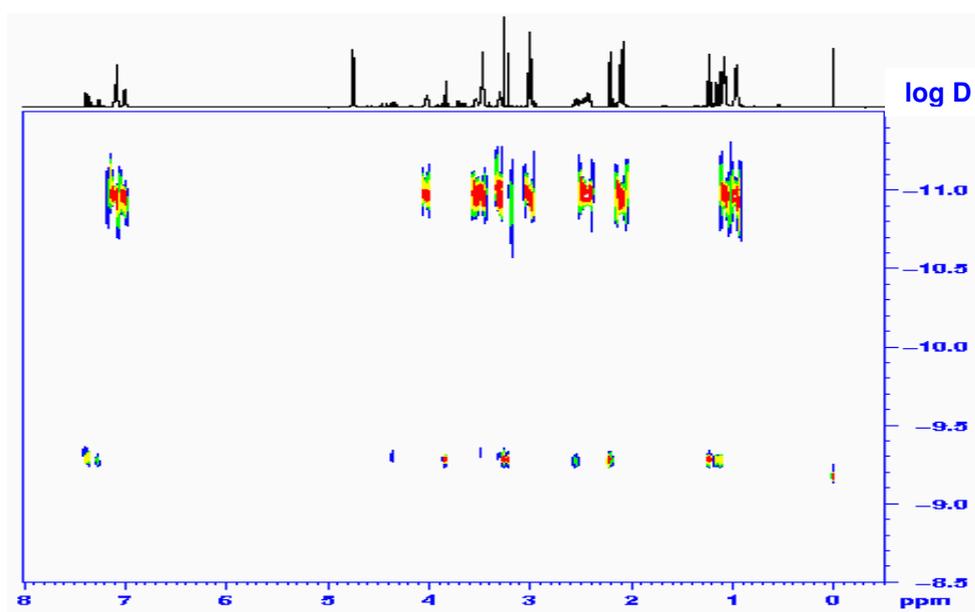


UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI ROMA “TOR VERGATA”

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche

**COMPLESSI π - π IN ACQUA E LORO
CARATTERIZZAZIONE TRAMITE SPETTROSCOPIA
NMR, DIFFUSIONE E LIGHT SCATTERING**



Dottoranda

Cecilia Sanna

Relatori

Giancarlo Angelini

Barbara Floris

Anno Accademico 2003-2004

Sommario

Premessa	1
Capitolo 1: Fondamenti di Risonanza Magnetica Nucleare.....	2
1.1 Introduzione.....	2
1.2 Momento magnetico nucleare	2
1.3 Livelli energetici.....	4
1.4 Magnetizzazione.....	5
1.5 Il fenomeno di Risonanza Magnetica Nucleare	6
1.6 Processi di rilassamento.....	7
1.7 Il segnale NMR.....	8
Riferimenti bibliografici.....	11
Capitolo 2: Interazioni π-π	13
2.1 Introduzione.....	13
2.2 Le interazioni non covalenti	13
2.3 Le interazioni non covalenti tra sistemi aromatici.....	14
2.4 Il modello teorico	14
2.5 Osservazione delle interazioni π - π via NMR	17
Riferimenti bibliografici.....	19
Capitolo 3: Cloroacetammidi	21
3.1 Introduzione.....	21
3.2 Metolachlor ¹	21
3.3 Metolachlor, Acetochlor e Pretilachlor.....	23
3.3.1 Preparazione dei campioni per l'analisi NMR.....	23
3.4 Discussione degli spettri monodimensionali	24
3.5 Variazioni di Concentrazione	26
3.5.1 Preparazione del campione.....	26
3.5.2 Risultati e discussione	26
Appendice: Tabelle di assegnazione.....	28
Riferimenti bibliografici.....	33
Capitolo 4: 3-fenil-2-nitropropanoati di etile.....	34
4.1 Introduzione.....	34
4.2 Sintesi dei 3-fenil-2-nitropropanoati di etile.....	34
4.3 Soluzioni acquose dei 3-fenil-2-nitropropanoati di etile	35
4.3.1 Discussione degli spettri monodimensionali	35
4.3.2 Variazione di temperatura	36
Appendice: Tabelle di assegnazione.....	38
Riferimenti bibliografici.....	43
Capitolo 5: L'effetto NOE e l'esperimento 2D-NOESY	44
5.1 L'effetto NOE ¹	44
5.2 L'esperimento 2D-NOESY	47
5.3 Il fenomeno della spin-diffusione e scelta del mixing-time.....	49
5.4 Esperimenti 2D NOESY condotti sulle Cloroacetammidi.....	50
5.5 Esperimenti 2D NOESY condotti sui 3-fenil-2-nitropropanoati di etile	51
Riferimenti bibliografici.....	53
Capitolo 6: Studi di diffusione mediante NMR	54
6.1 Introduzione.....	54
6.2 Diffusione	54
6.3 Studi di diffusione	55
6.3.1 I traccianti radioattivi.....	56
6.3.2 Neutron Scattering.....	56

6.3.3	Studi di diffusione mediante tecniche NMR.....	56
6.4	La tecnica PGSE.....	58
6.4.1	Osservazioni preliminari.....	58
6.4.2	Principi.....	59
6.4.3	Approccio macroscopico.....	61
6.5	Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY).....	63
6.5.1	Analisi dei dati e processing.....	63
6.6	Misure di diffusione condotte sulle Cloroacetammidi.....	64
6.6.1	Misure di diffusione NMR di campioni a diverse concentrazioni.....	67
6.7	Misure di diffusione condotte sui 3-fenil-2-nitropropanoati di etile.....	70
	Riferimenti bibliografici.....	72

Capitolo 7: Misure di Dynamic Light Scattering (DLS).....74

7.1	Introduzione.....	74
7.2	Teoria del Light Scattering.....	74
7.3	Teoria del Dynamic Light Scattering.....	77
7.4	Analisi dei dati.....	79
7.4.1	Analisi dei cumulanti.....	79
7.4.2	CONTIN.....	80
7.5	Vantaggi e limiti della tecnica.....	80
7.6	Risultati e discussione delle misure di Dynamic Light Scattering.....	81
7.7	Confronto tra i risultati DLS e DOSY.....	84
	Riferimenti bibliografici.....	86

Capitolo 8: Proprietà chimico-fisiche delle soluzioni acquose di Metolachlor87

8.1	Introduzione.....	87
8.2	Tensione superficiale.....	87
8.2.1	Determinazione della NMC.....	89
8.2.2	Concentrazione superficiale in eccesso ed area all'interfaccia.....	89
8.2.3	Termodinamica di aggregazione del Metolachlor.....	90
8.3	Proprietà colligative: abbassamento del punto di congelamento.....	90
8.3.1	Coefficiente osmotico.....	92
8.3.2	Coefficiente di attività.....	92
8.3.3	Calcolo del numero di aggregazione medio.....	93
8.4	Misure di viscosità.....	94
8.4.1	Calcolo del Volume idrodinamico.....	95
	Riferimenti bibliografici.....	98

Capitolo 9: Tentativo di simulazione dell'aggregazione mediante metodi di Dinamica Molecolare.....99

9.1	Introduzione.....	99
9.2	Limiti ed approssimazioni.....	100
9.3	Le equazioni del moto.....	100
9.4	La funzione di potenziale.....	101
9.5	Condizioni al contorno.....	104
9.6	Vincoli in DM.....	104
9.7	Algoritmi per l'integrazione delle equazioni del moto.....	105
9.8	Controllo della temperatura.....	105
9.9	Determinazione di parametri strutturali.....	105
9.10	Simulazione di Dinamica Molecolare sul Metolachlor ¹⁶	106
9.10.1	Struttura della molecola: topologia e gruppi di carica.....	106
9.10.2	Minimizzazione dell'energia.....	106
9.10.3	Simulazione di Dinamica Molecolare di una molecola di Metolachlor.....	107
9.10.4	Simulazione di Dinamica Molecolare di due molecole di Metolachlor.....	108
9.10.5	Simulazione di Dinamica Molecolare di quattro molecole di Metolachlor.....	110
	Riferimenti bibliografici.....	112

Capitolo 10: Materiali e metodi.....	113
10.1 NMR.....	113
10.2 Dynamic Light Scattering (DLS).....	114
10.3 Tensione Superficiale	115
10.4 Crioscopia.....	115
10.5 Viscosità	115
10.6 Dinamica Molecolare	116
10.7 Cromatografie.....	116
10.8 Reagenti.....	116
10.9 Sintesi	117
Riferimenti bibliografici	119
Conclusioni	120

Premessa

L'interesse per i meccanismi che governano l'aggregazione tra piccole molecole organiche a formare strutture ordinate quali micelle, vescicole e liposomi, ha condotto allo studio del comportamento in soluzione acquosa di due classi di composti, le cloroacetammidi e i 3-fenil-2-nitropropanoati di etile.

I composti in esame hanno una struttura molecolare anfifila, sono costituiti da una parete aromatica apolare e da catene alchiliche polari, in soluzione acquosa, quindi, si comportano alla stregua di un tensioattivo, generando strutture aggregate in modo da esporre le catene polari all'acqua e minimizzare le interazioni tra gli anelli aromatici e l'acqua stessa.

Nei capitoli 3, 4 e 5 verranno descritti i sistemi in esame mediante tecniche NMR sia mono che bidimensionali con le quali è stato possibile osservare gli aggregati e caratterizzarli.

Lo studio della diffusione mediante tecniche di Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) e di Dynamic Light Scattering (capitoli 6 e 7) permetterà di stimare le dimensioni degli aggregati e di definire un quadro completo del meccanismo di aggregazione.

Nel capitolo 8 verrà presentata un'analisi delle proprietà chimico-fisiche delle soluzioni e delle variazioni dei parametri termodinamici ad opera dei processi di aggregazione.

Sarà, inoltre, descritto, per completezza, un tentativo di simulazione mediante metodi di Dinamica Molecolare della formazione di aggregati.

Capitolo 1: Fondamenti di Risonanza Magnetica Nucleare

1.1 Introduzione

La Risonanza Magnetica Nucleare (dall'inglese Nuclear Magnetic Resonance, da cui l'acronimo NMR) rappresenta uno degli strumenti più validi che la scienza possiede oggi per osservare e comprendere fenomeni di diversa natura, nel campo della chimica, della fisica, della biologia e della medicina.

Nel 1946 due distinti gruppi di ricerca, uno formato da Bloch, Hansen e Packard¹ e l'altro da Purcell, Torrey e Pound², osservarono indipendentemente per la prima volta, segnali di Risonanza Magnetica Nucleare. Per la loro scoperta nel 1952 Bloch e Purcell vinsero il premio Nobel per la fisica. In questo capitolo viene descritta la teoria alla base della Risonanza Magnetica Nucleare secondo un approccio, cosiddetto, classico che, sebbene non sia rigoroso, consente di comprendere al meglio il fenomeno NMR dal punto di vista chimico; è comunque doveroso sottolineare che per una più profonda comprensione delle interazioni che regolano il comportamento degli spin nucleari è necessario un approccio spettroscopico che si avvalga della meccanica quantistica.

La trattazione quantomeccanica va oltre lo scopo di questa tesi, per quanto, alla fine di questo capitolo vengano riportati i riferimenti bibliografici di eccellenti testi consultabili per una analisi più rigorosa dell'argomento.³⁻¹⁹

1.2 Momento magnetico nucleare

La Risonanza Magnetica Nucleare è legata alle proprietà magnetiche dei nuclei.

Secondo la descrizione classica, il nucleo di un atomo è considerato come una sfera che ruota attorno ad un asse. La maggior parte dei nuclei possiede quindi un momento angolare intrinseco, \vec{P} , dato da:

$$\vec{P} = \hbar \vec{I} \quad (1.1)$$

dove \hbar è pari alla costante di Planck, h , diviso 2π e \vec{I} è il momento angolare di spin nucleare.

Il valore del numero di spin nucleare I dipende dal numero atomico e dalla massa atomica:

- Se la massa atomica è dispari, I è metà di un numero intero (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P).

- Se il numero atomico è dispari e la massa atomica è pari, I è un numero intero (^{14}N , ^2H).
- Se numero atomico e massa atomica sono pari, I è nullo e il nucleo non è attivo all’NMR (^{12}C , ^{16}O).

Il momento angolare nucleare \vec{P} è direttamente proporzionale al momento magnetico nucleare $\vec{\mu}$:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \quad (1.2)$$

la costante di proporzionalità γ è detta rapporto giromagnetico ed è una proprietà intrinseca di ogni nucleo.

Dalla combinazione delle equazioni (1.1) e (1.2) è possibile ricavare la relazione tra il momento magnetico nucleare $\vec{\mu}$ e il momento angolare di spin nucleare \vec{I} :

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \quad (1.3)$$

Se un nucleo con momento angolare \vec{P} e momento magnetico $\vec{\mu}$ è posto all’interno di un campo magnetico statico \vec{B}_0 , che in questa tesi verrà considerato sempre orientato lungo l’asse z , si avrà che la componente del momento angolare lungo l’asse z , P_z , sarà uguale ad un multiplo intero o semi intero di \hbar :

$$P_z = m\hbar \quad (1.4)$$

dove m , numero quantico magnetico, può assumere tutti i valori compresi tra $+I$ e $-I$ ($m = I, I-1, I-2, \dots, -I$). Si deduce che m può assumere $2I+1$ differenti valori che corrispondono ad un uguale numero di possibili orientazioni del momento angolare rispetto al campo magnetico esterno.

Dalle equazioni (1.2) e (1.4) si ottengono le corrispondenti componenti del momento magnetico lungo l’asse z :

$$\mu_z = m\hbar\gamma \quad (1.5)$$

Nella rappresentazione classica il nucleo è visto, quindi, come un dipolo che esegue un movimento di precessione intorno all’asse z lungo cui si orienta il campo magnetico esterno.

La frequenza di precessione è detta frequenza di Larmor ν_L ed è correlata all’intensità del campo magnetico esterno \vec{B}_0 dalla relazione:

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \text{ (Hz)} \quad (1.6)$$

Oppure:

$$\omega_L = \gamma B_0 \text{ (rad s}^{-1}\text{)} \quad (1.7)$$

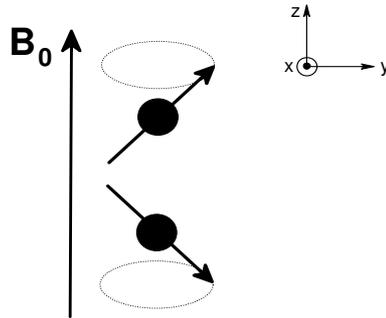


Figura 1.1: Moto di precessione di un dipolo intorno all'asse z lungo cui si orienta il campo magnetico esterno.

1.3 Livelli energetici

L'energia di un dipolo magnetico all'interno di un campo magnetico esterno di intensità B_0 è:

$$E = -\mu_z B_0 \quad (1.8)$$

Dalla combinazione delle equazioni (1.5) e (1.8) si ottiene:

$$E = -m\hbar\gamma B_0 \quad (1.9)$$

da cui segue che per un nucleo con $2I+1$ possibili orientazioni esistono $2I+1$ livelli energetici disponibili, ad esempio, per nuclei con numero di spin I pari ad $1/2$, come ^1H e ^{13}C , m può assumere soltanto due valori, $+1/2$ e $-1/2$ a cui corrispondono due livelli energetici in presenza del campo magnetico esterno; se $m = +1/2$, μ_z è parallelo alla direzione del campo, viceversa se $m = -1/2$, μ_z è antiparallelo. Il livello energetico corrispondente a $m = +1/2$ è denominato α , ed è quello a minor energia, mentre il livello energetico corrispondente a $m = -1/2$ è denominato β ed è a energia maggiore. La differenza di energia tra i due livelli α e β è:

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 \quad (1.10)$$

Dalla equazione (1.10) si osserva come la quantità di energia necessaria per promuovere la transizione tra i due livelli energetici sia direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico esterno applicato.

