b** and 0.024(5) for N1 in **c**) and an exogenous oxygen atom or bromide anions occupy the apical position. The metal ions lie above the basal plane (0.3817(7) \AA in **a**, 0.670(1) \AA in **b** and 0.6227(7) in **c**), shifted towards the apical position, whereas the Cu1–O5, Zn1–Br2 and Cd1–Br1 axes form angles of 7.92(2)°, 5.9(2)° and 11.4(1)° with the basal plane. In the case of the **a** and **c** complexes, the Cu–N and Cd–N distances, ranging respectively from 1.925(4) to 2.041(5) \AA and from 2.341(6) to 2.354(5) \AA , compare well with the mean values obtained from a search on the Cambridge Structural Database (CSD)^[33] for the Cu–N (2.029(1) \AA) and Cd–N (2.349(1) \AA) bond lengths. Conversely, three of four Zn–N bond lengths in **b** are longer than that generally observed in Zn^{II} complexes with polyaza ligands (mean value of 2.087(1) \AA found by a CSD search).^[33]

As far as the ligand conformation is concerned, in all three complexes the two pyridine units are not coplanar, with dihedral angles of 5.8(3)° in **a**, 12.7(5)° in **b** and 7.3(3)° in **c**. The ligand assumes a bent conformation along the N3–

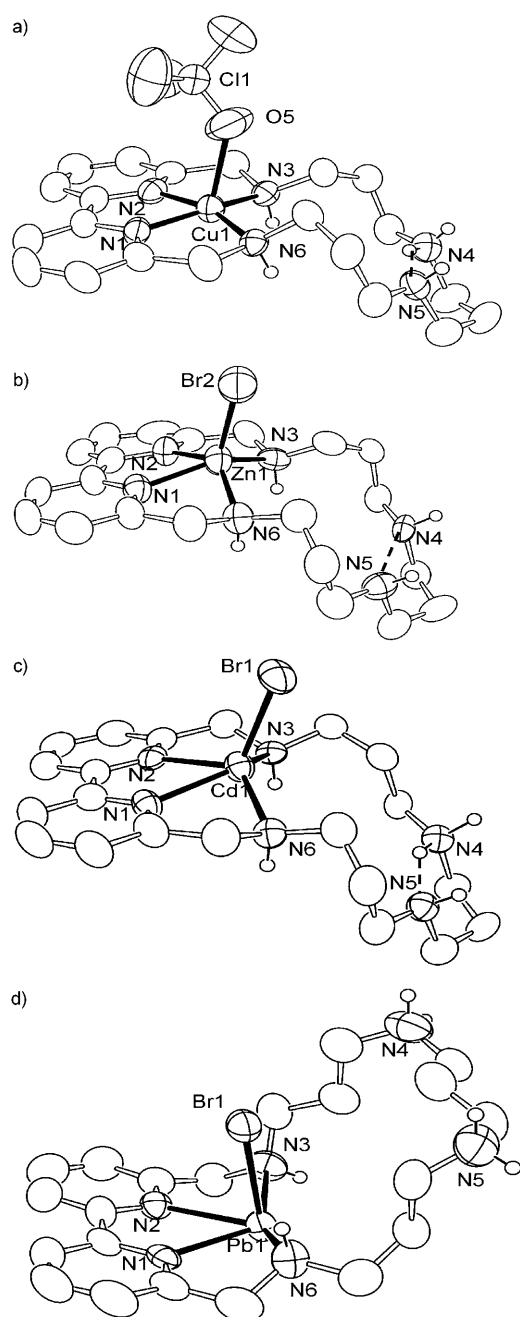


Figure 3. ORTEP drawings of the a) $[\text{Cu}(\text{HL1})(\text{ClO}_4)]^{2+}$, b) $[\text{Zn}(\text{HL1})\text{Br}]^{2+}$, c) $[\text{Cd}(\text{HL1})\text{Br}]^{2+}$ and d) $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L1})\text{Br}]^{3+}$ cations.

N6 axis with dihedral angles between the mean planes defined, respectively, by the four aliphatic nitrogen atoms and by the dipyrindine units of $157.8(1)^\circ$ in **a**, $141.8(3)^\circ$ in **b** and $145.3(1)^\circ$ in **c**. In the **a** and **c** complexes, the analysis of the Fourier difference maps allowed us to individuate the acidic proton, which results in being localised on the N4 amine groups. In both complexes, N4 is involved in a hydrogen bond with the adjacent N5 nitrogen atom ($\text{N4}\cdots\text{N5}$ $2.935(8)$ Å, $\text{H4}\cdots\text{N5}$ $2.14(5)$ Å, N4-H4-N5 $146(5)^\circ$ in **a**; $\text{N4}\cdots\text{N5}$ $2.818(8)$ Å, $\text{H2}\cdots\text{N5}$ $1.98(8)$ Å, N4-H2-N5 $148(7)^\circ$ in **c**). In the Zn^{II} complex **b**, the acidic proton was not local-

ised; however, the N4 and N5 nitrogen atoms are still hydrogen bonded, as testified by the short interatomic distance ($2.92(1)$ Å).

In the $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L1})\text{Br}]^{3+}$ complex, the metal ion is, once again, pentacoordinated by the heteroaromatic and benzylic nitrogen atoms and by a bromide anion. Although the arrangement of the donor atoms around the metal can be assimilated to a square pyramid, with the nitrogen donors defining the basal plane, in this case the coordination geometry presents strong distortions from the theoretical polyhedron. For instance, the N3-Pb1-N6 angle is $157.4(2)^\circ$ instead of the expected value of 90° . The Pb^{II} ion lies $0.3436(4)$ Å outside the basal plane; however, differently from the other L1 complexes, the metal is shifted in the opposite direction with respect to the apical position occupied by the bromide anion. The arrangement of the five donors around the metal leaves a large zone free from coordinated atoms, which is likely to be occupied by the lone pair of Pb^{2+} . Such a “gap” in the coordination geometry of Pb^{II} has been ascribed by several authors to the presence of a stereochemically active lone pair and has been found in other complexes with polyazamacrocycles containing heteroaromatic moieties.^[27g,34] The $\text{Pb}^{\text{II}}-\text{N}$ distances span from $2.509(8)$ to $2.760(8)$ Å. Two of them are around 0.2 Å longer than those generally observed in polyamine complexes with Pb^{II} (mean value of $2.577(6)$ Å found by a CSD search).

In the case of L2, crystals suitable for X-ray analysis were obtained only in the case of the Zn^{II} and Pb^{II} complexes. The crystal structure of the $[\text{Zn}(\text{HL2})\text{Br}][\text{Br}][\text{ClO}_4]$ complex has been previously described.^[31] The $[\text{Zn}(\text{HL2})\text{Br}]^{2+}$ cation (Figure 4a and Table 3) presents significant differences from the corresponding L1 complex **b**. Although in $[\text{Zn}(\text{HL2})\text{Br}]^{2+}$ the Zn^{II} ion is once again pentacoordinated by

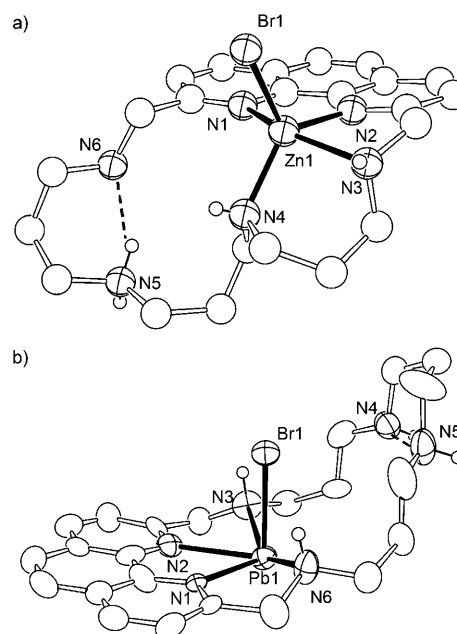


Figure 4. ORTEP drawings of the a) $[\text{Zn}(\text{HL2})\text{Br}]^{2+}$ and b) $[\text{Pb}(\text{HL2})\text{Br}]^{2+}$ cations.

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for the metal coordination environments in [Zn(HL2)Br][Br][ClO₄] and [Pb(HL2)Br][PF₆]_{1.5}[NO₃]_{0.5}·H₂O.

[Zn(HL2)Br][Br][ClO ₄] ^[a]		[Pb(HL2)Br][PF ₆] _{1.5} [NO ₃] _{0.5} ·H ₂ O	
Zn1–Br1	2.354	Pb1–Br1	2.735(1)
Zn1–N1	2.370	Pb1–N1	2.540(9)
Zn1–N2	2.047	Pb1–N2	2.51(1)
Zn1–N3	2.276	Pb1–N3	2.69(1)
Zn1–N4	2.072	Pb1–N6	2.77(1)
Br1–Zn1–N1	99.2	Br1–Pb1–N1	90.6(2)
Br1–Zn1–N3	102.5	Br1–Pb1–N3	76.8(2)
Br1–Zn1–N2	115.2	Br1–Pb1–N2	88.4(2)
Br1–Zn1–N4	118.2	Br1–Pb1–N6	77.3(2)
N1–Zn1–N3	149.4	N1–Pb1–N3	128.8(3)
N1–Zn1–N2	75.0	N1–Pb1–N2	65.5(3)
N1–Zn1–N4	98.0	N1–Pb1–N6	62.7(3)
N3–Zn1–N2	76.4	N3–Pb1–N2	64.7(3)
N3–Zn1–N4	90.5	N3–Pb1–N6	151.7(3)
N2–Zn1–N4	126.6	N2–Pb1–N6	125.8(3)

[a] From ref. [31].

the two heteroaromatic nitrogen atoms, two amine groups (N3 and N4) and a bromide anion, one of the benzylic nitrogen atoms (N6) is not involved in metal binding. Such a difference from the **b** complex with L1 may reside in the higher rigidity of phenanthroline with respect to dipyrindine. Whereas in [Zn(HL2)Br]²⁺ the rigidity of the phenanthroline moiety does not allow the simultaneous coordination of both benzylic amine groups to this metal, in [Zn(HL1)Br]²⁺ the loss of coplanarity between the two pyridine rings enables the ligand to assume an appropriate conformation for the simultaneous binding of both benzylic amine groups to the metal.

The crystal structure of [Pb(HL2)Br][PF₆]_{1.5}[NO₃]_{0.5}·H₂O (**e**) (see Figure 4b and Table 3) consists of [Pb(HL2)Br]²⁺ cations, PF₆[−] and NO₃[−] anions and water solvent molecules. One PF₆[−] and the nitrate anions lie on crystallographic C₂ axes and are in consequence only partially contained in the asymmetric unit. Both the coordination geometry and ligand conformation are very similar to those found for the Pb^{II} complex with L1, **d** (Figure 3d). In fact, the coordination environment is best described as a strongly distorted square pyramid, in which the basal plane is defined by the four nitrogen atoms (N1, N2, N3 and N6) and the apical position is occupied by the bromide anion. Once again, a zone “free” from coordinated donor atoms is clearly observable in the metal coordination environment, due to the presence of the stereochemically active lone pair of Pb^{II}.^[27g,34] The ligand displays a conformation folded along the N3–N6 axis, with a dihedral angle of 143.0(2)° between the plane of phenan-

throline and the plane defined by the secondary nitrogen atoms. A strong intramolecular hydrogen bond (N4⋯N5 2.77(2) Å) is observed between the two unbound amine donors, one of them being protonated. In this case, however, the acidic proton was not localised in the Δ*F* map.

Metal complexation in aqueous solutions—general features and selectivity patterns: The binding ability of the two ligands toward Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II} and Pb^{II} was first analysed by means of potentiometric titrations in aqueous solutions. This was to determine the species present in solution and their formation constants (Table 4) and to establish the possible presence of a selectivity pattern among the different metal cations. Both ligands form rather stable 1:1 complexes with the metals under investigation. However, the stability constants of the [ML1]²⁺ and [ML2]²⁺ (M = Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II} or Pb^{II}) complexes are 3–4 logarithmic units lower than the corresponding complexes with the hexadentate ligand **2** (see Scheme 1),^[9c,27c,g] which contains a triethylenetetraamine

Table 4. Stability constants of the Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II}, and Pb^{II} complexes with L1 and L2 in aqueous solution (0.1 M NMe₄NO₃, 298 K).

Reaction	Log <i>K</i> ^[a]			
	Cu ^{II}	Zn ^{II}	Cd ^{II}	Pb ^{II}
M ²⁺ + L1 = [ML1] ²⁺	15.2(1)	10.85(1)	13.9(1)	8.7(1)
[ML1] ²⁺ + H ⁺ = [M(HL1)] ³⁺	9.5(1)	8.01(1)	7.04(8)	8.7(1)
[M(HL1)] ³⁺ + H ⁺ = [M(H ₂ L1)] ⁴⁺	5.9(1)	6.10(1)	6.05(7)	7.5(1)
[M(H ₂ L1)] ⁴⁺ + H ⁺ = [M(H ₃ L1)] ⁵⁺	3.9(1)	4.5(1)	3.93(5)	–
[ML1] ²⁺ + OH [−] = [M{(OH)L1}] ⁺	2.7(1)	4.5(1)	4.01(1)	–
[M{(OH)L1}] ⁺ + OH [−] = [M{(OH) ₂ L1}]	–	3.5(1)	–	7.4(1)
M ²⁺ + L2 = [ML2] ²⁺	13.90(3)	9.83 ^[b]	10.21(1)	8.6(3)
[ML2] ²⁺ + H ⁺ = [M(HL2)] ³⁺	9.04(2)	8.41	8.66(1)	9.26(2)
[M(HL2)] ³⁺ + H ⁺ = [M(H ₂ L2)] ⁴⁺	5.97(3)	7.15	7.20(1)	7.65(1)
[M(H ₂ L2)] ⁴⁺ + H ⁺ = [M(H ₃ L2)] ⁵⁺	5.46(2)	5.30	–	–
[ML2] ²⁺ + OH [−] = [M{(OH)L2}] ⁺	–	3.90	–	3.77(3)
[M{(OH)L2}] ⁺ + OH [−] = [M{(OH) ₂ L2}]	–	2.47	–	–

[a] Values in parentheses are standard deviations on the last significant figure. [b] From ref. [31].

chain linking the 2,9-position of 1,10-phenanthroline. This effect can be attributed to the replacement of the ethylenic chains that link the amine groups in **2** by propylenic ones. In fact, the increased N–M–N bond angle, as a result of the larger bite of propylenic chains, may reduce the stability of the complexes.^[28] As a consequence of the reduced binding ability of amine groups joined by propylenic bridges, some amine groups are probably weakly bound or not bound to the metal cations. This structural hypothesis is supported by the marked tendency of the [ML1]²⁺ and [ML2]²⁺ complexes to bind acidic protons in aqueous solutions, affording mono-, di- and, in some cases, even triprotonated species. In particular, the constants for the addition of the first two protons to the [ML]²⁺ complexes are remarkably high, in most cases greater than 6 logarithmic units. These protonated species are of particular relevance in the solution chemistry of the present complexes because of their presence in a wide pH range, including the neutral pH region, as shown in Figure 5 for the Cu^{II} and Zn^{II} complexes with L1.

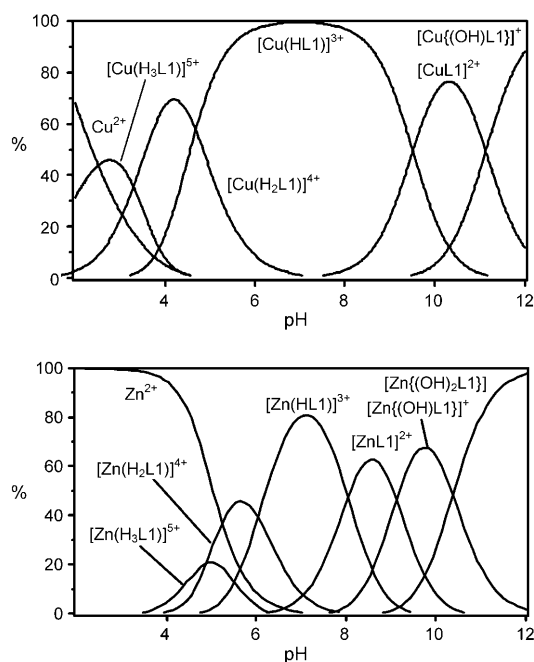


Figure 5. Distribution of the complexed species of L1 in the presence of 1 equiv of Cu^{II} (top) and Zn^{II} (bottom) ($[\text{L}] = [\text{Cu}^{\text{II}}] = [\text{Zn}^{\text{II}}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, 298 K, 0.1 M NMe_4NO_3).

To corroborate the potentiometric study, metal complexation was also followed by recording UV spectra at different pH values. In fact, the UV absorption band of 2,2'-dipyridine and 1,10-phenanthroline is markedly affected by metal coordination. In particular, metal binding to dipyrindine is accompanied by the disappearance of its original band at 293 nm and the simultaneous formation of a new structured band at approximately 305 nm, whereas metal coordination by 1,10-phenanthroline may result in either a decrease (in the case of Zn^{II} , Cd^{II} and Pb^{II} complexation) or an increase (in the case of Cu^{II}) of the absorbance of its UV band at 270 nm.^[9,27] These spectral changes can be used as a diagnostic tool to assess the involvement of the heteroaromatic nitrogen atoms in metal binding. As shown in Figure 6 for the Zn^{II} complexes with L1, the appearance of a new band with a maximum at 305 nm is observed above pH 4. In consequence, the absorbance monitored at 305 nm increases from pH 4 to pH 7, where the process of metal complexation occurs to form the $[\text{Zn}(\text{H}_x\text{L1})]^{(2+x)+}$ ($x=1-2$) complexes. Finally, the band does not show significant changes in the alkaline pH region, that is, with the formation of the $[\text{ZnL1}]^{2+}$, $[\text{Zn}\{\text{(OH)L1}\}]^+$ and $[\text{Zn}\{\text{(OH)}_2\text{L1}\}]$ complexes. Complexation of Zn^{II} by L2 to give the protonated complexes $[\text{Zn}(\text{H}_3\text{L2})]^{5+}$, $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L2})]^{4+}$ and $[\text{Zn}(\text{HL2})]^{3+}$ in the pH range 4–7 is accompanied by a decrease of the absorbance and by a slight redshift (around 6 nm) of the phenanthroline band at 270 nm (Figure 7). No further changes are then observed in the alkaline pH region. Similar results are also obtained with the other metal ions (see the Supporting Information, Figures S2 and S3). These data account for the involvement of the heteroaromatic nitrogen atoms in all of the different

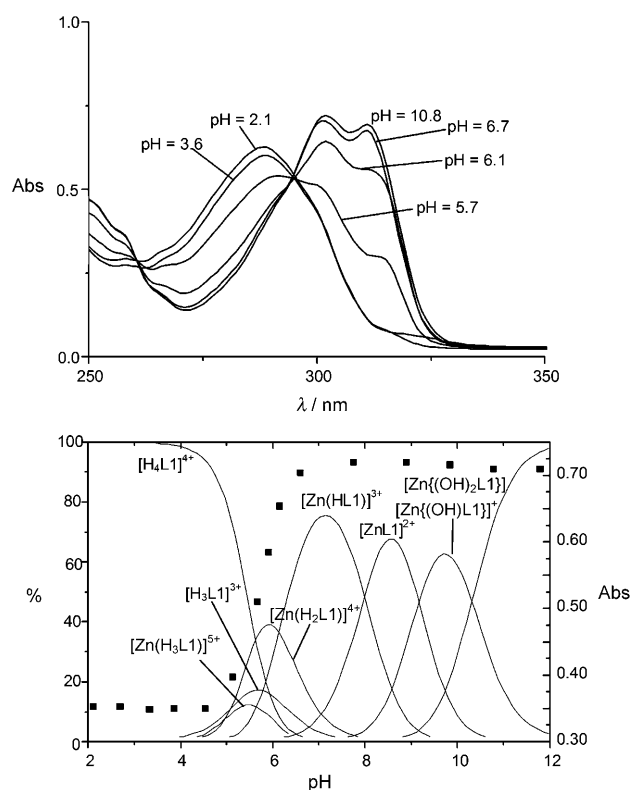


Figure 6. Top: Selected absorption spectra of L1 in the presence of 1 equiv of Zn^{II} . Bottom: Absorbance at 305 nm (\blacksquare , right y axis) as a function of pH compared to the distribution curves of the complexes (—, left y axis) for a system containing L1 and Zn^{II} in 1:1 molar ratio ($[\text{L1}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 298 K, 0.1 M NMe_4NO_3).

complexed species formed by L1 or L2, as is displayed by all of the crystal structures obtained for their metal complexes (see above).

The crystal structures of the complexes also show that the metal cations are coordinated by a single (in $[\text{Zn}(\text{HL2})]^{3+}$) or both benzylic nitrogen atoms (in $[\text{Cu}(\text{HL1})(\text{ClO}_4)]^{2+}$, $[\text{Zn}(\text{HL1})\text{Br}]^{2+}$, $[\text{Cd}(\text{HL1})\text{Br}]^{2+}$, $[\text{Pb}(\text{H}_2\text{L1})\text{Br}]^{3+}$ and $[\text{Pb}(\text{HL2})\text{Br}]^{2+}$). The remaining couple of amine donors, L1 and L2, far from the heteroaromatic moieties and characterised by a higher basicity, are probably not involved or weakly involved in metal binding in aqueous solution; they can therefore act as binding sites for the acidic protons in the protonated forms of the complexes.

If we compare the binding ability of the two ligands, Table 4 shows that the $[\text{ML1}]^{2+}$ complexes are generally more stable than the corresponding $[\text{ML2}]^{2+}$ ones, with the only exception being the Pb^{II} complexes, which display stability constants equal to those within the experimental error. The higher stability of the complexes with L1 cannot be attributed to the different binding ability of the dipyrindine nitrogen atoms with respect to the phenanthroline ones, since 2,2'-dipyridine and 1,10-phenanthroline give metal chelates with almost equal stability (for instance, $\log K = 9.00$ and 9.25 for the equilibrium $\text{Cu}^{2+} + \text{L} = [\text{CuL}]^{2+}$ with $\text{L} = 2,2'$ -dipyridine and 1,10-phenanthroline, respectively).^[30] On the

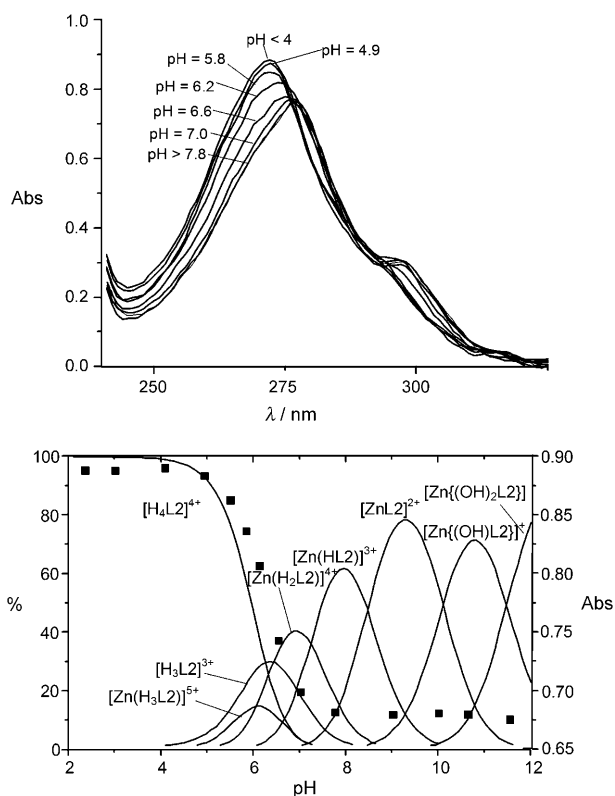
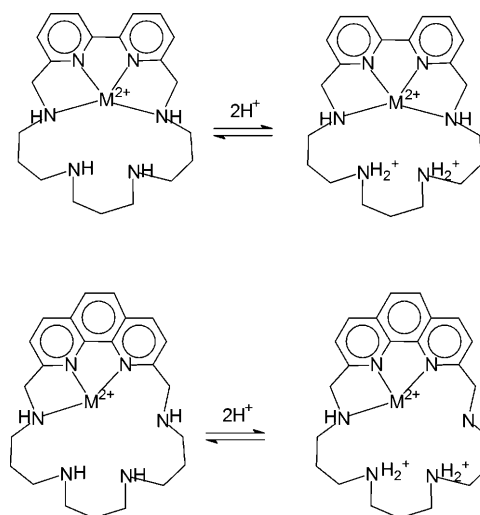


Figure 7. Top: Selected absorption spectra of L2 in the presence of 1 equiv of Zn^{II} . Bottom: Absorbance at 270 nm (■, right y axis) as a function of pH compared to the distribution curves of the complexes (—, left y axis) for a system containing L2 and Zn^{II} in 1:1 molar ratio ($[L_2] = 3 \times 10^{-5}$ M, 298 K, 0.1 M NMe_4NO_3).

other hand, previous work on phenanthroline-containing macrocycles, such as **1–3**, has shown that the rigidity of the heteroaromatic unit does not allow the simultaneous coordination of the phenanthroline donors and of both the adjacent benzylic amine groups to relatively small metal cations such as Cu^{II} or Zn^{II} .^[1p,9e,f,27c] This seems to be the case of L2 also. In fact, the crystal structure of the $[Zn(HL_2)]^{3+}$ complex shows that only one benzylic group is bound to the metal ion. Conversely, in the complexes with L1 the possible rotation of the two pyridine rings along the 2,2'-axis of dipyridine may confer to the macrocyclic framework a somewhat higher flexibility, which allows both the benzylic amine groups to bind to the metal cations, as is shown by the crystal structures of the Cu^{II} , Zn^{II} and Cd^{II} complexes with L1. It seems likely that L1 contains a preferred binding site for metals, consisting of the dipyridine nitrogen atoms and the two adjacent benzylic amine groups (Scheme 2). This tetradentate site is lost in L2, in which one benzylic nitrogen atom is not coordinated, due to the rigidity of phenanthroline. This structural difference may lead to the higher stability observed for the L1 complexes with Cu^{II} , Zn^{II} and Cd^{II} with respect to the corresponding complexes with L2. Of note, the larger Pb^{II} cation, which appears to be coordinated in a similar tetradentate mode by both L1 and L2



Scheme 2. Proposed binding mode of L1 in the $[ML_1]^{2+}$ and $[M(H_2L_1)]^{4+}$ complexes ($M = Cu^{II}$, Zn^{II} , Cd^{II}).

(Figure 3d and Figure 4b), gives complexes of equal stability with both ligands.

Among the investigated metal ions, Cu^{II} forms the most stable complex (Table 4), as expected considering the effect of the crystal-field stabilisation energy (CFSE) in Cu^{II} coordination. The most interesting feature in Table 4, however, is the higher stability of the $[CdL]^{2+}$ complex with respect to the $[ZnL]^{2+}$ and $[PbL]^{2+}$ ones ($L = L_1$ or L_2). This effect is of particular relevance in the case of L1, in which the $[CdL_1]^{2+}$ complex is more than 3 logarithmic units more stable than the corresponding Zn^{II} and Pb^{II} complexes, a rather uncommon feature with polyamine ligands, including phenanthroline or dipyridine-containing polyamine macrocycles.^[9,27] However, the comparison between the binding ability of L1 or L2 toward different metal cations is complicated by the presence of overlapping protonation and deprotonation equilibria involving the $[ML]^{2+}$ complexes (Table 4). This problem can be conveniently overcome by considering a competitive system containing ligand and metal cations in equimolar concentrations and calculating the overall percentages of the different complexed cations over a wide pH range. Plots of the percentages versus pH produces species distribution diagrams from which the binding ability of a ligand can be interpreted in terms of selectivity.^[35] Figure 8 displays similar plots obtained for competitive systems containing L1 or L2 and Zn^{II} , Cd^{II} and Pb^{II} . Whereas L2 shows a poor ability to recognise a single metal cation, L1 is characterised by a marked selectivity for Cd^{II} over Pb^{II} and Zn^{II} . For instance, at pH 7 more than 95% of Cd^{II} is complexed by L1, whereas Zn^{II} is complexed at less than 5%. Pb^{II} is complexed in percentages lower than 1% all over the pH range investigated. As discussed above, in L1 the metal cations are preferentially bound by the coordination site defined by the dipyridine nitrogen atoms and the two adjacent benzylic amine groups. Most likely, selective coordination of Cd^{II} over Zn^{II} and Pb^{II} is due to a better di-

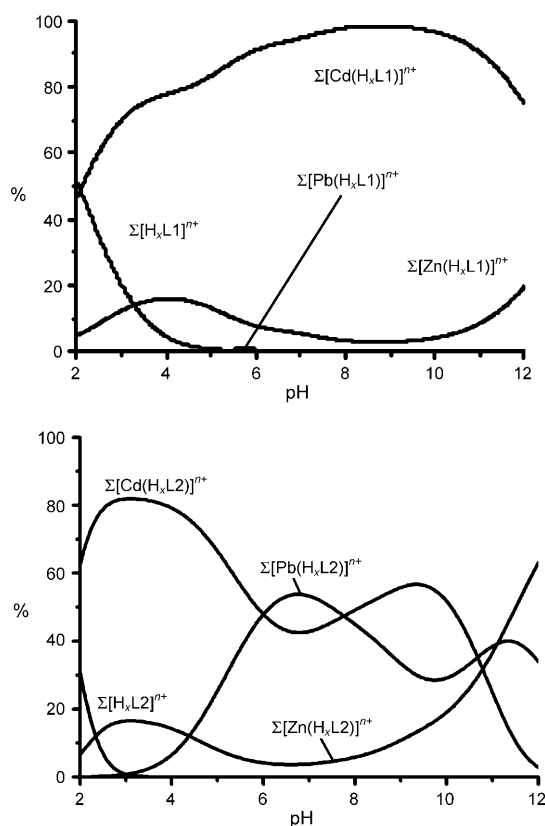


Figure 8. Overall percentages of the L1 (top) and L2 (bottom) complexed species with Zn^{II} , Cd^{II} and Pb^{II} as a function of pH in competitive systems containing Zn^{II} , Cd^{II} and Pb^{II} and L1 or L2 in equimolar ratio ($[\text{L1}] = [\text{L2}] = [\text{Zn}^{\text{II}}] = [\text{Cd}^{\text{II}}] = [\text{Pb}^{\text{II}}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$). $\Sigma[\text{M}(\text{H}_x\text{L})]^{(x-1)+} = [\text{ML}]^{2+} + [\text{M}(\text{HL})]^{3+} + [\text{M}(\text{H}_2\text{L})]^{4+} + [\text{M}(\text{H}_3\text{L})]^{5+} + [\text{M}\{(\text{OH})\text{L}\}]^{+} + [\text{M}\{(\text{OH})_2\text{L}\}]$ with $\text{L} = \text{L1}$ or L2 and $\text{M} = \text{Zn}$, Cd or Pb .

mensional and stereochemical matching between Cd^{II} and this tetradentate coordination site, which possesses the optimal dimension and conformation to host Cd^{II} . This suggestion is supported, once again, by the crystallographic analysis of the $[\text{M}(\text{HL1})]^{3+}$ complexes ($\text{M} = \text{Zn}^{\text{II}}$, Cd^{II} and Pb^{II}) in the solid state. In fact, while Cd^{II} forms four strong $\text{Cd}-\text{N}$ bonds, Zn^{II} shows weaker $\text{M}^{\text{II}}-\text{N}$ interactions and Pb^{II} features a strongly distorted coordination environment, with two of four bond lengths being remarkably longer.