In condizioni di equilibrio, la distribuzione degli spin nucleari tra i due livelli energetici, sempre assumendo che il nucleo abbia spin pari a $1/2$, è data dalla legge di Boltzmann:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T} \quad (1.11)$$

Dove N_β e N_α sono rispettivamente le popolazioni dei livelli energetici β e α , k_B è la costante di Boltzmann e T è la temperatura assoluta in Kelvin. A temperatura ambiente l'eccesso di popolazione del livello energetico inferiore è molto piccola (ad esempio, è solo dell'ordine di 1×10^5 per lo spin ^1H in un campo magnetico di 11.7 Tesla).¹⁷

1.4 Magnetizzazione

Sommando le componenti lungo l'asse z dei momenti magnetici nucleari si ottiene una magnetizzazione macroscopica M_0 allineata parallelamente all'asse del campo magnetico applicato poiché N_α è maggiore di N_β . Teoricamente sarebbe possibile misurare M_0 ma poiché si è detto che la differenza $N_\alpha - N_\beta$, a cui M_0 è correlata, è un valore molto piccolo diviene molto più pratico esaminare gli effetti su una magnetizzazione indotta con metodi di risonanza. Contrariamente a quanto avviene in altre forme di spettroscopia in cui si misura l'assorbimento o l'emissione di un fotone associato ad una particolare transizione energetica, in NMR si genera un segnale che può durare anche per diversi secondi anche se le transizioni tra diversi livelli di energia sono potenzialmente istantanee.

All'equilibrio la magnetizzazione macroscopica M_0 precessa alla frequenza ω_L , del particolare spin osservato, attorno all'asse del campo magnetico applicato B_0 .

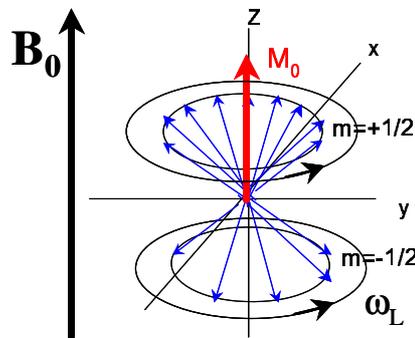


Figura 1.2: Moto di precessione alla frequenza ω_L dei momenti magnetici nucleari $N_\alpha + N_\beta$. Poiché $N_\alpha > N_\beta$ ne risulta una magnetizzazione macroscopica M_0 allineata lungo l'asse del campo magnetico \vec{B}_0 .

Al fine di osservare un segnale NMR è necessario allontanare il sistema dallo stato di equilibrio, variando le popolazioni dei livelli energetici.

1.5 Il fenomeno di Risonanza Magnetica Nucleare

Fornendo energia al sistema mediante una radiazione elettromagnetica generata da un flusso di corrente alternata si ottiene l'allontanamento del sistema dalla condizione di equilibrio. Di fatto, la radiazione elettromagnetica genera un nuovo campo magnetico \vec{B}_1 ortogonale a \vec{B}_0 , con $\|\vec{B}_1\| \ll \|\vec{B}_0\|$. I due campi magnetici risultano ortogonali poiché il flusso di corrente alternata proviene da una spira idealmente avvolta nel piano xy ¹⁴ e corrispondente a due vettori in controrotazione di intensità B_1 . Di questi due vettori solo uno, col corretto senso di rotazione rispetto alla precessione di Larmor, è attivo.

Un campo magnetico oscillante linearmente polarizzato di ampiezza $2B_1$ è equivalente ad una combinazione lineare di due campi magnetici di ampiezza B_1 che ruotano in direzioni opposte sul piano xy attorno all'asse z , ma l'interazione avviene solo tra la magnetizzazione e il campo magnetico che ruota nella sua stessa direzione.

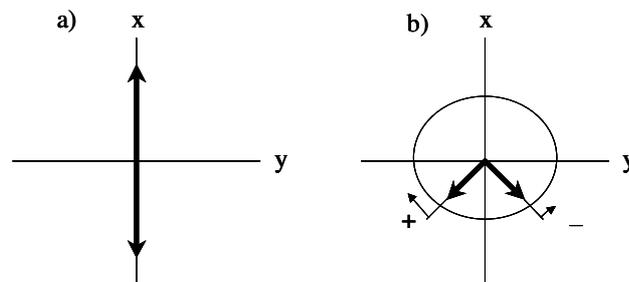


Figura 1.3: a) campo oscillante linearmente polarizzato; b) componenti rotanti in direzioni opposte.

Quando la frequenza di \vec{B}_1 è uguale alla frequenza di Larmor, ω_L , sarà soddisfatta la *condizione di risonanza*; in questo modo è possibile far avvenire transizioni fra livelli energetici e quindi modificare il numeri di spin di ciascun livello energetico.

Poiché le frequenze di precessione della maggior parte dei nuclei di interesse vanno dalle decine alle centinaia di Megahertz per campi magnetici da uno a circa venti Tesla, sia la perturbazione che le risposte del sistema avvengono nel range delle radiofrequenze.

Oggi, contrariamente a quanto avveniva in passato,⁴ il sistema viene sottoposto ad un breve e intenso impulso di energia alla opportuna radiofrequenza ν_1 ; la breve durata dell'impulso (pochi microsecondi) fa sì che esso contenga non solo la frequenza ν_1 ma una banda continua di frequenze, simmetriche rispetto alla frequenza centrale ν_1 , che eccita contemporaneamente tutti i nuclei suscettibili.

L'interazione tra il campo magnetico applicato \vec{B}_1 e la magnetizzazione \vec{M} produce una coppia torcente che muove la magnetizzazione verso il piano xy; la posizione finale della magnetizzazione dipende dalla durata dell'impulso.

Una volta perturbato, il sistema tende a tornare all'equilibrio al termine dell'impulso, i nuclei rilassano e tornano al loro stato originale, le popolazioni dei livelli energetici ritornano alla distribuzione di Boltzmann e la magnetizzazione M_{xy} , precedendo nel piano xy, torna al valore iniziale, M_0 , allineata lungo l'asse z.

1.6 Processi di rilassamento

Vi sono due processi di rilassamento mediante i quali il sistema torna all'equilibrio: il primo, detto *rilassamento longitudinale* o *spin-reticolo* tiene conto degli scambi energetici che avvengono tra il sistema di spin e l'ambiente molecolare cui è associato (reticolo) e comporta una progressiva degenerazione della componente della magnetizzazione lungo l'asse z verso il valore di equilibrio M_0 . Tale rilassamento ha un decadimento esponenziale con una costante di tempo T_1 .

Il *rilassamento trasversale* o *spin-spin*, descritto dalla costante di tempo T_2 , non contempla necessariamente uno scambio di energia e tiene conto delle interazioni tra spin nucleari vicini. A causa di tali interazioni gli spin che hanno una componente della magnetizzazione nel piano xy possiedono frequenze di risonanza leggermente differenti, ciò comporta una progressiva perdita di coerenza di fase tra gli spin nucleari e quindi un annullamento della componente della magnetizzazione nel piano xy, tanto più veloce quanto maggiore è l'allargamento in frequenza (fig. 1.4).

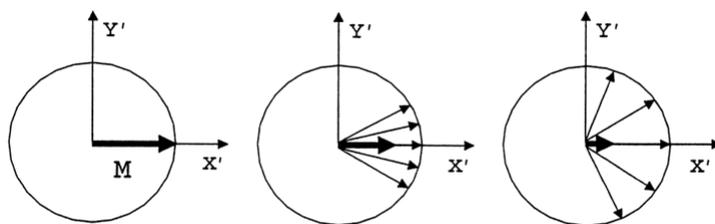


Figura 1.4: Defasamento degli spin e rilassamento trasversale della magnetizzazione nel sistema di coordinate rotanti (definito alla pagina seguente).

Eventuali disomogeneità presenti nel campo magnetico statico portano ad un maggior defasamento, con conseguente riduzione di T_2 .

T_2 non può mai essere maggiore di T_1 .^{13,14}

L'evoluzione del moto della magnetizzazione nel tempo, in presenza di un campo magnetico applicato \vec{B}_1 e durante il successivo rilassamento, è stata matematicamente analizzata da Bloch. Egli assunse che il rilassamento avviene mediante processi del primo ordine e formulò un set di equazioni che descrivono la variazione nel tempo delle componenti della magnetizzazione M_x , M_y ed M_z :

$$dM_x(t) / dt = \gamma [M_y(t) \cdot B_z - M_z(t) \cdot B_y] - M_x(t) / T_2$$

$$dM_y(t) / dt = \gamma [M_z(t) \cdot B_x - M_x(t) \cdot B_z] - M_y(t) / T_2$$

$$dM_z(t) / dt = \gamma [M_x(t) \cdot B_y - M_y(t) \cdot B_x] - [M_z(t) - M_0] / T_1$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, B_x e B_y sono rispettivamente le componenti del campo magnetico applicato \vec{B}_1 lungo l'asse x e lungo l'asse y, assumendo che \vec{B}_1 ruoti sul piano xy, B_z è pari a \vec{B}_0 , assumendo che questo sia orientato lungo l'asse z, T_1 e T_2 sono rispettivamente le costanti di tempo del rilassamento longitudinale e trasversale.

Dalle equazioni si evince che la variazione di una componente della magnetizzazione dipende dalle altre due.

E' possibile ottenere una semplificazione di tali equazioni descrivendo il fenomeno NMR in un sistema di coordinate rotanti, x' y' z' , ossia un sistema ortonormale che ruota attorno all'asse z' , coincidente con l'asse z, ad una frequenza pari alla frequenza di Larmor. Supponendo, inoltre che la frequenza di \vec{B}_1 sia uguale alla frequenza di Larmor, in questo nuovo sistema di coordinate si ha che sia la magnetizzazione \vec{M} che \vec{B}_1 appaiono fissi, di fatto, mediante questo artificio matematico viene rimossa la loro dipendenza dal tempo.

1.7 Il segnale NMR

L'oscillazione di M_{xy} subito dopo l'impulso genera un campo magnetico fluttuante che dà luogo ad una corrente in una spira idealmente avvolta lungo un asse perpendicolare a \vec{B}_0 , tale corrente indotta costituisce il segnale NMR.

Nella condizione sopra descritta, cioè nel caso in cui la frequenza di \vec{B}_1 è uguale alla frequenza di Larmor, ($\omega = \omega_L$) il segnale NMR decade in maniera esponenziale nel tempo (fig. 1.5a).

Di fatto, nell'esperimento reale, la frequenza dell'impulso, ω , non potrà essere esattamente uguale a tutte le frequenze di precessione presenti in un campione, ma sarà tale che $\omega - \omega_L > 0$ (condizione off-resonance), ciò comporta che durante l'impulso alcune componenti della

magnetizzazione evolvono nel tempo e si allontanano dalla frequenza di riferimento ω_L di un angolo φ proporzionale alla durata dell'impulso e alla differenza $\omega - \omega_L$:

$$\varphi = (\omega - \omega_L) \times t \quad (1.12)$$

Il segnale NMR ottenuto in questo caso avrà l'andamento mostrato in figura 1.5b:

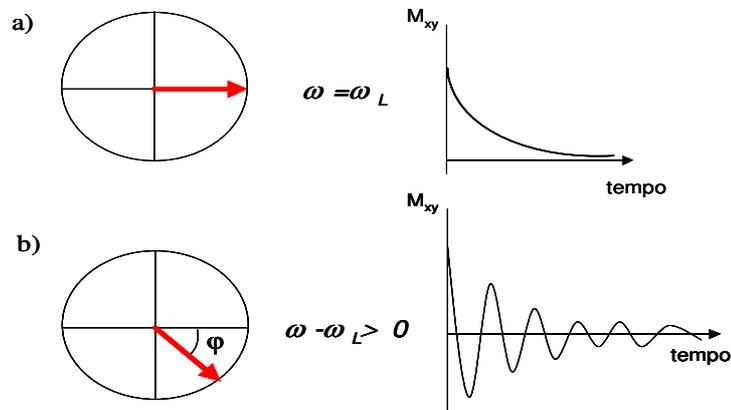


Figura 1.5: a) decadimento esponenziale della magnetizzazione nel tempo quando $\omega = \omega_L$; b) decadimento cosinusoidale della magnetizzazione nel tempo quando $\omega - \omega_L > 0$.

In un campione reale, sono presenti numerosi sistemi di spin che hanno frequenze differenti dalla frequenza di \vec{B}_1 . Poiché è stato utilizzato un impulso che ha eccitato contemporaneamente tutte le frequenze presenti nel campione il detector riceve una combinazione di queste, il segnale in uscita è un interferogramma chiamato *FID* (Free Induction Decay). La FID rappresenta il segnale NMR nel dominio dei tempi e per convertirlo in un segnale più facilmente comprensibile nel dominio delle frequenze si utilizza un operatore matematico chiamato “*Trasformata di Fourier (FT)*”.



Figura 1.6: Conversione del segnale dal dominio dei tempi al dominio delle frequenze mediante la Trasformata di Fourier.

Spesso, l'intensità di una singola FID è così bassa che dopo la Trasformata di Fourier i segnali sono molto deboli rispetto al rumore di fondo. Uno dei vantaggi dell'utilizzo degli impulsi rispetto all'onda continua risiede nella possibilità di ripetere le misure più

velocemente, diventa così possibile addizionare coerentemente i risultati di n misure, incrementando il rapporto segnale-rumore di un fattore pari a \sqrt{n} .

Riferimenti bibliografici

1. Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127.
2. Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37-38.
3. Pople, J. A.; Schneider, W. G.; Bernstein, H. J. *High-resolution Nuclear Magnetic Resonance*; McGraww-Hill: New York, **1959**.
4. Abragam, A. *The principles of nuclear magnetism*; Oxford University Press: New York, **1961**.
5. Lynden-Bell, R. M.; Harris, R. K. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*; Nelson, **1969**.
6. Farrar, T. C.; Becker, E. D. *Pulse and Fourier Transform NMR: introduction to theory and methods*; Academic press: New York, **1971**.
7. Shaw, D. *Fourier Transform NMR spectroscopy*; Elsevier: Amsterdam, **1976**.
8. Fukushima, E.; Roeder, S. B. W. *Experimental Pulse NMR: A nuts and bolts approach*; Addison-Wesley Publishing: Reading (Massachussets), **1981**.
9. Mehring, M. *Principles of high resolution NMR in solids*; Springer-Verlag: Berlin, **1983**.
10. Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions*; Oxford University Press: New York, **1987**.
11. Neuhaus, D.; Williamson, M. *The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis*; VCH Publishers: New York, **1989**.
12. Callaghan, P. T. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*; Oxford University Press: New York, **1991**.
13. Friebolin, H.. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*; VCH Publishers: Weinheim, **1991**.
14. Sanders, J. K. M.; Hunter, B. K. *Modern NMR spectroscopy: a guide for chemists*; 2nd ed.; Oxford University Press: New York, **1993**.
15. Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional solid-state NMR of polymers*; Academic press: London, **1994**.
16. Stejskal, E. O.; Memory, J. D. *High resolution NMR in the solid state*; Oxford University Press: New York, **1994**.
17. Cavanagh, J.; Fairbrother, W. J.; Palmer, A. G., III; Skelton, N. J. *Protein NMR spectroscopy: Principles and practice*; Academic Press: San Diego, **1996**.

18. Kimmich, R. *NMR tomography, Diffusometry and Relaxometry*; Springer: Berlin, **1997**.
19. Levitt, M. H. *Spin dynamics*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, **2001**.

Capitolo 2: Interazioni π - π

2.1 *Introduzione*

Le interazioni intermolecolari di tipo non covalente che coinvolgono sistemi aromatici rappresentano una importante driving force in grado di organizzare e controllare la struttura e le proprietà di aggregati molecolari.¹

E' noto che le interazioni di tipo π - π ed in particolare quelle π - π *stacking*, giocano un ruolo fondamentale nello stabilizzare: la struttura a doppia elica del DNA e dei suoi analoghi di sintesi, attraverso l'associazione verticale tra coppie di basi,² la struttura terziaria delle proteine,³ la conformazione di sistemi macrociclici poliaromatici,⁴ come le porfirine e i macrocicli di fenilacetilene (PAM's), nonché le proprietà di binding di sistemi supramolecolari di tipo host-guest.⁵

Nonostante vi sia una grande quantità di evidenze sperimentali che testimonia l'esistenza e l'importanza di queste interazioni, il quadro completo ed univoco dei fattori che le determinino non è ancora chiaro e può essere ottenuto solo per casi semplici e comporta una completa trattazione quantomeccanica del sistema.

2.2 *Le interazioni non covalenti*

Esaminando una qualunque interazione di tipo non covalente tra due molecole, vi sono numerosi effetti da prendere in considerazione: 1) interazioni di van der Waals considerate come la somma delle energie di dispersione e di repulsione; 2) interazioni elettrostatiche tra le distribuzioni statiche di carica su una molecola; 3) energia di induzione che rappresenta l'interazione tra la distribuzione statica di carica su una molecola e la distribuzione di carica indotta sull'altra; 4) trasferimento di carica che rappresenta un aumento di stabilità dovuto alla combinazione delle funzioni d'onda dello stato iniziale (AB) con uno stato eccitato a cariche separate (A^+B^-); 5) desolvatazione, ossia, due molecole che formano un complesso in soluzione devono essere desolvate prima che la complessazione possa avere luogo: il solvente può competere per i siti di riconoscimento e quindi destabilizzare il complesso, oppure, nel caso di solventi polari, gli effetti solvofobici possono stabilizzare il complesso.

Al fine di comprendere le interazioni di tipo π - π è importante considerare gli effetti relativi di ognuna di queste forze sull'interazione.

2.3 Le interazioni non covalenti tra sistemi aromatici

Mediante calcoli quantomeccanici, studi di cristalli ai raggi X e misure in soluzione delle proprietà termodinamiche dei sistemi π - π è stato possibile determinare le possibili geometrie dell'interazione tra due anelli aromatici. Si possono individuare tre geometrie principali denominate: *edge-face*, *face-to-face stacking* e *offset face-to-face stacking* (fig. 2.1):

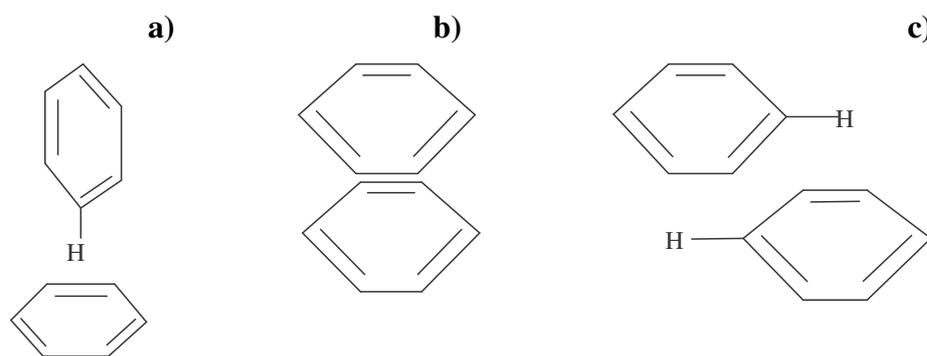


Figura 2.1: Possibili geometrie dell'interazione tra due anelli aromatici: a) *edge-face*; b) *face-to-face stacking*; c) *offset face-to-face stacking*.

La geometria *edge-face* (fig. 2.1a), che può essere considerata un'interazione CH- π , è stata trovata in un dimero di benzene allo stato solido⁶ ed è anche comunemente osservata tra i residui aromatici di proteine, anche lo stacking *offset face-to-face* (fig. 2.1c) si ritrova spesso nelle proteine^{3b,7} ed è la geometria di stacking delle basi del DNA, in questa conformazione viene ricoperta una maggior superficie del piano aromatico portando ad un incremento sia delle forze di van der Waals che delle interazioni idrofobiche. La geometria di tipo *face-to-face stacking* (fig. 2.1b) si osserva in sistemi del tipo accettore-donatore in cui l'interazione tra i due anelli aromatici è attrattiva; l'interazione tra benzene e perfluorobenzene è un eccellente esempio di questo tipo di geometria,⁸ è stato calcolato, infatti, che in tale conformazione si ottiene un incremento di stabilità pari a -15kJ mol^{-1} .

2.4 Il modello teorico

Diversi studi hanno dimostrato che forti interazioni attrattive tra due porfirine portano ad una aggregazione in soluzione.⁹ Successivamente venne osservato che, sia in soluzione che nello stato cristallino, le due porfirine si dispongono parallelamente l'una all'altra e che una porfirina è decentrata rispetto all'altra di 3-4 Å rispetto all'asse azoto-azoto,¹⁰ assume cioè, una conformazione di stacking di tipo *offset*.

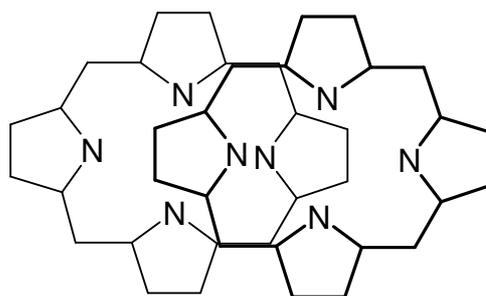


Figura 2.2: Geometria dello stacking tra due porfirine.

Mentre i dati sperimentali mostravano uno stacking di tipo *offset*, i calcoli di meccanica molecolare predicevano uno stacking perfettamente parallelo degli anelli porfirinici.

Nel 1990 Hunter e Sanders¹¹ approfondirono gli studi sui dimeri di porfirine e proposero un nuovo modello di calcolo per le interazioni π - π . Tale modello descrive il sistema π come costituito da una ossatura di legami σ carica positivamente inserita tra due nuvole di elettroni π cariche negativamente.

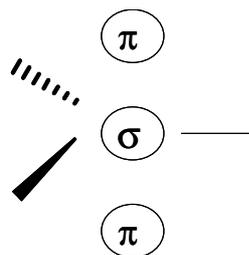


Figura 2.3: Atomo ibridizzato sp^2 in un sistema π .

Tenendo in considerazione questo modello, se si vanno ad analizzare i singoli contributi sopra elencati per un'interazione non covalente si vede che:

Forze di van der Waals: gli anelli aromatici hanno una superficie planare molto ampia, quindi lo stacking massimizza i contatti di van der Waals;

Interazioni elettrostatiche: uno stacking di tipo *offset* minimizza la repulsione tra gli elettroni π e rende massima l'attrazione tra l'ossatura di legami σ di un anello e gli elettroni π dell'anello immediatamente sotto di esso.

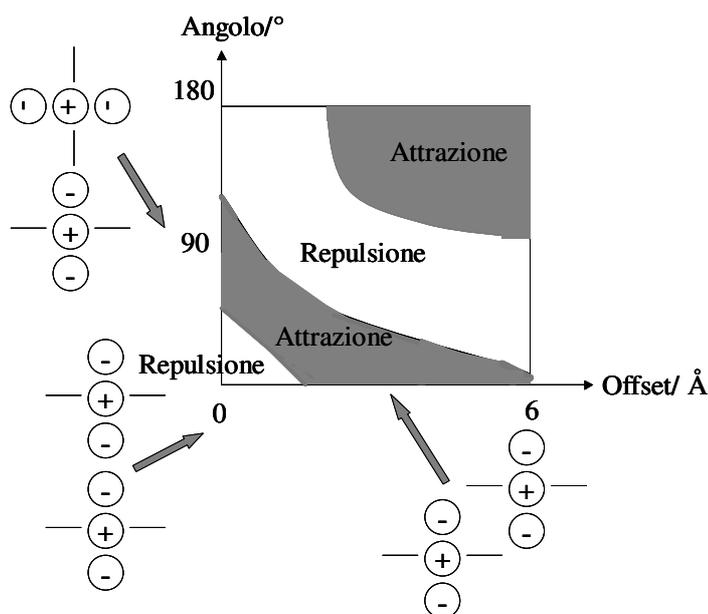


Figura 2.4: Interazioni elettrostatiche tra le distribuzioni di carica π in funzione dell'orientazione.

Induzione: esistono poche evidenze sperimentali che provano l'importanza di effetti di induzione nelle interazioni aromatiche, in generale, se questi sono presenti stabilizzano un'interazione già di per sé favorevole;

Trasferimento di carica: in molti complessi aromatici si osservano comunemente nello spettro di assorbimento le bande UV-Visibile caratteristiche di un trasferimento di carica; nel caso di complessi π - π tali bande sono assenti e ciò significa che non è il trasferimento di carica il motore che genera questi complessi;

Desolvatazione: la superficie planare degli elettroni π delle molecole aromatiche è fortemente apolare e quindi le forze solvofobiche favoriscono lo stacking.

Il semplice modello di calcolo di Hunter e Sanders tiene conto di tutti i contributi ed è stato il primo in grado di raccordare le evidenze sperimentali con le predizioni teoriche. I loro risultati possono essere riassunti come segue: gli effetti elettrostatici come l'attrazione σ - π , piuttosto che le interazioni π - π , conducono ad interazioni favorevoli e determinano la geometria del sistema π , mentre le forze di van der Waals e gli effetti solvofobici regolano l'intensità delle interazioni.

Nel precedente paragrafo sono state delineate le possibili geometrie dell'interazione tra due anelli aromatici; ulteriori considerazioni possono essere fatte sulla base del modello sopra descritto: mentre le geometrie *edge-face* e *offset face-to-face* costituiscono dei minimi di energia potenziale e rappresentano interazioni elettrostatiche favorevoli tra densità di cariche

opposte, lo stacking *face-to-face* rappresenta, invece, un'interazione non favorevole poiché le regioni ad alta densità elettronica dei due anelli si trovano a stretto contatto. Tale geometria risulta favorevole solo nel caso in cui la presenza di sostituenti diversi sui due anelli aromatici rende disuguale la distribuzione di carica su di essi come nel caso del dimero benzene-esafuorobenzene. In generale, le interazioni π - π possono essere influenzate in maniera considerevole se il sistema aromatico è polarizzato dalla presenza di un sostituente o di un eteroatomo:¹² un sostituente elettron-donatore (es. NMe_2) aumenta la densità elettronica sull'anello aumentando la repulsione tra gli elettroni π (fig. 2.5a), mentre un sostituente elettron-attrattore (es. NO_2) ha l'effetto opposto (fig. 2.5c). La presenza di un eteroatomo sull'anello aromatico può avere entrambi gli effetti oppure non apportare nessun contributo elettronico al sistema.

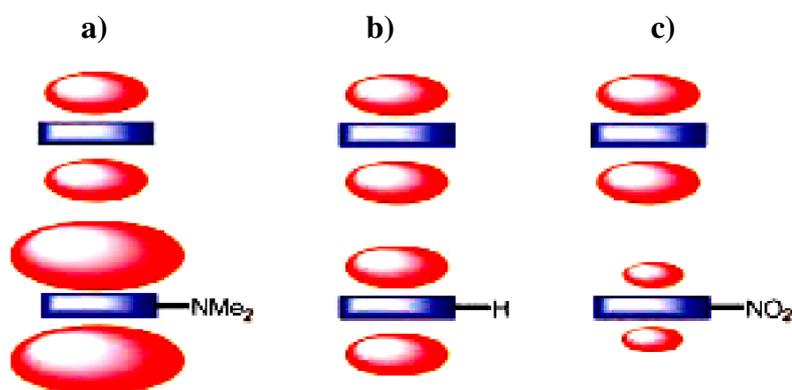


Figura 2.5:Rappresentazione schematica dell'effetto dei sostituenti sulle interazioni π - π : a) sostituente elettron-donatore; b) assenza di sostituente; c) sostituente elettron-attrattore.

Si ritrovano in letteratura diversi lavori che provano la fondatezza del modello proposto da Hunter e Sanders sia dal punto di vista teorico che sperimentale.¹³

2.5 Osservazione delle interazioni π - π via NMR

Tecniche di Risonanza Magnetica Nucleare sono state utilizzate per studiare complessi π - π , poiché questi mostrano un comportamento peculiare sotto l'influenza di un campo magnetico, osservabile mediante esperimenti NMR sia mono che bidimensionali.

La prima evidenza sperimentale della presenza di interazioni π - π in soluzione per via NMR si ottiene dallo spettro monodimensionale: le risonanze relative ai nuclei interessati a tali interazioni risultano spostate a campi più alti rispetto alle risonanze ottenute in assenza di interazioni π - π (diverso solvente, diversa temperatura e/o concentrazione).

Studi NMR condotti su aggregati di un particolare nucleotide, la guanosina 5'-monofosfato disodico (5'-GMP), hanno permesso di risalire alla struttura di tali aggregati, confutando modelli precedenti secondo i quali l'autoassociazione di questi nucleotidi avveniva esclusivamente mediante legami a idrogeno.¹⁴ Variazioni di chemical shift a diverse temperature e misure dei tempi di rilassamento longitudinale e di trasferimento di saturazione hanno dimostrato che la driving force del processo di associazione risiede non nei legami a idrogeno ma nelle interazioni tra gli anelli aromatici, che portano alla formazione di un complesso π - π .

Santa et al.¹⁵ hanno misurato le variazioni dei valori delle costanti di accoppiamento dipolare ^1H - ^1H di molecole aromatiche semplici quali benzene, benzene monosostituito, naftalene ed esafluorobenzene in presenza di un forte campo magnetico e la dipendenza di queste variazioni dal solvente. Tali sistemi aromatici si allineano lungo l'asse di un forte campo magnetico in misura minima, infatti, i valori delle costanti di accoppiamento dipolare ^1H - ^1H risultano dell'ordine di decine di mHz per un campo magnetico di 400 MHz e non è possibile una loro osservazione diretta, è però possibile la loro determinazione indiretta, nel caso di sistemi di spin simmetrici, qualora si ottenga uno spettro NMR di alta qualità. In questo modo si determinano le strutture preferenziali dei complessi π - π costituiti dalle molecole in esame.

Tecniche NMR sono state utilizzate anche da Cubberley e Iverson¹⁶ per studi di binding (associazione) in soluzioni acquose. La determinazione delle costanti di binding tra strutture aromatiche elettrone-ricche ed elettrone-povere, in vari solventi, indica che la driving force dell'aggregazione è la desolvatazione, per quanto, le interazioni elettrostatiche tra molecole elettronicamente complementari determinino la geometria dello stacking. Tale osservazione risulta in perfetto accordo con il modello sopra descritto proposto da Hunter e Sanders.