To verify the presence of a tetradentate cavity well suited to host Cd^{II} that is also in non-protonated complexes, we optimised the $[\text{ML1}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ species within the density functional theory (DFT) framework. For all complexes, we used as starting coordinates those derived from the crystal structures of the protonated complexes, by removing the acidic protons and replacing the halogen ion with a water molecule. In fact, halogen ions are generally weakly bound by the present metal cations and therefore they can be easily replaced by a water molecule in aqueous solution. The obtained $\text{M}-\text{N}$ ($\text{M} = \text{Zn}$, Cd or Pb) distances and complete geometries are reported in Table 5 and Figure 9, respectively. Similarly to the crystal structures of the protonated complexes, the metal cations are unequivocally coordinated by

Table 5. $\text{M}-\text{X}$ ($\text{M} = \text{Zn}$, Cd and Pb ; $\text{X} = \text{N}$, O) distances computed at the B3LYP level for the $[\text{ML1}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complexes.

Complex	M-N1	M-N2	M-N3	M-N6	M-N4	M-N5	M-O
$[\text{ZnL1}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	2.118	2.144	2.196	2.112	4.803	3.226	2.065
$[\text{CdL1}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	2.342	2.351	2.319	2.279	4.372	3.552	2.251
$[\text{PbL1}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	2.507	2.507	2.563	2.564	4.543	4.543	2.313

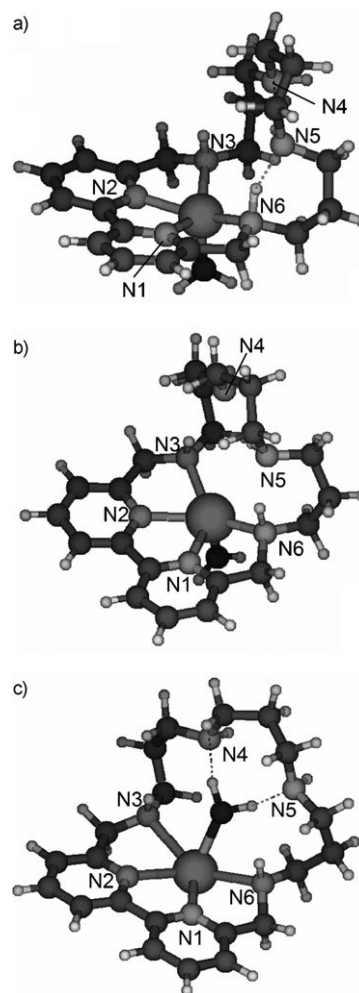


Figure 9. Optimised geometries computed at the B3LYP level for $[\text{ML1}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complexes: a) $\text{M} = \text{Zn}$, b) $\text{M} = \text{Cd}$, c) $\text{M} = \text{Pb}$.

the dipyridine nitrogen atoms and by the adjacent benzylic amine donors, whereas the central amine groups of the aliphatic chain do not show interactions with the metals. The data in Table 5 point out that the most favourable stereochemical matching is found for the Cd^{II} ion. In this case, the L1 ligand acts as a perfect tetradentate ligand. In fact, three of the four closest $\text{Cd}-\text{N}$ distances are perfectly in agreement with the $\text{Cd}-\text{N}$ distances generally observed in Cd^{II} complexes with polyaza ligands. The short $\text{Cd}-\text{N6}$ should be induced by the non-symmetric L1 folding through the hydrogen bond between the N6 proton and N5 . The $[\text{ZnL1}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ geometry instead presents fairly longer distances than those usually found in Zn^{II} complexes with polyamine

ligands (mean value 2.087(1) Å, see above), confirming the Zn^{II} ion to be too small to fit into the tetradentate binding site of L1. Similarly to [CdL1(H₂O)]²⁺, the Zn–N6 bond is the shortest one, probably due to the formation of a hydrogen bond between the N6 proton and N5. The [PbL1-(H₂O)]²⁺ cation is characterised by a water molecule interacting through hydrogen bonding with the amine groups not involved in metal coordination. Similarly to the crystal structure of [Pb(H₂L1)Br]³⁺, the metal cation is shifted in the opposite direction with respect to the apical position occupied by the water molecule. The two dipyrindine nitrogen atoms interact with the metal at very short distances, whereas the two benzylic amine groups are coordinated more weakly. These structural features suggest a not optimal fitting of Pb^{II} within the tetradentate binding site of L1.

Fluorimetric chemosensing of metal cations with L1 and L2:

The chemosensing ability of L1 and L2 was studied by means of spectrofluorimetric measurements on aqueous solutions containing the ligand and the selected metal ion in equimolar ratio at different pH values. In fact, both ligands present a marked pH dependence of their emission spectra. In the case of L1, the emission of the ligand is completely quenched from slightly acidic to alkaline pH values in the presence of Cu^{II} or Pb^{II}. Superimposition of the distribution diagram of the Cu^{II} or Pb^{II} complexes with the maximum of the emission intensity of dipyrindine at 345 nm at different pH values clearly shows that the fluorescence quenching is simply due to the formation of the metal complexes (see Figure 10a for Pb^{II}), as generally observed for complexation of paramagnetic ions, such as Cu^{II}, or heavy metal cations, such as Pb^{II}. A different behaviour is observed in the case of Zn^{II} and Cd^{II}, in which a less common pH dependence of the emission spectra is observed. As shown in Figure 10b and c for Cd^{II}, the fluorescence emission displays an OFF–ON–OFF pH profile, with a maximum of the emission intensity at pH 6.2. Figure 10c points out that, among the different complexes present in solution, only the protonated complexes [Cd(H_xL1)]^{(x+2)+} (x=1–3) are emissive, whereas [CdL1]²⁺ and its hydroxo derivatives do not show any fluorescence emission. This behaviour, which is also found in the case of the Zn^{II} complexes (see the Supporting Information, Figure S4) can be interpreted in consideration of the fact that the [ZnL1]²⁺ and [CdL1]²⁺ complexes are characterised by the central amine groups of the aliphatic chain not involved or weakly involved in metal coordination (Scheme 2), which may quench the emission of the complex thanks to a PET process involving their lone pairs. As a consequence, the [ML1]²⁺ complexes and their hydroxo derivatives, formed in the alkaline pH region, are not emissive. Protonation of the complexes in the pH range 4–8 takes place on these unbound amine groups (Scheme 2). Binding of a couple of protons or of a single acidic proton, which can be shared by the two central amine groups of the aliphatic chain through hydrogen bonding, can inhibit the PET process, renewing the fluorescence emission of the Zn^{II} and Cd^{II} complexes. Finally, the decrease of the emission ob-

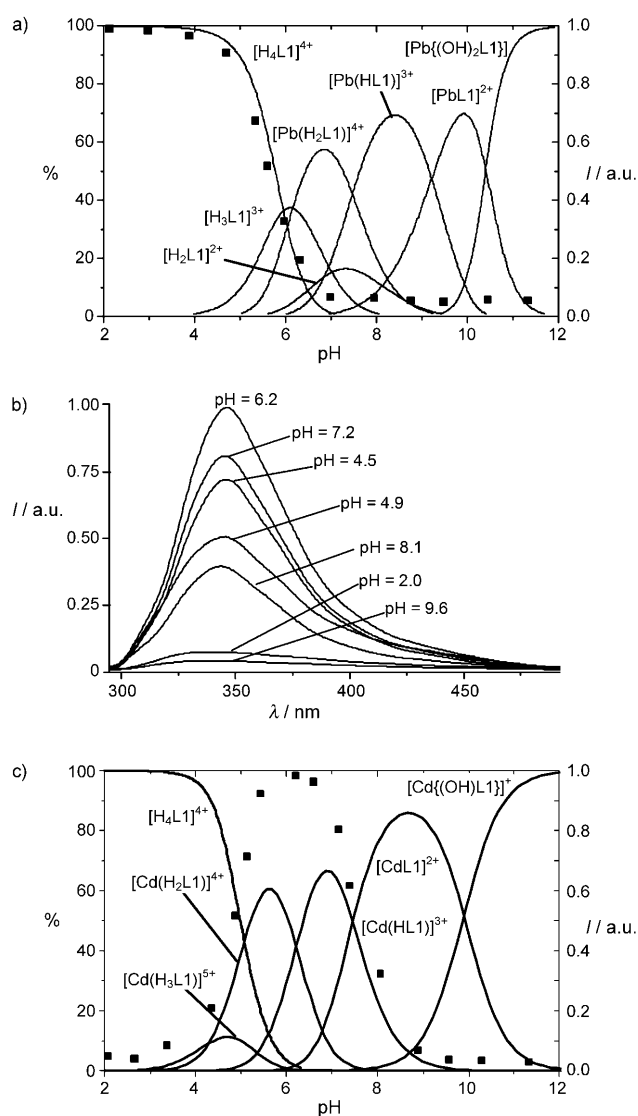


Figure 10. a) Fluorescence emission intensity at 345 nm (■, right y axis) as a function of pH compared to the distribution curves of the complexes (—, left y axis) for a system containing L1 and Pb^{II} in 1:1 molar ratio ([L1]=[Pb^{II}]=1 × 10⁻⁵ M, λ_{exc}=298 nm, 298 K, 0.1 M NMe₄NO₃); b) selected fluorescence emission spectra of L1 in the presence of 1 equiv of Cd^{II}; c) fluorescence emission intensity at 345 nm (■, right y axis) as a function of pH compared to the distribution curves of the complexes (—, left y axis) for a system containing L1 and Cd^{II} in 1:1 molar ratio ([L1]=[Cd^{II}]=1 × 10⁻⁵ M, 298 K, λ_{exc}=298 nm, 0.1 M NMe₄NO₃).

served below pH 4 is simply due to complex decomposition, which affords the free ligand in its tetraprotonated form ([H₄L1]⁴⁺), an almost non-emissive species. The emissive characteristics of the Zn^{II} and Cd^{II} protonated complexes are also confirmed by the fluorescence emission spectra of [Zn(HL1)Br][ClO₄]₂ and [Cd(HL1)Br][ClO₄]₂ solid compounds dissolved in anhydrous CH₃CN (see the Supporting Information, Figure S5). In fact, both compounds display a marked fluorescence emission, with a maximum of the intensity at 352 nm, slightly redshifted with respect to the

spectra in aqueous solutions. Conversely, the $[\text{Cu}(\text{HL1})\text{-(ClO}_4)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ complex does not give any emission enhancement.

Of note, addition of increasing amounts of Zn^{II} or Cd^{II} to an aqueous solution of L1, buffered at pH 6.5, leads to a linear increase of the fluorescence emission intensity of dipyridine at 345 nm up to 0.8:1 (in the case of Zn^{II}) or 1:1 (in the case of Cd^{II}) metal to ligand molar ratio (see the Supporting Information, Figure S6). The emission intensity achieves a constant value for molar ratios greater than 1.2 in the case of Cd^{II} or 1.4 in the case of Zn^{II} . These data not only confirm that L1 forms rather stable 1:1 metal chelates with Zn^{II} and Cd^{II} , but also indicate that the receptor is able to ratiometrically sense these metal cations, thanks to chelation-induced enhancement of fluorescence. Furthermore, a competitive experiment carried out by adding increasing amounts of Pb^{II} to a solution containing Cd^{II} and L1 at pH 6.5 in equimolecular ratio shows that the fluorescence emission intensity at 345 nm of the Cd^{II} complex is only slightly affected by the presence of more than 1 equiv of Pb^{II} (for instance, only a 5% reduction of the intensity is observed in the presence of 3 equiv of Pb^{II} ; see the Supporting Information Figure S7), that is, the Cd^{II} complex is preferentially formed in high percentages, even in the presence of a large excess of Pb^{II} . Conversely, the same experiment carried out on solutions containing L1 and Zn^{II} in 1:1 molar ratio show an 18% decrease of the emission of the Zn^{II} complex in the presence of only 1 equiv of Pb^{II} . These results point out that the stability of the complexes decreases in the order $\text{Cd}^{\text{II}} > \text{Zn}^{\text{II}} > \text{Pb}^{\text{II}}$, confirming, at least qualitatively, the selectivity pattern deduced from the potentiometric measurements (Figure 8, top). Actually, the ability to selectively bind Cd^{II} over Zn^{II} and Pb^{II} , and to give fluorescent Zn^{II} or Cd^{II} complexes in a narrow pH range represent peculiar features of this receptor.

The complexes with L2 are characterised by different pH dependence. In fact, all the metal complexes, including those with Zn^{II} and Cd^{II} , do not show fluorescence emission all over the pH range investigated; unlike L1, the Zn^{II} and Cd^{II} protonated complexes $[\text{M}(\text{HL2})]^{3+}$ and $[\text{M}(\text{H}_2\text{L2})]^{4+}$, which are the predominant species in solution in the pH range 4–7 (see Figure 11 for Cd^{II} and the Supporting Information, Figure S8), are not emissive. Whereas the lack of emission of the Cu^{II} and Pb^{II} complexes with L2 can be related, once again, to the paramagnetic or heavy nature of the metal cation, the different emission properties of the protonated Zn^{II} and Cd^{II} complexes with L2 with respect to those with L1 is probably due to the different structural characteristics of the complexes. Differently from L1, the L2 complexes with Zn^{II} or Cd^{II} are characterised by a benzylic amine group not bound or weakly bound to the metal cations. This amine group is less basic than the central amine groups of the aliphatic chain; this suggests that in the $[\text{M}(\text{HL2})]^{3+}$ and $[\text{M}(\text{H}_2\text{L2})]^{4+}$ complexes the unbound benzylic amine group is not involved in proton binding. As already observed in the case of the protonation of the ligand alone, this amine group, positioned at a short distance from the flu-

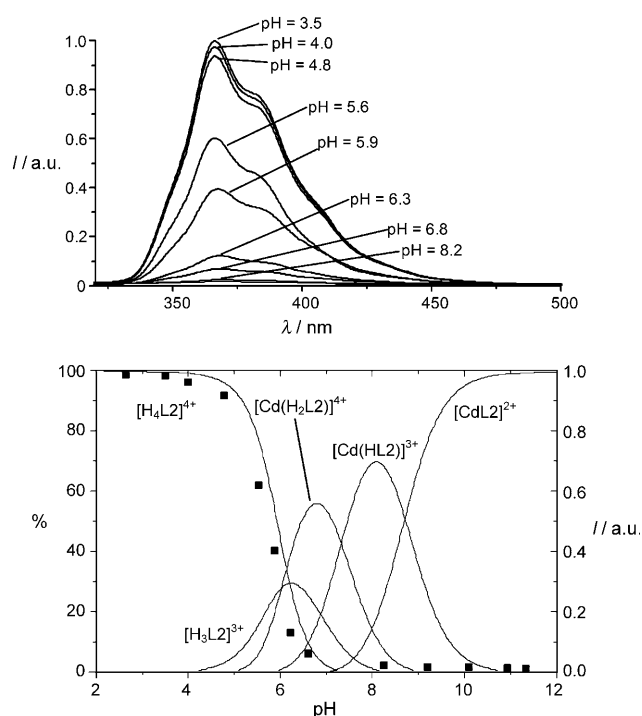


Figure 11. Top: Selected fluorescence emission spectra of L2 in the presence of 1 equiv of Cd^{II} . Bottom: Fluorescence emission intensity at 370 nm (\blacksquare , right y axis) as a function of pH compared to the distribution curves of the complexes (—, left y axis) for a system containing L2 and Cd^{II} in 1:1 molar ratio ($[\text{L2}] = [\text{Cd}^{\text{II}}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, 298 K, 0.1 M NMe_4NO_3).

orophore, can behave as an efficient quencher of the fluorescence emission of phenanthroline.

Conclusion

This study shows that subtle structural parameters can determine the selectivity properties of ligands as well as the fluorescence emission of their complexes. The coupling within the same cyclic structure of a 2,2'-dipyridine unit and an aliphatic tetramine moiety characterised by propylenic spacers between the nitrogen donors gives rise to a ligand able to selectively coordinate Cd^{II} over Zn^{II} and Pb^{II} . This characteristic is due to the presence of a tetradentate cavity with the optimal dimension to host the Cd^{II} ion. Of note, this coordinative site is composed of the less basic heteroaromatic and benzylic nitrogen atoms, whereas the most basic amine groups, located in the middle of the aliphatic chain, are not involved in metal binding and can easily protonate at neutral pH. The simple replacement of dipyridine with phenanthroline, a heteroaromatic unit with a donor ability almost equal to that of dipyridine but more rigid, leads to loss of selectivity. In fact, the rigidity of phenanthroline does not allow the simultaneous involvement of both the heteroaromatic nitrogen atoms and the adjacent benzylic amine groups and the consequent formation of a tetradentate binding site for metal cations. This slight structural difference

also determines the fluorescence emission properties of the Zn^{II} and Cd^{II} complexes. Whereas the dipyrindine-containing ligand gives fluorescent protonated complexes at neutral pH, due to the involvement of all nitrogen atoms in metal or proton binding, the phenanthroline-based analogue forms non-emissive complexes at any pH value. In fact, in the L2 complexes, the presence of an unbound benzylic amine group close to the fluorophore can efficiently quench the fluorescent emission of phenanthroline through a PET process.

Experimental Section

Synthesis of ligands and their metal complexes: L2 was prepared as previously reported.^[36] Crystals of [(H_{4,5}L2)(H₂O)_{0.5}Cl_{0.5}][ClO₄]₂·2H₂O suitable for X-ray analysis were obtained in 27% yield by slow evaporation of an HCl (0.1 M) aqueous solution of L2 (0.01 M) in the presence of a ten-fold excess of NaClO₄. L1 was synthesised by using a modification of the Richman and Atkins procedure.^[37] Reaction of 1,5,9,13-tetraazacyclodecane (1)^[36] with 6,6'-bis(bromomethyl)-2,2'-bipyridine^[38] (2) afforded the tosylated macrocycle (3), which was then deprotected in a CH₃COOH/HBr mixture.

6,6'-(2,6,10,14-Tetraazacyclodecane-1,5,9,13-tetraaza[15])(3,3')-2,2'-bipyridylophane (3): A suspension of 2 (940 mg, 2.75 mmol) in dry acetonitrile (250 mL) was added, over a period of 4 h, to a stirred suspension of 1 (2.0 g, 2.5 mmol) and K₂CO₃ (3.45 g, 25 mmol) in dry acetonitrile (250 mL) at reflux, under a nitrogen atmosphere. At the end of the addition, the mixture was kept under stirring at reflux for an additional 2 h. The suspension was filtered on Celite, washed with acetonitrile, and the resulting solution was evaporated under reduced pressure to obtain a crude solid, which was purified by column chromatography on neutral aluminium oxide by using a petroleum ether/ethyl acetate 1:2 mixture as eluent. Pure compound 3 was obtained as a white solid (862 mg, 35% yield). ¹H NMR (300 MHz, [D]CHCl₃, 25°C, TMS): δ = 8.18 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.48 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.25 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 4.27 (s, 4H), 2.95–2.90 (m, 6H), 2.77–2.71 (m, 6H), 2.34 (s, 6H), 2.26 (s, 6H), 1.34–1.26 ppm (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, [D]CHCl₃, 25°C, TMS): δ = 159.0, 157.2, 143.7–143.3, 136.1–135.0, 137.4, 129.7–129.5, 127.1–126.8, 120.5, 119.3, 52.5, 48.3, 47.5, 46.9, 45.2, 28.7, 28.0, 21.3 ppm.

6,6'-(2,6,10,14-Tetraaza[15])-2,2'-bipyridylophane pentahydrobromide (L1-5HBr): Compound 3 (985 mg, 1 mmol) and phenol (7.5 g, 80 mmol) were dissolved in a HBr/AcOH 33% mixture (100 mL); the solution was kept under stirring at 90°C for 20 h, until a white precipitate was formed. The reaction mixture was cooled to room temperature and then CH₂Cl₂ (100 mL) was added to complete the precipitation and the suspension was stirred for an additional 1 h. The solid residue was filtered and washed several times with CH₂Cl₂. The hydrobromide salt was then recrystallised from a EtOH/water 3:1 (v/v) mixture, filtered and dried under vacuum at 40°C overnight. Yield: 470 mg, 61%; ¹H NMR (300 MHz, [D₂]H₂O, pH 4.5, 25°C, DSS): δ = 8.27 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.56 (s, 4H), 3.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H), 3.21 (t, *J* = 5.4, 4H), 3.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.15 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.01 ppm (t, *J* = 7.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, [D₂]H₂O, pH 4.5, 25°C, DSS): δ = 154.4, 150.3, 140.3, 125.1, 123.1, 50.9, 44.5, 43.3, 43.2, 22.1, 21.3 ppm; MS (ESI): *m/z* (%): 368.30 (100) [M⁺+H], 184.6 (100) [M²⁺+2H]; elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₃₂N₆·5HBr (*M_r* = 773.08): C 32.63, H 4.82, N 10.87; found: C 32.41, H 5.03, N 10.69.

[Cu(HL1)(ClO₄)][ClO₄]₂·H₂O (a): Cu(ClO₄)₂·6H₂O (14.8 mg, 0.04 mmol) was added to a solution of L1-5HBr (30 mg, 0.04 mmol) in water (10 mL). The pH of the solution was adjusted to 5 by slow addition of a few drops of 0.1 M NaOH. The solution was then stirred for 30 min and then NaClO₄·H₂O (100 mg) was added. Crystals of the complex suitable for X-ray analysis were obtained by slow evaporation at room tempera-

ture of the resulting solution. Yield: 19.3 mg (64.3%); elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₃₃N₆CuCl₃O₁₃ (*M_r* = 749.45): C 33.66, H 4.71, N 11.21; found: C 33.4, H 4.8, N 11.2.

[Zn(HL1)Br][ClO₄]₂ (b): Crystals suitable for X-ray analysis of this complex were prepared from Zn(ClO₄)₂·6H₂O (14.9 mg, 0.04 mmol) and L1-5HBr (30 mg, 0.04 mmol) by using a procedure similar to that used for a, adjusting the pH of the solution to 6. Yield: 22.1 mg (77.5%); elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₃₃N₆ZnBrCl₂O₈ (*M_r* = 712.71): C 35.34, H 4.66, N 11.77; found: C 35.4, H 4.7, N 11.7.

[Cd(HL1)Br][ClO₄]₂ (c): Crystals suitable for X-ray analysis of this complex were prepared from CdBr₂·4H₂O (14.8 mg, 0.04 mmol) and L1-5HBr (30 mg, 0.04 mmol) by using the same procedure used for complex a. Yield: 22.0 mg (72.4%); elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₃₃N₆CdBrCl₂O₈ (*M_r* = 760.75): C 33.16, H 4.37, N 11.05; found: C 33.3, H 4.5, N 11.0.

[Pb(H₂L1)Br][ClO₄]₃·H₂O (d): Crystals suitable for X-ray analysis of this complex were prepared from PbBr₂·3H₂O (16.8 mg, 0.04 mmol) and L1-5HBr (30 mg, 0.04 mmol) by using the same procedure used for complex a. Yield: 25.5 mg (65.4%); elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₃₆N₆PbBrCl₃O₁₂ (*M_r* = 947.12): C 25.90, H 3.73, N 8.63; found: C 25.8, H: 3.8, N 8.6.

Caution! Perchlorate salts of organic ligands and their metal complexes are potentially explosive; these compounds must be handled with great care.

[Pb(HL2)Br][PF₆]_{1.5}[NO₃]_{0.5}·H₂O (e): Pb(NO₃)₂·3H₂O (15.4 mg, 0.04 mmol) was added to a solution of L2-4HBr (28.6 mg, 0.04 mmol) in water (10 mL). The pH of the solution was adjusted to 6 by slow addition of a few drops of NaOH (0.1 M). The solution was then stirred for 30 min and then KPF₆ (40 mg) was added. Crystals of the complex suitable for X-ray analysis were obtained by slow evaporation at room temperature of the resulting solution. Yield: 18.2 mg (60.7%); elemental analysis calcd (%) for PbC₂₃H₃₅N_{6.5}BrP_{1.5}F₉O_{2.5} (*M_r* = 749.45): C 29.17, H 3.72, N 9.61; found: C 29.3, H 3.7, N 9.6.

Potentiometric measurements: Equilibrium constants for protonation and complexation reactions with L were determined by pH-metric measurements at (298.1 ± 0.1) K in 0.1 M NMe₄NO₃, by using equipment and procedures^[39] that have been already described. Ligand and metal ion concentrations of (1–2) × 10^{−3} M were employed in the potentiometric measurements, with varying of the metal to ligand molar ratio from 0.5:1 to 2:1. Three titrations (about 100 data points for each one) were performed in the pH range 2–12. The computer program HYPERQUAD^[40] was used to calculate equilibrium constants from electromotive force (emf) values.

Spectrophotometric and spectrofluorimetric measurements: Absorption spectra were recorded on a Perkin–Elmer Lambda 25 spectrophotometer. Fluorescence emission spectra were collected on a Perkin–Elmer LS55 spectrofluorimeter. In the measurements carried out at different pH values, HNO₃ and NaOH were used to adjust the pH values that were measured on a Metrohm 713 pH meter. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) buffer (1 mM) was used in the titrations performed at pH 6.5. In the competition experiments, successive readings of the emission intensity were carried out after each addition of Pb^{II} to ensure that the equilibrium was reached.

NMR spectroscopy: ¹H (300 MHz) and ¹³C (75 MHz) NMR spectra of samples in CDCl₃ and D₂O at different pH values were recorded at 298 K on a Varian Gemini 300 spectrometer. To adjust the pD, small amounts of NaOD (0.01 M) and DCl were added to the solution containing L1. The pH was calculated from the measured pD values by using the following formula: pH = pD − 0.40.^[41] ¹H-¹H and ¹H-¹³C 2D correlation experiments were performed to assign the ¹H NMR spectroscopic signals.

Crystal structure analyses: Data for the X-ray structural analyses of [(H_{4,5}L2)(H₂O)_{0.5}Cl_{0.5}][ClO₄]₂·2H₂O, [Cu(HL1)(ClO₄)][ClO₄]₂·H₂O (a), [Zn(HL1)Br][ClO₄]₂ (b), [Cd(HL1)Br][ClO₄]₂ (c), [Pb(H₂L1)Br][ClO₄]₃·H₂O (d) and [Pb(HL2)Br][PF₆]_{1.5}[NO₃]_{0.5}·H₂O (e) were collected using an Oxford Diffraction Xcalibur3 diffractometer equipped with CCD area detector and graphite monochromated MoK_α radiation. Data

Table 6. Crystal data and structure refinement for [(H_{4.5}L2)(H₂O)_{0.5}Cl_{0.5}][ClO₄]₄·2H₂O, [Cu(HL1)(ClO₄)][ClO₄]₂·H₂O (**a**), [Zn(HL1)Br][ClO₄]₂ (**b**), [Cd(HL1)Br][ClO₄]₂ (**c**), [Pb(H₂L1)Br][ClO₄]₃·H₂O (**d**) and [Pb(HL2)Br][PF₆]_{1.5}[NO₃]_{0.5}·H₂O (**e**).

	[(H _{4.5} L2)(H ₂ O) _{0.5} Cl _{0.5}] [ClO ₄] ₄ ·2H ₂ O	a	b	c	d	e
formula	C ₂₃ H _{41.5} Cl _{4.5} N ₆ O _{18.5}	C ₂₁ H ₃₅ Cl ₃ CuN ₆ O ₁₃	C ₂₁ H ₃₃ BrCl ₂ N ₆ O ₈ Zn	C ₂₁ H ₃₃ BrCdCl ₂ N ₆ O ₈	C ₂₁ H ₃₆ BrCl ₃ N ₆ O ₁₃ Pb	C ₂₃ H ₃₅ BrF ₉ N _{6.5} O _{2.5} P _{1.5} Pb
<i>M_r</i>	857.65	749.44	713.71	760.74	974.01	947.13
crystal system	triclinic	triclinic	triclinic	triclinic	monoclinic	orthorhombic
space group	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 ₁ / <i>a</i>	<i>Pcca</i>
crystal size [mm ³]	0.25 × 0.2 × 0.2	0.3 × 0.2 × 0.1	0.4 × 0.3 × 0.1	0.2 × 0.1 × 0.1	0.3 × 0.3 × 0.2	0.3 × 0.25 × 0.1
<i>a</i> [Å]	7.540(5)	8.335(1)	8.262(3)	8.503(3)	14.161(1)	35.219(2)
<i>b</i> [Å]	12.277(2)	13.020(2)	13.446(4)	13.253(4)	11.3706(8)	13.5409(6)
<i>c</i> [Å]	19.118(7)	15.066(2)	13.537(4)	13.794(3)	20.586(2)	13.0922(7)
α [°]	83.97(1)	73.93(1)	101.51(2)	101.6(2)	90	90
β [°]	79.31(2)	78.90(1)	100.12(3)	102.7(3)	97.520(7)	90
γ [°]	84.28(1)	84.34(1)	101.09(2)	102.4(3)	90	90
<i>V</i> [Å ³]	1724(1)	1539.9(4)	1409.8(8)	1429.8(7)	3286.2(5)	3286.2(5)
<i>Z</i>	2	2	2	2	4	4
<i>T</i> [K]	298	298	298	298	298	298
λ [Å]	0.71069	0.71069	0.71069	0.71069	0.71069	0.71069
ρ_{calcd} [mg m ⁻³]	1.653	1.616	1.681	1.767	1.969	2.015
μ (MoK α) [mm ⁻¹]	0.471	1.041	2.533	2.403	6.663	6.852
<i>F</i> (000)	892	774	728	764	1904	3672
θ_{max} [°]	22	23.25	23.25	28.52	23.81	23.25
total reflns	18739	9283	11191	14295	14970	16549
unique reflns	5855	4161	3986	6034	5012	4462
(<i>R</i> _{int})	(0.0243)	(0.0483)	(0.0804)	(0.0538)	(0.0555)	(0.0681)
observed reflns (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	4339	2263	2296	4319	2995	2361
parameters	478	442	388	360	406	403
GOF	1.075	0.934	1.121	1.097	0.954	0.922
<i>wR</i> ₂ ^[a] (all data)	0.1285	0.1360	0.2455	0.2048	0.1056	0.1316
<i>R</i> ₁ ^[b] (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	0.0423	0.0528	0.0880	0.0635	0.0451	0.0492

[a] $R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$. [b] $wR_2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum wF_o^4]^{1/2}$.

collection was performed using a ω scan with the CrysAlis CCD program.^[42] Data reduction was carried out with the CrysAlis Red program,^[43] and an empirical absorption correction was applied using spherical harmonics, implemented with the SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.^[43] Structures were solved by direct methods (SIR2004)^[44] and refined against F^2 by using SHELXL-97,^[45] with non-hydrogen atoms anisotropic and hydrogen atoms in riding mode. A summary of data collection and structure refinement is reported in Table 6. In [(H_{4.5}L2)(H₂O)_{0.5}Cl_{0.5}][ClO₄]₄·2H₂O, the water oxygen O3 and the chloride Cl5, enclosed in the macrocyclic cavity, share almost the same position and have been refined with partial occupational parameters (0.5). Attempts performed to refine the structure in the *P1* space group, considering a doubled content of the asymmetric unit, failed; in **a** the H1, H2 and H4 hydrogen atoms, bound to the N4 and N5 secondary nitrogen atoms, have been localised in the ΔF map, introduced in the calculation and isotropically refined with a fixed thermal parameter ($U = 0.05 \text{ \AA}^2$); in **b**, the acidic proton has not been localised in the ΔF map, and has been introduced in a calculated position with a partial population parameter (0.5) on the secondary N4 and N5 nitrogen atoms. Disorder has been found for one of the perchlorate anions, the oxygen atoms of which have been found distributed over two different positions with equal occupational factor (O41, O42, O43, O44 and O41', O42', O43', O44'); in **c**, the H1 and H2 hydrogen atoms, bound to the N4 secondary nitrogen, have been localised in the ΔF map, introduced in the calculation and isotropically refined; in **d** the hydrogen atoms belonging to the water solvent molecule have not been localised in the ΔF map and not introduced in the calculation; in **e** one of the PF₆⁻ anion and the nitrate anion lie on crystallographic *C*₂ axes and are consequently only partially contained in the asymmetric unit. The acidic proton has not been localised in the ΔF map, and has been introduced in calculated position on the secondary N4 and N5 nitrogen atoms with a partial population parameter (0.5). CCDC-

716578 ([[(H_{4.5}L2)(H₂O)_{0.5}Cl_{0.5}][ClO₄]₄·2H₂O), 716577 (**a**), 716581 (**b**), 716576 (**c**), 716579 (**d**) and 716580 (**e**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Computational details: GAMESS US software package^[46] was used throughout all the calculations. The default thresholds were used for all the optimisations. Hay-Wadt pseudopotentials and basis sets^[47] were used for Zn^{II} and Cd^{II} complexes. SBK pseudopotentials and basis sets^[48] were used for the Pb^{II} complex. The B3LYP functional^[49] was used throughout all the calculations.

Acknowledgements

Financial support of MIUR (PRIN 2007) is gratefully acknowledged.

- [1] Selected reviews: a) V. Balzani, G. Bergamini, P. Ceroni, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 2456–2469; b) L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccaroni, L. S. Dolci in *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 9* (Eds C. D. Geddes, J. R. Lakowicz), Springer, New York, **2005**, pp. 1–57; c) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, G. Rabaioli, A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 85–108; d) B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 3–40; e) V. Amendola, M. Bonizzoni, D. Esteban-Gomez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, F. Sancenon, A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 1451–1470; f) R. Martinez-Mañez, F. Sancenon, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419–4476; g) B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**; h) A. P. de Silva,

- H. Q. N. Gunaratne, T. Gunlauson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566; j) J. L. Sessler, J. M. Davis, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 989–997; j) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 502–532; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 486–516; k) M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 3–15; l) L. Prodi, *New J. Chem.* **2005**, *29*, 20–31; m) F. Pina, M. A. Bernardo, E. Garcia-España, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2143–2157; n) A. J. Parola, J. C. Lima, C. Lodeiro, F. Pina in *Fluorescence of Supramolecules, Polymers, and Nanosystems, Springer Series on Fluorescence, Vol. 4* (Ed.: M. N. Berberan-Santos), Springer, Berlin, **2008**, pp. 117–149; o) V. Amendola, L. Fabbrizzi, F. Foti, M. Licchelli, C. Mangano, P. Pallavicini, A. Poggi, D. Sacchi, A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 273–299; p) A. Bencini, M. A. Bernardo, A. Bianchi, E. Garcia-España, C. Giorgi, S. Luis, F. Pina, B. Valtancoli in *Advances in Supramolecular Chemistry, Vol. 8* (Ed.: G. W. Gokel), Cerberus Press, Miami, **2002**, pp. 79–130.
- [2] a) Z. Wang, M. A. Palacios, P. Anzenbacher, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7451–7459; b) M. A. Palacios, Z. Wang, V. A. Montes, G. V. Zyryanov, P. Anzenbacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10307–10314.
- [3] a) M. Arduini, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Langmuir* **2007**, *23*, 8632–8636; b) P. Teolato, E. Rampazzo, M. Arduini, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2238–2245; c) F. Mancin, E. Rampazzo, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1844–1854.
- [4] I. Stoll, J. Eberhard, R. Brodbeck, W. Eisfeld, J. Mattay, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1155–1163.
- [5] J. Tolosa, A. J. Zuccherro, U. H. F. Bunz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6498–6506.
- [6] B. Garcia-Acosta, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, K. Rurack, M. Spieles, E. Garcia-Breijo, L. Gil, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 3123–3135.
- [7] a) P. Pallavicini, Y. Diaz-Fernandez, F. Foti, C. Mangano, S. Patroni, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 178–187; b) Y. Diaz Fernandez, A. Perez Gramatges, V. Amendola, F. Foti, C. Mangano, P. Pallavicini, S. Patroni, *Chem. Commun.* **2004**, 1650–1651.
- [8] a) M. C. Aragoni, M. Arca, A. Bencini, A. J. Blake, C. Caltagirone; G. De Filippo, F. A. Devillanova, A. Garau, T. Gelbrich, M. B. Hursthouse, F. Isaia, V. Lippolis, M. Mameli, P. Mariani, B. Valtancoli, C. Wilson, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 4548–4559, A. Danesi, F. A. Devillanova, A. Garau, T. Gelbrich, F. Isaia, V. Lippolis, M. B. Hursthouse, B. Valtancoli, C. Wilson, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 8088–8097; b) M. C. Aragoni, M. Arca, A. Bencini, A. J. Blake, C. Caltagirone; G. De Filippo, F. A. Devillanova, A. Garau, T. Gelbrich, M. B. Hursthouse, F. Isaia, V. Lippolis, M. Mameli, P. Mariani, B. Valtancoli, C. Wilson, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 4548–4559; c) M. C. Aragoni, M. Arca, A. Bencini, A. J. Blake, C. Caltagirone, A. Decortes, F. Demartin, F. A. Devillanova, E. Faggi, L. S. Dolci, A. Garau, F. Isaia, V. Vito, L. Prodi, C. Wilson, B. Valtancoli, N. Zaccaroni, *Dalton Trans.* **2005**, 2994–3004.
- [9] a) C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, L. Borsari, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, J. C. Lima, A. J. Parola, F. Pina, L. Borsari, A. Danesi, C. Giorgi, C. Lodeiro, P. Mariani, F. Pina, S. Santarelli, A. Tamayo, B. Valtancoli, *Dalton Trans.* **2006**, 4000–4010; c) C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, A. Danesi, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, J. C. Lima, F. Pina, A. M. Bernardo, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 5134–5146; d) C. Lodeiro, A. J. Parola, F. Pina, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, A. Masotti, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2968–2975; e) A. Bencini, M. A. Bernardo, A. Bianchi, V. Fusi, C. Giorgi, F. Pina, B. Valtancoli, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1911–1918; f) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, V. Fusi, B. Valtancoli, M. A. Bernardo, F. Pina, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 3806–3813.
- [10] a) M. Chadlaoui, B. Abarca, R. Ballesteros, C. Ramirez de Arellano, J. Aguilar, R. Aucejo, E. Garcia-España, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9030–9034; b) J. Pina, J. Seixas de Melo, F. Pina, C. Lodeiro, J. C. Lima, A. J. Parola, C. Soriano, M. P. Clares, M. T. Albelda, R. Aucejo, E. Garcia-España, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7449–7458; c) J. Alarcón, M. T. Albelda, R. Belda, M. P. Clares, E. Delgado-Pinar, J. C. Frias, E. Garcia-España, J. Gonzalez, C. Soriano, *Dalton Trans.* **2008**, 6530–6538.
- [11] D. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *47*, 168–175.
- [12] a) R. M. F. Batista, E. Oliveira, S. P. G. Costa, C. Lodeiro, M. Raposo, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6575–6578; b) A. Tamayo, B. Pedras, C. Lodeiro, L. Escriche, J. Casabo, J. L. Capelo, B. Covelo, R. Kivekas, R. Sillanpaa, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7818–7826.
- [13] a) M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, D. Sacchi, M. Vazquez, C. Zampa, *Chem. Commun.* **2003**, 1812–1813; b) L. Fabbrizzi, F. Foti, M. Licchelli, A. Poggi, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 4612–4614; c) L. Fabbrizzi, M. Licchelli, F. Mancin, M. Pizzeghello, G. Rabaioli, A. Taglietti, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 94–101; d) M. Di Casa, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, A. Poggi, A. Russo, A. Taglietti, *Chem. Commun.* **2001**, 825–826.
- [14] a) J. V. Ros-Lis, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, M. Spieles, K. Rurack, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10101–10114; b) J. V. Ros-Lis, R. Martinez-Manez, K. Rurack, F. Sancenon, J. Soto, M. Spieles, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 5183–5185; c) F. Sancenon, R. Martinez-Manez, J. Soto, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4321–4323; d) M. E. Padilla-Tosta, J. M. Lloris, R. Martinez-Manez, M. D. Marcos, M. A. Miranda, T. Pardo, F. Sancenon, J. Soto, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1475–1482.
- [15] a) J. F. Callan, A. P. de Silva, D. C. Magri, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8551–8588; b) A. P. de Silva, D. B. Fox, A. J. M. Huxley, T. S. Moody, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 41–57.
- [16] a) Z. Dai, J. W. Canary, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1708–1718; b) M. Royzen, A. Durandin, V. G. J. Young, N. E. Geacintov, J. W. Canary, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3854–3855; c) M. Royzen, Z. Dai, J. W. Canary, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1612–1613.
- [17] a) X. Zhang, D. Hayes, S. J. Smith, S. Friedle, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15788–15789; b) E. M. Nolan, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5910–5918; c) E. M. Nolan, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3443–3480; d) C. J. Chang, S. J. Lippard in *Neurodegenerative Diseases and Metal Ions* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, K. O. Sigel), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, pp. 321–370; e) S. C. Burdette, G. K. Grant B. Spingler, R. Y. Tsien, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7831–7841.
- [18] G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccaroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 344–350.
- [19] a) W. M. Leevy, S. T. Gammon, H. J. Jiang, J. R. Johnson, D. J. Maxwell, E. N. Jackson, M. Marquez, D. Piwnica-Worms, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16476–16477; b) K. M. DiVittorio, W. M. Leevy, E. J. O’Neil, J. R. Johnson, S. Vakulenko, J. D. Morris, K. D. Rosek, N. Serazin, S. Hilkert, S. Hurley, M. Marquez, B. D. Smith, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 286–293.
- [20] a) M. Soibinet, L. Souchon, I. Leray, B. Valeur, *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 1077–1082; b) V. Souchon, I. Leray, B. Valeur, *Chem. Commun.* **2006**, 4224–4226; c) J. P. Malval, I. Leray, B. Valeur, *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1089–1094; d) R. Métivier, I. Leray, V. Bernard, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4480–4490.
- [21] a) R. Parkesh, T. C. Lee, T. Gunnlaugsson, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 310–317; b) T. Gunnlaugsson, T. C. Lee, R. Parkesh, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11239–11249; c) T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard, N. S. Murray, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1557–1560; d) T. Gunnlaugsson, T. C. Lee, R. Parkesh, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4065–4068.
- [22] a) L. F. Lindoy, *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, Cambridge University Press, Cambridge, **1989**; b) L. F. Lindoy, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 2179–2186.
- [23] J. S. Bradshaw, *Aza-crown Macrocycles*, Wiley, New York, **1993**.
- [24] a) K. B. Mertes, J. M. Lehn in *Comprehensive Coordination Chemistry* (Ed.: G. Wilkinson), Pergamon, Oxford, **1987**, pp. 915–1009; b) J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [25] P. Guerriero, S. Tamburini, P. A. Vigato, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *113*, 17–243.
- [26] J. Nelson, V. McKee, G. Morgan, in *Progress in Inorganic Chemistry, Vol. 47* (Ed.: K. D. Karlin), Wiley, New York, **1998**, pp. 167–213.

- [27] a) C. Anda, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, P. Fornasari, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, A. J. Parola, F. Pina, *Dalton Trans.* **2003**, 1299–1307; b) C. Bazzicalupi, A. Belusci, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, S. Ciattini, C. Giorgi, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 2151–2157; c) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, L. Borsari, A. Danesi, C. Giorgi, C. Lodeiro, P. Mariani, F. Pina, S. Santarelli, A. Tamayo, B. Valtancoli, *Dalton Trans.* **2006**, 4000–4010; d) P. Arranz, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, S. Ciattini, P. Fornasari, C. Giorgi, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6383–6389; e) D. K. Chand, H.-J. Schneider, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, S. Ciattini, B. Valtancoli, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4001–4008; f) A. Bencini, A. Bianchi, V. Fusi, C. Giorgi, A. Masotti, P. Paoletti, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7686; g) C. Bazzicalupi, A. Bencini, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 393–400; h) C. Bazzicalupi, A. Bencini, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 941–948.
- [28] R. D. Hancock, A. E. Martell, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1875–1914.
- [29] A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-España, M. Micheloni, J. A. Ramirez, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *188*, 97–156.
- [30] R. M. Smith, A. E. Martell, NIST Stability Constants Database, Version 4.0, National Institute of Standards and Technology, Washington, **1997**.
- [31] C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, P. Fornasari, C. Giorgi, C. Marinelli, B. Valtancoli, *Dalton Trans.* **2003**, 2564–2570.
- [32] a) N. Armaroli, L. De Cola, V. Balzani, J.-P. Sauvage, C. O. Dietrich-Buchecker, J. M. Kern, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88*, 553–556; b) J. M. Kern, J.-P. Sauvage, J. L. Weidmann, N. Armaroli, L. Flamigni, P. Ceroni, V. Balzani, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5329–5338; c) N. Armaroli, L. De Cola, V. Balzani, J.-P. Sauvage, C. O. Dietrich-Buchecker, J. M. Kern, A. Bailal, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 3241–3247; < lit d > N. Armaroli, P. Ceroni, V. Balzani, J. M. Kern, J.-P. Sauvage, J. L. Weidmann, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1997**, *93*, 4145–4150.
- [33] a) F. H. Allen, *Acta Crystallogr. Sect. B* **2002**, *58*, 380–388; b) Cambridge Structural Database, Version 5.29, **2007**.
- [34] a) R. D. Hancock, M. S. Shaikjee, S. M. Dobson, C. A. Boeyens, *Inorg. Chim. Acta* **1988**, *154*, 229–238; b) V. J. Thom, M. S. Shaikjee, R. D. Hancock, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2992–3000; c) V. J. Thom, G. D. Hosken, R. D. Hancock, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3378–3381;
- d) V. J. Thöm, G. D. Hosken, R. D. Hancock, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1985**, 1877–1880; e) A. Andrés, A. Bencini, A. Charachalios, A. Bianchi, P. Dapporto, E. Garcia-España, P. Paoletti, P. Paoli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 3507–3513.
- [35] A. Bianchi, E. Garcia-España, *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 1727–1732.
- [36] C. Bazzicalupi, A. Beconcini, A. Bencini, V. Fusi, C. Giorgi, A. Masotti, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 1675–1682.
- [37] J. E. Richman, T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268–2275.
- [38] a) U. S. Schubert, C. Eschbaumer, M. Heller, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3373–3376; b) T. M. Cassol, F. W. J. Demnitz, M. Navarro, E. A. Neves, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8203–8206.
- [39] A. Bencini, A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, E. Garcia-España, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 1171–1174.
- [40] P. Gans, A. Sabatini, V. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 807–812.
- [41] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–709.
- [42] CrysAlis CCD, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.5, **2008**.
- [43] CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.5, **2008**.
- [44] M. C. Burla, R. Caliandro, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, L. De Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38*, 381–388.
- [45] G. M. Sheldrick, SHELXL-97, Göttingen, **1997**.
- [46] a) M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. Su, T. L. Windus, M. Dupuis, J. A. Montgomery, *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363; b) M. S. Gordon, M. W. Schmidt in *Theory and Applications of Computational Chemistry: The First Forty Years* (Eds.: C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim, G. E. Scuseria), Elsevier, Amsterdam, **2005**, pp. 1167–1184.
- [47] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270–283.
- [48] W. J. Stevens, H. Basch, M. Krauss, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 6026–6033.
- [49] a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648; b) P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chablowski, M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623–11627; c) R. H. Hertwig, W. Koch, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *268*, 345–351.

Received: February 2, 2009
Published online: June 5, 2009

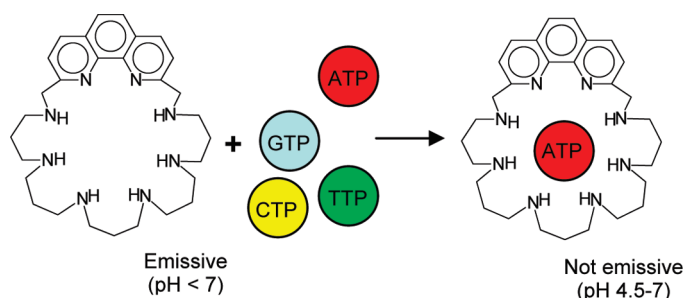
Exploring the Binding Ability of Phenanthroline-Based Polyammonium Receptors for Anions: Hints for Design of Selective Chemosensors for Nucleotides

Carla Bazzicalupi, Andrea Bencini,* Silvia Biagini, Enrico Faggi, Stefano Meini, Claudia Giorgi, Alessio Spepi, and Barbara Valtancoli

Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, Via della Lastruccia, 3, 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy

andrea.bencini@unifi.it

Received July 4, 2009



The synthesis of receptor 2,6,10,14,18-pentaaza[20]-21,34-phenanthrolinephane (L1), containing a pentaamine chain linking the 2,9 positions of a phenanthroline unit, is reported. The protonation features of L1 and of receptor 2,6,10,14,18,22-hexaaza[23]-24,37-phenanthrolinephane (L2) have been studied by means of potentiometric, ^1H NMR, and spectrofluorimetric measurements; this study points out that the fluorescent emission of both receptors depends on the protonation state of the polyamine chain. In fact, the receptors are emissive only at neutral or acidic pH values, where all the aliphatic amine groups are protonated. Potentiometric titrations show that L2 is able to bind selectively ATP over TTP, CTP, and GTP. This selectivity is lost in the case of L1. ^1H and ^{31}P NMR measurements and molecular mechanics calculations show that the phosphate chains of nucleotides give strong electrostatic and hydrogen-bonding interactions with the ammonium groups of the protonated receptors, while the nucleobases interact either via π -stacking with phenanthroline or via hydrogen bonding with the ammonium groups. Of note, MM calculations suggest that all nucleotides interact in an inclusive fashion. In fact, in all adducts the phosphate chain is enclosed within the receptor cavities. This structural feature is confirmed by the crystal structure of the $[(\text{H}_6\text{L}_2)_2(\text{TTP})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$ adduct. Fluorescence emission measurements at different pH values show that L2 is also able to ratiometrically sense ATP in a narrow pH range, thanks to emission quenching due to a photoinduced electron transfer (PET) process from an amine group of the receptor to the excited phenanthroline.

Introduction

Nucleotides are ubiquitously present in biological systems and play crucial roles in many cellular functions, such as transport across membranes, DNA synthesis, cell signaling, and energy- or electron-transfer processes.¹ These functions are generally regulated by recognition processes involving proteins able to selectively bind the appropriate nucleotide anion, thanks to the encapsulation of the anionic

substrates within clefts or pockets with the appropriate dimensions and disposition of the binding sites to optimally host a selected nucleotide. It is now accepted that the binding process is regulated by different noncovalent interactions, such as charge–charge and charge–dipole interactions, hydrogen bonding, hydrophobic effects, and stacking interactions, that work cooperatively to stabilize the adducts.

In this context, the design of synthetic receptors able to bind phosphate anions in aqueous solution represents one of the approaches to the analysis of the weak forces which regulate the recognition processes in biological systems.²

(1) (a) Hirsch, A. K. H.; Fischer, F. R.; Diederich, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 338–352. (b) Dugas, H. *Bioorganic Chemistry: a Chemical Approach to Enzyme Action*; Springer: New York, 1996. (c) Davidson, A. M. L.; Dassa, E.; Orelle, C.; Chen, J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 317–364. (d) Alton, G. R.; Lunney, E. A. *Expert Opin. Drug Discovery* **2008**, *3*, 595–605. (e) Lewis, J. A.; Lebois, E. P.; Lindsley, C. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 269–280. (f) Matte, A.; Delbaere, L. T. J. *Handbook Proteins* **2007**, *1*, 114–118. (g) Turk, B. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 4–10. (h) Hollenstein, K.; Dawson, R. J. P.; Locher, K. P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 412–418. (i) Morrow, J. R.; Amyes, T. L.; Richard, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 539–548. (l) Rye, C. S.; Baell, J. B. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 3127–3141.

(2) Selected reviews: (a) Atwood, J. L.; Holman, K. T.; Steed, J. W. *Chem. Commun.* **1996**, 1401–1407. (b) Fabbri, L.; Licchelli, M.; Rabaioni, G.; Taglietti, A. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 85–108. (c) Amendola, V.; Bonizzoni, M.; Esteban-Gomez, D.; Fabbri, L.; Licchelli, M.; Sancenon, F.; Taglietti, A. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1451–1470. (d) Garcia España, E.; Diaz, P.; Llinares, J. M.; Bianchi, A. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2952–2980. (e) Bianchi, A.; Garcia-España, E.; Bowman-James K., Eds. *Supramolecular Chemistry of Anions*; Wiley-VCH: New York, 1997. (f) Tamaru, S.; Hamachi, I. *Struct. Bonding* **2008**, *129*, 95–125. (g) Katayev, E. A.; Ustyniuk, Y. A.; Sessler, J. L. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3004–3037. (h) Caltagirone, C.; Gale, P. A. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 520–563. (i) Kim, S. K.; Lee, D. H.; Hong, J.; Yoon, J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 23–31. (j) Kang, S. O.; Hossain, M. A.; Bowman-James, K. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3038–3052. (k) Gunnlaugsson, T.; Glynn, M.; Tocci, G. M.; Kruger, P. E.; Pfeiffer, F. M. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3094–3117. (l) Lankshear, M. D.; Beer, P. D. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3142–3160. (m) Gimeno, N.; Vilar, R. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3161–3189. (n) Gale, P. A.; Quesada, R. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3219–3244. (o) Amendola, V.; Fabbri, L. *Chem. Commun.* **2009**, 513–531. (p) Kubik, S. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 585–605. (q) Chmielewski, M. J.; Davis, J. J.; Beer, P. D. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 415–424. (r) Parola, A. J.; Lima, J. C.; Lodeiro, C.; Pina, F. *Springer Ser. Fluoresc.* **2008**, *4*, 117–149. (s) Gamez, P.; Mooibroek, T. J.; Teat, S. J.; Reedijk, J. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 435–444. (t) Kang, S. O.; Begum, R. A.; Bowman-James, K. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7882–7894. (u) Anzenbacher, P.; Nishiyabu, R.; Palacios, M. A. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2929–2938. (v) Schmidtchen, F. P. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2918–2928. (w) Schmidtchen, F. P.; Berger, M. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1609–1646. (y) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.

(3) (a) Hosseini, M. W.; Blaker, A. J.; Lehn, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3896–3904. (b) Dhaensens, M.; Lehn, J. M.; Vigneron, J. P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 1379–1381.

(4) (a) Schneider, H. J.; Blatter, T.; Palm, B.; Pfingst, U.; Rüdiger, V.; Theis, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7704–7708. (b) Eliseev, A. V.; Schneider, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6081–6088.

(5) (a) Aguilar, J. A.; Garcia-España, E.; Guerrero, J. A.; Luis, S. V.; Llinares, J. M.; Miravet, J. F.; Ramirez, J. A.; Soriano, C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2237–2238. (b) Aguilar, J. A.; Celda, B.; Fusi, V.; Garcia-España, E.; Luis, S. V.; Martinez, M. C.; Ramirez, J. A.; Soriano, C.; Tejero, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 1323–1328.

(6) Furuta, H.; Magda, D.; Sessler, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 978–985.

(7) Menger, F. M.; Catlin, K. K. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2147–2150.

(8) (a) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Faggi, E.; Giorgi, C.; Santarelli, S.; Valtancoli, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2440–2441. (b) Arturoni, E.; Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Caltagirone, C.; Danesi, A.; Giorgi, C.; Garau, A.; Lippolis, V.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 6651–6563.

(9) Padilla-Tosta, M. E.; Lloris, J. M.; Martinez-Mañez, R.; Pardo, T.; Soto, J.; Benito, A.; Marcos, M. D. *Inorg. Chem. Commun.* **2000**, *3*, 45–48.

(10) Vickers, M. S.; Martindale, K. S.; Beer, P. D. *J. Mat. Chem.* **2005**, *15*, 2784–2790.

(11) Delepine, A. S.; Tripier, R.; Handel, H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1743–1750.

(12) Kwon, J. Y.; Singh, N. J.; Kim, H. N.; Kim, S. K.; Kim, K. S.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8892–8893.

(13) Huston, M. E.; Akkaya, E. U.; Czarnik, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8735–8736.

(14) Kejik, Z.; Zaruba, K.; Michalik, D.; Sebek, J.; Dian, J.; Pataridis, S.; Volka, K.; Kral, V. *Chem. Commun.* **2006**, 1533–1535.

(15) Altgan, S.; Akkaya, E. U. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9269–9271.

(16) (a) Albenda, M. T.; Bernardo, M. A.; Garcia-España, E.; Godino-Salido, M. L.; Luis, S. V.; Melo, M. J.; Pina, F.; Soriano, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 2545–2549. (b) Aucejo, R.; Diaz, P.; Garcia-España, E.; Alarcon, J.; Delgado-Pinar, E.; Torres, F.; Soriano, C.; Guillem, C. M. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 44–51.

Actually, several examples of nucleotide anion binding by synthetic receptors, mostly of polyammonium type, have been recently reported.^{3–29} Similarly to natural systems, the formation of stable host–guest adducts requires the incorporation in the receptor of sites for multiple interactions with substrates. In fact, to achieve a better recognition of nucleotide anions, the receptor needs to contain not only positively charged ammonium groups able to interact with the anionic phosphate moiety but also binding sites able to interact via hydrogen bonding or π -stacking with the nucleobases or the sugar moieties.^{2–11,13,19–21} Finally, the binding sites of the receptor need to be opportunely preorganized to optimally interact with the anionic substrate. From this point of view, encapsulation of the nucleotide, or of a portion of the nucleotide, in clefts or cavities of the receptor may strengthen the overall host–guest interaction affording particularly stable adducts or favoring recognition of a selected nucleotide anion. Actually, encapsulation of a determined subunits of nucleotides, e.g., the phosphate chain or the nucleobase, within the cavity of cyclic polyammonium receptors has been often proposed on the basis of molecular modeling results.^{4,5}

The insertion of heteroaromatic subunits with fluorogenic characteristics within the receptor structure may represent an important “added value” to this class of receptors. In fact, in this case, the aromatic moiety can be used not only to bind the substrates via π -stacking and or hydrophobic interactions but also to signal their presence in solution, thanks to quantifiable changes of its emission properties.^{2,12–29}

(17) Casasus, R.; Climent, E.; Marcos, M. D.; Martinez-Manez, R.; Sancenon, F.; Soto, J.; Amoros, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903–1917.

(18) Ambrosi, G.; Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Guerri, A.; Macedi, E.; Micheloni, M.; Paoli, P.; Pontellini, R.; Rossi, P. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 5901–5912.

(19) (a) Sakamoto, T.; Ojida, A.; Hamachi, H. *I. Chem. Commun.* **2009**, 141–152. (b) Ojida, A.; Nanaka, H.; Miyahara, Y.; Tamaru, S.; Sada, K.; Hamachi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5518–5521. (c) Ojida, A.; Takashima, I.; Kohira, T.; Nonaka, H.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12095–12101.

(20) Casasus, R.; Climent, E.; Marcos, M. D.; Martinez-Manez, R.; Sancenon, F.; Soto, J.; Amoros, P.; Cano, J.; Ruiz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903–1917.