Tecniche NMR bidimensionali basate sulla spettroscopia NOE, quali NOESY e ROESY, consentono di avere un quadro più completo della conformazione dei complessi π - π ¹⁷ e verranno trattate in dettaglio nei successivi capitoli.

Riferimenti bibliografici

1. Recenti reviews sulle interazioni aromatiche: a) Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 651-669 and references therein. b) Waters, M. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 736 – 741.
2. a) Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag: New York, **1984**; pp132-140. b) Guckian, K. M.; Schweitzer, B. A.; Ren, R. X.-F.; Sheils, C. J.; Tahmassebi, D. C.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2213-2222. c) Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Krische, M. J.; Lehn, J.-M. *Nature* **2000**, 407, 720-723.
3. a) Burley, S. K.; Petsko, G. A. *Ad. Protein. Chem.* **1988** 39, 125-189. b) Burley, S. K.; Petsko, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7995-8001. c) McGaughey, G. B.; Gagnè, M.; Rappè, A. K. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15458-15463. d) Butterfield, S. M.; Patel, P. R.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9751-9755. e) Tatko, C. D.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9372-9373.
4. a) Shetty, A. S.; Zhang, J.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1019-1027. b) Lahiri, S.; Thompson, J. L.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11315-11319. c) Schneider, H. J.; Wang, M. *J. Org. Chem.* **1994** 59,7464-7472.
5. a) Ferguson, S. B.; Sanford, E. M.; Seward, E. M.; Diederich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5410-5419. b) Klärner, F. G.; Kahlert, B. *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 919-932.
6. Cox, E. G.; Cruickshank, D. W. J.; Smith, J. A. S. *Proc. R. Soc. London A* **1958**, 247, 1-21.
7. Hunter, C. A.; Singh, J.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1991**, 218, 837-846.
8. West, J.; Mecozzi, S.; Dougherty, D. A. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, 10, 347-350.
9. a) Alexander, A. E. *J. Chem. Soc.* **1937**, 1813-1816. b) Hughes, A. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1936**, 155, 710-711. c) Abraham, R. J.; Eivazi, F.; Pearson, H.; Smith, K. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 698-699. d) Abraham, R. J.; Eivazi, F.; Pearson, H.; Smith, K. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 699-701.
10. a) Hunter, C. A.; Leighton, P.; Sanders, J. H. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 547-552. b) Scheidt, W. R.; Lee, Y. J. *Structure Bonding 64*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **1987**.
11. Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525-5534.
12. Rashkin, M. J.; Waters, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1860-1861.

13. a) Ferguson, S. B.; Seward, E. M.; Diederich, F.; Sanford, E. M.; Chou, A.; Inicencio-Szweda, P.; Knobler, C. B. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5595-5596. b) Cozzi, F.; Cinquini, M.; Annunziata, R.; Dwyer, T.; Siegel, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5729-5733. c) Cozzi, F.; Cinquini, M.; Annunziata, R.; Siegel, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5330-5331. d) Newcomb, L. F.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4993-4994. e) Sindkhedkar, M. D.; Mulla, H. R.; Cammers-Goodwin, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9271-9277.
14. Petersen, S. B.; Led, J. J.; Johnston, E. R.; Grant, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5007-5015.
15. Laatikainen, R.; Ratilainen, J.; Sebastian, R.; Santa H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11006-11010.
16. Cubberley, M. S.; Iverson, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7560-7563.
17. Wakita, M.; Kuroda, Y.; Fujimara, Y.; Nakagawa, T. *Chemistry and Physics of Lipids* **1992**, 62, 45-54.

Capitolo 3: Cloroacetammidi

3.1 Introduzione

E' stato condotto uno studio sulla formazione di complessi π - π in soluzione acquosa su una serie di erbicidi appartenenti alla classe delle cloroacetammidi, essi danno luogo ad una nuova classe di complessi π - π costituiti da molecole organiche a basso peso molecolare.

3.2 Metolachlor¹

Il Metolachlor (fig. 3.1) è un erbicida appartenente alla classe delle cloroacetammidi,² la sua struttura ha un anello aromatico che, in particolari condizioni, dà luogo ad interazioni π - π .

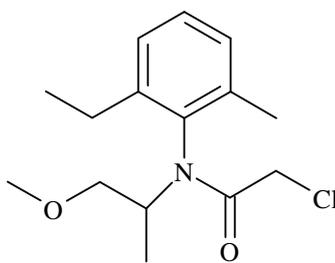


Figura 3.1: Metolachlor [2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(2-metossi-1-metiletil) acetammide]

Lo spettro NMR del Metolachlor in D₂O ad una concentrazione inferiore alla sua solubilità in acqua (1.87 mM a 20°C) appare analogo agli spettri ottenuti in solventi organici.

Aumentando la concentrazione ad un valore superiore alla solubilità riportata si osserva che il campione diviene opalescente, lo spettro mostra gli stessi segnali ottenuti in condizioni di diluizione e in più la formazione di nuove risonanze. L'osservazione di queste nuove risonanze indica che la quantità di Metolachlor in acqua è maggiore della solubilità riportata (circa un fattore dieci). Lasciando il campione a temperatura ambiente per diversi giorni si osserva una lieve separazione di fase. Lo spettro NMR di questa soluzione non cambia nel tempo e ciò vuol dire che la soluzione è stabile e conferma la presenza di nuove risonanze che possono essere dovute alla formazione di aggregati irregolari, di dimeri, oppure di aggregati regolari.

E' importante sottolineare che le nuove risonanze osservate, la cui intensità aumenta all'aumentare della concentrazione del campione, compaiono tutte a campi più alti rispetto ai segnali osservati in condizioni di diluizione; inoltre, questi nuovi segnali sono netti e ben

risolti e ciò denota la presenza di ordine molecolare all'interno di tali aggregati, escludendo la possibilità che si tratti di aggregati irregolari ed è in accordo con la formazione di complessi π - π .

Quindi, in soluzioni acquose relativamente concentrate, le molecole di Metolachlor tendono a formare dimeri o aggregati regolari che minimizzano l'esposizione degli anelli aromatici all'acqua attraverso interazioni π - π e ne aumentano pertanto la solubilità apparente.

Al fine di identificare i complessi π - π , è stata utilizzata la tecnica DOSY (diffusion-ordered spectroscopy).

È stato eseguito un esperimento ^1H DOSY di una soluzione concentrata (16.9mM) di Metolachlor. I segnali ottenuti sono tutti ben risolti e possono essere classificati secondo il loro coefficiente di diffusione. Lo spettro DOSY mostra che tutte le extra risonanze sono caratterizzate dallo stesso coefficiente di diffusione, il che dimostra che appartengono tutte alla stessa struttura; inoltre, il coefficiente di diffusione del complesso è molto minore di quello del monomero. Questa grande differenza non è in accordo con l'ipotesi di un complesso dimerico.

Avendo escluso la possibilità che si formino aggregati irregolari o dimeri, va considerata la possibilità che si tratti di aggregati regolari ad elevato peso molecolare, tenuti insieme da interazioni π - π ed idrofobe.

Sono stati eseguiti una serie di esperimenti 2D NOESY utilizzando tempi di contatto molto diversi (10-400 ms).

La presenza di aggregati regolari ad elevato peso molecolare è stata confermata dalle seguenti osservazioni:

- I cross peaks NOESY della specie monomerică appaiono negativi e non mostrano effetti dovuti a spin diffusione anche a tempi di contatto piuttosto lunghi;
- I cross peaks NOESY della specie polimerica appaiono positivi e mostrano forti effetti di spin diffusione anche a tempi di contatto piuttosto brevi;
- A tempi di contatto molto brevi (10ms) non è presente spin diffusione e si osserva una serie di cross peaks NOESY intensi e ben definiti.

Tutti gli esperimenti sopra descritti condotti sul Metolachlor confermano la presenza del complesso π - π e mostrano che il DOSY 2D NMR è un'ottima tecnica per studiare la formazione di tali complessi.

3.3 *Metolachlor, Acetochlor e Pretilachlor*

Il comportamento peculiare del Metolachlor ci ha portato ad approfondire lo studio delle interazioni π - π in soluzione acquosa e ad estendere la ricerca ad altre due molecole appartenenti alla classe delle cloroacetammidi: Acetochlor e Pretilachlor (fig.3.2):

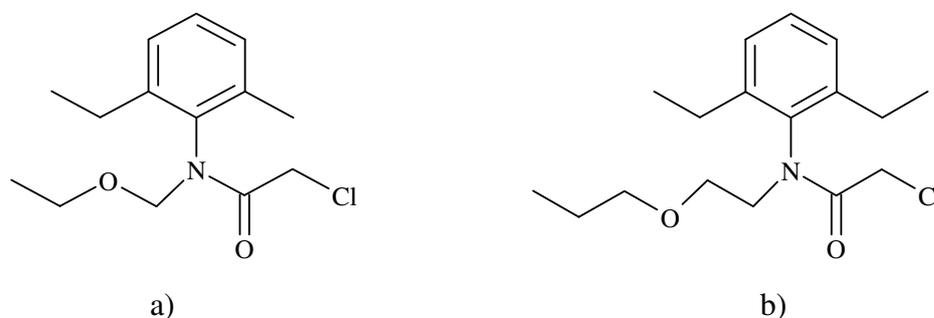


Figura 3.2: a) **Acetochlor** [2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-etossimetil]acetammide]; b) **Pretilachlor** [2-cloro-N-(2,6-dietilfenil)-N-(2-propossietil)acetammide].

Questi composti mostrano in soluzione acquosa un comportamento analogo a quello del Metolachlor. La Tabella 3.1 mostra alcune proprietà dei composti in esame:

Tabella 3.1 Peso molecolare, solubilità e stato fisico dei composti in esame.

Composto	Stato fisico	Solubilità in H ₂ O a 20°C (mM)	Peso Molecolare (Da)
Metolachlor	Liquido	1.8	284
Acetochlor	Liquido	0.8	270
Pretilachlor	Liquido	0.2	312

3.3.1 *Preparazione dei campioni per l'analisi NMR*

Si introduce nel tubo NMR una quantità di composto superiore alla solubilità in acqua riportata in Tabella 3.1 e si aggiungono 0.7ml di una soluzione 0.22mM di trifluoroacetato di 4,4-dimetil-4-silapentano-1-ammonio (DSA) in D₂O. Il DSA³ viene utilizzato come standard interno per stimare la concentrazione effettiva degli aggregati in soluzione e per calibrare i chemical shifts negli spettri ¹H.

Il tubo NMR viene agitato energicamente a mano per circa 30s; la soluzione diviene lievemente torbida. Si registra lo spettro ¹H di questa soluzione e lo si considera come spettro di riferimento al tempo zero. Successivamente, il tubo NMR viene lasciato a riposo a temperatura ambiente e si registrano gli spettri ¹H ad intervalli di tempo regolari. Nel tempo in cui il campione NMR viene lasciato a riposo si verifica una parziale separazione di fase e la

soluzione diviene nuovamente limpida. Quando lo spettro NMR non cambia tra due intervalli di tempo successivi, la soluzione si considera stabile. Per la maggior parte dei campioni è necessario attendere circa 1 ora per raggiungere la completa stabilità. Sono necessarie alcune precisazioni in merito alla preparazione del campione; primo, sono stati sperimentati diversi metodi di preparazione del campione, a partire dalla stessa quantità di composto e tutti hanno condotto agli stessi risultati, come confermato dagli spettri ^1H , tuttavia, si è scelta la procedura sopra descritta poiché di semplice esecuzione, veloce e riproducibile; secondo, se si diluisce il campione riportandolo ad una concentrazione inferiore alla solubilità riportata si ottiene uno spettro ^1H identico a quello registrato sulla soluzione preparata direttamente a partire da una quantità di campione inferiore alla sua solubilità, ciò suggerisce che, come atteso, il campione non si degrada nel tempo e che l'aggregazione è un processo reversibile.

3.4 *Discussione degli spettri monodimensionali*

I composti considerati hanno una struttura anfifila, sono solubili nella maggior parte dei solventi organici (cloroformio, dimetilsolfossido, metanolo) ma mostrano una scarsa solubilità in acqua (vedi Tabella 3.1), inoltre, la presenza dell'anello aromatico nella loro struttura può dare luogo, in particolari condizioni, ad interazioni π - π .

Per semplificare la seguente discussione le soluzioni acquose (D_2O) dei composti studiati al di sotto e al di sopra della solubilità riportata verranno da qui in avanti definite rispettivamente soluzioni diluite o concentrate.

In soluzioni diluite in D_2O come anche in CDCl_3 , gli spettri ^1H e ^{13}C dei composti studiati appaiono analoghi (fig. 3.3). L'assegnazione spettrale completa si trova nell'appendice di questo capitolo.

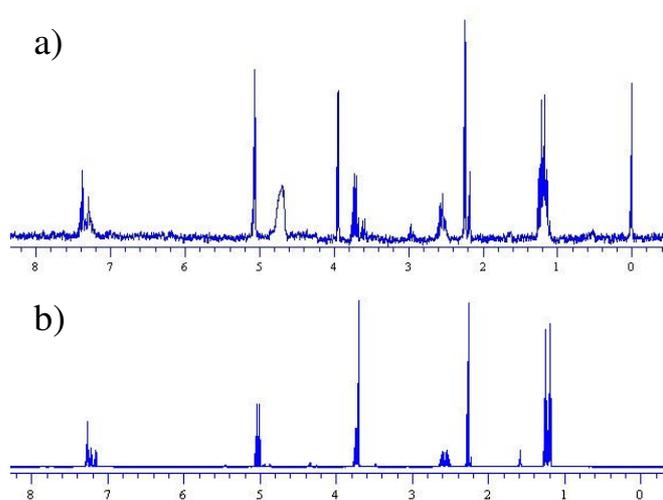


Figura 3.3: Acetochlor.

a) Spettro ^1H in D_2O , in presenza di DSA come standard interno, ad una concentrazione inferiore alla solubilità riportata (0.6mM);

b) Spettro ^1H in CDCl_3 .

Aumentando la concentrazione in D₂O si osserva una leggera opalescenza e lo spettro ¹H mostra la presenza di nuove risonanze; tali risonanze appaiono tutte a campi più alti rispetto ai segnali ottenuti per le soluzioni diluite (fig. 3.4).

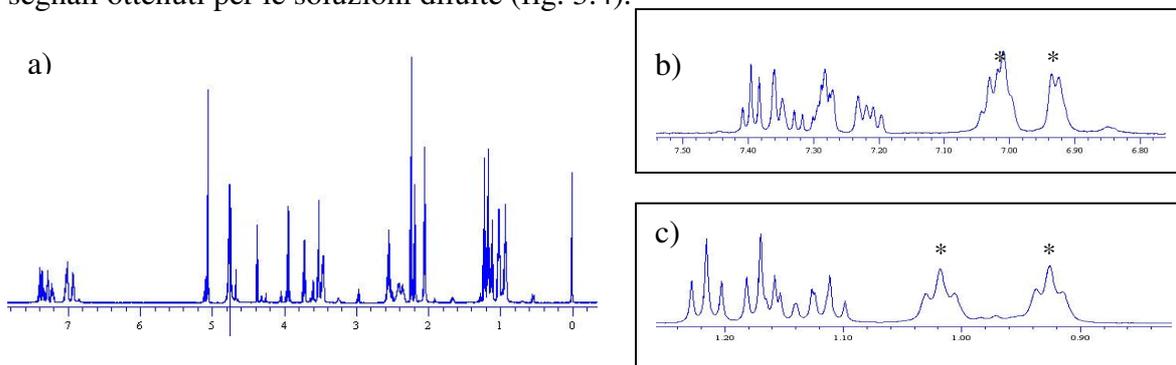


Figura 3.4: Acetochlor. a) Spettro ¹H in D₂O registrato a 600.13 MHz ad una concentrazione superiore alla solubilità riportata (6mM); b) Espansione della regione dello spettro compresa tra 7.5 e 6.8ppm; c) Espansione della regione dello spettro compresa tra 1.3 e 0.8ppm. Le risonanze dovute all'aggregato sono contrassegnate da un asterisco.