(21) Zapata, F.; Caballero, A.; Espinosa, A.; Tarraga, A.; Molina, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4034–40.

(22) Zyrjanov, G. V.; Palacios, M. A.; Anzenbacher, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7849–7852.

(23) Jose, D. A.; Mishra, S.; Ghosh, A.; Shrivastav, A.; Mishra, S. K.; Das, A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1979–1982.

(24) Khatua, S.; Choi, S. H.; Lee, J.; Kim, K.; Do, Y.; Churchill, D. G. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 2993–2999.

(25) Sun, Y.; Zhong, C.; Gong, R.; Fu, E. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3044–3047.

(26) Ghosh, A.; Shrivastav, A.; Jose, D. A.; Mishra, S. K.; Chandrakanth, C. K.; Mishra, S.; Das, A. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5312–5319.

(27) Wang, H.; Chan, W. H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 162–168.

(28) Lee, H. N.; Xu, Z.; Kim, S. K.; Swamy, K. M. K.; Kim, Y.; Kim, S. J.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3828–3829.

(29) Lee, D. H.; Kim, S. Y.; Hong, J. I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4777–4780.

(30) (a) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Biagini, S.; Bianchi, A.; Faggi, E.; Giorgi, C.; Marchetta, M.; Totti, F.; Valtancoli, B. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 8049–8063. (b) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bussotti, L.; Berni, E.; Biagini, S.; Faggi, E.; Foggi, P.; Giorgi, C.; Lapini, A.; Marcelli, A.; Valtancoli, B. *Chem. Commun.* **2007**, 1230–1232. (c) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Borsari, L.; Danesi, A.; Giorgi, C.; Lodeiro, C.; Mariani, P.; Pina, F.; Santarelli, S.; Tamayo, A.; Valtancoli, B. *Dalton Trans.* **2006**, *33*, 4000–4010. (d) Lodeiro, C.; Parola, A. J.; Pina, F.; Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Masotti, A.; Valtancoli, B. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2968–2975. (e) Bencini, A.; Bernardo, M. A.; Bianchi, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Pina, F.; Valtancoli, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1911–1918.

TABLE 1. Protonation Constants of L1 and L2 (0.1 M NMe₄Cl, 298.1 K)

reaction	log K	
	L = L1	L = L2 ^a
L + H ⁺ = [HL] ⁺	10.24(1)	10.14(1)
[HL] ⁺ + H ⁺ = [H ₂ L] ²⁺	9.87(1)	10.10(1)
[H ₂ L] ²⁺ + H ⁺ = [H ₃ L] ³⁺	8.02(1)	8.59(1)
[H ₃ L] ³⁺ + H ⁺ = [H ₄ L] ⁴⁺	7.24(1)	7.79(1)
[H ₄ L] ⁴⁺ + H ⁺ = [H ₅ L] ⁵⁺	6.51(2)	6.98(1)
[H ₅ L] ⁵⁺ + H ⁺ = [H ₆ L] ⁶⁺		6.90(1)

^aFrom ref 31.

Results and Discussion

Protonation of the Receptors. Since the binding properties of polyammonium receptors are generally determined by the formation of protonated species in aqueous solutions and by the localization of the ammonium groups within the receptor structure, we preliminarily carried out a study on the basicity properties of L1 and L2 by coupling potentiometric, ¹H NMR, spectrophotometric, and fluorimetric measurements in aqueous solutions. The protonation constants of L2 have been previously communicated,³¹ while the protonation equilibria of L1 have been potentiometrically determined in this study. The basicity constants of both ligands are reported in Table 1.

Receptors L1 and L2 can bind up to five and six acidic protons in the pH range investigated (2.5–10.5), respectively.³² Their protonation constants are higher than those observed for the corresponding protonation equilibria in the phenanthroline-containing macrocycle 2,5,8,11,14-pentaaza[15]-16,29-phenanthroline,^{30c} which contains five amine groups separated by ethylenic chains, in agreement with the larger +I inductive effect exerted on amine groups by propylenic chains and with the higher flexibility of L1 and L2 which allow a better minimization of the electrostatic repulsion between positive charges in the polyprotonated forms of the receptors.³³ All protonation constants of L1 and L2 are also higher than those reported for 1,10-phenanthroline (log *K* = 4.96),³⁴ suggesting that the heteroaromatic nitrogens are not directly involved in the process of proton binding in aqueous solutions, at least in the pH range investigated. The analysis of the pH dependence of the ¹H NMR signals often give useful information on the localization of the acidic protons in polyammonium cations.³³ However, in the case of L1 and L2, the resonances of the hydrogen atoms of the propylenic chains cannot be safely attributed at all pH values, due to their similar chemical shifts. Conversely, the sharp singlet of the benzylic methylene group (4 in Scheme 1) at 4.69 (L1, pH 1.9) or 4.72 ppm (L2, pH 2), adjacent to the phenanthroline unit, is easily recognizable at all pH values in both receptors.

As shown in Figure 1 for L1, the chemical shift is not affected by pH in the pH range 11–8. A remarkable downfield shift is observed below pH 8, i.e., with the formation of the [H₄L1]⁴⁺ and [H₅L1]⁵⁺ species in solution, suggesting that the last two protonation steps of the receptor occur on the benzylic nitrogen atoms adjacent to phenanthroline N_a.

(33) Bencini, A.; Bianchi, A.; Garcia-España, E.; Micheloni, M.; Ramirez, J. A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *188*, 97–156.

(34) Smith, R. M.; Martell, A. E. *NIST Stability Constants Database*, version 4.0; National Institute of Standards and Technology: Washington, DC, 1997.

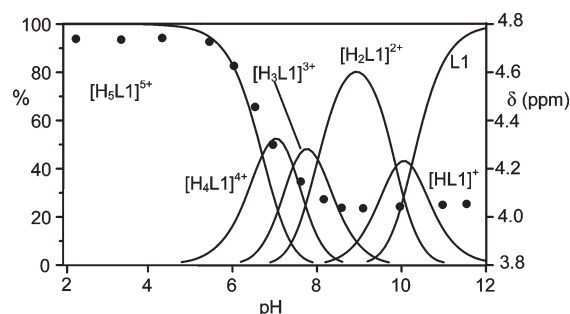


FIGURE 1. pH dependence of the ¹H NMR chemical shifts of the benzylic protons of L1 (●) and distribution diagrams of its protonated forms (298 K, 0.1 M NMe₄Cl).

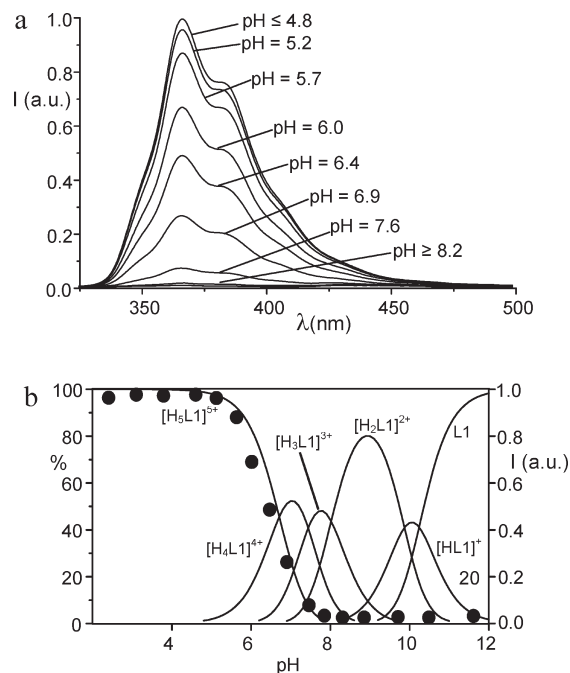


FIGURE 2. Emission spectra of L1 at selected pH values (a) and pH dependence of its emission intensity at 366 nm (298 K, λ_{exc} 270 nm, 0.1 M NMe₄Cl) (b).

A similar behavior is also found in the case of L2, where a marked upfield shift of this signal is observed upon the formation of the [H₅L2]⁵⁺ and [H₆L2]⁶⁺ protonated species (Supporting Information, Figure S2). The first three (L1) or four protonation steps (L2) take place on the central amine groups of the aliphatic chain. The lower proton affinity of the N_a nitrogen atoms, in comparison with the N_b and N_c ones, can be reasonably ascribed to the electron-withdrawing effect of the heteroaromatic unit on the adjacent N_a amine groups. Therefore, L1 and L2 present a preferential binding zone for protons, i.e., the central amine groups N_b and N_c of the aliphatic chain, located far from the heteroaromatic units. Of note, in both L1 and L2, the resonances of the heteroaromatic protons show only minor shifts in the pH range 2–12, supporting the hypothesis that phenanthroline is not directly involved in the process of proton binding.

This fact is substantially confirmed by the analysis of the UV spectra of L1 and L2 recorded in aqueous solutions at different pH values. In fact, the UV band of phenanthroline at 270 nm is

TABLE 2. Stepwise Stability Constants of the Adducts Formed by L1 and L2 with Nucleotides (0.1 M NMe₄Cl, 298.1 K)

reaction	log K			
	S ⁴⁻ = ATP	S ⁴⁻ = CTP	S ⁴⁻ = TTP	S ⁴⁻ = GTP
[HL1] ⁺ + S ⁴⁻ = [HL1S] ³⁻	2.61(3)		3.57(1)	
[H ₂ L1] ²⁺ + S ⁴⁻ = [H ₂ L1S] ²⁻	3.12(3)		3.80(1)	3.24(2)
[H ₃ L1] ³⁺ + S ⁴⁻ = [H ₃ L1S] ⁻	4.11(3)	3.01(4)	4.27(2)	4.07(2)
[H ₄ L1] ⁴⁺ + S ⁴⁻ = [H ₄ L1S]	5.66(3)	4.64(5)	5.70(2)	5.59(3)
[H ₃ L1] ³⁺ + [HS] ³⁻ = [H ₄ L1S]	5.67(4)		5.64(2)	5.30(3)
[H ₄ L1] ⁴⁺ + [HS] ³⁻ = [H ₅ L1S] ⁺	5.73(4)	6.01(5)	6.09(2)	5.93(3)
[H ₅ L1] ⁵⁺ + S ⁴⁻ = [H ₅ L1S] ⁺		6.13(5)		
[H ₅ L1] ⁵⁺ + [HS] ³⁻ = [H ₆ L1S] ²⁺	6.05(4)	5.29(5)	5.31(2)	5.48(3)
[H ₅ L1] ⁵⁺ + [H ₂ S] ²⁻ = [H ₇ L1A] ³⁺	5.30(4)	5.83(5)	4.29(2)	4.60(3)
[H ₅ L1] ⁵⁺ + [H ₃ S] ⁻ = [H ₈ L1S] ⁴⁺	5.64(4)			
[H ₂ L2] ²⁺ + S ⁴⁻ = [H ₂ L2S] ²⁻	4.29(2) ^a	3.16(2) ^a	3.03(3) ^a	2.87(3) ^a
[H ₃ L2] ³⁺ + S ⁴⁻ = [H ₃ L2S] ⁻	5.41(2)	4.38(2)	4.15(3)	4.47(3)
[H ₄ L2] ⁴⁺ + S ⁴⁻ = [H ₄ L2S]	7.08(2)	5.98(2)	5.24(3)	5.75(3)
[H ₄ L2] ⁴⁺ + [HS] ³⁻ = [H ₅ L2S] ⁺	8.86(3)	7.84(2)	7.11(3)	6.60(3)
[H ₅ L2] ⁵⁺ + S ⁴⁻ = [H ₅ L2S] ⁺	8.89(3)	7.27(2)	7.21(3)	6.93(3)
[H ₅ L2] ⁵⁺ + [HS] ³⁻ = [H ₆ L2S] ²⁺	9.68(3)	8.95(2)	7.67(4)	7.87(3)
[H ₆ L2] ⁶⁺ + S ⁴⁻ = [H ₆ L2S] ²⁺	9.91(3)	8.62(2)	7.98(3)	8.40(3)
[H ₆ L2] ⁶⁺ + [HS] ³⁻ = [H ₇ L2S] ³⁺	9.55(3)	8.58(4)	8.06(3)	7.16(3)
[H ₆ L2] ⁶⁺ + [H ₂ S] ²⁻ = [H ₈ L2S] ⁴⁺	9.17(3)	8.06(4)	3.57(1)	

^aFrom ref 31.

affected only by a small redshift (ca. 4 nm) accompanied by a slight increase of the absorbance below pH 9.

These spectral changes can be attributed to hydrogen bonding with the ammonium groups of aliphatic chains rather than to direct involvement of the phenanthroline in proton binding. In fact, protonation of 1,10-phenanthroline³⁵ is accompanied by a far higher redshift (ca. 20 nm) of its absorption band. Conversely, the emission spectra of L1 and L2 are strongly pH-dependent. As shown in Figure 2 for L1, the receptor is not emissive in alkaline aqueous solutions and shows the typical emission of phenanthroline only at acidic pH values, i.e., upon protonation of the [H₄L1]⁴⁺ species to give the [H₅L1]⁵⁺ one. This effect can be attributed to the presence, in [H₄L1]⁴⁺, of an unprotonated benzylic amine group (N_a in Scheme 1). In fact, as already observed in other phenanthroline-containing polyamine ligands,^{30d,e} the lone pair of the benzylic nitrogens, located close to phenanthroline, can efficiently quench the fluorescence emission of the fluorophore through an electron transfer process. Protonation of both the benzylic amine groups below pH 7 makes their lone pairs no longer available for the PET process and gives rise to a consequent renewal of the fluorescence emission of phenanthroline. A similar behavior is found for L2, where only the hexaprototated [H₆L2]⁶⁺ species, which is prevalent in solution at in the acidic pH region, is emissive (see the Supporting Information, Figure S3).

Binding of Nucleotide Triphosphates in Aqueous Solutions.

Since the binding properties of polyamine receptors toward anionic species in aqueous solution are often dependent on their protonation state and, therefore, on the pH of the solutions, we decided to investigate first their ability to interact

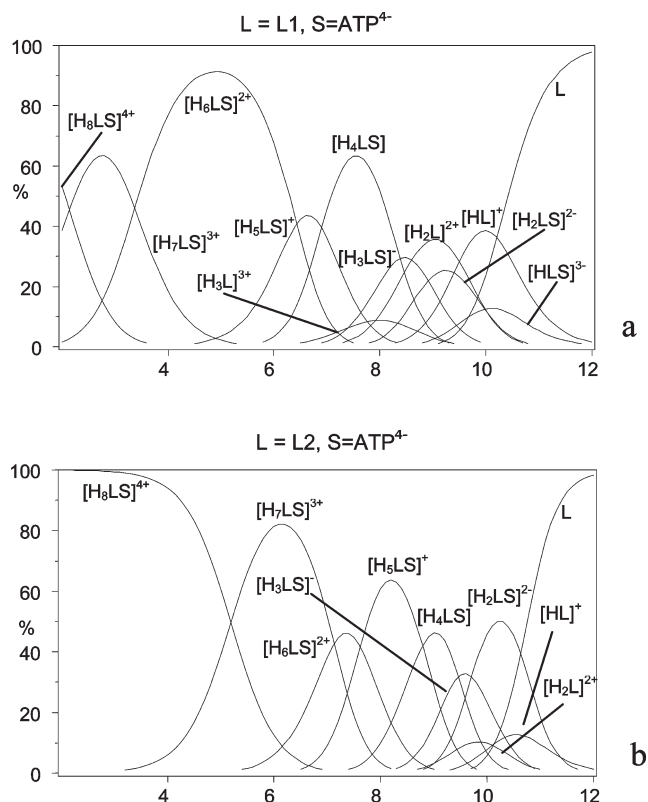


FIGURE 3. Distribution of the ATP adducts with L1 (a) and L2 (b) ([L1] = [L2] = [ATP] = 1 · 10⁻³ M, 298 K, 0.1 M NMe₄Cl).

with nucleotide triphosphate anions by means of potentiometric measurements. Both receptors form stable 1:1 adducts in aqueous solutions (Table 2). Although the formation of both 1:1 and 2:1 anion/receptor adducts has been observed in previously reported cases,³⁶ data analysis with the program

(35) (a) Armaroli, N.; De Cola, L.; Balzani, V.; Sauvage, J.-P.; Dietrich-Buchecker, C. O.; Kern, J. M. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1992**, *88*, 553–556. (b) Kern, J. M.; Sauvage, J.-P.; Weidmann, J. L.; Armaroli, N.; Flamigni, L.; Ceroni, P.; Balzani, V. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5329–5338. (c) Armaroli, N.; De Cola, L.; Balzani, V.; Sauvage, J.-P.; Dietrich-Buchecker, C. O.; Kern, J. M.; Bailal, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1993**, 3241–3247. (d) Armaroli, N.; Ceroni, P.; Balzani, V.; Kern, J. M.; Sauvage, J.-P.; Weidmann, J. L. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, *93*, 4145–4150.

(36) Dietrich, B.; Hosseini, M. W.; Lehn, J.-M.; Session, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1282–1283.

(37) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.

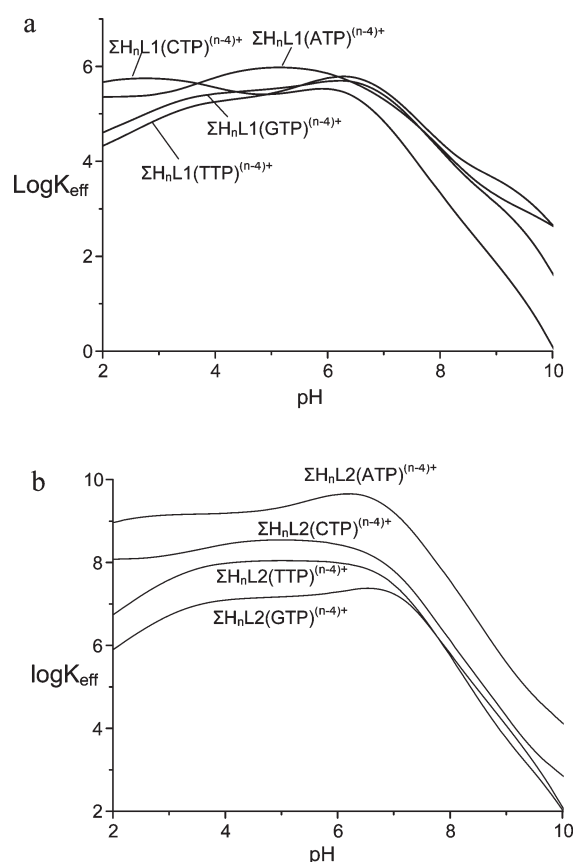


FIGURE 4. Plot of $\log K_{\text{eff}}$ as a function of pH for the L1 (a) and L2 (b) adducts with nucleotides ($K_{\text{eff}} = \Sigma H_n LS / (\Sigma H_{(h-i)} S \cdot \Sigma H_i L)$, with $L = L1$ or $L2$ and $S = \text{ATP, CTP, TTP}$ or GTP).

HYPERQUAD³⁷ under our experimental conditions reveals only 1:1 stoichiometries for all species detected in our systems. The eventual formation of oligomeric adducts (with 2:2 stoichiometries, for instance) was also ruled out by performing potentiometric titrations in a wide range of concentrations of receptors and substrates (see the Experimental Section).

Analysis of the titration curves allows one to determine the species formed in solution and their overall formation constants β_{HLS} ($S = \text{ATP, CTP, TTP}$ or GTP , $L = L1$ or $L2$), relative to equilibria of the type $L + S^{4-} + nH^+ = [H_n LS]^{(n-4)+}$ (see the Supporting Information, Table S1). Plots of the distribution curves of the species formed by L1 and L2 with the nucleotides (see Figure 3 for the ATP adducts with both receptors and the Supporting Information, Figure S4–S6, for the CTP, GTP, and TTP adducts) outline that complexation occurs in a wide pH range (for instance ATP is almost completely bound by both polyammonium receptors for pH values lower than 9), with the formation of a large number of 1:1 adducts with different protonation degrees.

The determination of the stepwise formation constants for the adducts between the protonated receptors and the anionic substrates, relative to equilibria of the type $H_{h-i}L + H_i S = [H_h LS]$, implies the knowledge of the localization of the acidic protons on receptor and substrates in the $[H_h LS]$ host–guest species. This task is made difficult by the presence in aqueous solution of a large number of overlapping

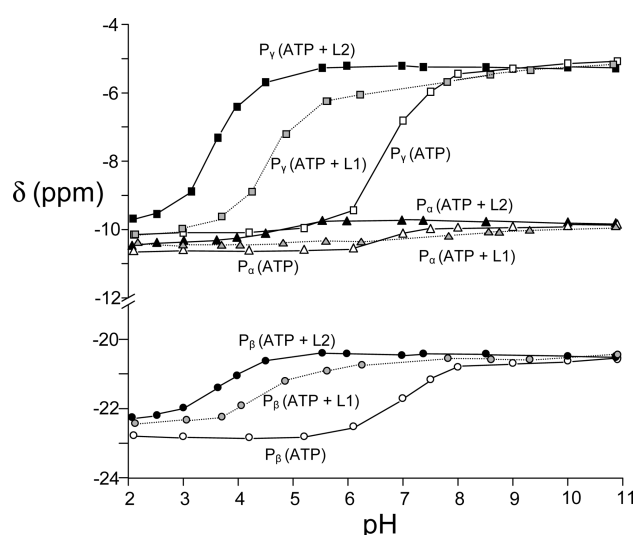


FIGURE 5. pH dependence of the ³¹P NMR chemical shifts of the ATP signals in the absence and in the presence of 1 equiv of L1 and L2 ($[L1] = [L2] = [\text{ATP}] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$).

equilibria in the same pH range and by the values of the protonation constants of the substrates, which are quite similar, in some cases, to the protonation constants of receptors. In these cases, in fact, different equilibria can be proposed for the formation of the same supramolecular adduct. For instance, the $[H_6 L2(\text{ATP})]^{2+}$ adduct could be formed either through the equilibrium $[H_5 L2]^{5+} + [\text{HATP}]^{3-} = [H_6 L2(\text{ATP})]^{2+}$ or $[H_6 L2]^{6+} + \text{ATP}^{4-} = [H_6 L2(\text{ATP})]^{2+}$, with calculated equilibrium constants of 9.68 and 9.91, respectively. The values of the stability constants of the adducts, calculated by using this approach are given in Table 2.

To overcome the presence of different equilibria present in solution at the same pH value, it can be useful to calculate effective stability constants.³⁸ For a given pH value, if the total amount of free substrate ($\Sigma H_{(h-i)} S$), free receptor ($\Sigma H_i S$) and adduct formed ($\Sigma H_h LS$) are known, one can define an effective stability constant by using the following equation:

$$K_{\text{eff}} = \Sigma H_h LS / (\Sigma H_{(h-i)} S \cdot \Sigma H_i L)$$

Plots of the pH dependence of the logarithms of the effective constants (Figure 4) point out that in all cases the stability of the adducts is strongly influenced by pH. In fact, a marked increase of the $\log K_{\text{eff}}$ values is generally observed from alkaline to slightly acidic pH values, with a maximum between pH 7 and 4; then the stability generally shows a slight decrease at lower pH values. In the alkaline and slightly acidic pH region, the substrates are in their less protonated and highly charged forms (S^{4-} or HS^{3-}), and therefore the observed increasing stability from pH 10 to slightly acidic pH values can be reasonably attributed to the increasing number of protonated ammonium functions gathered on the receptor, which enhances the receptor ability to give electrostatic and hydrogen-bonding interactions with the anionic substrates. Conversely, the decrease of the $\log K_{\text{eff}}$ values at more acidic pH values can be reasonably attributed to the progressive formation in solution of highly

(38) Bianchi, A.; Garcia-España, E. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 1727–1732.

TABLE 3. ^{31}P NMR Shifts (δ , ppm) of Nucleotides in Their Adducts with L1 and L2 and Corresponding Complexation-Induced ^{31}P NMR Chemical Shifts (CIS, ppm), Measured in D_2O Solution at pH 6, 298 K

	ATP			CTP			TTP			GTP		
	P_α	P_β	P_γ	P_α	P_β	P_γ	P_α	P_β	P_γ	P_α	P_β	P_γ
Receptor L1												
δ (ppm)	-10.7	-21.8	-6.0	-10.7	-22.0	-7.7	-10.8	-22.6	-7.9	-11.0	-21.9	-8.6
CIS	0.2	2.2	3.0	0.2	0.7	2.9	0.0	0.5	2.6	0.1	0.5	2.0
Receptor L2 ^a												
δ (ppm)	-9.9	-20.3	-5.2	-10.5	-21.5	-6.5	-10.8	-22.2	-7.6	-10.9	-21.3	-7.4
CIS	1.0	2.7	4.8	0.4	1.2	3.8	0.1	0.9	2.9	0.2	1.1	3.2

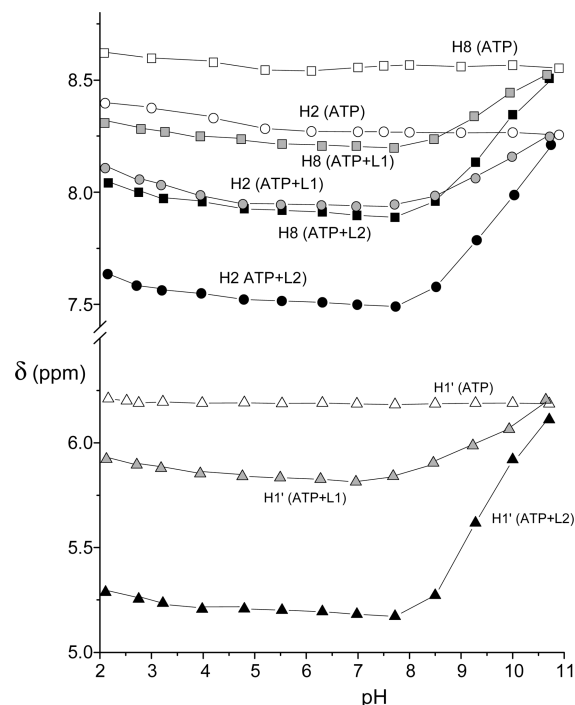
^aFrom ref 31.

protonated and less negatively charged forms of the substrates (H_2S^{2-} and H_3S^-) and to the consequent reduced electrostatic and hydrogen-bonding interactions between the two partners.

If the pH dependence of the conditional constants is similar for both receptors, significant differences are instead observed in the binding ability at a given pH value of the two receptors. In fact, L2 shows a remarkable higher binding affinity for each substrate than L1 and a marked selectivity for ATP over GTP, TTP, and CTP (Figure 4b) all over the pH range investigated. Conversely, a similar binding affinity for all four nucleotides features L1, which displays only a slight preference for ATP binding in the pH range 4–6. While the higher affinity of L2 toward nucleotide anions could be simply attributed to the higher positive charge gathered on the receptor at a given pH (for instance, at pH 6, L1 and L2 are present in solution as penta- and hexaprotonated species, $[\text{H}_5\text{L1}]^{5+}$ and $[\text{H}_6\text{L2}]^{6+}$), the selectivity displayed by L2 for ATP cannot be interpreted only in terms of charge–charge and hydrogen-bonding interactions between receptors and substrates. Therefore, we also analyzed the different host–guest systems by means of ^1H and ^{31}P NMR spectra recorded at various pH values.

Figure 5 reports the chemical shifts of the ^{31}P NMR signals of ATP in the presence and in the absence of L1 or L2 at different pH values. Similar plots have been also obtained for CTP, GTP, and TTP and are supplied within the Supporting Information (Figure S7), while Table 3 lists the CIS (complexation-induced shifts) of the different signals measured at pH 6, where the most stable adducts are generally formed. Binding of all substrates to L1 or L2 gives noticeable changes in the chemical shifts of the ^{31}P NMR signals of the triphosphate chain. In fact, marked upfield shifts are observed for the signals of the terminal P_γ phosphate group and, to a lesser extent, of the central P_β group. The signal of the P_α phosphate is generally only slightly affected by the presence of the receptors, and therefore, it is probably weakly involved in the stabilization of the adducts.

Considering nucleotide complexation by L2, Table 3 and Figures 5 and S7 show that the upfield shifts of the ^{31}P signals in the presence of the receptor decrease in the order $\text{ATP} > \text{CTP} > \text{TTP} \approx \text{GTP}$, which is almost the same sequence found for the stability constants of the adducts determined by potentiometric measurements (Figure 4). At the same time, for a given nucleotide, the adducts with L2 display higher complexation induced upfield shifts than those observed for L1. At a first glance, these results seem to suggest that the stability of the adducts is mainly determined

**FIGURE 6.** pH dependence of the ^1H NMR signals of the adenine protons H2 and H8 and of the ribose proton H1' of ATP in the presence of 1 equiv of L1 and L2.

by charge–charge and hydrogen-bonding interactions involving the phosphate chain. On the other hand, analysis of the ^1H NMR spectra recorded at different pH values on D_2O solutions containing the nucleotides and L1 or L2 provides unambiguous evidence of the involvement of the nucleobases in the recognition processes. In fact, all nucleotides, in the presence of L1 and L2, display downfield shifts for the signals of the aromatic protons of nucleobases and of the anomeric proton H1' of the sugar moiety.

Plots of the chemical shifts of these signals of nucleotides in the presence and in the absence of L1 or L2 vs pH (see Figure 6 for ATP and Supporting Information, Figures S8, for the other nucleotides) show that the complexation-induced chemical shifts are higher at slightly acidic pH values and strongly decrease in the alkaline pH region. However, the observed complexation-induced upfield shifts of the heteroaromatic protons of phenanthroline and nucleobases are less affected by pH than the downfield shifts observed for

TABLE 4. ^1H NMR Chemical Shifts for Protons of Phenanthroline, for Aromatic Protons of Nucleobases, and for the Anomeric H1' Proton of Ribose in the Adducts of L1 and L2 with ATP, CTP, GTP, and TTP and Corresponding Complexation-Induced Chemical Shifts (CIS, ppm), Measured in D_2O Solution at pH 6, 298 K

		H2	H1	H3		H8	H2	H1'
L1	δ	8.31	7.78	7.76	ATP	8.22	7.95	5.83
	CIS	-0.09	-0.11	-0.07		-0.33	-0.34	-0.38
L2 ^a	δ	8.27	7.63	7.65	ATP	7.91	7.49	5.25
	CIS	-0.26	-0.32	-0.14		-0.60	-0.76	-0.96
<hr/>								
		H2	H1	H3		H6	H5	H1'
L1	δ	8.32	7.82	7.65	CTP	7.75	6.11	5.88
	CIS	-0.08	-0.07	-0.08		-0.20	-0.11	-0.14
L2 ^a	δ	8.39	7.73	7.72	CTP	7.67	6.02	5.79
	CIS	-0.14	-0.22	-0.08		-0.28	-0.20	-0.24
<hr/>								
		H2	H1	H3		H6		H1'
L1	δ^a	8.34	7.83	7.67	TTP	7.68		6.13
	CIS	-0.06	-0.06	-0.06		-0.10		-0.19
L2 ^a	δ	8.35	7.75	7.71	TTP	7.43		5.90
	CIS	-0.18	-0.20	-0.09		-0.35		-0.42
<hr/>								
		H2	H1	H3		H8		H1'
L1	δ^a	8.28	7.78	7.63	GTP	8.08		5.75
	CIS	-0.11	-0.11	-0.10		-0.15		-0.10
L2 ^a	δ	8.35	7.67	7.70	GTP	7.79		5.46
	CIS	-0.23	-0.28	-0.10		-0.44		-0.39

^aFrom ref 31.

the ^{31}P signals of the phosphate chain. Whereas the latter are strongly reduced or, in the same cases, almost absent below pH 4–5 and at alkaline pH values, the former show only minor changes in a wide pH range, generally from pH 2 to 8, indicating that the interactions between phenanthroline and nucleobases are less sensible to the pH of the medium than the charge–charge interactions involving the phosphate moieties of nucleotides.

In the case of the larger receptor L2, the observed downfield shifts induced by complexation with the receptor (Table 4) decreases in the order $\text{ATP} \gg \text{GTP} > \text{TTP} > \text{CTP}$ accounting for a stronger interaction of adenine of ATP with the receptor. Of note, the ^1H NMR signals of the phenanthroline unit of L2 also exhibit relevant downfield shifts (see Table 4 and Figure 7b for ATP and Supporting Information, Figures S9–S11) in the presence of all nucleotides. The downfield shifts of the phenanthroline protons of L2 are larger in the case of ATP and decrease in the order $\text{ATP} \gg \text{GTP} > \text{TTP} \approx \text{CTP}$, a sequence similar to that observed for the protons of nucleobases in the presence of L2. These results may indicate that the phenanthroline unit of L2 and the nucleobases are coupled by π -stacking interactions, which decrease on passing from ATP to CTP.

In the case of the smaller receptor L1, the formation of the host–guest adducts with all nucleotides induces smaller shifts of the ^1H resonances of both nucleobases and phenanthroline with respect to complexation with the larger host L2 (Table 4, Figures 6 and 7 and Supporting Information, Figures S8–S11). In particular, the shift of the phenanthroline signals of L1 in the presence of nucleotides are only slightly affected by complexation, suggesting that the heteroaromatic unit of this receptor is weakly involved in the stabilization of the adducts.

These NMR results suggest that the stability sequences observed for the host–guest adducts is not only determined by electrostatic interactions and hydrogen-bonding contacts between the ammonium groups of L1 or L2 and the triphosphate chains of nucleotides, but also by the interactions between the nucleobases and the two polyammonium hosts.

Overall, the ATP adducts with L2, the most stable among all the systems investigated, display the strongest charge–charge interactions involving the phosphate chain and robust π -stacking interactions between adenine and phenanthroline. Conversely, the phenanthroline unit of the smaller receptor L1 is likely to play a minor role in the stabilization of the adducts, accounting for the lower stability of the adducts with this receptor.

To corroborate these results, we carried out a MM analysis on the adducts with L1 and L2, and we tried to obtain crystals suitable for X-ray analysis. Our attempts to crystallize the complexes were unfruitful, with the only exception of the TTP–L2 adduct, which was structurally characterized.

Molecular Modeling and Structure Analysis. The host–guest interactions between the two receptors and nucleotides were analyzed by means of molecular modeling studies by using an implicit simulation of aqueous solution (preliminary results on ATP and CTP complexation with L2 have been previously presented).³¹ In particular, we focused our attention on the interaction between the $[\text{H}_5\text{L1}]^{5+}$ and $[\text{H}_6\text{L2}]^{6+}$ protonated receptors, which are the main species present in aqueous solution at neutral and slightly acidic pH values, and the tetraanionic forms of nucleotides. The most interesting finding is the encapsulation of the triphosphate chain of nucleotides within the macrocyclic cavity of L1 and L2. This structural feature is common to all sampled conformers of the four different anionic substrates. In all adducts, the two protonated receptors assume a similar conformation, folded along the axis connecting the two benzylic amine groups, while the nucleotides are characterized by a bent conformation which allows the simultaneous encapsulation of the phosphate chain within the cavity of the protonated guest and the interaction of the nucleobase either with the phenanthroline unit or with the polyammonium chain.

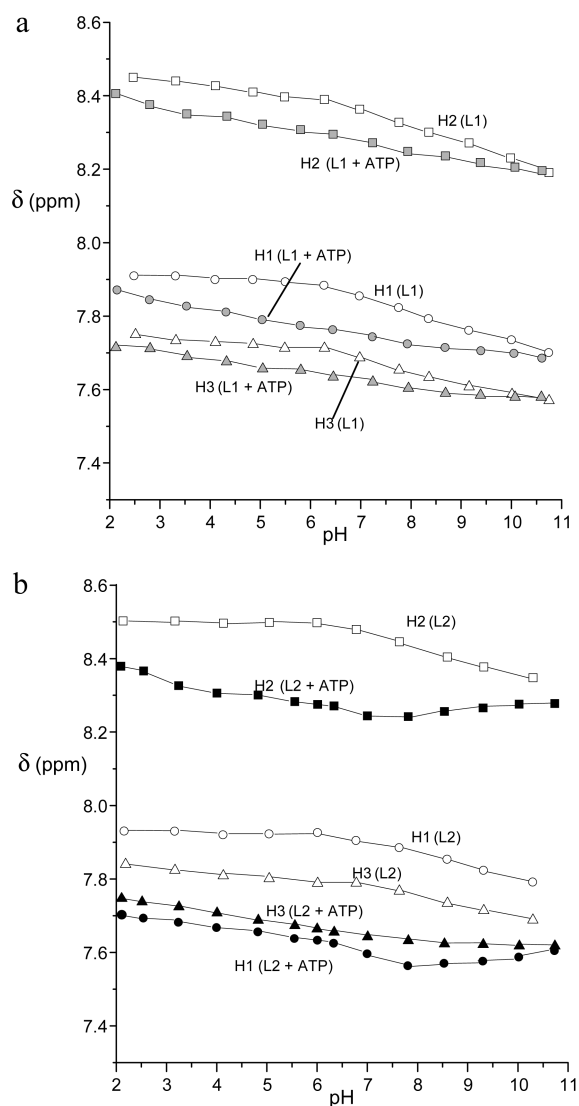


FIGURE 7. pH dependence of the signals of the phenanthroline protons of L1 (a) and L2 (b) in the absence and in the presence of 1 equiv of ATP.

In the case of the adducts with L2, the sampled conformers can be grouped in two different families, which differ in the interaction mode with the receptor. In the first family (Figure 8, A family) the nucleobases interact essentially via face to face π -stacking with the heteroaromatic unit of the receptor. In the case of ATP and GTP, the purine bases are stacked above the phenanthroline unit and lie on planes almost parallel to that of phenanthroline. In the adducts with CTP and TTP, the pyrimidine bases lie on planes slightly bent (24.6° and 7.6° for CTP and TTP, respectively) with respect to that phenanthroline and are less “overlapped” with this heteroaromatic unit.

The A family is the most populated in the case of ATP (70% of sampled conformers) and the less populated in the adducts with CTP (35%), TTP (30%) and GTP (40%), accounting for a higher tendency of ATP to form π -stacked adducts. In the second family, the most populated for CTP, TTP, and GTP, the nucleobases are still located close to the phenanthroline unit, but the interaction takes place essentially via hydrogen bonding with the protonated nitrogens of

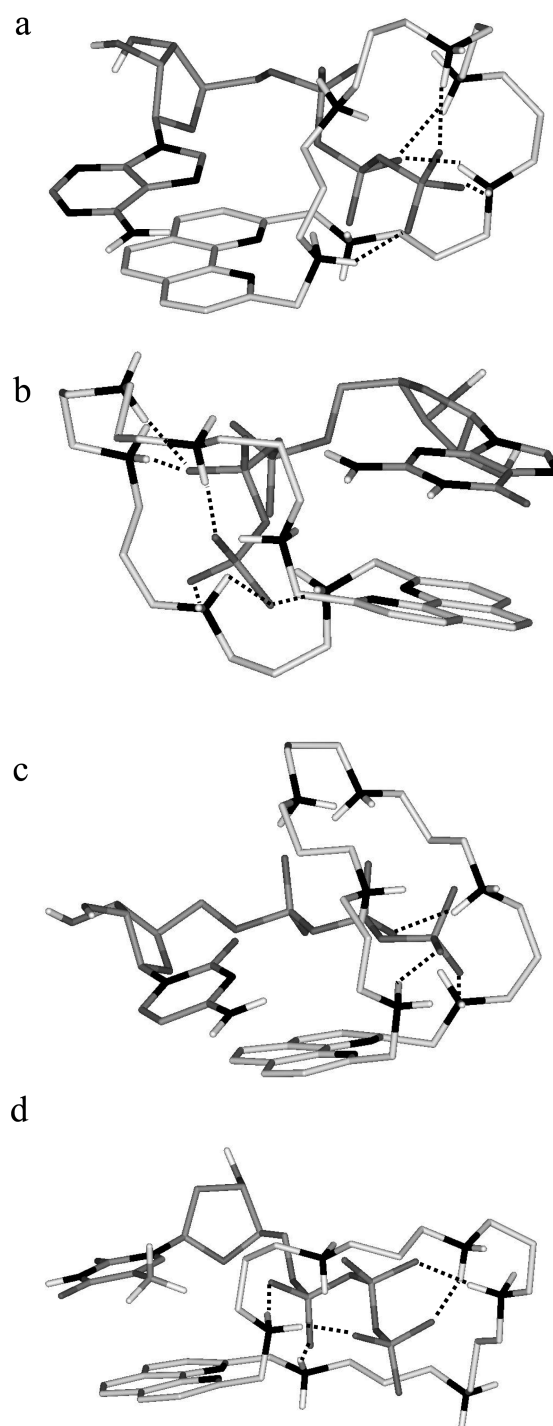


FIGURE 8. Lowest energy conformers of the adducts between $[H_6L2]^{6+}$ and ATP (a), GTP (b), CTP (c), and TTP (d) in the A families of conformers.

the receptor (Figure 9). In particular, the oxygen group O8 of the carbonyl function of GTP and TTP or the nitrogen atoms N7 and N3 of ATP and CTP are hydrogen bonded with one ammonium group of the aliphatic chain (see the Supporting Information, Figures S12–S14 for labeling).

In both families, encapsulation of the triphosphate unit within the receptor cavity enables the formation of a number of hydrogen-bonding contacts with the charged polyammonium chain (see the Supporting Information for a complete

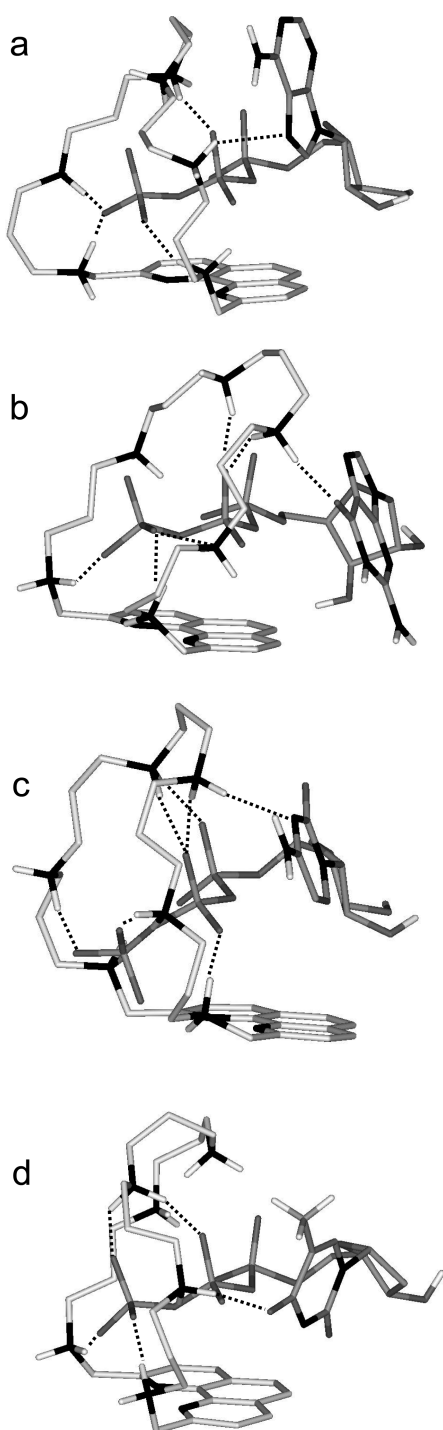


FIGURE 9. Lowest energy conformers of the adducts between $[H_6L2]^{6+}$ and ATP (a), GTP (b), CTP (c), and TTP (d) in the B families of conformers.

list of the hydrogen bonds, Tables S3–S5). The terminal and central phosphate groups are the most involved in the resulting hydrogen-bonding network, in keeping with the ^{31}P NMR results. Of note, among the different nucleotides, the triphosphate unit of ATP gives a robust hydrogen-bonding network with the polyammonium chain and, at the same time, exhibits the most pronounced π -stacking interaction between the nucleobase and phenanthroline. These results are in good agreement with the largest shifts

observed for the ^{31}P and 1H NMR signals of ATP in the presence of the receptor and can account for the higher stability found for the ATP adducts with L2. It seems likely that the phosphate chain and the adenine unit of ATP play a more pronounced cooperative role in the binding process than the corresponding triphosphate units and nucleobases of the other nucleotides. If this can be ascribed, in the case of CTP and TTP, to the poorer tendency of cytosine and thymine to give π -stacking and hydrophobic interactions than adenine, due to their less extended aromatic structure, this consideration cannot be applied to GTP, since guanine and adenine generally display similar ability to give π -stacked complexes. On the other hand, it is known that steric effects can influence the stability of host–guest adducts. From this point of view, a tentative explanation for the higher stability displayed by the ATP adducts with respect to the GTP ones could reside in the mutual disposition of the nucleobase and the aliphatic chain of L2. In fact, to achieve simultaneously inclusion of the phosphate chain and face-to-face π -stacking, the receptor assumes a folded conformation, with the polyamine chain almost perpendicular to the phenanthroline plain. Therefore, to “overlap” phenanthroline, guanidine and adenine need to assume a position very close and almost perpendicular to the aliphatic chain of L2. The guanine structure is somewhat more hindered than adenine, due to the simultaneous presence of the two bulky C=O and $-NH_2$ groups. Differently from the $-NH_2$ group of ATP, in the guanine adduct with L2 these two groups are also oriented toward the aliphatic chain of L2 (Figure 8b). Steric hindrance between guanine and the aliphatic portion of L2 could justify the observed less tendency of GTP to give π -stacked adducts.

In the L1 adducts, the receptor and nucleotides assume bent conformations similar to those found in the case of L2, which enable the encapsulation of the triphosphate unit within the cavity of the receptor (Supporting Information, Figure S12) and the formation of a hydrogen bonding network with the ammonium groups of the receptor. The most significant difference with respect to the adducts with L2 can be observed in the interaction mode of the nucleobases with the receptor. In fact, most of the sampled conformers display a mutual disposition of the nucleobases and phenanthroline similar to that observed in the B families of the L2 adducts, featured by hydrogen bonding contacts between the nucleobases and the ammonium groups of the receptor. Actually, for all nucleotides, only a limited number of adducts (< 15%) display face-to-face π -stacking pairing, suggesting that in L1 this kind of interaction plays a minor role in the stabilization of the adducts and, overall, that phenanthroline is weakly involved in the recognition process. This result, once again, is in agreement with the small complexation induced shift observed for the 1H NMR signals of the phenanthroline unit of L1.

The different interaction mode of the nucleobases in the L1 adducts can be related to the smaller dimension of this receptor. In fact, in the case of the larger receptor L2, the nucleotides assume a bent conformation, which allows the simultaneous encapsulation of the phosphate chain within the receptor cavity and the formation of π -stacking interactions with phenanthroline. In the case of L1, the triphosphate chain is still fitted within the receptor cavity, in a fashion similar to that observed in the adducts with L2. If encapsulat-

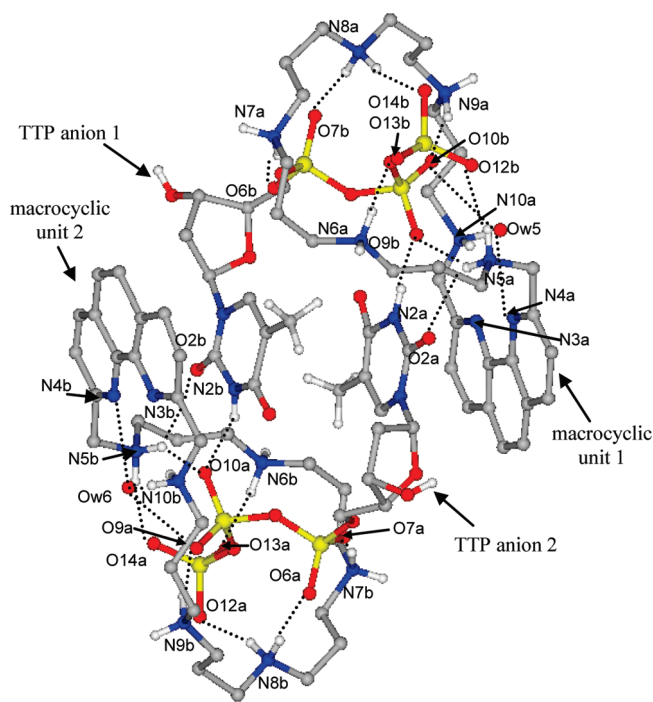


FIGURE 10. Crystal structure of the $[(H_6L2)_2TTP_2(H_2O)_2]^{4+}$ cation. Hydrogen bond distances (Å): N2a...O9b 2.75(1), N2b...O10a 2.76(1), N6a...O13b 2.63(2), N9b...O9a 2.78(3), N8a...O7b 2.77(2), N8a...O14b 2.73(2), N5a...O2a 2.96(1), N5a...O9b 2.78(2), N5a...O12b 2.82(2), N7a...O6b 2.72(3), N9a...O10b 2.61(3), N5b...O2b 3.04(2), N5b...O10a 2.69(2), N5b...O14a 2.75(3), N6b...O13a 2.70(2), N10a...Ow5 2.79(3), N8b...O12a 2.83(3), N8b...O6a 2.86(2), N7b...O7a 2.72(3), N10b...Ow6 2.76(3), N4a...Ow5 2.89(2), Ow5...O10b 2.94(2), N4b...Ow6 2.94(2), Ow6...O9a 2.87(2).

ion of the phosphate chains enables the formation of a stabilizing network of hydrogen-bonding interactions, the smaller dimension of L1 does not allow to the nucleobases to assume simultaneously a spatial disposition “overlapped” to the phenanthroline unit of the receptor, preventing the formation of face-to-face π -stacking interactions.

To obtain further information on the structural features of the adducts, we attempted to get crystals suitable for X-ray analysis from aqueous solutions containing receptors and nucleotides in 1:1 molar ratio. In the case of the system TTP-L2 we obtained crystals of compound $[(H_6L2)_2(TTP)_2(H_2O)_2]Br_4 \cdot 7H_2O$, which was structurally characterized. The crystal structure is constituted by a dimeric adduct $[(H_6L2)_2(TTP)_2(H_2O)_2]^{4+}$ (Figure 10), four bromide anions and seven crystallization water molecules. The $[(H_6L2)_2(TTP)_2(H_2O)_2]^{4+}$ adduct, featured by a non crystallographic inversion symmetry, is formed by two protonated L2 receptors, two TTP anions, and two water molecules, held together by several hydrogen-bonding contacts and π -stacking interactions. As shown in Figure 10, each protonated receptor is characterized by a conformation folded along the axis linking the benzylic nitrogen atoms, in a manner similar to that observed in the calculated conformers of the $[(H_6L2)(TTP)]^{2+}$ adduct. The two receptors assume a head-to-tail cyclic disposition and define a three-dimensional cavity, where two TTP anions are hosted. The triphosphate chain of each TTP anion is encapsulated within the macrocyclic cavity of one protonated receptor to give a

network of charge-assisted hydrogen-bonding interactions with the ammonium groups, while its pyrimidine base is sandwiched between the phenanthroline unit of the second receptor and the thymine group of the other TTP anion. This leads to the formation of a face-to-face π -stacked array of two thymidine and two phenanthroline units, with interplanar distances of 3.3 Å between phenanthroline and thymine planes and of 3.6 Å between the two thymine units.

Of note, each phosphate chain is fitted inside a macrocyclic cavity affording hydrogen-bonding interactions between all phosphate groups and the protonated amine groups. Indirect hydrogen bonds contacts, i.e., mediated by a bridging water molecule, are also observed between the P_β phosphate and both phenanthroline nitrogens (N4a or N4b) and a single benzylic ammonium group (N10a or N10b). Finally, the thymine carbonyl group O2a or O2b interacts via hydrogen bonding with a protonated nitrogen of the receptor, while the thymine nitrogen atom N2a or N2b is hydrogen bonded to the P_β phosphate of a different TTP unit. The interaction modes observed in this crystal structure, such as the inclusion of the phosphate chain within the cavity of L2 and the π -pairing between phenanthroline and thymine, resemble those observed in the calculated conformers for the nucleotides/L2 adducts.

Conversely, the formation of a dimeric assembly, not found in aqueous solution, may reflect the scarce tendency of thymine to give π -stacking interaction with the phenanthroline of the receptor in the 1:1 adducts. As a consequence, in the solid state the phosphate chain of each TTP unit is enclosed in the cavity of one of the polyammonium receptor, while the corresponding thymine moiety prefers to interact via π -stacking with the phenanthroline of a second protonated receptor and via hydrogen bonding and π -stacking with a second TTP anion.

Although nucleotide complexation by synthetic polyammonium receptors has been widely investigated, only a single crystal structure of this type of adducts has been previously reported.^{8a} At the same time, no crystal structure displaying an inclusive binding mode of the anionic moiety of nucleotides has been previously shown, although this binding feature has been often proposed to justify the formation of stable adducts between nucleotides and cyclic polyammonium receptors.^{4,5}

The resolution of this crystal structure allowed us to perform a molecular modeling analysis of the adduct between $[H_6L2]^{6+}$ and TTP in its tetraanionic form, using as starting coordinates those obtained from the X-ray analysis. In $[(H_6L2)_2TTP_2(H_2O)_2]^{4+}$, each polyammonium receptor interacts simultaneously with one TTP anion via inclusion within its cavity of the triphosphate chain and with a second TTP anion essentially via π -stacking. Therefore, we performed two different MD simulations by using either the coordinates of the polyammonium receptor and of the TTP anion interacting together in the inclusive fashion (indicated as “macrocyclic unit 1” and “TTP anion 1” in Figure 10), or the coordinates of the macrocycle and of TTP interacting together mainly *via* π -stacking (“macrocyclic unit 1” and “TTP anion 2” in Figure 10). In both cases, simulated annealing leads to two different families of conformers with structural characteristics almost equal to those previously achieved using starting coordinates obtained by manual docking (see Supporting Information, Tables S6 and S7

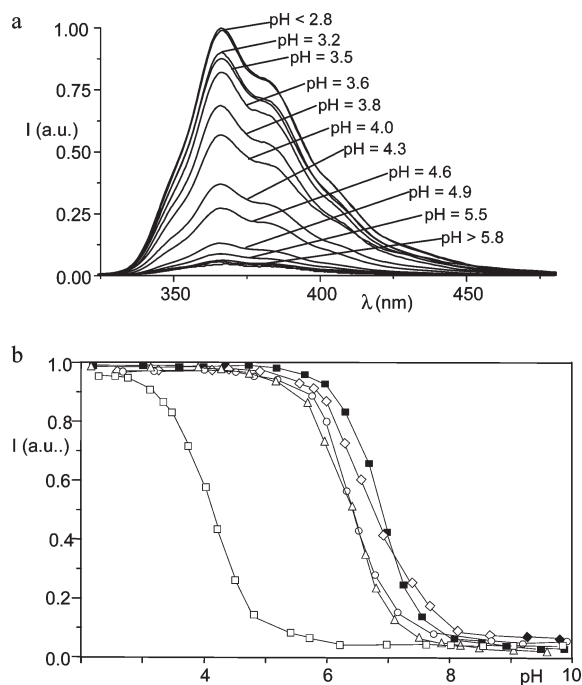


FIGURE 11. Emission spectra of L2 at selected pH values (a) and pH-dependence of its emission intensity at 366 nm in the absence (■) and in the presence of 1 equiv of ATP (□), CTP (△), GTP (◇) and TTP (◊) ($[L2] = [ATP] = [CTP] = [GTP] = [TTP] = 2.5 \times 10^{-5}$ M, 298 K, λ_{exc} 270 nm, 0.1 M NMe_4Cl) (b).

and Figure S16). In fact, both families display the triphosphate anion enclosed within the macrocyclic cavity, while the nucleobase interacts either via π -stacking (A family) with phenanthroline or via hydrogen bonding between one carbonyl oxygen thymine and ammonium group of the receptor (B family). This second interaction mode is the preferred one by TTP (the 68% of sampled conformers belong to the B families), as already found by means of the manual docking procedure. Although these results do not add new information on binding mode of the receptor, they give confidence to the overall minimization procedure used in the absence of crystallographic data as starting coordinates.

Fluorescence Sensing of ATP. As discussed above, both receptors exhibit an ON-OFF pH dependence of their fluorescence emission. In fact, they are not emissive in the alkaline pH region and show the typical emission band of phenanthroline only below pH 7–8 (Figure 2 and Supporting Information, Figure S3). Analogous pH profiles are also observed for the adducts of L1 with the four nucleotides. Conversely, ATP gives significant changes in the pH dependence of the emission spectra of the larger receptor L2 (Figure 11), while the pH dependence of the spectra is only slightly affected by the presence of the other nucleotides. In fact, the phenanthroline unit of L2 becomes emissive at remarkably more acidic pH values in the presence of ATP (below pH 4.5), while only minor displacements of the pH profile toward acidic pH values are observed in the case of CTP, GTP, and TTP.

In consequence, in the pH range 4.5–7 L2 is emissive in the presence of CTP, TTP and GTP, while is quenched in the presence of ATP (Figure 11b). Therefore, L2 is not only able of selectively bind ATP over the other nucleotides, but also

to selectively sense ATP in a narrow pH range (pH 4.5–7), thanks to a complexation induced quenching of fluorescence.

In principle, the quenching of the fluorescent emission of L2 in the presence of ATP in the pH range 4.5–7 could occur through an electron-transfer (PET) process involving either the adenine moiety or a not protonated amine group of the receptor. In fact, the electron-rich adenine unit may give rise to a PET process to excited phenanthroline, a typical aromatic electron-rich moiety. This mechanism has been already proposed for similar quenching effects upon ATP binding to fluorogenic polyammonium cations.^{3b} This hypothesis is supported by MM calculations and 1H NMR measurements, which clearly show that, among the four nucleotides, adenine of ATP gives the strongest π -stacking interactions with phenanthroline of L2, and assumes a spatial position very close to that of phenanthroline, which could favor the PET process. On the other hand, Figure 6 shows that the interaction between adenine and phenanthroline is not much affected by pH and it is present also at pH values lower than 4.5, i.e., in the pH region where the ATP adducts are emissive.

However, among the adducts with L2, ATP gives not only the more robust π -stacked pairing, but also the strongest charge–charge interactions between its triphosphate unit and the polyammonium chain of the receptor. As already observed in the absence of nucleotides at pH > 7, the quenched status of phenanthroline is due to the presence of a not protonated amine group. L2 becomes emissive below pH 7, where all amine groups are protonated, and therefore, their lone pairs are not available to quench the excited fluorophore through a PET process. The fact that L2 in the presence of ATP is not emissive in the pH range 4.5–7 may be related to the hydrogen-bonding and charge interactions between the anionic phosphate moiety and the polyammonium chain of the protonated receptor, which could lead to an intracomplex proton transfer from one ammonium group to a phosphate, making an amine lone pair available for the quenching process in this pH range. This mechanism has been already proposed to explain the quenching of the emission of other polyammonium receptors in the presence of phosphate anions.¹³ Of note, Figure 5 shows that the downfield shift observed for the signals of the phosphate chain in the presence of ATP is maximum at slightly acidic pH values, where the L2–ATP adduct is quenched, but decreases remarkably below pH 4.5, where protonation of the triphosphate moiety of the nucleotide reduces its charge–charge interactions with the polyammonium groups. This may prevent the process of proton transfer from the polyammonium chain, renewing the fluorescence emission of phenanthroline. This observation suggests that the quenching of the emission at slightly acidic pH values is probably due to a PET process involving the lone pair of an amine group, which deprotonates upon a proton-transfer process induced by the strong electrostatic and hydrogen-bonding interactions present in this pH range.