Lo spettro ottenuto in queste condizioni suggerisce che i composti in esame, a concentrazioni superiori alla loro solubilità, si riorganizzano in aggregati molecolari, regolari o irregolari, che minimizzano l'esposizione degli anelli aromatici all'acqua.

Tale osservazione è in accordo con la formazione di complessi π - π ;⁴ infatti, in un complesso π - π il centro dell'anisotropia magnetica viene spostato al di fuori del piano dell'anello aromatico verso il centro del complesso. E' da notare che unicamente la formazione di un complesso π - π può causare uno shift a campi più alti di tutti i segnali inclusi quelli relativi ai protoni aromatici stessi,⁵ inoltre, questi nuovi segnali sono netti e ben risolti e ciò esclude la possibilità che si tratti di aggregati irregolari.

L'equilibrio chimico che regola il passaggio dal monomero all'aggregato è un processo lento rispetto alla scala dei tempi NMR; infatti, lo spettro ¹H NMR di una soluzione acquosa concentrata dei composti studiati mostra i segnali di entrambe le specie.

Uno dei metodi utilizzati per lo studio dell'equilibrio monomero-dimero si basa sull'osservazione dello scambio in funzione della temperatura, come è stato precedentemente riportato da Petersen et al.⁶ sulla guanosina 5'-monofosfato disodico. Questo metodo può essere utilizzato quando la differenza di energia tra le specie coinvolte nell'equilibrio è tale da consentire l'osservazione dello scambio in funzione della temperatura. Tuttavia, nel nostro caso, non è stato possibile osservare alcuno scambio nell'intervallo di temperatura in esame (300-353 K). Infatti, variando la temperatura non si osserva né coalescenza né un

allargamento dei segnali nello spettro protonico. Inoltre, aumentando la temperatura, la solubilità del monomero aumenta e l'equilibrio chimico si sposta verso il monomero.

3.5 *Variazioni di Concentrazione*

Esaminando lo spettro ^1H monodimensionale di una serie di campioni di Metolachlor in D_2O a diverse concentrazioni, in presenza di DSA come standard interno, è possibile ricavare importanti informazioni sul comportamento dei composti in esame in soluzione acquosa.

3.5.1 *Preparazione del campione*

In un tubo NMR si introduce una quantità nota di Metolachlor, si aggiungono 0.7ml di una soluzione 2.2 mM di DSA in D_2O e si agita la soluzione a mano per 30s.

Di ogni campione è stato acquisito lo spettro ^1H a quattro differenti tempi: immediatamente dopo la preparazione, dopo trenta minuti, dopo un ora e dopo un giorno; è stato osservato che tra lo spettro acquisito dopo un'ora dalla preparazione e quello acquisito dopo un giorno vi erano delle variazioni trascurabili perciò il campione si considera stabile dopo un'ora dalla preparazione.

3.5.2 *Risultati e discussione*

Su ogni spettro acquisito dopo un ora dalla agitazione manuale è stato assegnato il valore di 1 all'integrale relativo al segnale del DSA a 0.00ppm ed è stato misurato il corrispondente valore dell'integrale relativo ai segnali compresi tra 1.265ppm e 0.953ppm che corrispondono ai metili 11 e 4 (vedi tabella di assegnazione in appendice) del monomero e dell'aggregato, dove presente.

I valori degli integrali ottenuti in funzione delle diverse concentrazioni dei campioni sono riportati in grafico (figura 3.5):

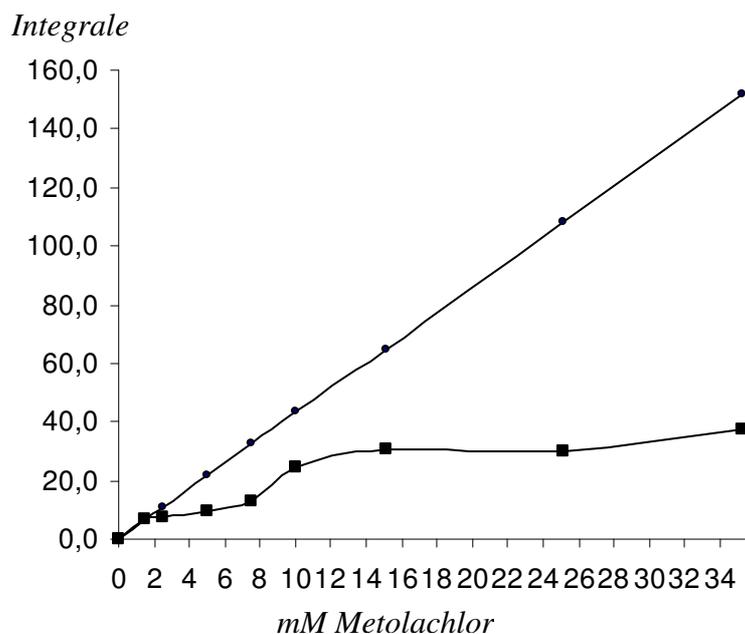


Figura 3.5: ■ Valori degli integrali dei segnali compresi tra 1.265 e 0.953ppm in funzione della concentrazione di Metolachlor (mM) in D₂O a 300K; ● Valori teorici degli integrali. Gli integrali sono misurati rispetto al DSA (0.2mM)

Confrontando la curva teorica (●) con quella sperimentale (■) si osserva un andamento bimodale di quest'ultima, infatti, sono chiaramente visibili due plateaux che corrispondono alla formazione di due diversi sistemi aggregati. Il primo si forma a bassa concentrazione (2mM) mentre il secondo si forma a concentrazione più elevata (12mM). Si osserva, inoltre, una graduale perdita di segnale, infatti, all'aumentare della concentrazione le risonanze presenti sullo spettro rimangono le stesse, ne varia solamente l'intensità in maniera non coerente con la curva teorica. Ciò è dovuto, probabilmente, alla formazione di aggregati di dimensioni molto elevate che, sebbene non visibili via NMR, causano la diminuzione del valore dell'integrale letto sullo spettro monodimensionale.

In conclusione, dall'osservazione degli spettri monodimensionali risulta che, i composti in esame in soluzione acquosa danno luogo alla formazione di complessi π - π , caratterizzati da risonanze strette e ben risolte tutte a campi alti rispetto ai corrispondenti segnali del monomero. In particolare, a concentrazioni inferiori a 2mM si osservano solamente i segnali del monomero (vedi figura 3.3a), al di sopra di tale concentrazione ha inizio l'aggregazione ed è possibile distinguere due diversi sistemi aggregati, il primo a concentrazioni comprese tra 2 e 12mM, il secondo tra 12 e 35mM, inoltre, un terzo sistema aggregato di dimensioni molto elevate e per questo non osservabile sullo spettro NMR, è presente in tutti i campioni a concentrazione maggiore di 2mM ed è responsabile della perdita di segnale mostrata in figura 3.5.

Al fine di studiare l'entità e la grandezza dei complessi π - π a cui le cloroacetammidi in esame danno luogo sono state utilizzate tecniche NMR bidimensionali, di Diffusion Ordered

Spectroscopy (DOSY) e di Dynamic Light Scattering (DLS); i risultati ottenuti mediante queste tecniche verranno descritti nei capitoli che seguono.

Appendice: Tabelle di assegnazione

Le tabelle che seguono mostrano l'assegnazione degli spettri ^1H e ^{13}C NMR in CDCl_3 e in D_2O (soluzione concentrata) dei composti in esame.

Tale assegnazione è stata condotta analizzando gli spettri NMR monodimensionali ^1H e ^{13}C in CDCl_3 , ^1H in D_2O e le mappe bidimensionali in CDCl_3 , e in D_2O ottenute mediante esperimenti 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), con le quali vengono determinate tutte le correlazioni tra carbonio e idrogeno direttamente legati tra loro ed esperimenti 2D HMBC (Heteronuclear Multi-Bond Connectivity) con i quali si osservano le correlazioni tra carbonio e idrogeno separati da più di un legame, generalmente due o tre legami.

Gli spettri in CDCl_3 sono calibrati sul segnale del CHCl_3 a 7.26ppm mentre quelli in D_2O sono calibrati sul segnale del DSA, utilizzato come standard interno, a 0.00ppm. La numerazione adottata per l'assegnazione è riportata in figura 3.6. Il Metolachlor utilizzato per l'analisi NMR è presente come miscela di isomeri, nelle tabelle di assegnazione sono indicati i chemical shifts associati a ciascuno dei due isomeri.

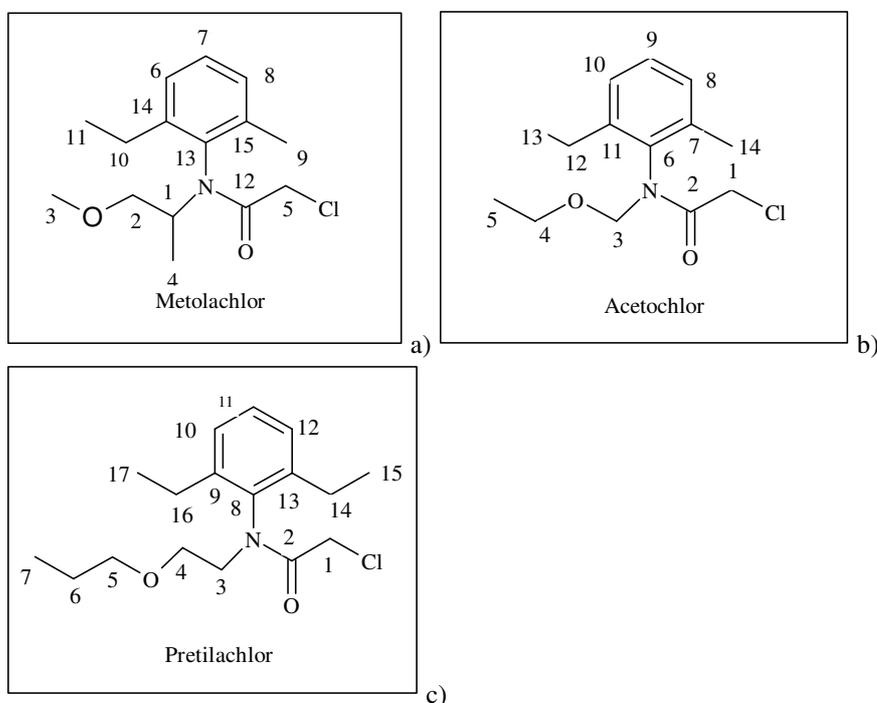


Figura 3.6: Numerazione adottata per l'assegnazione spettrale dei composti in esame: a) Metolachlor; b) Acetochlor; c) Pretilachlor.

Tabelle di Assegnazione in CDCl₃ a T=300K.

<i>Acetochlor</i>	Tipo	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J_{H-H}</i> (Hz)
1	CH ₂	42.13	3.701	s	
2	CO	167.81			
3	CH ₂	78.74	Ha 5.000 Hb 5.040	dd	10.0
4	CH ₂	66.04	Ha 3.735 Hb 3.733	dq	14.0;7.0
5	CH ₃	15.19	1.190	t	7.0
6	C	141.90			
7	C	136.20			
8	CH	127.24	7.147	d	7.5
9	CH	129.15	7.267	dd	7.7;7.5
10	CH	127.24	7.210	d	7.7
11	C	138.00		t	7.7
12	CH ₂	23.63	Ha 2.609 Hb 2.529	dq dq	15.0;7.6
13	CH ₃	14.47	1.240	t	7.6
14	CH ₃	18.48	2.260	s	

<i>Pretilachlor</i>	Tipo	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J_{H-H}</i> (Hz)
1	CH ₂	41.76	3.667	s	
2	CO	167.17			
3	CH ₂	50.21	3.784	t	6.1
4	CH ₂	67.32	3.619	t	6.1
5	CH ₂	72.71	3.317	t	6.8
6	CH ₂	22.79	1.510	tq	6.8; 7.5
7	CH ₃	10.48	0.851	t	7.5
8	C	141.50			
9	C	138.11			
10	CH	126.83	7.208	d	7.7
11	CH	129.08	7.325	t	7.7
12	CH	126.83	7.208	d	7.7
13	C	138.11			
14	CH ₂	23.43	2.615 2.534	dq dq	15.3; 7.7
15	CH ₃	14.17	1.250	t	7.7
16	CH ₂	23.43	2.615 2.534	dq dq	15.3; 7.7
17	CH ₃	14.17	1.250	t	7.7

<i>Metolachlor</i>	Tipo	ISOMERO SS/RR				ISOMERO SR/RS			
		¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J_{H-H}</i> (Hz) ^a	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J_{H-H}</i> (Hz)
1	CH	55.18	4.220	m		55.18	4.220	m	
2	CH ₂	74.40	Ha 3.740 Hb 3.497	dd dd	9.5;4.3 9.5;4.8	74.40	Ha 3.682 Hb 3.485	dd dd	9.5;4.3 9.5;4.8
3	CH ₃	58.32	3.275	s		58.32	3.251	s	
4	CH ₃	15.19	1.156	d	7.6	15.19	1.144	d	7.1
5	CH ₂	42.68	3.608	s		42.68	3.597	s	
6	CH	126.73	7.203	bd	7.6	126.73	7.203	bd	7.6
7	CH	128.61	7.253	dd	7.6	128.61	7.253	dd	7.6
8	CH	128.76	7.132	bd	7.4	128.76	7.120	bd	7.4
9	CH ₃	18.63	2.250	s		18.63	2.225	s	
10	CH ₂	23.63	Ha 2.553 Hb 2.549	dq dq	15.1;7.6 15.1;7.6	23.63	Ha 2.553 Hb 2.527	dq dq	15.1;7.6 15.1;7.6
11	CH ₃	13.94	1.244	t	7.6	13.94	1.244	t	7.6
12	CO	166.65				166.65			
13	C	142.45				142.45			
14	C	136.56				136.56			
15	C	136.95				136.95			

Tabelle di assegnazione in D₂O a T=300K

<i>Acetochlor</i>	Tipo	MONOMERO				POLIMERO			
		¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J_{H-H}</i> (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J_{H-H}</i> (Hz)
1	CH ₂	42.15	3.958 3.927	dd	14.9	41.48	3.520	s	
2	CO	170.66				166.75			
3	CH ₂	78.35	Hb 5.103 Ha 5.055	dd	11.3	77.82	4.768	s	
4	CH ₂	66.25	3.715	q	7.1	65.06	3.460	bq	7.4
5	CH ₃	13.91	1.170	t	7.1	13.59	0.925	t	7.5
6	C	141.83				138.02			
7	C	136.23				136.00			
8	CH	128.84	7.276	d	7.0	128.84	6.929	bd	6.5
9	CH	129.51	7.395	t	7.4	129.02	7.030	bt	7.5
10	CH	127.16	7.353	d	7.0	126.52	7.009	m	
11	C	136.70				141.49			
12	CH ₂	22.90	2.553	m		23.22	2.376	m	
13	CH ₃	13.38	1.215	t	7.5	12.60	1.018	t	7.5
14	CH ₃	17.23	2.235	s		17.72	2.047	s	

<i>Pretilachlor</i>	Tipo	MONOMERO				POLIMERO			
		¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> _{H-H} (Hz)
1	CH ₂	41.47	3.898	s		41.15	3.520	s	
2	CO	168.90				165.86			
3	CH ₂	48.82	3.845	t	5.6	49.45	3.594	t	5.5
4	CH ₂	66.40	3.620	t	5.6	67.05	3.422	t	5.5
5	CH ₂	72.54	3.350	t	7.1	71.70	3.108	t	6.6
6	CH ₂	21.70	1.474	tq	7.3;7.1	22.55	1.292	tq	7.2;6.6
7	CH ₃	13.76	0.807	t	7.3	10.04	0.654	t	7.2
8	C	141.67				140.96			
9	C	138.80				137.94			
10	CH	125.87	7.299	d	7.7	126.16	7.063	d	7.7
11	CH	126.86	7.358	d	7.7	128.65	7.147	t	7.7
12	CH	125.87	7.299	d	7.7	126.16	7.063	d	7.7
13	C					137.94			
14	CH ₂	22.56	2.534 2.587	dq	15.3;7.7	22.92	2.399 2.496	dq dq	15.1;7.5
15	CH ₃	13.06	1.232	t	7.7	13.60	1.072	t	7.5
16	CH ₂	22.56	2.534 2.587	dq	15.3;7.7	22.92	2.399 2.496	dq dq	15.1;7.5
17	CH ₃	13.06	1.232	t	7.7	13.60	1.072	t	7.5

Metolachlor

Tipo	MONOMERO (isomero SR/RS)				MONOMERO (isomero SS/RR)				AGGREGATO (isomero SR/RS)				AGGREGATO (isomero SS/RR)			
	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} ^a (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} ^a (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} ^a (Hz)
1 CH	57.59	4.347	m		57.59	4.347	m		57.76	4.018	m		57.76	4.018	m	
2 CH ₂	77.20	Ha 3.663 Hb 3.477	dd	10.3;4.9	77.20	Ha 3.721 Hb 3.477	dd	10.2;4.7	77.20	Ha 3.488 Hb 3.292	m		77.20	Ha 3.534 Hb 3.292	m	
3 CH ₃	60.91	3.214	s		60.91	3.256	s		60.91	2.985	s		60.91	3.008	s	
4 CH ₃	17.75	1.148	d	6.8	17.75	1.110	d	6.9	18.08	0.964	bd	8.4	18.08	0.951	bd	7.2
5 CH ₂	45.97	3.830	m		45.97	3.830	m		45.30	3.463	m		45.30	3.463	m	
6 CH	129.84	7.351	d	7.4	129.84	7.351	d	7.4	129.64	7.085	m		129.64	7.085	m	
7 CH	132.33	7.387	dd	7.6;7.4	132.33	7.387	dd	7.6;7.4	131.65	7.108	m		131.65	7.108	m	
8 CH	131.99	7.261	d	7.6	131.99	7.261	d	7.6	131.64	7.004	m		131.64	7.004	m	
9 CH ₃	20.90	2.216	s		20.90	2.208	s		21.51	2.110	s		21.51	2.075	s	
10 CH ₂	26.40	2.539	m		26.40	2.539	m		26.74	2.437	m		26.74	2.437	m	
11 CH ₃	16.09	1.226	t	7.5	16.09	1.226	t	7.5	16.74	1.070	m		16.74	1.075	m	
12 CO	172.78				172.78				168.88				168.88			
13 C	145.69				145.69				145.50				145.50			
14 C	138.64				138.64				140.32				140.32			
15 C	140.33				140.33				139.88				139.88			

Riferimenti bibliografici

1. Viel, S.; Mannina, L.; Segre, AL. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2515-2519.
2. H. Moser, G. Rihs, H. Sauter; *Z. Naturforsch.* **1982**, 37b, 451-454.
3. Nowick, J. S.; JKahshoor, O.; Hashemzadeh, M.; Brower, J. O. *Organic Letters* **2003**, 5, 3511-3513.
4. L. Castellani, M. Flieger, L. Mannina, P. Sedmera, A. L. Segre, M. Sinibaldi; *Chirality*, **1994**, 6, 543-548.
5. R. M. Lynden-Bell, R. K. Harris; In *Studies in Modern Chemistry*. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; Thomas Nelson, **1969**; 91.
6. Petersen, S. B.; Led, J. J.; Johnston, E. R.; Grant, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5007-5015.

Capitolo 4: 3-fenil-2-nitropropanoati di etile

4.1 Introduzione

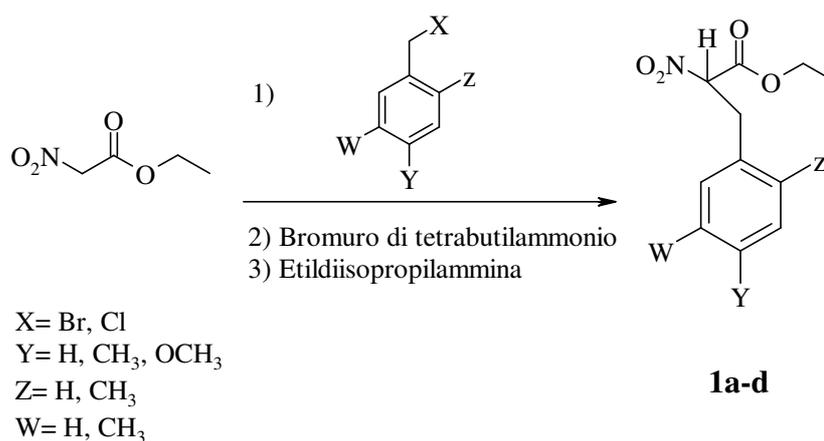
L'analisi mediante NMR ha evidenziato la formazione di complessi π - π in soluzione acquosa ad opera di 3-fenil-2-nitropropanoati di etile variamente sostituiti sull'anello aromatico. Tali composti mostrano in soluzione acquosa un comportamento simile a quello delle cloroacetammidi descritto nel capitolo precedente, sebbene siano state riscontrate alcune differenze.

4.2 Sintesi dei 3-fenil-2-nitropropanoati di etile

Gli esteri dell'acido 2-nitropropanoico sono importanti dal punto di vista sintetico poiché, possono essere utilizzati come precursori di composti biologicamente attivi quali amminoacidi naturali,¹ nitroenammine, eterocicli contenenti azoto² nonché di innumerevoli amminoacidi non naturali³ che costituiscono dei versatili building blocks nella preparazione di molecole di interesse farmacologico.⁴

Sono state condotte le sintesi in laboratorio di una serie di 3-fenil, 2-nitropropanoati di etile secondo lo schema sotto riportato:

Schema 4.1



A partire dal nitroacetato di etile, prodotto disponibile in commercio, si opera una alchilazione mediante un alogenuro benzilico, variamente sostituito, in presenza di bromuro di tetrabutilammonio che catalizza l'alchilazione e di etildiisopropilammina come base.

La tabella 4.1 mostra i prodotti ottenuti dalla sintesi sopra descritta e le corrispondenti rese di reazione:

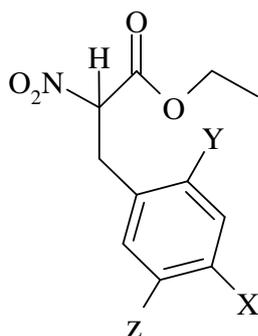


Tabella 4.1

Prodotto	Nome	X	Y	Z	Resa %
1a	R	H	H	H	41
1b	RCH ₃	CH ₃	H	H	73
1c	ROCH ₃	OCH ₃	H	H	22
1d	R(CH ₃) ₂	H	CH ₃	CH ₃	32

La reazione viene condotta in assenza di solvente per facilitare la purificazione del prodotto; solitamente le alchilazioni sui nitroesteri vengono effettuate in solventi dipolari aprotici i quali, però, essendo altobollenti risultano di difficile eliminazione soprattutto in presenza di prodotti termicamente instabili quali i 3-fenil-2-nitropropanoati di etile.

Sebbene l'agente alchilante sia sempre in difetto (0.9eq) rispetto al substrato e la reazione sia condotta a 0°C, non è possibile evitare la dialchilazione a causa dell'elevato carattere acido dei protoni acetilici del nitroacetato di etile.

E' stato osservato che la presenza di un gruppo elettron-donatore sull'anello aromatico provoca una notevole diminuzione delle rese poiché facilita la formazione di un sottoprodotto che comunque è sempre presente nel grezzo di reazione; si tratta dell'aldeide corrispondente all'alogenuro benzilico utilizzato per l'alchilazione.

La procedura sintetica utilizzata è descritta in dettaglio nella parte sperimentale della Tesi (capitolo 10).

4.3 Soluzioni acquose dei 3-fenil-2-nitropropanoati di etile

Analogamente a quanto osservato per il Metolachlor, le molecole in analisi, **1a-d**, sono solubili nella maggior parte dei solventi organici ma mostrano una scarsa solubilità in acqua.

Data la notevole acidità del protone in α al carbonile, questi composti danno luogo, in soluzione acquosa, ad un equilibrio cheto-enolico.

4.3.1 Discussione degli spettri monodimensionali

Gli spettri ¹H NMR in CDCl₃ e in D₂O a concentrazioni inferiori a 10⁻⁴M appaiono finemente risolti.

Aumentando la concentrazione in D₂O si osserva la presenza di nuove risonanze che compaiono tutte a campi più alti rispetto ai segnali osservati nelle precedenti condizioni.

Tale osservazione è in accordo con la formazione di complessi π - π che minimizzano l'esposizione degli anelli aromatici all'acqua.

La preparazione dei campioni è stata effettuata secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.2; immediatamente dopo l'agitazione manuale la soluzione appare lievemente torbida, dopo 48 ore dalla preparazione si verifica una parziale separazione di fase e la soluzione diviene nuovamente limpida.

Lo spettro ^1H NMR in D_2O dei composti **1a-d**, mostra le tre specie presenti: il monomero in forma esterea, il monomero in forma enolica e l'aggregato.

Operando in D_2O , il protone in α al carbonile che partecipa all'equilibrio cheto-enolico, è visibile solamente sullo spettro registrato al tempo zero e successivamente scompare.

Lo spettro di soluzioni concentrate dei composti in esame subisce una variazione nel tempo, infatti, dopo due giorni dalla preparazione lo spettro mostra una considerevole diminuzione di intensità delle risonanze risolte e la comparsa di risonanze asimmetriche e larghe come mostrato in figura 4.1.

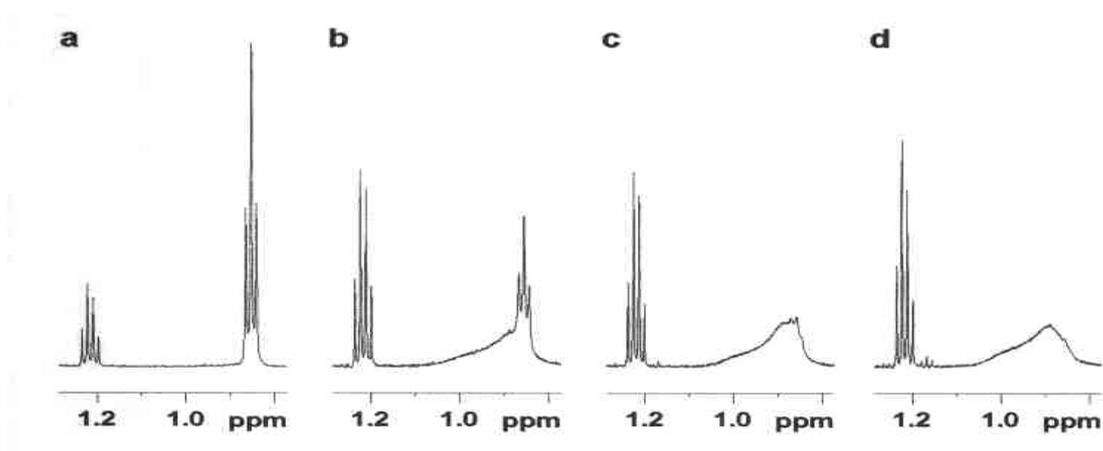


Figura 4.1: Regione dello spettro ^1H di una soluzione concentrata (1mg ml^{-1}) di RCH_3 in D_2O a 300K a: a) $t = 0$; b) $t = 2\text{h}$; c) $t = 24\text{h}$; d) $t = 48\text{h}$; dopo agitazione manuale del tubo NMR. L'asse verticale è stato incrementato di un fattore 2 in b), c) e d).

4.3.2 Variazione di temperatura

Su un campione di RCH_3 in D_2O (1mg ml^{-1}) lasciato a riposo per 48 ore dopo la preparazione sono stati eseguiti degli spettri ^1H a diverse temperature; partendo da 300k è stata gradatamente innalzata la temperatura e sono stati registrati gli spettri ad ogni variazione. All'aumentare della temperatura è stato osservato, come atteso, una graduale diminuzione dell'intensità dei segnali dell'aggregato ed un aumento dei segnali del monomero, in particolare, si osserva un incremento dei segnali dell'estere e una diminuzione dei segnali dell'enolo. L'innalzamento della temperatura sposta, quindi, l'equilibrio cheto-enolico verso

l'estere ed aumenta la solubilità del composto portando alla scomparsa dell'aggregato come mostrato in figura 4.2:

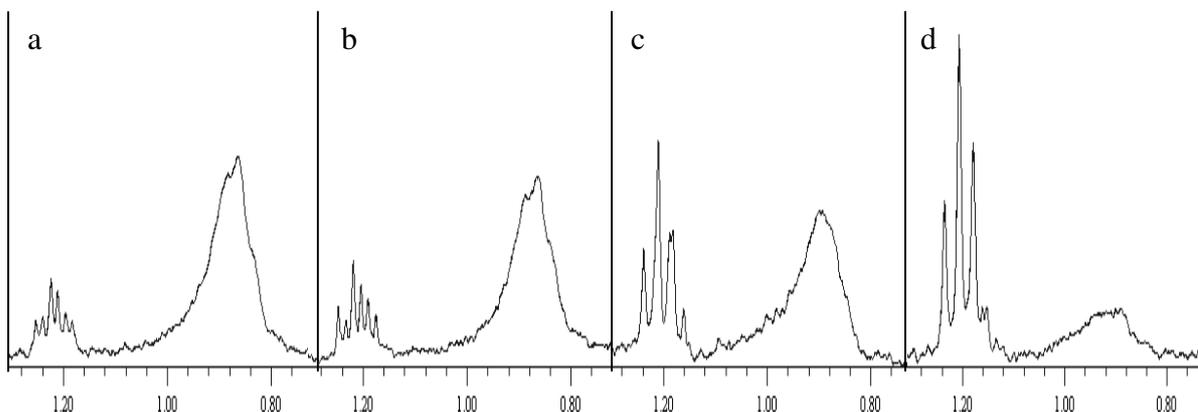


Figura 4.2: Regione dello spettro ^1H di una soluzione concentrata (1mg ml^{-1}) di RCH_3 in D_2O
a: a) $T=300\text{K}$; b) $T=310\text{K}$; c) $T=335\text{K}$; d) $T=353\text{K}$.