L2 is also able to ratiometrically detect ATP.³¹ In fact, addition of increasing amounts of ATP to a solution of L2 in the pH range 5–7 leads to linear decrease of the fluorescence emission of the receptor and the fluorescence of L2 is completely quenched in the presence of 1 equiv of ATP. The other triphosphate nucleotides produce only small

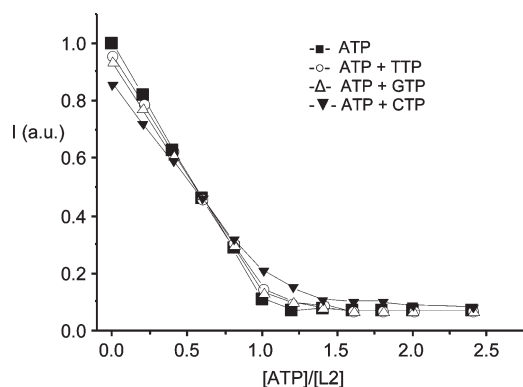


FIGURE 12. Fluorescence intensity of L2 at 366 nm in the presence of increasing amounts of ATP in the absence (■) and in the presence of 1 equiv of TTP (△), GTP (○) and CTP (▼). (λ_{exc} 270 nm, NMe_4Cl 0.1 M, 298.1 K, pH = 6, $[\text{L}] = 2.5 \times 10^{-5}$).

decrease of the fluorescence emission (at maximum 18% for CTP). Of note, ratiometrically sensing of ATP is scarcely affected by the presence in solution of 1 equiv of the other nucleotides. In fact, a competition experiment, carried out by adding increasing amounts of ATP to a solution buffered at pH 6 containing 1 equiv of TTP or GTP, shows a linear decrease of the fluorescence emission of the fluorophore very similar to that observed in the absence of these nucleotides. In the presence of 1 equiv of CTP, the most efficient competing agent for ATP, the fluorescence emission of L2 linearly decreases up to a 1:0.8 L2/ATP molar ratio and achieves a constant value for L2/ATP molar ratios greater than 1.4 (Figure 12).

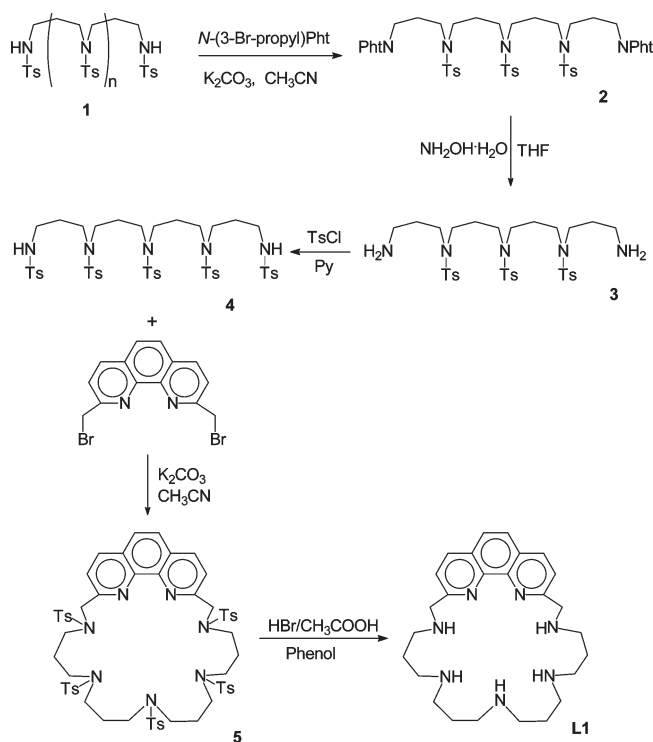
These results indicate not only that the sensing ability for ATP is scarcely affected by the presence of the other nucleotides, but also confirms, at least qualitatively, that the binding ability of L2 toward nucleotides decreases in the order $\text{ATP} \gg \text{CTP} > \text{TTP} \cong \text{GTP}$, in keeping with the results obtained by means of potentiometric measurements.

Concluding Remarks

The comparison of the binding properties of L1 and L2 shows that slight differences in the receptor and/or nucleotide structures can determine the binding mode as well as the fluorescence emission of the adducts. The host-guest adducts formed by the highly protonated forms of L1 and L2 present similar inclusive coordination modes of the phosphate chain within the receptor cavity, which allow the formation of an hydrogen-bonding network between the ammonium groups of L1 and L2 and the anionic phosphate groups of nucleotides. In both the adducts with L1 and L2, all nucleotides assume folded conformations, which allow the simultaneous encapsulation of their triphosphate chain and the interaction of the nucleobases with the receptor. However, only receptor L2 is larger enough to allow the π -pairing of nucleobases with phenanthroline. In fact, despite the bent conformation assumed by nucleotides, the nucleobases cannot achieve an appropriate disposition to give π -stacking with the phenanthroline of L1, due to the somewhat smaller dimension of this receptor. The adducts with L2 are consequently more stable than those with L1.

To achieve selective recognition of a given substrate, the receptor binding sites need to be simultaneously involved in

SCHEME 2. Synthetic Procedure To Achieve L1



strong interactions with the guest species. Despite the similar structure of nucleotide triphosphates, ATP gives the most stable adducts with L2, thanks to a pronounced cooperative role played in the binding process by the phosphate chain and the adenine unit, which give rise respectively to a robust hydrogen-bonding network with the polyammonium chain of L2 and to strong π -stacking interactions with phenanthroline. This binding mode justifies not only the higher stability of the ATP-L2 adducts, but also the quenching of emission of phenanthroline, which takes place via a PET process from the receptor to the excited phenanthroline. Analysis of pH-dependence of the fluorescence emission shows that quenching of phenanthroline is induced by ATP binding only in a narrow pH range, between pH 4.5 and 7, that is the same pH region where the phosphate moiety of ATP gives the strongest interactions with the ammonium chain of L2. This suggests that the quenching effect is likely to be related to a proton-transfer process from an ammonium group to the anionic phosphate chain.

Experimental Details

Synthesis of Receptors. The procedure for the synthesis of receptors L1 is depicted in Scheme 2. L2,³¹ 2,9-bis(bromomethyl)-1,10-phenanthroline,³⁹ and tosylated amine 1,5,9-tritosyl-1,5,9-tetraazanonane (**1**)⁴⁰ were prepared as previously described. The reaction of pertosylated polyamine **4** with 2,9-bis(bromomethyl)-1,10-phenanthroline in dry acetonitrile at reflux and in presence of K_2CO_3 afforded macrocycle **4** in moderate yield. Deprotection of the nitrogen atoms was achieved by treatment of **4** with HBr in acetic acid and in

(39) Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18*, 599–601.

(40) (a) Bencini, A.; Burguete, M. I.; Garcia-España, E.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; Soriano, C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4749–4753. (b) Aguilar, J.; Diaz, P.; Escarti, F.; Garcia-España, E.; Gil, L.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 307–316.

presence of phenol. Deprotected macrocyclic receptor L1 was obtained in good yield as its hydrobromide salt.

1,17-Phthalimido-5,9,13-tritosyl-5,9,13-triazaheptadecane (2). Tosylated amine **1** (15.8 g, 26.6 mmol) and K_2CO_3 (29.7 g, 215 mmol) were suspended in refluxing dry acetonitrile (150 mL). To this mixture was added dropwise a solution of *N*-(3-bromopropyl)phthalimide (14.7 g, 55 mmol) in dry acetonitrile (150 mL). After the addition was complete, the suspension was refluxed for 48 h and then filtered off. The solvent was evaporated, and the residue suspended in refluxing ethanol to give **2** as a white solid. Yield: 23.2 g, (90%). Mp: 265–267 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 7.83–7.81 (m, 4H), 7.72–7.64 (m, 10H), 7.34–7.28 (m, 6H), 3.69 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.23–3.13 (m, 12H), 2.43 (s, 9H), 1.97–1.87 (m, 8H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.4 MHz) δ (ppm): 168.1, 143.2, 136.0, 133.9, 132.0, 129.7, 127.1, 123.1, 46.8, 46.6, 35.6, 28.6, 27.8, 21.5. Anal. Calcd for $C_{49}H_{53}N_5O_{10}S_3$: C, 60.79; H, 5.52; N, 7.23. Found: C, 60.9; H, 5.6; N, 7.3.

5,9,13-Tritosyl-1,5,9,13,17-pentaazaheptadecane (3). A mixture of **2** (3.48 g, 3.6 mmol) and hydrazine hydrate (85% in water, 8 mL) in THF (400 mL) was refluxed overnight and then cooled to room temperature and the resulting solid filtered off. The filtrate was concentrated to dryness, affording the deprotected amine **3** as a white solid. Yield: 2.51 g (98%). Mp: 150–152 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 7.67–7.53 (m, 6H), 7.23 (m, 6H), 3.12–3.03 (m, 12H), 2.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.34 (s, 9H), 1.83–1.75 (m, 4H), 1.62–1.54 (m, 4H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.4 MHz) δ (ppm): 143.3, 143.1, 135.9, 135.7, 129.6, 129.5, 127.0, 126.7, 46.8, 46.5, 38.9, 32.1, 28.7, 21.4. Anal. Calcd for $C_{33}H_{49}N_5O_6S_3$: C, 55.98; H, 6.98; N, 9.89. Found: C, 56.1; H, 6.9; N, 9.7.

1,5,9,13,17-Pentatosyl-1,5,9,13,17-pentaazaheptadecane (4). To a stirred solution of tosyl chloride (6.67 g, 35 mmol) in pyridine (55 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of the amine **3** (8.5 g, 12 mmol) in 50 mL of pyridine. After the addition was complete, the red solution was stirred at room temperature overnight and then poured in a water–ice mixture: an orange, gummy solid was obtained; it was ground and stirred in water until it turned into a pale pink powder, which was filtered and dried in vacuo at 40 °C overnight. The product **4** was recrystallized from hot $CHCl_3$ by addition of cold EtOH and obtained as a white solid (10.3 g, 85% yield). Mp: 203–205 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 7.84–7.73 (m, 12H), 7.43–7.35 (m, 12H), 3.24–3.12 (m, 16H), 3.09–3.06 (m, 4H), 2.53–2.51 (m, 18H), 2.02–1.88 (m, 8H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.4 MHz) δ (ppm): 143.5, 143.4, 143.2, 136.8, 135.4, 129.8, 129.6, 127.1, 127.0, 47.5, 47.2, 46.7, 40.2, 29.4, 29.1, 21.5. Anal. Calcd for $C_{47}H_{61}N_5O_{10}S_5$: C, 55.54; H, 6.05; N, 6.89. Found: C, 55.7; H, 6.2; N, 6.6.

2,6,10,14,18-Pentatosyl-2,6,10,14,18-pentaaza[19](2,9)cyclo-1,10-phenanthroline (5). To a refluxing, stirred suspension of the tosylated polyamine **4** (2.54 g, 2.5 mmol) and K_2CO_3 (3.45 g, 25 mmol) in dry acetonitrile (250 mL) and under nitrogen atmosphere was added a suspension of 2,9-bis-(bromomethyl)-1,10-phenanthroline (1.0 g, 2.75 mmol) in dry acetonitrile (250 mL) during 4 h. At the end of the addition, the mixture was stirred and refluxed for additional 2 h and then cooled to room temperature. The suspension was filtered on Celite and washed with acetonitrile, and the filtrate was evaporated to obtain a solid, which was purified by column chromatography on neutral aluminum oxide, using a mixture of PE/AcOEt 1:1.5 as the eluant. The fractions containing **6** ($R_f = 0.5$) were evaporated to dryness; **5** was obtained as a pale brown solid (1.08 g, 35% yield). Mp: 195–197 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 8.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.70–7.64 (m, 6H), 7.62–7.56 (m, 8H), 7.34–7.26 (m, 8H), 4.78 (s, 4H), 3.24 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H), 2.99 (m, 4H), 2.66 (m, 4H), 2.55 (s, 9H), 2.41 (s, 6H), 1.84 (m, 4H), 1.65 (m, 4H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.4 MHz) δ (ppm): 157.7, 143.2, 143.4, 143.0, 137.5, 135.9, 135.4, 129.6, 127.9, 127.1, 77.5, 55.3,

48.1, 46.7, 46.4, 46.3, 28.3, 28.1, 28.0, 21.2. Anal. Calcd for $C_{61}H_{69}N_7O_{10}S_5$: C, 60.03; H, 5.70; N, 8.03. Found: C, 59.9; H, 5.9; N, 7.9.

2,6,10,14,18-Pentaaza[19](2,9)cyclo-1,10-phenanthroline Hexahydrobromide (L1·6HBr). The tosylated macrocycle **5** (1.23 g, 1.0 mmol) and phenol (9.4 g, 100 mmol) were dissolved in HBr/AcOH 33% (100 mL); the reaction mixture was stirred and refluxed for 20 h until a white solid formed. The reaction mixture was cooled to room temperature, 100 mL of dichloromethane was added to complete the precipitation, and the mixture was stirred for an additional 1 h. The solid was filtered and washed with dichloromethane to remove the residual phenol. Receptor L1, as hydrobromide salt, was then recrystallized from a mixture of EtOH/water 3:1 (v/v), filtered/ and dried at 40 °C overnight in the presence of KOH (559 mg, 55% yield). Mp: 200 °C dec. 1H NMR (D_2O , 300 MHz, pH = 1.9) δ (ppm): 8.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.92 (s, 2H), 7.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.68 (s, 4H), 3.29 (m, 4H), 3.15 (m, 12H), 2.19 (m, 4H), 2.03 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (D_2O , 75.4 MHz, pH = 1.9) δ (ppm): 151.4, 144.6, 139.4, 129.2, 127.1, 123.6, 52.5, 45.2, 45.95, 44.86, 42.6, 23.0, 22.4. ESI-MS (m/z) 450.33 (100) ($[M + H]^+$), 226.2 (58) ($[M + 2H]^{2+}$). Anal. Calcd for $C_{26}H_{39}N_7 \cdot 6HBr$: C, 33.39; H, 4.85; N, 10.49. Found: C, 33.1; H, 4.8; N, 10.2.

Synthesis of the $[(H_6L2)_2(TTP)_2(H_2O)_2]Br_4 \cdot 7H_2O$ Adduct. L2·6HBr (10 mg, 0.01 mmol) and thymidine triphosphate monosodium salt (4.8 mg, 0.01 mmol) were dissolved in water, and the pH of the solution was raised to 6 with 0.1 M NaOH. The solution was then kept under an acetone atmosphere until the formation of colorless crystals suitable for X-ray analysis. Yield: 7.0 mg (56.9%) Anal. Calcd for $C_{78}H_{148}Br_4N_{20}O_{37}P_6$: C, 38.13; H, 6.06; N, 11.37. Found: C, 38.3; H, 6.2; N, 11.2.

Potentiometric Measurements. Equilibrium constants for protonation and complexation reactions with L were determined by pH-metric measurements at 298.1 ± 0.1 K in 0.1 M NMe_4Cl , by using equipment and procedures which have been already described.^{8b,31} In the experiments to determine the stability of the adducts with L1 and L2, the receptor concentrations were varied from 5×10^{-4} to 5×10^{-3} M, while the concentration of nucleotides was varied in the range 4×10^{-4} – 9×10^{-3} M. At least three measurements (about 100 data points each one) were performed for each system in the pH range 2.5–10.5, and the relevant emf data were treated by means of the computer program HYPERQUAD.³⁷ Full details are given within the Supporting Information.

Spectrophotometric and Spectrofluorimetric Measurements. Absorption and fluorescence emission spectra were recorded as previously described.³⁰ In the measurements carried out at different pH values, HCl and NaOH were used to adjust the pH values which were measured on a pH meter. TRIS buffer (1 mM) was used in the titrations performed at pH 6.0. In the competition experiments, successive readings of the emission intensity were carried out after each addition of CTP, TTP, or GTP to the ATP solution to ensure that the equilibrium was reached.

NMR Spectroscopy. 1H (300 MHz) and ^{13}C (75 MHz) in $CDCl_3$ and D_2O solutions at different pH values were recorded at 298 K on a 300 MHz spectrometer. To adjust the pD, small amounts of 0.01 M NaOD and DCl were added to the solutions. The pH was calculated by the measured pD values by using the following formula: $pH = pD - 0.40$.⁴¹ 2D correlation experiments were performed to assign the 1H NMR signals. Complexation-induced ^{31}P and 1H NMR chemical shifts (CIS, ppm) were measured as the difference $\delta_{OBS} - \delta_{nucleotide}$ where δ_{OBS} is the chemical shift of a signal measured in D_2O solutions containing receptor and substrate in a 1:1 molar ratio (both 5×10^{-3} M, in these conditions all adducts are completely formed in solution

(41) Covington, A. K.; Paabo, M.; Robinson, R. A.; Bates, R. G. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–709.

and no amounts of uncomplexed receptor or substrate is present in solution), and $\delta_{\text{nucleotide}}$ is the chemical shift of the corresponding signal of the not complexed receptor or substrate.

Crystal Structure Analyses. Data for the X-ray structural analysis of $[(\text{H}_6\text{L2})_2\text{TTP}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Br}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were collected on an Oxford Diffraction Xcalibur3 diffractometer equipped with CCD area detector and graphite-monochromated Mo $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71069 \text{ \AA}$, $T = 150 \text{ K}$). Data collection was performed using ω scan with the CrysAlis CCD program.⁴² Data reduction was carried out with the CrysAlis Red program,⁴³ and an empirical absorption correction was applied using spherical harmonics, implemented in SCALE3 AB-SPACK scaling algorithm.⁴³

Crystals of the compound belong to the triclinic family ($\text{C}_{78}\text{H}_{148}\text{Br}_4\text{N}_{20}\text{O}_{37}\text{P}_6$, $M_w = 2463.62$, $P1$, $a = 13.1824(8) \text{ \AA}$, $b = 14.2832(9) \text{ \AA}$, $c = 17.092(1) \text{ \AA}$, $\alpha = 91.782(5)^\circ$, $\beta = 109.531(5)^\circ$, $\gamma = 115.968(6)^\circ$; $V = 2666.3(3) \text{ \AA}^3$; $Z = 1$; $\rho_{\text{calc}} = 1.534 \text{ mg/m}^3$; $\mu = 1.689 \text{ mm}^{-1}$; $F(000) = 1282$; $\theta_{\text{max}} = 24.71$). Structures were solved by direct methods (SIR2004)⁴⁴ and refined against F^2 by using SHELXL-97,⁴⁵ with non-hydrogen non-carbon atoms anisotropic. Carbon atoms were refined isotropically in order to avoid a too low data/parameters ratio. Hydrogen atoms linked to carbon or nitrogen atoms were introduced in calculated position and refined in riding mode. Hydrogen atoms belonging to the solvent water molecules were not localized in the final ΔF map and not introduced in the calculation. All six-membered aromatic rings were restrained to idealized hexagons. Due to low intensity of data at high resolution, only data up to $\sin\theta/\lambda = 0.59$ were used during refinement. Agreement factors at the end of refinement were $R1 = 0.0777$, $wR2 = 0.1686$ (4847 reflections with $I > 2\sigma(I) - 846$ parameters refined); $R1 = 0.1769$, $wR2 = 0.2180$ (all data). The Flack parameter at the end of refinement was $-0.019(16)$.

(42) *CrysAlis CCD*, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.5, 2008.

(43) *CrysAlis RED*, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.5, 2008.

(44) Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Casciaro, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 115–119.

(45) Sheldrick, G. M., *SHELX-97*, Göttingen, 1997.

Computational Details. MD calculations were performed by using the AMBER3 forcefield, as implemented in the Hyperchem 7.51 package,⁴⁶ by using the procedure and method which has been already described.^{8b,31} Starting conformations of the $[\text{H}_6\text{L2}(\text{S})]^{2+}$ or $[\text{H}_5\text{L1}(\text{S})]^+$ adducts ($\text{S} = \text{ATP}^{4-}$, GTP^{4-} , CTP^{4-} , TTP^{4-}), obtained by manual docking of the minimized conformer of the receptor to the substrate (minimum distance between the atoms of receptor and substrate $> 5 \text{ \AA}$) and, in the case of the $[\text{H}_6\text{L2}(\text{TTP})]^{2+}$ complex, derived from the X-ray crystal structure, were freely minimized. Full details are given within the Supporting Information.

Acknowledgment. Financial support from MIUR (PRIN 2007) is gratefully acknowledged

Supporting Information Available: Full details for potentiometric measurements and molecular mechanics calculations; overall stability constants of the adducts; list of files containing the atomic coordinates of the minimized conformers; hydrogen-bonding distances in the low energy conformers of the adducts of $[\text{H}_5\text{L1}]^{5+}$ and $[\text{H}_6\text{L1}]^{6+}$ with nucleotides; titration data and fit curves for potentiometric titrations performed to determine the protonation constants of L2; pH dependence of the chemical shifts of the benzylic protons and of the fluorescence emission at 365 nm of L2; distribution diagrams of the adducts of L1 and L2 with CTP, TTP, and GTP; pH dependence of the ^{31}P NMR and ^1H NMR chemical shifts of the phosphate chain and of the nucleobases of CTP, TTP, and GTP in the absence and in the presence of L1 and L2; pH dependence of the ^1H NMR chemical shifts of the phenanthroline protons of L1 and L2 in the absence and in the presence of CTP, TTP, and GTP; labeled lowest energy conformers of the adducts of $[\text{H}_5\text{L1}]^{5+}$ and $[\text{H}_6\text{L1}]^{6+}$ with nucleotides; ORTEP drawing of the $[(\text{H}_6\text{L2})_2(\text{TTP})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$ cation; ^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **2–5** and of **L1**; atomic coordinates of the calculated low energy conformers in MDL_Mol format. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

(46) *Hyperchem $\beta 1$ release 7.51 for Windows MM System*, Hypercube, Inc., Gainesville, FL, 2002.

A Tris-Macrocyclic with Proton Sponge Characteristics as Efficient Receptor for Inorganic Phosphate and Nucleotide Anions

Andrea Bencini,^{*,[a]} Silvia Biagini,^[a] Claudia Giorgi,^{*,[a]} Henri Handel,^{*,[b]} Michel Le Baccon,^[b] Palma Mariani,^[a] Piero Paoletti,^[a] Paola Paoli,^[c] Patrizia Rossi,^[c] Raphaël Tripier,^[b] and Barbara Valtancoli^[a]

Keywords: Macrocycles / Anion binding / Nucleotides / Proton sponge / Molecular modeling / Thermodynamics

Synthesis, characterisation and proton-sponge behaviour of a new linear constrained tris-macrocyclic (**L**), containing three cyclen (cyclen = 1,4,7,10-tetraazacyclododecane) reinforced macrocycles connected by two 2,6-pyridinediylbis(methylene) linkers, is reported. Protonated forms of **L** are efficient receptors for inorganic phosphate and nucleotide anions (ATP and ADP). The binding properties of **L** toward these substrates have been investigated in aqueous solution by means of potentiometric titrations, determining the stability constants of the adducts. The interaction mode was clarified

by using ¹H and ³¹P NMR measurements in aqueous solution and by means of molecular modelling calculations carried out on differently protonated species of **L** as well as on several nucleotide-receptor adducts. The stability of the adducts is mainly due to charge-charge and hydrogen bonding interactions between the polyphosphate chain of nucleotides and the ammonium groups of **L**.

(© Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, Germany, 2009)

Introduction

Anion binding, the coordination of chemical species by virtue of their anionic nature, plays a central role in biological processes.^[1] For instance, a large variety of substrates and cofactors engaged in biological processes are anions. From this point of view, inorganic phosphates and nucleotides are ubiquitously present in biological systems and play crucial roles in many cellular functions, such as transport across membranes, DNA synthesis, cell signalling and energy or electron-transfer processes.^[1] In most cases, these functions are regulated by recognition processes involving proteins able to selectively bind the appropriate phosphate or nucleotide anion by using essentially non covalent interactions, such as charge-charge and charge-dipole interactions, hydrogen bonding and hydrophobic effects.

In this context, the design of synthetic receptors able to bind phosphate anions in aqueous solution has represented

and still represents one of the approaches to the analysis of the weak forces which regulate the recognition processes in biological systems.^[2] Actually, several examples of phosphate anion binding by synthetic receptors, mostly of polyammonium type, have been recently reported.^[3–18] It is now accepted that the formation of stable host-guest adducts requires the incorporation of sites for multiple interactions with substrates. In particular, to achieve a better recognition of nucleotide anions, the receptor needs to contain not only positively charged ammonium groups able to interact with the anionic phosphate moiety, but also binding sites able to interact via hydrogen bonding or π -stacking with the nucleobases. Finally, the binding sites of the receptor need to be suitably preorganised within the receptor structure to optimally interact with the anionic substrate. Although many examples of polyammonium ligands with different molecular structures are known, less attention has been devoted to “structurally reinforced” polyamine receptors containing amine groups linked together by two short aliphatic chains. On the other hand, structural modifications of tetraaza macrocycles based on the ethylene bridging of adjacent^[19] (side-bridged) or opposite^[20] (cross-bridged) nitrogen atoms have been recently reported according to various procedures. The resulting bridged polyazacycloalkanes have been shown to exhibit unusual properties in metal coordination^[21] and also to act as strong bases in aqueous solution.^[22] We have previously also shown that the binding properties toward metal cations displayed by these reinforced tetraamine ligands are persisting also in their polycyclic derivatives.^[23]

[a] Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, via della Lastruccia, 3, 50019 Sesto Fiorentino Firenze, Italy
E-mail: claudia.giorgi@unifi.it

[b] UMR CNRS 6521, “Chimie, électrochimie moléculaire et analytique”, Université de Bretagne occidentale, C.S. 93837, 6, avenue Victor-Le-Gorgeu, 29238 Brest cedex 3, France
E-mail: henri.handel@unibrest.it

[c] Dipartimento di Energetica “Sergio Stecco”, Università di Firenze, via S. Marta 3, 50139, Firenze, Italy

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.200900770>.

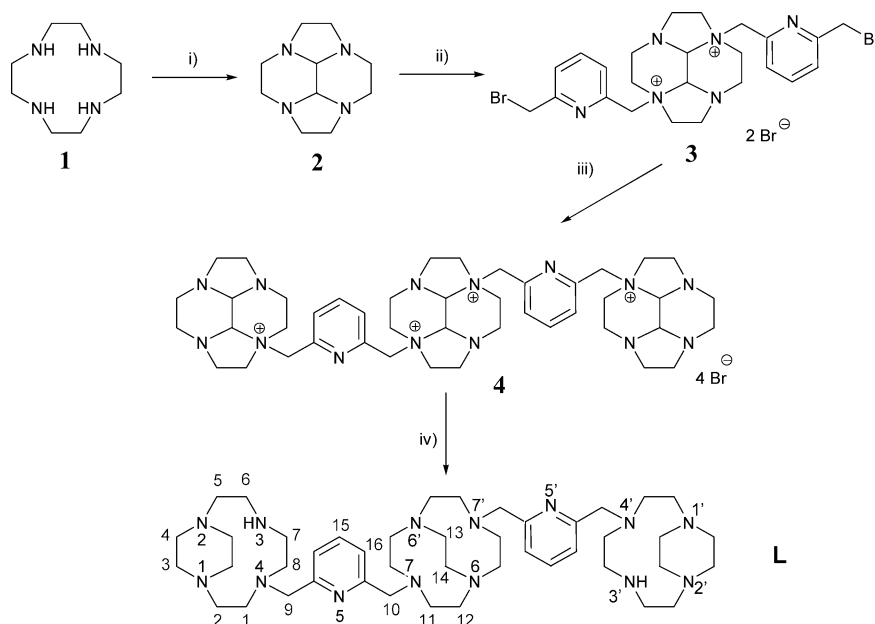


Figure 1. Synthesis of **L** and ligand drawing with atom labelling used in NMR experiments. i) MeOH/glyoxal, ii) 2,6-bis(bromomethyl)pyridine/CH₃CN, iii) **2**/DMF, iv) NaBH₄/EtOH.

We have now synthesized a new molecule (**L**) containing three 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) reinforced rings connected by two 2,6-pyridinediylbis(methylene) linkers (Figure 1). This ligand contains both side-bridged and cross-bridged amine groups and is obtained in a four steps procedure starting from cyclen using bis-aminal intermediates for the macrocycle selective alkylation^[24] and for the formation of the ethylene bridges.^[19,20] In principle, this ligand may behave as multifunctional receptor for anionic forms of nucleotides, through the formation of salt bridges between the ammonium groups and the phosphate chains and π -stacking and hydrophobic interactions between the pyridine unit and the adenine moiety of substrates.^[17]

In this paper we report the results of a potentiometric, ¹H and ³¹P NMR and molecular modelling study on the interaction of phosphate, diphosphate, triphosphate, ATP and ADP with variously protonated form of **L**, in order to elucidate the correlation between the stability of the supramolecular adducts formed and the structure of the receptor.

Results and Discussion

Synthesis of the Ligand **L**

The macrocyclic bis-aminal **2** is cleanly obtained from the condensation of glyoxal with cyclen **1** as described previously.^[25] Reaction of one equivalent of a biselectrophile with **2** (see Figure 1) leads to an *N*¹,*N*⁷-dialkylation of the macrocycle via a diquat salt. The diammonium salt **3** was then allowed to react with an excess of cyclen-glyoxal **2** giving the tetra-salt **4**. The latter yielded the linear constrained tris-macrocycle **L** after filtration and cleavage of the bis-aminal bridges with NaBH₄ in absolute ethanol.

Basicity Properties of the Receptor

A necessary preliminary requisite for the investigation of the binding properties of the receptor in its protonated forms is the knowledge of its basicity properties. The protonation equilibria of **L** have been studied first by means of potentiometric measurements in aqueous solution at 298.1 ± 0.1 and 313.1 ± 0.1 K in 0.1 mol dm⁻³ NMe₄Cl. **L** behaves as a very strong base in the first and in the second protonation step; in fact, deprotonation of the diprotonated species H₂L²⁺ is not detected by means of potentiometric titrations, at least in the pH range investigated (2–12). Furthermore, the ¹H NMR spectra of the ligand in 0.5 M NaOH is equal to that recorded at pH 11.5, indicating that the H₂L²⁺ species cannot be deprotonated even in strongly alkaline solution, i.e., receptor **L** behaves as a “biproton sponge”.^[26] Actually, H₂L²⁺ gives rise, in the pH range 2–12, to six protonation equilibria, which are listed in Table 1 together with the corresponding protonation constants. The distribution diagram of the protonated species at 313.1 K is shown in Figure 2, while that at 298.1 K is reported in the Supporting Information (Figure S1).