Per lo stesso campione sono stati registrati gli spettri ^1H a partire da una temperatura di 353K fino ad arrivare a 300K . L'abbassamento di temperatura porta ad una diminuzione della solubilità del composto e quindi ad un aumento dei segnali dell'aggregato, i quali, oltre a crescere in intensità appaiono gradualmente più risolti come mostrato in figura 5.3:

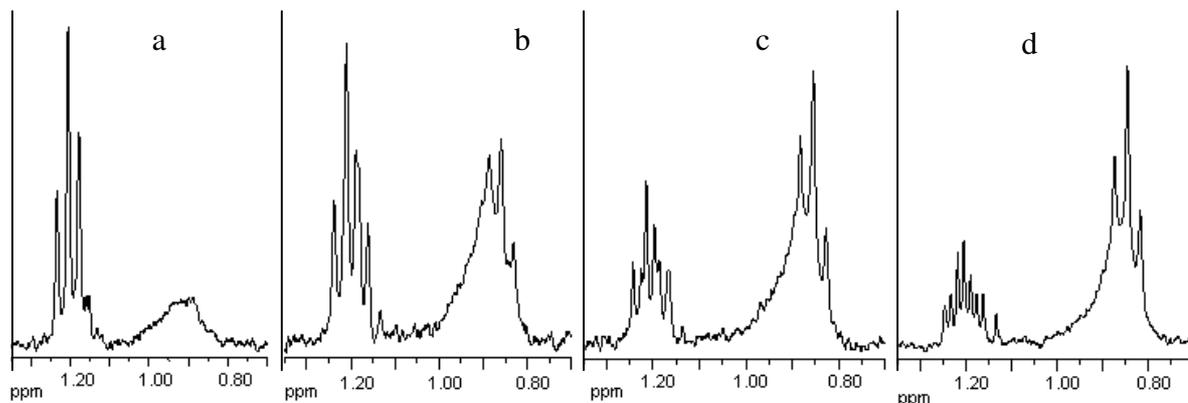


Figura 4.3: Regione dello spettro ^1H di una soluzione concentrata (1mg ml^{-1}) di RCH_3 in D_2O
a: a) $T=353\text{K}$; b) $T=335\text{K}$; c) $T=320\text{K}$; d) $T=300\text{K}$

In conclusione, il comportamento mostrato dai 3-fenil-2-nitropropanoati di etile in soluzione acquosa appare simile a quello osservato per le cloroacetammidi, con alcune differenze.

La formazione di complessi π - π è evidenziata dalla comparsa di nuove risonanze nette e ben risolte a campi alti rispetto ai corrispondenti segnali della specie monomeric. A differenza delle cloroacetammidi, questi composti mostrano nel tempo una perdita di risoluzione dovuta, probabilmente, alla presenza di diversi sistemi aggregati tra i quali intercorre uno scambio chimico sufficientemente lento, rispetto alla scala dei tempi NMR, da poter osservare le

diverse specie presenti. Le variazioni di temperatura non modificano l'equilibrio tra la specie monomerica e l'aggregato che resta comunque lento rispetto alla scala dei tempi NMR. Al fine di studiare l'entità e la grandezza dei complessi π - π a cui i 3-fenil-2-nitropropanoati di etile danno luogo sono state utilizzate tecniche NMR bidimensionali, di Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) e di Dynamic Light Scattering (DLS); i risultati ottenuti mediante queste tecniche verranno descritti nei capitoli che seguono.

Appendice: Tabelle di assegnazione

Le tabelle che seguono mostrano l'assegnazione degli spettri ^1H e ^{13}C NMR in CDCl_3 e in D_2O (soluzione concentrata) dei composti in esame.

Tale assegnazione è stata condotta analizzando gli spettri NMR monodimensionali ^1H e ^{13}C in CDCl_3 , ^1H in D_2O e le mappe bidimensionali in CDCl_3 , e in D_2O ottenute mediante esperimenti 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), con le quali vengono determinate tutte le correlazioni tra carbonio e idrogeno direttamente legati tra loro ed esperimenti 2D HMBC (Heteronuclear Multi-Bond Connectivity) con i quali si osservano le correlazioni tra carbonio e idrogeno separati da più di un legame, generalmente due o tre legami.

Gli spettri in CDCl_3 sono calibrati sul segnale del CHCl_3 a 7.26ppm mentre quelli in D_2O sono calibrati sul segnale del DSA, utilizzato come standard interno, a 0.00ppm. La numerazione adottata per l'assegnazione è riportata in figura 4.4.

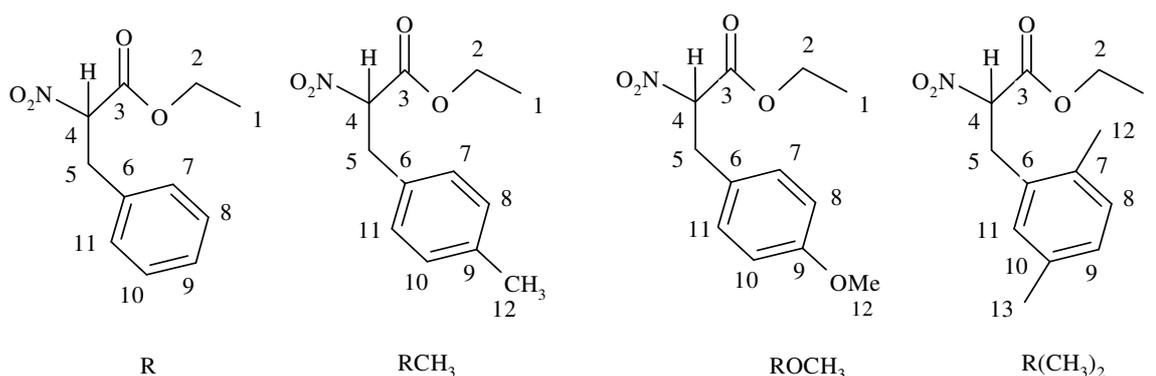


Figura 4.4: Numerazione adottata per l'assegnazione spettrale dei composti in esame.

Tabelle di Assegnazione in CDCl₃ a T=300K.

R	Tipo	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J_{H-H} (Hz)
1	CH ₃	13.54	1.278	t	7.0
2	CH ₂	63.09	Ha 4.285 Hb 4.281	q q	-14.1; 7.0 -14.1; 7.0
3	CO	164.33			
4	CH	89.24	5.334	dd	9.4, 5.9
5	CH ₂	36.01	Ha 3.481 Hb 3.562	dd dd	-14.7;9.4 -14.7;5.9
6	C	134.41			
7	CH	129.01	7.210	d	7.0
8	CH	129.23	7.320	dd	7.0;7.6
9	CH	128.04	7.283	d	7.6
10	CH	129.23	7.320	dd	7.0;7.6
11	CH	129.01	7.210	d	7.0

RCH₃	Tipo	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J_{H-H} (Hz)
1	CH ₃	13.80	1.281	t	7.1
2	CH ₂	63.14	Ha 4.282 Hb 4.277	q q	14.3; 7.1 14.3; 7.1
3	CO	164.04			
4	CH	89.35	5.306	dd	5.7;9.6
5	CH ₂	35.93	3.515 3.435	dd dd	14.7;9.6 14.7;5.7
6	C	130.56			
7	CH	128.70	7.090	bd	8.2
8	CH	129.62	7.120	bd	7.9
9	C	137.45			
10	CH	129.62	7.120	bd	7.9
11	CH	128.70	7.090	bd	8.2
12	CH ₃	21.09	2.317	s	

ROCH₃	Tipo	¹³C (ppm)	¹H (ppm)	m	J_{H-H} (Hz)
1	CH ₃	13.91	1.282	t	7.1
2	CH ₂	63.14	Ha 4.281 Hb 4.276	q q	14.3;7.1 14.3;7.1
3	CO	164.02			
4	CH	89.44	5.281	dd	5.8;9.5
5	CH ₂	35.56	3.420 3.497	dd dd	14.7;5.8 14.7;9.5
6	C	125.94			
7	CH	129.98	7.124	d	8.7
8	CH	114.35	6.843	d	8.8
9	C	159.11			
10	CH	114.35	6.843	d	8.8
11	CH	129.98	7.124	d	8.7
12	CH ₃	55.27	3.784	s	

R(CH₃)₂	Tipo	¹³C (ppm)	¹H (ppm)	m	J_{H-H} (Hz)
1	CH ₃	13.84	1.277	t	7.2
2	CH ₂	63.13	4.283	q	7.2
3	CO	164.25			
4	CH	88.02	5.314	dd	9.0;6.2
5	CH ₂	33.61	Ha 3.557 Hb 3.457	dd dd	14.8; 9.0 14.8; 6.2
6	C	132.08			
7	C	133.10			
8	CH	130.74	7.061	d	7.8
9	CH	128.60	6.982	d	7.8
10	C	135.98			
11	CH	130.13	6.919	s	
12	CH ₃	20.85	2.269	s	
13	CH ₃	18.76	2.308	s	

Tablelle di assegnazione in D₂O a T=300K

R	Tipo	MONOMERO-ESTERE				MONOMERO-ENOLO				AGGREGATO			
		¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)
1	CH ₃	13,30	1,225	t	7,1	13,11	1,213	t	7,1	13,30	0,808	t	7,0
2	CH ₂	64,53	4,276	q	7,1	61,46	4,173	q	7,1	62,86	3,841	q	7,0
3	CO	166,26				165,84 (COH)				160,15			
4	CH	88,89	5,813	dd	8,8, 6,7	118,05 (C)				85,12	5,185	dd	5,7;6,2
5	CH ₂	35,82	a 3,595	dd dd	14,5, 8,8 14,5, 6,7	63,07	3,966	s		35,83	3,207 3,156	dd dd	14,7;6,2 14,7;5,7
6	C	134,39				135,79				133,40			
7	CH	129,20	7,318	d	7,7	127,72	7,243	d	7,7	128,83	6,921	d	7,7
8	CH	129,20	7,390	dd	7,7;7,0	127,72	7,343	dd	7,7;7,0	128,83	6,972	dd	7,7;7,0
9	CH	128,10	7,327	dd	7,7;7,0	126,28	7,250	dd	7,7;7,0	127,37	6,928	dd	7,7;7,0
10	CH	129,20	7,390	dd	7,7;7,0	127,72	7,343	dd	7,7;7,0	128,83	6,972	dd	7,7;7,0
11	CH	129,20	7,318	d	7,7	127,72	7,243	d	7,7	128,83	6,921	d	7,7

RCH ₃	Tipo	MONOMERO-ESTERE				MONOMEROENOLO				AGGREGATO			
		¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)
1	CH ₃	12,63	1,224	t	7,2		1,212	t	7,2	13,43	0,855	t	7,2
2	CH ₂	64,45	4,271	q	7,2	61,42	4,167	q	7,2	62,43	3,872	q	7,2
3	CO												
4	CH	89,02	5,770	dd	6,9;6,7					89,02	5,175	m	
5	CH ₂	35,35	3,545 3,509	dd dd	14,5 6,7	62,64	3,917	s		35,59	3,202 3,155	dd dd	14,5 9,7
6	C												
7	CH	129,14	7,206	bd	8,5	127,62	7,141	bd	7,9	128,12	6,794	d	8,0
8	CH	128,29	7,226	bd	8,5	127,62	7,178	bd	7,9	128,23	6,820	d	8,0
9	C												
10	CH	128,29	7,226	bd	8,5	127,62	7,178	bd	7,9	128,23	6,820	d	8,0
11	CH	129,14	7,206	bd	8,5	127,62	7,141	bd	7,9	128,12	6,794	d	8,0
12	CH ₃	20,26	2,301	s		20,00	2,286	s		20,26	1,947	s	

		MONOMERO-ESTERE				MONOMERO-ENOLO				AGGREGATO			
ROCH ₃	Tipo	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)
1	CH ₃	12,91	1,220	t	7,1	12,91	1,215	t	7,1		0,886	t	7,0
2	CH ₂	64,34	4,269	q	7,1	61,42	4,174	q	7,1	62,61	3,908	m	
3	CO												
4	CH	88,92	5,759	dd	6,7					88,92	5,220	m	
5	CH ₂	34,96	3,523	m		62,70	3,902	s		35,20	3,187	m	
6	C												
7	CH	114,22	6,980	d	8,7	114,22	6,947	d	8,7	113,96	6,571	d	7,9
8	CH	130,22	7,268	d	8,8	129,17	7,202	d	8,8	129,96	6,868	d	7,9
9	C												
10	CH	130,22	7,268	d	8,8	129,17	7,202	d	8,8	129,96	6,868	d	7,9
11	CH	114,22	6,980	d	8,7	114,22	6,947	d	8,7	113,96	6,571	d	7,9
12	CH ₃	55,54	3,817	s		55,77	3,810	s		54,63	3,373	s	

		MONOMERO-ESTERE				MONOMERO-ENOLO				AGGREGATO			
R(CH ₃) ₂	Tipo	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz) ^a	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz) ^a	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	m	J _{H-H} (Hz)
1	CH ₃	17,74	1,206	t	7,2	17,44	1,169	t	7,2	12,92	0,859	t	7,0
2	CH ₂	65,52	4,266	q	7,2	63,05	4,142	q	7,2	62,41	3,871	q	7,0
3	CO									163,72			
4	CH	89,42	5,760	dd	7,2;8,9					87,64	5,162	m	
5	CH ₂	34,61	Ha 3,607	dd dd	14,5;8,9 14,5;7,2	62,10	3,871	s		32,84	Ha 3,228	d d	14,5 14,5
6	C									134,97			
7	C									131,92			
8	CH	131,89	7,170	d	7,5	130,82	7,094	bd	7,9	129,37	6,734	m	
9	CH	131,60	7,126	d	7,5	129,61	7,039	m		127,83	6,669	m	
10	C									132,81			
11	CH	130,18	7,102	s		131,17	7,034	s		130,22	6,667	s	
12	CH ₃	19,31	2,300	s		19,59	2,239	s		17,58	1,941	s	
13	CH ₃	19,31	2,300	s		21,80	2,255	s		19,90	1,962	s	

Riferimenti bibliografici

1. a) Díez-Barra, E.; de la Hoz, A.; Moreno, A. *Synth. Comm.* **1994**, 24, 1817-1821; b) Zen, S.; Kaji, E. *Bull. Chem. Soc. Jp.* **1970**, 43, 2277-2278 e **1973**, 46, 337-338; c) Niyazymbetov, M. E.; Evans, D. H. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 779-783.
2. Kislyi, V. V.; Samet, A. V.; Semenov, V. V. *Curr. Org. Chem.* **2001**, 5, 553-570.
3. a) Duthaler, R. O. *Tetrahedron* **1994**, 50, 1539-1548; b) Williams, R. M. *Synthesis of Optically Active α -Amino Acids*; Pergamon Press: Oxford, **1989**.
4. a) Alvarez-Ibarra, C.; Csáky, A. G.; Gómez de la Oliva, C. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3544-3547; b) Tsukamoto, T.; Kitazume, T.; McGuire, J. J.; Coward, J. K. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 66-72; c) Hollinshead, S. P.; Trudell, M. L.; Skolnick, P.; Cook, J. M. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1062-1069.

Capitolo 5: L'effetto NOE e l'esperimento 2D-NOESY

5.1 L'effetto NOE ¹

L'effetto nucleare Overhauser (NOE) si definisce come la perturbazione dell'intensità di una data riga di risonanza qualora se ne irradi un'altra accoppiata dipolarmente ad essa.²

Un prerequisito per avere quest'effetto è che il rilassamento spin-reticolo dei nuclei sia dominato dall'accoppiamento dipolare; ci deve essere in pratica, un apprezzabile *cross-relaxation*.