Pyridine nitrogen atoms are characterized by far lower basicity than aliphatic amine N atoms, the protonation constant of pyridine being 5.67 log units,^[27] while the first protonation constant of secondary amines usually ranges between 9 and 11 logarithmic units. Therefore, it is expected that at least the first two protonation steps of H₂L²⁺ take place on the amine groups of the aliphatic chains. To support this hypothesis and to determine the localisation of the acidic protons in all the protonated species of the receptor, we performed ¹H NMR measurements in aqueous solutions at different pH values. The spectra present a marked fluxionality at room temperature and for this reason the ¹H

Table 1. Protonation constants of L, determined in 0.1 mol dm⁻³ NMe₄Cl at 298.1 ± 0.1 K and 313.1 ± 0.1 K (values in parentheses are standard deviation in the last significant digit).

	log K	
	T = 298.1 K	T = 313.1 K
H ₂ L ²⁺ + H ⁺ = H ₃ L ³⁺	10.6(1)	9.7(1)
H ₃ L ³⁺ + H ⁺ = H ₄ L ⁴⁺	7.78(5)	7.0(1)
H ₄ L ⁴⁺ + H ⁺ = H ₅ L ⁵⁺	5.49(5)	5.1(1)
H ₅ L ⁵⁺ + H ⁺ = H ₆ L ⁶⁺	4.67(5)	4.3(1)
H ₆ L ⁶⁺ + H ⁺ = H ₇ L ⁷⁺	3.22(6)	2.9(1)
H ₇ L ⁷⁺ + H ⁺ = H ₈ L ⁸⁺	2.2(1)	2.0(1)

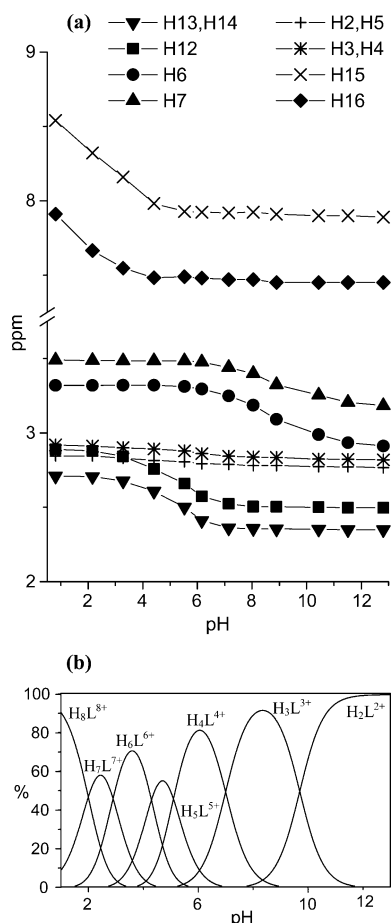


Figure 2. (a) pH dependence of selected ¹H NMR signals of the ligand (313.1 K, I = 0.1 M), (b) distribution diagram of the protonated species of the ligand.

NMR study was performed at 313.1 K. The pH dependence of selected ¹H NMR signals of the receptor is reported in Figure 2 (the chemical shifts of the signals of protons H1, H8 and H11 do not show significant changes in the pH range investigated and they are omitted).

At pH 12.0 the spectrum exhibits eleven signals, nine for the aliphatic protons and two for the aromatic ones. In particular, the aliphatic portion of the spectrum is featured by seven multiplets at δ = 2.21 ppm (attributed to the hydrogen atoms H1, H8 and H11), 2.77 ppm (H2 and H5), 2.82 ppm

(H3 and H4), 2.93 ppm (H6), 3.21 ppm (H7), 2.44 ppm (H12), 2.30 ppm (H13 and H14), and by two singlets at δ = 3.93 ppm for H9 and 4.12 ppm for H10 (see Figure 1 for atom labelling), while the aromatic region of the spectrum displays two multiplets for the protons H15 and H16 at δ = 7.89 ppm and 7.45 ppm, respectively. All the assignments have been made on the basis of ¹H-¹H homonuclear correlation experiments at the different pH values studied. The spectral features account for a time averaged C_{2v} symmetry of the molecule, which is preserved throughout all the pH range investigated.

The analysis of the ¹H spectrum of the receptor may suggest a tentative localisation of the two acidic protons in the H₂L²⁺ species. In fact, the methylene groups H2, H3, H4 and H5, adjacent to N1 and N2 give rise to two multiplets at δ = 2.77 ppm (for H2 and H5) and 2.82 ppm (for H3 and H4). These chemical shifts are unusually high for a CH₂ group adjacent to a tertiary nitrogen atom. For instance the CH₂ groups H12, H13 and H14 give two signals at δ = 2.44 ppm and 2.30 ppm. Furthermore, the signals of H2, H3, H4 and H5 do not vary significantly in all the pH range investigated. These observations suggest that in H₂L²⁺ the two acidic protons are shared between N1 and N2 and between the symmetry related N1' and N2' nitrogen atoms, adjacent to the methylene groups H2, H3, H4 and H5. Therefore, each lateral reinforced macrocycle shows a proton sponge behaviour. At a first glance, the fact that the central reinforced tetrammine ring does not display “proton sponge” characteristics can be somewhat surprising. On the other hand, the increased positive charge gathered on the receptor with the formation of the H₂L²⁺ species reduces the proton affinity of the central macrocyclic ring. Actually, a similar behaviour has been found in a bis-macrocyclic receptor composed by two reinforced tetraamine rings separated by a benzene unit.^[23b]

In the pH-range 11.5–6.0 where the first two protons bind to the ligand, the signals of the hydrogen atoms H6 and H7, in the α-position with respect to N3, exhibit a downfield shift, whereas the other signals do not shift appreciably, suggesting that in the H₄L⁴⁺ species the two acidic protons are localized on the secondary nitrogens N3 and N3' of the lateral macrocyclic units. Finally, in the pH range 5.5–3.5 the receptor binds two further protons, giving the H₅L⁵⁺ and H₆L⁶⁺ species. The formation of this hexaprotonated form is accompanied by a downfield shift of the H12, H13 and H14 protons (see Figure 2). These spectral features indicate that the fifth and sixth protonation steps take place on the N6 and N6' nitrogens of the central tetraamine ring.

It is to be noted that the signals of the aromatic protons H15 and H16 do not display significant shifts in the pH range 11.5–4.0, indicating that the heteroaromatic nitrogens are not involved in proton binding. Conversely, a downfield shift is observed for the resonances of H15 and H16 only below pH 4, where the hepta- and octa-protonated species are formed in solution. This may suggest that in the H₇L⁷⁺ and H₈L⁸⁺ species the two acidic protons are localized on the pyridine N atoms N5 and N5'.

Phosphate Anion Binding in Aqueous Solution

Binding of phosphate, diphosphate, triphosphate, ATP and ADP by H_2L^{2+} has been studied by means of potentiometric and 1H and ^{31}P NMR measurements in aqueous solution. In fact, protonation of **L** enables the receptor to form stable adducts with all the anionic species of substrates investigated. Analysis of the potentiometric data with the program HYPERQUAD^[28] allows one to determine the species formed in solution and their overall formation constants β_{HLA} ($A = PO_4^{3-}$, $P_2O_7^{4-}$, $P_3O_{10}^{5-}$, ADP^{3-} , ATP^{4-}), relative to equilibria of the type $H_2L + A + nH = [H_{n+2}LA]$, which are listed in Tables 2 and 3. Figure 3 displays the distribution diagrams of the adducts with ATP and ADP, while those with the inorganic phosphate anions are given within the Supporting Information (Figure S2). The data in Tables 2 and 3 and in Figure 3 support the assumption of the formation of a large number of 1:1 adducts with different protonation degree. Substrate complexation occurs in a wide pH range (for instance ATP and ADP are almost completely bound by the polyammonium receptor between pH 3 and 9).

Table 2. Overall stability constants ($\log \beta$) of the PO_4^{3-} , $P_2O_7^{4-}$ and $P_3O_{10}^{5-}$ adducts with H_2L^{2+} , determined by means of potentiometric measurements in 0.1 mol dm^{-3} NMe_4Cl at $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$ (charges omitted for clarity, value in parentheses are standard deviation in the last significant digit).

	$\log \beta$ PO_4^{3-}	$P_2O_7^{4-}$	$P_3O_{10}^{5-}$
$H_2L + A + H = H_3LA$	14.99 (3)		
$H_2L + A + 2H = H_4LA$	26.28 (3)	23.44 (4)	
$H_2L + A + 3H = H_5LA$	34.13 (3)	31.92 (3)	32.19 (8)
$H_2L + A + 4H = H_6LA$	41.44 (2)	38.13 (4)	38.20 (9)
$H_2L + A + 5H = H_7LA$	46.99 (2)	44.43 (5)	44.40 (8)
$H_2L + A + 6H = H_8LA$	51.76 (3)	52.77 (5)	49.41 (8)
$H_2L + A + 7H = H_9LA$	55.08 (4)	53.38 (5)	53.56 (5)

Table 3. Overall stability constants ($\log \beta$) of the ATP^{4-} and ADP^{3-} adducts with H_2L^{2+} , determined by means of potentiometric measurements in 0.1 mol dm^{-3} NMe_4Cl at $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$ (charges omitted for clarity, value in parentheses are standard deviation in the last significant digit).

	$\log \beta$ ADP^{3-}	ATP^{4-}
$H_2L + A + H = H_3LA$	14.89(1)	
$H_2L + A + 2H = H_4LA$	23.37(1)	23.22 (6)
$H_2L + A + 3H = H_5LA$	29.87(1)	32.14(9)
$H_2L + A + 4H = H_6LA$	35.58(1)	38.24(8)
$H_2L + A + 5H = H_7LA$	40.48(1)	42.95(8)
$H_2L + A + 6H = H_8LA$	43.81(1)	47.86(9)
$H_2L + A + 7H = H_9LA$		51.87(8)

Although the formation of both 1:1 and 2:1 anion/receptor adducts has been observed in some previously reported cases,^[29] the data analysis under our experimental conditions reveals only 1:1 stoichiometries for all species detected in our systems. The determination of the stepwise formation constants of the adducts between the protonated receptor and the anionic substrates, i.e., the constants relative to equilibria of the type $H_{n-1}L + H_iA = [H_nLA]$, implies the

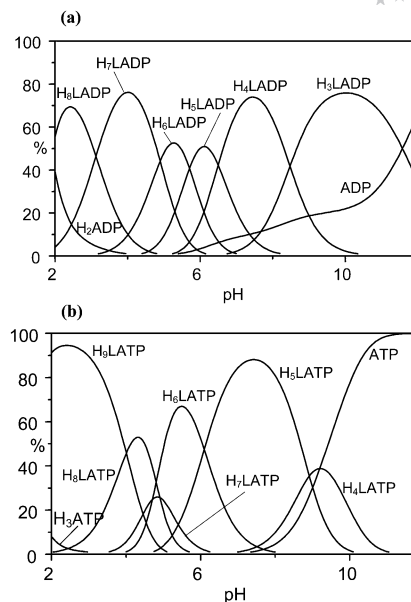


Figure 3. Distribution diagrams for the systems H_2L^{2+}/ADP (a) (0.1 mol dm^{-3} NMe_4Cl , 298.1 K , $[H_2L^{2+}] = [ADP] = 1.10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) and H_2L^{2+}/ATP (b) (0.1 mol dm^{-3} NMe_4Cl , 298.1 K , $[H_2L^{2+}] = [ATP] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

knowledge of the localisation of the acidic protons on receptor and substrates. This task is made difficult in the present case by the presence in aqueous solution of a large number of overlapping equilibria in the same pH range and by the values of the protonation constants of the substrates, which are quite similar, in some cases, to the protonation constants of the receptor. In these cases, in fact, two different equilibria can be proposed. For instance, the H_9LATP adduct could be formed either through the equilibria $H_6L + H_3ATP = H_9LATP$ or $H_7L + H_2ATP = H_9LATP$, with equilibrium constants of 7.22 and 7.28 respectively. The values of the stability constants of the adducts, calculated by using this approach are given within the Supporting Information (Tables S3 and S4). To overcome the presence of different equilibria present in solution at the same pH value, it can be useful to calculate effective stability constants.^[30] For a given pH value, if the total amount of free substrate ($\Sigma H_{(h-i)}A$), free receptor $[H_{(i)}L]$ and adduct formed (H_hLA) are known, one can define an effective stability constant by using the equation $K_{\text{eff}} = \Sigma H_hLA / [\Sigma H_{(h-i)}A \Sigma H_iL]$.

Plots of the pH dependence of the logarithms of the conditional constants (Figure 4) for the different systems show that all five substrates form remarkably stable complexes with the receptor in a wide pH range. In all cases, the stability slightly increases from alkaline to slightly acidic pH values, with a maximum between pH 3.5 and 4.5, and then decreases markedly at higher pH values. In the alkaline and slightly acidic pH region, the substrates are in their less protonated and highly charged forms, and therefore an increasing number of protonated ammonium functions may enhance the receptor ability to give electrostatic and hydrogen bonding interactions with the anionic substrates, thus lead-

ing to the observed increasing stability from pH 10 to about 4. The marked decrease of the K_{eff} values at more acidic pH values can be reasonably attributed to the formation in solution of highly or fully protonated forms of the substrates, featured by a low or null negative charge.

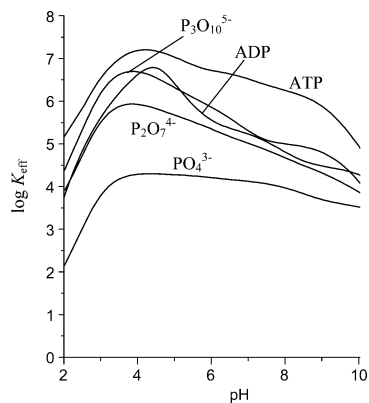


Figure 4. Logarithms of the effective stability constants for the systems $\text{PO}_4^{3-}/\text{P}_2\text{O}_7^{4-}/\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}/\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}:\text{H}_2\text{L}^{2+}$ ($[\text{H}_2\text{L}^{2+}] = [\text{substrates}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

Comparing the binding ability of L towards the different substrates, the stability of the adducts increases in the order phosphate < diphosphate < triphosphate \approx ADP < ATP. This sequence can be only partially explained in terms of electrostatic and hydrogen bonding interactions between the receptor and the different phosphate anions. Actually, the higher K_{eff} values observed for triphosphate with respect to di- and monophosphate can be reasonably attributed to the large negative charge gathered on triphosphate at a given pH (for instance at pH 4 the three inorganic anions are mainly present in solution as H_2PO_4^- , $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$ and $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{3-}$, respectively) as well as to the larger number of phosphate groups potentially available to interact via hydrogen bonding with the receptor.

The adducts with ADP and ATP display a somewhat higher stability than those with tri- and diphosphate which cannot be interpreted considering only electrostatic and hydrogen bonding interactions involving the phosphate chain of the anions. In fact, the nucleotides are present in solution at pH 4 as $\text{H}_2\text{ATP}^{2-}$ and HADP^{2-} , i.e., with negative charge lower ($\text{H}_2\text{ATP}^{2-}$) or equal (HADP^{2-}) to that of tri- and diphosphate, respectively.

This could indicate that, in addition to the electrostatic interactions between the phosphate chain and the polyammonium receptor, other effects (hydrogen bond interactions between adenine N atoms and/or hydroxy groups of nucleotides and ammonium functions, hydrophobic and/or π -stacking interactions between the heteroaromatic moieties and cation- π system interactions between the charged ammonium group and adenine) may contribute to the stability of the adducts.

To elucidate the structural features of adducts with ATP and ADP, anion coordination has also been followed by recording ^{31}P NMR spectra on solutions containing receptors and substrates in 1:1 molar ratio at different pH values.

Figures 5 and 6 show the pH dependence of the ^{31}P chemical shifts of the phosphate groups of ATP and ADP in the presence of 1 equiv. of the receptor at different pH values, together with those of free ATP and ADP. A list of the complexation-induced ^{31}P chemical shifts (CIS) for the $\text{ATP-H}_2\text{L}^{2+}$ and $\text{ADP-H}_2\text{L}^{2+}$ systems at pH 6 and 6.5, respectively, is reported within the Supporting Information (Table S5).

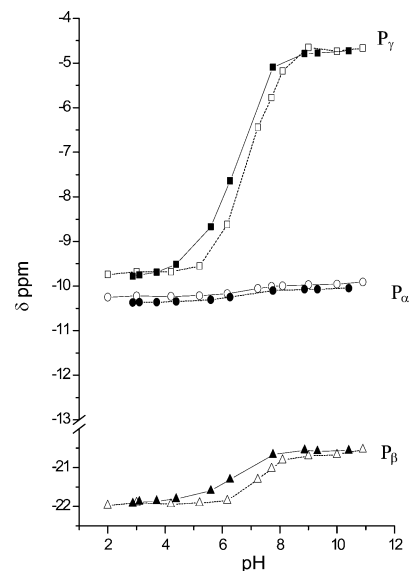


Figure 5. Experimental ^{31}P chemical shifts of free ATP (....., empty symbols) and of ATP in the presence of H_2L^{2+} (—, filled symbols) as a function of pH ($[\text{ATP}] = [\text{H}_2\text{L}^{2+}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, 298.1 K).

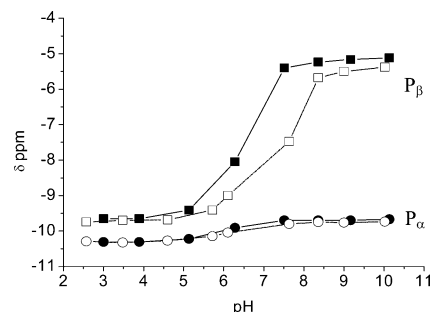


Figure 6. Experimental ^{31}P chemical shifts of free ADP (....., empty symbols) and of ADP in the presence of H_2L^{2+} (—, filled symbols) as a function of pH ($[\text{ADP}] = [\text{H}_2\text{L}^{2+}] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, 298.1 K).

The plots in Figures 5 and 6 indicate that coordination of substrates produces significant variations in the ^{31}P chemical shifts, as already observed for analogous associated species with other polyammonium macrocyclic receptors.^[4,5]

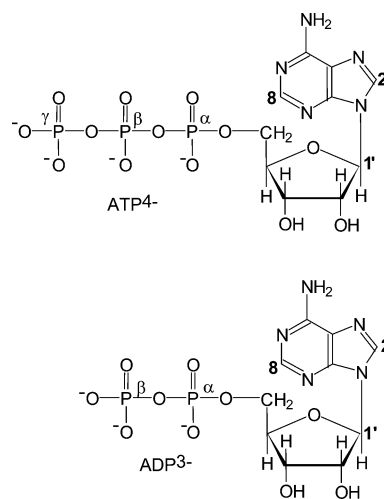
In the case of the adducts with ATP, Figure 5 shows a downfield shift upon complexation of the signals of the phosphate groups P_γ and, at a less extent, P_β , while the chemical shift of P_α is almost not influenced by the interaction with the receptors, suggesting that in ATP binding the ammonium functions of the receptor mainly interact with

the two contiguous phosphate groups of nucleotides P_{β} and P_{γ} . In the case of ADP, the resonance of the terminal phosphate group P_{β} shifts downfield in the presence of the receptor, while the chemical shift of the P_{α} is almost not influenced by the interaction, indicating that in the adducts with ADP the polyammonium receptor interacts mainly with the terminal phosphate group P_{β} of the nucleotide. In both ATP and ADP complexation, however, the variations of chemical shifts are pH dependent, being greater in the pH range 9–4, in keeping with the potentiometric study of these systems, which has shown that large amounts of the 1:1 receptor/substrate adducts are formed from slight alkaline to acidic pH values (Figure 3), i.e., in the pH region where highly protonated species of the receptor and anionic species of ADP or ATP are simultaneously present in solution.

The ^{31}P NMR spectroscopic data confirm the important role played in the formation of the adducts by the phosphate chains, which can interact via electrostatic forces and hydrogen bonding with the ammonium groups of the receptor.

^1H NMR spectra carried out on solutions containing the receptor and ADP or ATP can provide evidences for the participation of π -stacking interactions in the stabilization of the adducts with receptor (for labelling, see ligand drawing in Figure 1 and Scheme 1). The pH dependence of the signals of the adenine protons H2 and H8 and of anomeric proton H1' for both nucleotides in absence and in the presence of receptor is displayed in Figure 7, while the complexation-induced ^1H chemical shifts (CIS) for the nucleotides- H_2L^{2+} systems at a fixed pH value are reported within the Supporting Information (Table S6). Throughout the pH range in which interaction occurs, upfield displacements are observed for these signals of both nucleotides in the pres-

ence of the receptor. However, the variation of chemical shifts observed upon ATP and ADP complexation by the receptor are generally rather low (for instance CIS value of -0.07 , -0.12 , and -0.12 ppm are measured for the signals of the H2, H8 and H1' protons of ATP at pH 6) than those observed for ATP or ADP coordination by polyammonium macrocycles containing phenylene spacers.^[5] Remarkably higher displacements of the resonances (more than 1 ppm) for the H atoms of the adenine moiety are usually found when π -stacking interactions give an important contribution to complex formation, as in the case of polyammonium macrocycles containing large heteroaromatic systems, such as phenanthroline.^[17b] Conversely, the present



Scheme 1.

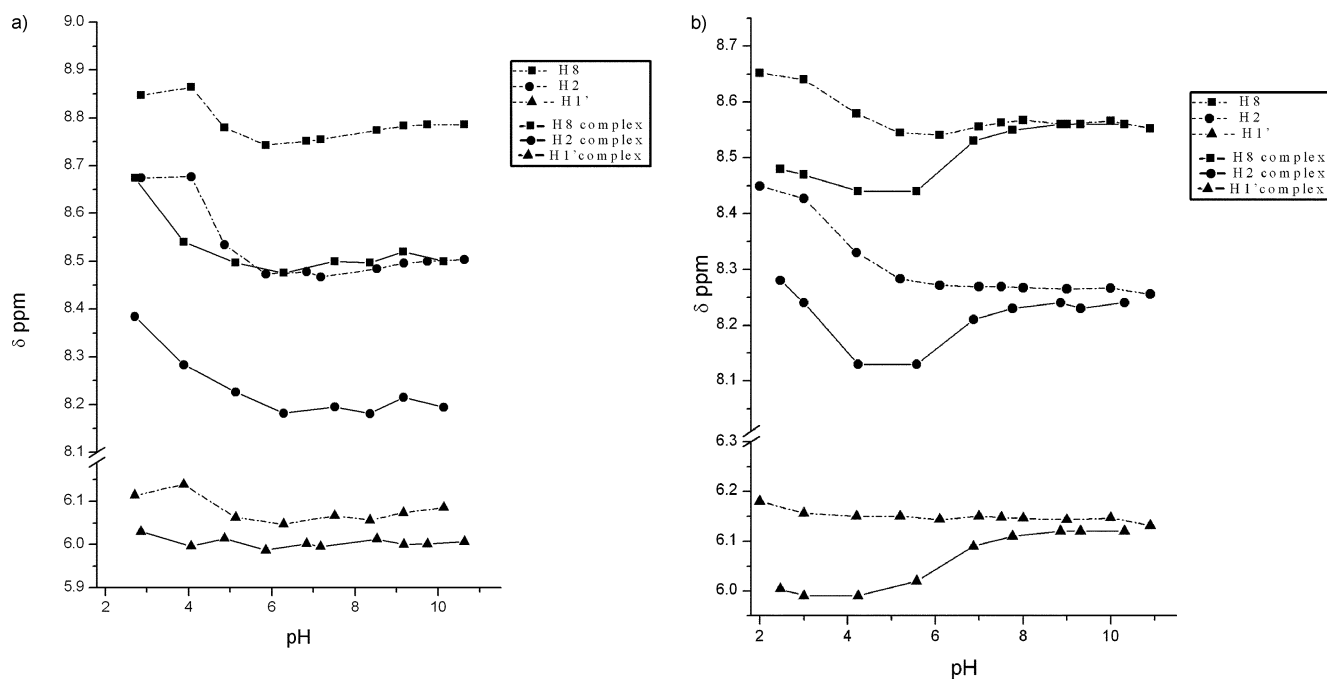


Figure 7. Experimental ^1H chemical shifts for the aromatic protons of free ADP (----) and of ADP in the presence of H_2L^{2+} (—) (a) and for the aromatic protons of free ATP (----) and of ATP in the presence of H_2L^{2+} (—) (b).

data account for a rather weak π -stacking interaction occurring between the adenine unit of nucleosides and pyridine moiety of the ligand.

Molecular Modelling

MD simulations were performed on the protonated receptors H_hL^{h+} ($h = 3, 4$ and 6) in vacuo and by using an implicit water model. The analysis of each MD trajectory reveals no significant changes in the overall shape of the cation within every simulation. However, a comparison of the average conformations resulting from the six MD protocols highlights the different shapes adopted by the receptor depending on its charge and on the nature of the surrounding medium. In particular, depending on the molecular charge and the solvent polarity, the two lateral reinforced macrocyclic systems arrange in a different way with respect to each other and to the central macrocycle, thus giving

different shapes to the receptor. The relative distances between the geometric centroids of the three [12]aneN₄ rings and the centroid of the overall molecule (C_{MT}) were computed in order to quantify the differences in the overall molecular shape. For example in vacuo, by increasing the molecular charge, the side arms spread out progressively: 6.4, 7.6 and 12.0 Å are the mean distances from C_{MT} and the centroids of the terminal reinforced rings in H_3L^{3+} , H_4L^{4+} and H_6L^{6+} , respectively. The H_3L^{3+} receptor has on average a sort of flat calyx-like shape, with the central macrobicyclic ring at the base and the terminal reinforced [12]aneN₄ rings in a head-to-tail relative arrangement (Figure 8, a). By adding positive charges the side arms unfold progressively: the H_6L^{6+} species is completely open (a kind of flat cylinder, Figure 8, b) and, at variance with the previous two species (H_3L^{3+} and H_4L^{4+}) shows three distinct, equally charged and accessible binding sites (i.e., the tetraaza rings) for the guest. As expected, the increase of the solvent polarity

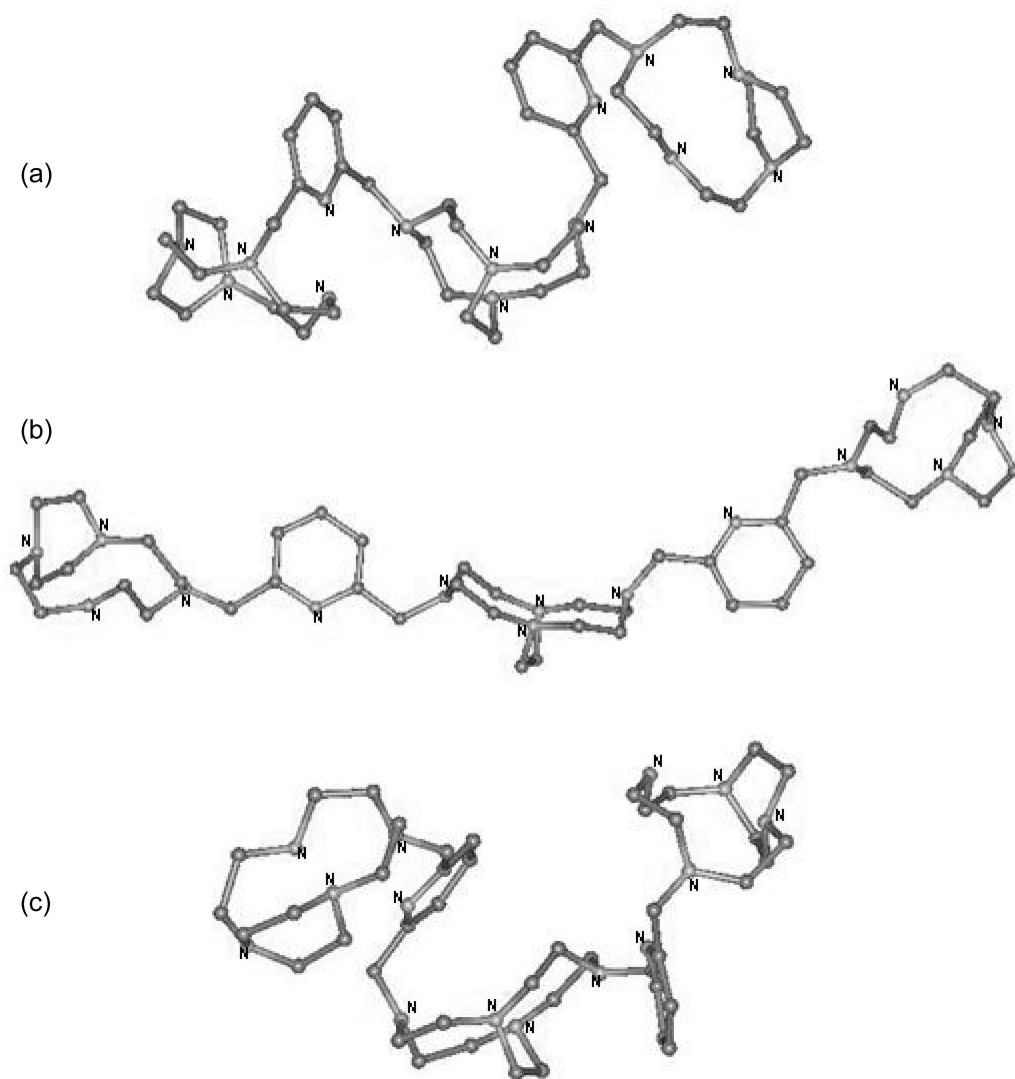


Figure 8. a) View of the minimum energy conformation of the H_3L^{3+} receptor in vacuo; b) view of the minimum energy conformation of the H_6L^{6+} receptor in vacuo; c) view of the minimum energy conformation of the H_6L^{6+} receptor in the implicit water model environment.

makes the positively charged side arms close again about the central reinforced macrocyclic ring almost facing each other and, as a consequence, all the cations shape a sort of calyx (see for example H_6L^{6+} in Figure 8, c). Now the computed inter-centroid distances are: 4.2, 5.2 and 5.2 Å in H_3L^{3+} , H_4L^{4+} and H_6L^{6+} , respectively.

In summary the H_3L^{3+} cation appears the most crowded in both the environments: its potential binding sites are well inside the molecular framework.

The interaction of the minimised protonated forms of the receptor with ATP and ADP was then analysed. In the minimisation procedure, we chose the protonated forms of ATP and ADP present in aqueous solutions in the pH range where the H_3L^{3+} , H_4L^{4+} and H_6L^{6+} are formed and therefore we analysed the adducts $[(H_3L)(ADP)]$, $[(H_3L)(HATP)]$, $[(H_4L)(ADP)]^+$, $[(H_4L)(HATP)]^+$, $[(H_6L)(HADP)]^{4+}$ and $[(H_6L)(HATP)]^{3+}$. The interaction of H_3L^{3+} and H_4L^{4+} with the two nucleotides was first analysed, docking the nucleotide anionic species ADP^{3-} and $HATP^{3-}$ into the H_3L^{3+} and H_4L^{4+} receptors. As already mentioned, in the lowest energy conformation of the H_3L^{3+} cation, both in vacuo and in the polar medium, the acidic protons point inside the receptor framework and are involved in some intramolecular H-bonds, preventing any hydrogen bond interactions between the nucleotides and the receptor (the sum of the hydrogen and oxygen Van der Waals radii, that is 2.7 Å,^[31] was considered as threshold to spot H-bond interactions). The inspection of the retained poses, with the term poses we refer to different positioning and orientation of the anions with respect to the binding

site of the ligand,^[32] shows that in vacuo both the anions wrap around the terminal reinforced macrocycle bearing the bipositive charge, while in the polar medium the nucleo-

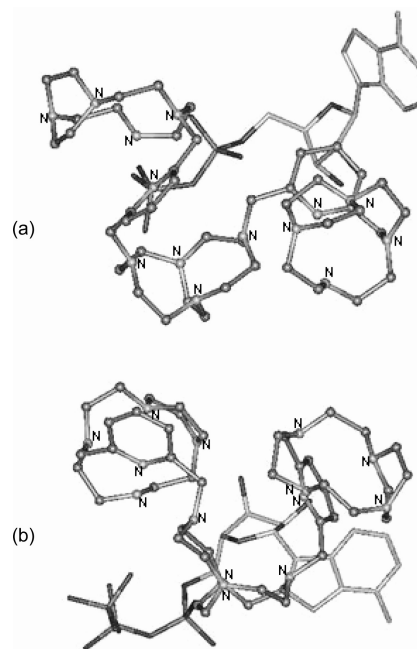


Figure 9. a) View of the best pose of the H_4L^{4+}/ADP^{3-} adduct in the implicit water model environment; b) view of the best pose of the $H_4L^{4+}/HATP^{3-}$ adduct in the implicit water model environment.

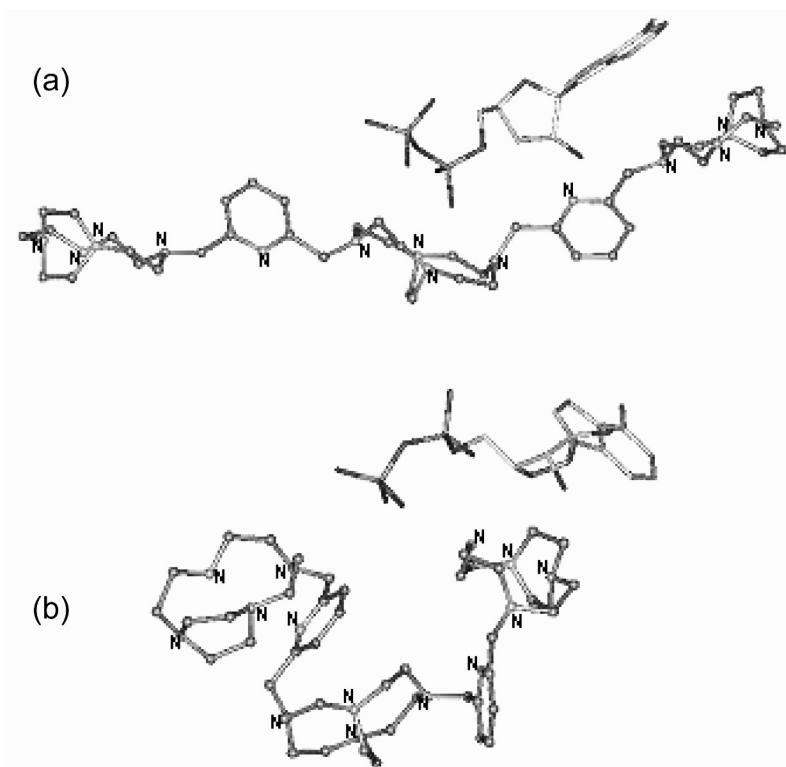


Figure 10. a) View of the best pose of the $H_6L^{6+}/HADP^{2-}$ adduct in vacuo; b) view of the best pose of the $H_6L^{6+}/HADP^{2-}$ adduct in the implicit water model environment.

tides stand on the top of the receptor cavity (Figure S3). In the case of the H_4L^{4+} , the saved poses, both in vacuo and in the polar medium, show the smaller ADP anion anchored (only intermolecular $NH\cdots O$ distances less than the sum of the oxygen and hydrogen Van der Waals radii were considered) to a NH_2^+ group invariably thanks to hydrogen bond interactions involving the oxygen atoms of the P_β phosphate group (Figure 9, a). In the case of ATP, the two contiguous P_β and P_γ phosphate groups of the $HATP^{3-}$ species are involved in the interaction with the protonated secondary nitrogens of H_4L^{4+} (Figure 9, b). Finally, in vacuo poses reveal that both the nucleotides stand on the terminal reinforced tetraaza ring with the aromatic moiety on the top of the central macrobicycle, while in the simulated solvent both of them wrap about the terminal reinforced cyclen (Figure S4).

Results from the docking of the $HADP^{2-}$ and $HATP^{3-}$ species to the H_6L^{6+} cation evidence the leading role of the acidic H atoms of the central macrobicycle in the interaction with the tested guests in vacuo. In fact in the open and outstretched conformation of the H_6L^{6+} cation, they are facing each others and point towards the upper surface of the tetraaza ring allowing the formation of strong hydrogen bond interactions ($NH\cdots O$ distances less than 2.0 Å) with the oxygen atoms provided by the phosphate groups of both the nucleotides. The latter are on the top of the central tetraaza ring and in most of the saved poses the oxygen atoms bound to P_α of $HADP^{2-}$ and P_β of $HATP^{3-}$ act as bifurcated acceptors towards the acidic hydrogens of the central macrobicycle (part a of Figure 10 and Figure S5). In the polar medium, instead, both the anions interact via H-bonds with the NH_2^+ group of a terminal tetraaza ring and stand on the top of the calyx (Figure 10, b). Analyses of poses (Figure S6) reveal that in both the nucleotides the H-bond acceptors are provided by the terminal phosphate group P_β for $HADP^{2-}$ and by the two phosphate moieties P_β and P_γ for $HATP^{3-}$ and that in some cases the acidic proton acts as bifurcated donor.

Conclusions

The present tris-macrocycle **L** behaves as “double” proton sponge, giving rise in aqueous solution to a H_2L^{2+} species which cannot be deprotonated even at strongly alkaline pH values. The two acidic protons are localized in two lateral reinforced macrocyclic units. Further protonation of H_2L^{2+} affords a H_4L^{4+} species, where each lateral tetraamine macrocycle is diprotonated. The central macrocyclic units is involved in proton binding only in the species with higher protonation degree. These positively charged forms of the receptor give stable 1:1 adducts with inorganic phosphate anions, ADP and ATP. The stability of the adducts is mainly determined by electrostatic and hydrogen bonding interactions. Due to the particular calyx-like shape assumed by the receptor in aqueous solutions, only the lateral macrocyclic moieties seem to be involved in anion binding, while the central tetramine unit is shielded from the

interaction with the anionic substrates. In nucleotide binding, both ^{31}P NMR experiments and MD calculations, carried out by using an implicit water model, show that the lateral macrocyclic units interact mainly with the terminal and central phosphoate groups of ATP and with the terminal phosphoate group of ADP. Conversely, the adenine moiety of nucleotides seems to play a minor role in the stabilization of the adducts.

Experimental Section

Materials: The sodium salts of ATP and ADP and $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$, $Na_5P_3O_{10} \cdot 6H_2O$, employed in the potentiometric measurements, were purchased from Merck.

Synthesis of L

Cyclen-glyoxal **2** was synthesised as described previously.^[25]

Compound 3: To a stirred solution of 2,6-bis(bromomethyl)pyridine (4 g; 15.1 mmol) dissolved in 15 mL of dry acetonitrile, a solution of cyclen-glyoxal **2** (0.75 g; 3.8 mmol) in 10 mL of dry acetonitrile was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for a week. The precipitate was collected by filtration, washed with diethyl ether and dried in vacuo, giving **3** as a white powder with 90% of yield. ^{13}C NMR (100.62 MHz; $[D_6]DMSO$, 298 K): δ = 33.6, 42.4, 46.4, 55.5, 59.6 (αCH_2), 60.4 (αCH_2 -Py), 76.4 (CH-aminal), 122.2, 123.4, 136.5, 148.4, 159.8 (CH-Ar) ppm. MALDI-TOF (H_2O): m/z 720.94 $[M + H]^+$. $C_{24}H_{32}Br_4N_6 \cdot H_2O$ (742.19): calcd. C 38.73, H 7.04, N 11.29; found C 39.01, H 7.12, N 11.61.

Compound 4: Compound **3** (1.5 g; 2 mmol) was added to a solution of bis-aminal **2** (1.2 g; 6.2 mmol) in 25 mL of dry DMF. The mixture was stirred at room temperature for 10 d. The precipitate was collected by filtration, washed with diethyl ether. The solid was dissolved in water; a subsequent addition of ethanol leads to a precipitate which is filtered and dried in vacuo, at 60 °C, giving **4** as a white powder with 70% of yield. ^{13}C NMR (100.62 MHz; D_2O ; 298 K): δ = 45.5, 46.6, 49.4, 50.5, 50.8, 51.1, 51.2, 54.2, 58.6, 63.6, 64.1, 65.3, 65.3, 65.6 (αCH_2), 74.5, 81.3, 86.3, 86.5 (Ca), 131.6, 131.8, 143.4, 143.5, 151.4, 151.6, 151.6, 152.2 (Car) ppm. MALDI-TOF (H_2O): m/z 1082.2 $[M + H]^+$. $C_{42}H_{64}Br_4N_{14} \cdot 2H_2O$ (1120.71): calcd. C 45.83, H 9.44, N 17.01; found C 45.51, H 9.22, N 17.31.

Compound L: A large excess of $NaBH_4$ (24 equiv.) was added in small portions over 1 h to a stirred solution of polyammonium salts **4** in absolute ethanol (1 g in 60 mL). The mixture was allowed to stir at room temperature for one week. After cooling at 0 °C and aqueous HCl (2 M) addition until $pH \approx 3-4$, the resulting mixture was evaporated to dryness. The resulting white solid was then dissolved in a small quantity of water and potassium hydroxide pellets were added until basic medium. The aqueous phase was then evaporated to dryness and the residue was extracted with chloroform (3×50 mL). The combined organic phases were finally evaporated to give **L** in 78% of yield (0.590 g). ^{13}C NMR (75.47 MHz. $CDCl_3$; 298 K): δ = 46.7, 48.2, 48.4, 50.0, 51.8, 52.0, 55.8, 56.0, 56.7, 56.9, 57.2 (αCH_2); 61.0, 61.2 (αCH_2 Py), 119.9, 136.2, 136.6, 159.0, 159.2 (Car) ppm. MALDI-TOF ($CHCl_3$, Dithranol): m/z 801.6 $[M + H]^+$.

Hydrochloride derivatives were obtained by addition of concentrated aqueous HCl to an ethanolic solution of ligand at 0 °C. The resulting white precipitate was filtered, washed with absolute ethanol and dissolved in a solution of 6 M HCl. After 2 h at 80 °C, solvent was evaporated to give a white powder which was dried under vacuum at 80 °C for 24 h. $C_{44}H_{76}N_{14} \cdot 8HCl \cdot H_2O$ (1106.46):

calcd. C 43.87, H 8.04, N 16.28, Cl 23.84; found C 43.81, H 7.72, N 16.02, Cl 24.12.

Potentiometric Measurements: All pH metric measurements ($\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$) were carried out in degassed 0.1 mol dm^{-3} NMe_4Cl solutions, at 298.1 ± 0.1 and 313.1 ± 0.1 K, by using equipment and procedure which have been already described.^[33] The combined In-gold 405 S7/120 electrode was calibrated as a hydrogen concentration probe by titrating known amounts of HCl with CO_2 -free NMe_4OH solutions and determining the equivalent point by the Gran's method^[34] which allows to determine the standard potential E° , and the ionic product of water [$\text{p}K_w = 13.83(1)$ and $\text{p}K_w = 13.40(1)$ at 298.1 K and 313.1 K, respectively, in 0.1 mol dm^{-3} NMe_4Cl]. In all the experiments the ligand concentration $[\text{L}]$ was about $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. In the anionic coordination experiments the anion concentration was varied over the range $[\text{L}] \leq [\text{anion}] \leq 2[\text{L}]$. At least four measurements (about 150 data points each one) were performed in the pH range 2.3–12.0 for all systems.

The e.m.f. data were treated by means of the computer program HYPERQUAD^[28] which furnished the equilibrium constants reported in Tables 1, 2, and 3.

NMR Spectroscopy: ^1H spectra in D_2O solution at different pH values were recorded at 298.1 K and 313.1 K in a Varian 300 MHz spectrometer. In ^1H NMR spectra peak positions are reported relative to DSS. ^1H - ^1H 2D correlation experiments were performed to assign the signals. Small amounts of 0.01 mol dm^{-3} NaOD or DCl solutions were added to a solution of **L** to adjust the pD. The pH was calculated from the measured pD values using the relationship $\text{pH} = \text{pD} - 0.40$.^[35]

Molecular Modelling Procedures: The three H_3L^{3+} , H_4L^{4+} and H_6L^{6+} differently protonated species of the receptor and their adducts with different anionic species of the nucleotides (ADP^{3-} , HATP^{3-} and HADP^{2-}) were taken into account in the modelling studies. In all cases the speciation of the modelled adducts was retrieved from the potentiometric data. Three were the objectives of the modelling study: i) to assess the role of the degree of protonation in determining the conformational behaviour of **L**; ii) to compare the complexation ability of the same protonated form of the receptor H_hL^{h+} ($h = 3, 4$) towards equally charged nucleotides (ADP^{3-} , HATP^{3-}); iii) to test how the charge of the substrate (HADP^{2-} vs. HATP^{3-}) affects the interaction with the receptor (H_6L^{6+}). Due to the lack of single crystals of **L** or H_hL^{h+} suitable for X-ray diffraction, the starting 3D framework of the receptor was obtained by assembling appropriate molecular fragments retrieved from the Cambridge Structural Database (CSD; v.5.28).^[36] The protonation sites of each H_hL^{h+} species were identified on the basis of the ^1H NMR experiments performed at different pH values: in H_3L^{3+} the acidic protons are bound to the two reinforced N atoms N1 and N1' and to the secondary N3; H_4L^{4+} features the additional proton on N3'; in H_6L^{6+} the nitrogen atoms N6 and N6' of the central ring bear the further hydrogen ions.

Each starting model H_hL^{h+} , roughly improved by an energy minimization procedure, underwent molecular dynamics (MD) simulations (time step: 1fs, equilibration time: 100 ps, production time: 1000 ps, $T = 300$ K) in order to explore its potential energy surface both in vacuo and in water, the latter simulated by using a distance dependent dielectric constant. Then energy minimization procedures (by using the steepest descent and conjugate gradient algorithms) were applied in order to obtain the starting geometries for the subsequent docking protocols. The programs used for the MD and the energy minimization were the simulation protocols Standard Dynamics Cascade and Minimization implemented in Accel-

rys Discovery Studio 1.7.^[37] The starting geometries for the nucleotides⁻ were retrieved from the CSD. Atomic charges were calculated by the Gasteiger method. Docking simulations were performed at 300 K both in vacuo and in the simulated water solvent by using the protocol Ligand Fit implemented in Discovery Studio. In all adducts the doubly charged reinforced tetraaza ring of the H_hL^{h+} species was taken into account for the receptor-substrate interaction. In addition, also the central charged macrobicycle of H_6L^{6+} was considered for the interaction with the guests in the docking protocols performed in vacuo.

Different substrate conformations were generated during the docking procedure by means of the Monte-Carlo method. In-situ ligand minimization was performed by means of the Smart Minimizer algorithm, the number of saved poses was 40. The Force Field used for all the simulations was CHARMM.^[38]

Supporting Information (see also the footnote on the first page of this article): Protonation constants of substrates, stepwise stability constants of the adducts, CIS values of the ^{31}P and ^1H NMR signals of ADP and ATP in the presence of the receptor, distribution diagram of protonated species of **L** at 298.1 K, distribution diagrams of **L** with inorganic phosphate, best poses of the $\text{H}_3\text{L}^{3+}/\text{ADP}^{3-}$, $\text{H}_3\text{L}^{3+}/\text{HATP}^{3-}$ and $\text{H}_6\text{L}^{6+}/\text{HATP}^{3-}$ adducts in vacuo and in the implicit water model environment; best poses of the $\text{H}_4\text{L}^{4+}/\text{ADP}^{3-}$ and $\text{H}_4\text{L}^{4+}/\text{HATP}^{3-}$ adduct in vacuo.

Acknowledgments

This work has been financially supported by the Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (MIUR) within the program PRIN 2007.

- [1] a) A. K. H. Hirsch, F. R. Fischer, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 338–352; b) H. Dugas, *Bioorganic Chemistry: a Chemical Approach to Enzyme Action*, Springer, New York, **1996**; c) A. M. L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle, J. Chen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 317–364; d) G. R. Alton, E. A. Lunney, *Expert Opin. Drug Discovery* **2008**, *3*, 595–605; e) J. A. Lewis, E. P. Lebois, C. W. Lindsley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 269–280; f) A. Matte, L. T. J. Delbaere, *Handbook of Proteins* **2007**, *1*, 114–118; g) B. E. Turk, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 4–10; h) K. Hollenstein, R. J. P. Dawson, K. P. Locher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 412–418; i) J. R. Morrow, T. L. Amyes, J. P. Richard, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 539–548; j) C. S. Rye, J. B. Baell, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 3127–3141; k) S. Mangani, M. Ferraroni in *Supramolecular Chemistry of Anions*, A. Bianchi, E. Garcia-España, K. Bowman-James (Eds.), Wiley-VCH, New York, **1997**.
- [2] Selected Reviews: a) J. L. Atwood, K. T. Holman, J. W. Steed, *Chem. Commun.* **1996**, 1401–1407; b) J.-M. Lehn *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspective*; VCH, Weinheim, **1995**; c) P. Beer, J. W. Wheeler, C. Moore, in: *Supramolecular Chemistry*; V. Balzani, L. De Cola (Eds.); Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **1992**; d) H. E. Katz, in *Inclusion Compounds*; J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNichol (Eds.); Oxford University Press: Oxford, **1991**; e) V. Amendola, M. Bonizzoni, D. Esteban-Gomez, L. Fabbri, M. Licchelli, F. Sancenon, A. Taglietti, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1451–1470; f) E. Garcia España, P. Diaz, J. M. Llinares, A. Bianchi, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2952–2980; g) A. Bianchi, E. Garcia-España, K. Bowman-James (Eds.), *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, **1997**; h) S. Tamaru, I. Hamachi, *Struct. Bonding (Berlin)* **2008**, *129*, 95–125; i) E. A. Katayev, Y. A. Ustynyuk, J. L. Sessler, *Coord. Chem.*

- Rev. **2006**, *250*, 3004–3037; j) C. Caltagirone, P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 520–563; k) S. K. Kim, D. H. Lee, J. Hong, J. Yoon, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 23–31; l) S. O. Kang, M. A. Hossain, K. Bowman-James, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3038–3052; m) T. Gunnlaugsson, M. Glynn, G. M. Tocci, P. E. Kruger, F. M. Pfeffer, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3094–3117; n) M. D. Lankshear, P. D. Beer, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3142–3160; o) N. Gimero, R. Vilar, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3161–3189; p) P. A. Gale, R. Quesada, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3219–3244; q) V. Amendola, L. Fabbrizzi, *Chem. Commun.* **2009**, 513–531; r) K. Wichmann, B. Antonoli, T. Söhnel, M. Wenzel, K. Gloe, K. Gloe, J. R. Price, L. F. Lindoy, A. J. Blake, M. Schröder, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2987–3003.
- [3] a) C. Caltagirone, G. W. Bates, P. A. Gale, M. E. Light, *Chem. Commun.* **2008**, 61–63; b) C. Olivier, Z. Grote, E. Solari, R. Scopelliti, K. Severin, *Chem. Commun.* **2007**, 4000–4002; c) H. F. M. Nelissen, D. K. Smith, *Chem. Commun.* **2007**, 3039–3041; d) S. Yamaguchi, I. Yoshimura, T. Kohira, S. Tamaru, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11835–11841; e) J. Yoon, S. K. Kim, N. J. Singh, J. W. Lee, Y. J. Yang, K. Chellappan, K. S. Kim, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 581–583; f) P. D. Beer, J. Cadman, J. M. Lloris, R. Martinez-Manez, E. Padilla, T. Pardo, D. K. Smith, J. Soto, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 127–134; g) A. Ghosh, A. Shrivastav, D. A. Jose, S. K. Mishra, C. K. Chandrakanth, S. Mishra, A. Das, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5312–5319; h) S. O. Kang, V. W. Day, K. Bowman-James, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2677–2680; i) R. Casaus, E. Climent, M. D. Marcos, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, P. Amoros, J. Cano, E. Ruiz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1903–1917; j) A. Kumar, P. S. Pandey, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 165–168; k) G. V. Zyryanov, M. A. Palacios, P. Anzenbacher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7849–7852; l) D. A. Jose, S. Mishra, A. Ghosh, A. Shrivastav, S. K. Mishra, A. Das, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1979–1982; m) G. Ambrosi, P. Dapporto, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 304–314; n) V. Amendola, M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, A. Palchetti, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 120–127.
- [4] a) M. W. Hosseini, A. J. Blaker, J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3896–3904; b) M. Dhaenens, J. M. Lehn, J. P. Vigneron, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 1379–1381.
- [5] a) J. A. Aguilar, E. Garcia-España, J. A. Guerrero, S. V. Luis, J. M. Llinares, J. F. Miravet, J. A. Ramirez, C. Soriano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2237–2238; b) L. Rodriguez, J. C. Lima, J. A. Parola, F. Pina, R. Meitz, R. Aucejo, E. Garcia-España, J. M. Llinares, C. Soriano, J. Alarcon, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 6173–6183; c) J. A. Aguilar, B. Celda, V. Fusi, E. Garcia-España, S. V. Luis, M. C. Martinez, J. A. Ramirez, C. Soriano, R. Tejero, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 1323–1328; d) J. A. Aguilar, A. B. Descalzo, P. Diaz, V. Fusi, E. Garcia-España, S. V. Luis, M. Micheloni, J. A. Ramirez, P. Romani, C. Soriano, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 1187–1192; e) P. Arranz, A. Bencini, A. Bianchi, P. Diaz, E. Garcia-España, C. Giorgi, V. L. Santiago, M. Queral, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, *9*, 1765–1770; f) R. Aucejo, P. Diaz, E. Garcia-España, J. Alarcon, E. Delgado-Pinar, F. Torres, C. Soriano, C. M. Guillem, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 44–51.
- [6] a) F. P. Schmidtchen, M. Berger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2694–2696; b) F. P. Schmidtchen, *Top. Curr. Chem.* **2005**, *255*, 1–29; c) K. Worm, F. P. Schmidtchen, A. Schier, A. Schäfer, M. Hesse, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 360–362.
- [7] a) H. J. Schneider, T. Schiestel, P. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7698–7703; b) H. J. Schneider, T. Blatter, B. Palm, U. Pfingsttag, V. Rüdiger, I. Theis, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7704–7708; c) A. V. Eliseev, H. J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6081–6088 and references cited therein.
- [8] H. Fuuta, D. Magda, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 978–985.
- [9] Y. Murakami, J. Kikuchi, T. Ohno, O. Hayashida, M. Kojima, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7672–7681.
- [10] F. Vögtle, H. Sieger, W. M. Müller, *Top. Curr. Chem.* **1981**, *98*, 107–161.
- [11] F. M. Menger, K. K. Catlin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2147–2150.
- [12] M. T. Reetz, C. M. Niemeyer, K. Harms, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1472–7681.
- [13] a) C. Bazzicalupi, A. Beconcini, A. Bencini, V. Fusi, C. Giorgi, A. Masotti, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 1675–1682; b) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, M. Cecchi, B. Escuder, V. Fusi, E. Garcia-España, C. Giorgi, V. L. Santiago, G. Maccagni, V. Marcelino, P. Paoletti, P. B. Valtancoli, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6807–6815; c) A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, V. Fusi, E. Garcia-España, J. M. Llinares, J. A. Ramirez, P. Paoletti, B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1114–1120; d) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, V. Fusi, C. Giorgi, A. Granchi, P. Paoletti, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 775–781.
- [14] M. P. Mertes, K. B. Mertes, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 413–421 and references cited therein.
- [15] H. Chen, S. Ogo, R. H. Fish, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4993–5001.
- [16] a) E. Kimura, A. Sakonaka, T. Yatsunami, M. Kodama, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3041–3045; b) E. Kimura, M. Kodama, T. Yatsunami, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3182–3187.
- [17] C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, P. Fornasari, C. Giorgi, A. Masotti, P. Paoletti, B. Valtancoli, *J. Phys. Org. Chem.* **2001**, *14*, 432–443.
- [18] a) S. Develay, R. Tripier, M. Le Baccon, V. Patinec, G. Serratrice, H. Handel, *Dalton Trans.* **2005**, 3016–3024; b) S. Develay, R. Tripier, M. Le Baccon, V. Patinec, G. Serratrice, H. Handel, *Dalton Trans.* **2006**, 3418–3426; c) S. Develay, R. Tripier, N. Bernier, M. Le Baccon, V. Patinec, G. Serratrice, H. Handel, *Dalton Trans.* **2007**, 1038–1046; d) N. Le Bris, H. Bernard, R. Tripier, H. Handel, *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 3026–3032; e) A. S. Delepine, R. Tripier, H. Handel, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1743–1750.
- [19] a) R. D. Hancock, M. P. Ngwenya, P. W. Wade, J. C. A. Boyens, S. Dobson, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, *164*, 73–84; b) R. A. Kolinski, *Pol. J. Chem.* **1995**, *69*, 1039–1045.
- [20] a) G. R. Weisman, M. E. Rogers, E. H. Wong, J. P. Jasinski, E. S. Paight, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8604–8605; b) G. R. Weisman, E. H. Wong, D. C. Hill, M. E. Rogers, D. P. Reed, J. C. Calabrese, *Chem. Commun.* **1996**, 947–948.
- [21] T. J. Hubin, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *241*, 27–46.
- [22] J. Springborg, *Dalton Trans.* **2003**, *9*, 1653–1665.
- [23] a) N. Bernier, M. Allali, R. Tripier, F. Conan, V. Patinec, S. Develay, M. Le Baccon, H. Handel, *New J. Chem.* **2006**, *30*, 435–441; b) N. Bernier, R. Tripier, V. Patinec, M. Le Baccon, H. Handel, *C. R. Chim.* **2007**, *10*, 832–838.
- [24] J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtisek, J. Rohovec, I. Lukes, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 243–266.
- [25] M. Le Baccon, F. Chuburu, L. Toupet, H. Handel, M. Soibinet, I. Deschamps-Olivier, J. P. Barbier, M. Aplincourt, *New J. Chem.* **2001**, *25*, 1168–1174.
- [26] a) R. W. Alder, R. B. Sessions, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3651–3652; b) R. W. Alder, A. Casson, R. B. Sessions, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3652–3653.
- [27] G. Anderegg, H. Wanner, *Inorg. Chim. Acta* **1986**, *113*, 101–108.
- [28] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- [29] B. Dietrich, M. W. Hosseini, J.-M. Lehn, R. B. Session, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1282–1283.
- [30] M. T. Albelda, M. A. Bernardo, E. Garcia-España, M. Luz Godino-Salido, S. V. Luis, M. J. Melo, F. Pina, C. Soriano, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 2545–2549.
- [31] A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441–451.

- [32] J. B. Cross, D. C. Thomponson, B. K. Raj, J. C. Baber, K. Yi Fan, Y. Hu, C. Humblet, *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1455–1474.
- [33] C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, A. Danesi, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, J. C. Lima, F. Pina, M. A. Bernardo, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 5134–5146.
- [34] G. Gran, *Analyst (London)* **1952**, *77*, 661–671.
- [35] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–706.
- [36] F. H. Allen, R. Taylor, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 463–475.
- [37] Accelrys.inc, San Diego California, USA.
- [38] a) P. Swaminathan, M. Sundaralingam, *Acta Crystallogr., Sect. B* **1980**, *36*, 2590–2597; b) A. C. Larson, *Acta Crystallogr., Sect. B* **1978**, *34*, 3601–3604.

Received: July 10, 2009

Published Online: September 28, 2009

Solo grazie alla collaborazione e all'impegno di diverse persone è stato per me possibile arrivare oggi a realizzare questa tesi.

Vorrei pertanto ringraziare il Prof. Antonio Bianchi e il Prof. Andrea Bencini per i continui suggerimenti, la Dott.ssa Carla Bazzicalupi, la Prof.ssa Barbara Valtancoli, la Dott.ssa Claudia Giorgi e la Dott.ssa Palma Mariani per le preziose collaborazioni.

Ringrazio il gruppo di ricerca del Prof. Ferdinando Secco dell'Università di Pisa per la realizzazione delle misure di interazione con il DNA e il gruppo di fotochimica del Prof. Fernando Pina dell'Università di Lisbona per il supporto e gli insegnamenti durante il periodo di lavoro nel suo laboratorio.

Ringrazio i miei laureandi volenterosi e tutti coloro che sono passati e passano dal Gruppo di Chimica Supramolecolare perché con molti di essi non ho solo trascorso volentieri le ore di lavoro, ma ho trovato degli amici che mi accompagnano ancora oggi fuori dall'Università.