L'effetto NOE è largamente impiegato per due scopi principali: l'aumento dei segnali di nuclei a bassa sensibilità come il ¹³C e lo studio del meccanismo dipolare per il rilassamento spin-reticolo allo scopo di ottenere informazioni sulle distanze internucleari.³

Il meccanismo con cui avviene la variazione di intensità, può essere compreso considerando un sistema di spin IS (con I e S, entrambi nuclei a spin 1/2) e assumendo inizialmente che il rilassamento sia interamente di origine dipolare. Questo sistema a quattro livelli è illustrato in figura 5.1. Si vede facilmente che le intensità dello spin S non sono influenzate dalla saturazione delle risonanze dello spin I, a condizione che entrambe le transizioni I siano ugualmente perturbate.

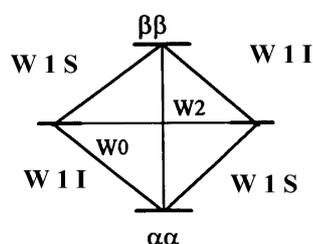


Figura 5.1: Diagramma dei livelli energetici di I ed S

L'effetto Overhauser è generato solo se, effetti di *cross-relaxation* entrano in gioco per ristabilire l'equilibrio.

Il risultato è una distribuzione di tipo stazionario, che riflette la competizione tra l'effetto perturbativo del secondo campo a radiofrequenze B_1 e le diverse vie di rilassamento.

Il rilassamento opera attraverso le probabilità di transizione a singolo quanto W_I (in cui si inverte il solo spin I) e W_S (in cui si inverte il solo spin S), la probabilità di transizione a zero-quantum W_0 (in cui I e S si invertono in senso opposto) e la probabilità W_2 (in cui I e S invertono nello stesso senso). I termini di *cross-relaxation* W_2 e W_0 sono importanti solo nel meccanismo dipolo-dipolo. Nella situazione pratica le popolazioni di spin sono perturbate

simmetricamente: entrambe le transizioni I sono totalmente saturate ed entrambe le transizioni S sono ugualmente influenzate. Le deviazioni delle popolazioni di spin dall'equilibrio di Boltzmann possono essere rappresentate da due numeri, a e b , definiti come:

$$2a = S_z - S_0 \qquad 2b = I_z - I_0 \qquad (5.1)$$

dove I_0 e S_0 sono le rispettive intensità all'equilibrio di Boltzmann e sono legate dalla relazione:

$$I_0 / S_0 = \gamma_I / \gamma_S \qquad (5.2)$$

Quando la popolazione di spin di ogni livello devia dall'equilibrio, c'è un conseguente flusso di spin nella direzione che porta verso l'equilibrio e questo flusso è proporzionale alle relative differenze di popolazione e alle probabilità delle transizioni che operano nel rilassamento:

$$\frac{dn_1}{dt} = 2aW_s + 2bW_I + 2(a+b)W_2 \qquad (5.3)$$

$$\frac{dn_2}{dt} = -2aW_s + 2bW_I - 2(a-b)W_0 \qquad (5.4)$$

di conseguenza:

$$\frac{d(n_1 - n_2)}{dt} = 2a(2W_s + W_2 + W_0) + 2b(W_2 - W_0) \qquad (5.5)$$

In condizioni di stato stazionario questa derivata deve essere zero e quindi risulta come espressione generale:

$$a/b = (W_2 - W_0)/(2W_s + W_2 + W_0) \qquad (5.6)$$

La condizione che gli spin I siano saturati, $I_z=0$, può essere ora inserita, dando l'espressione $2b = -I_0$. Riconsiderando l'equazione (5.2) si ha:

$$\eta = \frac{S_z - S_0}{S_0} = \frac{W_2 - W_0}{(2W_s + W_2 + W_0)} \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \qquad (5.7)$$

Il parametro η è chiamato fattore di guadagno nucleare Overhauser. È più utile calcolare il rapporto secondo cui l'intensità del segnale S è variata, dato da:

$$S_z / S_0 = 1 + \eta \qquad (5.8)$$

E' noto che per un rilassamento puramente dipolare, il peso relativo delle varie probabilità di rilassamento è dato da:

$$W_2 : W_s : W_0 = 12 : 3 : 2 \qquad (5.9)$$

Da questo rapporto deriva l'espressione semplificata:

$$1 + \eta = 1 + 0.5 \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \qquad (5.10)$$

Questa relazione ha una particolare importanza nel caso degli spettri del ^{13}C ; in questo caso, infatti, gli spettri sono registrati irradiando a banda larga sulla frequenza del protone, questo comporta un guadagno di tipo NOE per i segnali dei ^{13}C legati ad almeno un ^1H , che può essere stimato proprio grazie all'equazione (5.10).

Quando l'interazione dipolo-dipolo è solo uno dei molti e differenti meccanismi di rilassamento in competizione, non si osserva il pieno guadagno nucleare Overhauser. L'equazione (5.7) deve essere modificata per considerare un'altra probabilità di transizione a singolo-quanto W_s^* , che funziona come una via di "dispersione" e attenua il guadagno nucleare Overhauser.

$$\eta = \frac{S_z - S_0}{S_0} = \frac{W_2 - W_0}{(2W_s^* + 2W_s + W_2 + W_0)} \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \quad (5.11)$$

Nel caso limite in cui $2W_2^* \gg (W_2 - W_0)$, il fattore di guadagno va a zero.

Un'applicazione completamente differente dell'effetto nucleare Overhauser consiste nella determinazione delle distanze internucleari, solitamente interprotoniche.

Le probabilità di transizione di *cross-relaxation* sono correlate alla distanza internucleare r_{IS} attraverso l'espressione:

$$W_2 - W_0 = 0.5 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2}{\hbar^2 \tau_c r_{IS}^6} \quad (5.12)$$

dove τ_c è il tempo di correlazione necessario per una riorientazione molecolare. Questa espressione permette di ottenere una accurata determinazione della distanza r_{IS} . Il problema è che il termine W_2^* , presente nell'equazione (5.11), non è conosciuto.

Distanze internucleari relative possono però essere misurate se due guadagni nucleari Overhauser sono determinati per lo stesso spin osservato S, mentre si satura prima un vicino I, poi un altro vicino R. Questo è possibile perché il fattore W_2^* rimane costante, e se il sistema di spin I-S-R si trova su una parte rigida della molecola, il tempo di correlazione τ_c è lo stesso. Quindi, stabilito che non ci sia NOE tra I e R, il rapporto degli effetti Overhauser è dato da

$$\frac{\eta_S(I)}{\eta_S(R)} = \left(\frac{r_{SR}}{r_{IS}} \right)^6 \quad (5.13)$$

In molti casi pratici la situazione è complicata dalla presenza di altri spin interagenti ed è preferibile utilizzare un'espressione più generale, anche se il principio rimane lo stesso.¹

La trattazione esposta precedentemente presuppone la condizione che la riorientazione molecolare sia veloce se paragonata alla frequenza di precessione di Larmor, ciò dipende dalla mobilità della molecola e in particolare dalla sua velocità di tumbling.

Molecole piccole (<1000 Da) in soluzione, in condizioni standard, si muovono rapidamente e producono un NOE negativo sulle risonanze protoniche, al contrario, macromolecole e aggregati molecolari (>3000 Da) si muovono lentamente in soluzione e producono un NOE positivo; molecole di medio peso molecolare (1000-3000 Da) che hanno una velocità di tumbling "intermedia" possono manifestare un NOE che va da valori positivi a valori negativi e generalmente piccoli.

Un effetto spurio da tenere presente analizzando macromolecole o aggregati molecolari è la *spin-diffusion*, una specie di dispersione che si propaga attraverso la nube circostante di protoni.¹ Questo problema può essere ridotto tramite misure dell'effetto nucleare Overhauser *transiente*, prima che ci sia un'apprezzabile spin diffusione.

Il metodo basato sull'effetto NOE, pur presentando qualche difficoltà e limitazione, permette di ottenere utili informazioni, infatti, nel caso in cui non sia possibile definire con precisione la distanza internucleare, si è comunque in grado di stabilire se due nuclei si trovino o no sulla stessa parte della molecola e, in genere, a distanze inferiori a circa 5Å.

5.2 L'esperimento 2D-NOESY

L'esperimento 2D-NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) può essere considerato come la versione bidimensionale dell'esperimento "transient NOE".⁴ Il "transient NOE" induce il guadagno NOE applicando un impulso a 180° ad una delle risonanze: ne risulta un'inversione delle popolazioni dei livelli associati con lo spin S. La distribuzione di non-equilibrio non è mantenuta continuamente, come nello *steady-state* NOE, quindi il guadagno NOE del segnale di I raggiunge un massimo e poi diminuisce.

La sequenza utilizzata nell'esperimento⁵ 2D-NOESY è riportata in maniera schematica in figura 5.2:

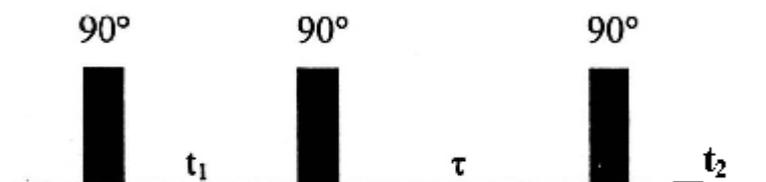


Figura 5.2: Sequenza di impulsi per l'esperimento 2D-NOESY

Si può vedere che la sequenza consiste essenzialmente di tre impulsi a radiofrequenze di 90° ciascuno e di tre tempi indicati come t_1 o tempo d'evoluzione, τ o *mixing time* e t_2 o tempo di acquisizione. Il primo impulso a 90_x^0 porta la magnetizzazione sul piano xy . Gli spin cominciano, quindi, a precedere, durante il tempo di evoluzione t_1 , nel sistema di riferimento del laboratorio, alla frequenza di Larmor caratteristica, in completa analogia con un classico esperimento NMR monodimensionale.⁶ Il tempo di evoluzione t_1 non è un parametro fisso all'interno di uno stesso esperimento ma è progressivamente variato, così da creare una modulazione della ampiezza della magnetizzazione che, dopo trasformata di Fourier nelle due direzioni, genera i caratteristici spettri 2D. Il secondo impulso a 90_x^0 ruota i vettori di magnetizzazione così che si abbia una componente lungo l'asse z .

Durante il seguente periodo di mescolamento τ le componenti della magnetizzazione lungo l'asse z scambiano sotto l'influenza della *cross-relaxation*. Le componenti trasversali non sono necessarie e possono essere eliminate tramite il *phase-cycling* o l'uso dei gradienti di campo pulsato (v. capitolo seguente). Infine, il terzo impulso a 90_x^0 crea nuovamente una magnetizzazione osservabile, portando sul piano xy le componenti prima presenti sull'asse z . Quindi il vettore di magnetizzazione I , di un sistema di spin IS , precederà con la sua caratteristica frequenza di Larmor ω_I durante t_1 . Durante il mixing time τ , parte di questa magnetizzazione è trasferita allo spin S , ad una velocità determinata dalla *cross-relaxation* tra i due spin. La magnetizzazione trasferita precede, poi, durante t_2 alla frequenza di Larmor dello spin S , ω_S . La parte di magnetizzazione, che non era stata ruotata sull'asse z dal secondo impulso a 90_x^0 , continua invece a precedere durante t_2 alla frequenza ω_I . La discussione precedente vale in maniera analoga e simmetrica per lo spin S .

Dopo una doppia trasformata di Fourier rispetto a t_1 e t_2 si ottiene uno spettro bidimensionale del tipo mostrato in figura 5.3.

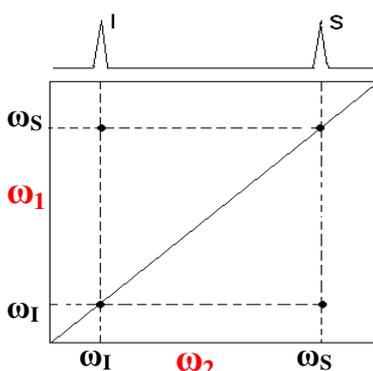


Figura 5.3: Rappresentazione schematica di uno spettro 2D-NOESY.

Si osservano picchi diagonali generati dalla magnetizzazione che non è migrata durante τ e *crosspeaks* generati dal trasferimento di magnetizzazione tra i due spin I e S. Questo trasferimento è dovuto all'effetto nucleare Overhauser. Poiché questo processo dipende anche dalla distanza tra i nuclei, i *crosspeaks* correlano risonanze che sono accoppiate attraverso lo spazio e la loro intensità è inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza tra i nuclei interagenti. A parità di mixing time i contatti NOE tra nuclei vicini nello spazio saranno dunque più intensi dei contatti NOE tra nuclei lontani.

Rispetto alla mobilità delle molecole la mappa bidimensionale mostrerà: NOE negativi (tumbling veloce) che avranno la fase opposta ai picchi sulla diagonale, mentre NOE positivi (tumbling lento) avranno la stessa fase dei picchi sulla diagonale.

E' da notare però che anche i trasferimenti di saturazione dovuti a fenomeni di scambio chimico o conformazionale hanno la stessa fase dei picchi sulla diagonale e possono essere confusi con i NOE positivi.

5.3 *Il fenomeno della spin-diffusione e scelta del mixing-time*

Da quanto visto fin qui risulta che uno dei parametri più importanti per un esperimento NOESY è il tempo di mescolamento o *mixing-time*. Questo è un tempo d'attesa che non viene variato durante l'esperimento. Poiché il trasferimento di magnetizzazione tra nuclei interagenti avviene proprio durante τ , la scelta di questo parametro risulta fondamentale ai fini della riuscita dell'esperimento NOESY. Generalmente, i valori di τ sono dell'ordine delle centinaia di millisecondi e nella scelta si tiene conto delle dimensioni della molecola in studio; solitamente, più la molecola è piccola più τ è grande.

Nel caso di complessi π - π e di micelle, la scelta del mixing time è particolarmente critica. Come indicato in precedenti lavori,⁷ per questi sistemi l'utilizzo di valori di τ anche relativamente brevi (50–100 ms) può comportare la presenza nello spettro di picchi di correlazione dovuti a forte *spin-diffusione*.

La presenza di questo tipo di picchi può portare ad interpretazioni errate, introducendo nello spettro contatti non reali. D'altra parte, il fenomeno della spin diffusione, o più semplicemente, del trasferimento di magnetizzazione da uno spin all'altro è osservabile solamente in regime di tumbling lento o di scambio chimico,⁸ ciò significa che la presenza di spin diffusione in uno spettro NOE registrato su soluzioni di normale viscosità è indicativa della presenza di grandi sistemi molecolari⁴ come, macromolecole, liposomi⁹ o aggregati ordinati.^{7a}

5.4 *Esperimenti 2D NOESY condotti sulle Cloroacetammidi*

Per confermare la presenza di complessi ad alto peso molecolare in soluzione, sono stati condotti esperimenti 2D NOESY sulle tre cloroacetammidi (Metolachlor, Acetochlor, Pretilachlor) utilizzando tempi di contatto molto diversi (10-400ms). Prima e dopo ogni esperimento 2D è stato registrato lo spettro ^1H per accertarsi che il campione non vari durante l'esperimento. Per tutti e tre i campioni è stato osservato un comportamento analogo, in particolare, sugli spettri NOESY a differenti tempi di contatto da 10ms a 400ms i crosspeaks NOE del monomero sono negativi, mentre i crosspeaks relativi all'aggregato appaiono tutti positivi e mostrano una marcata spin diffusione. La figura 6.4 mostra uno degli spettri 2D NOESY ottenuti ad un tempo di contatto di 400ms:

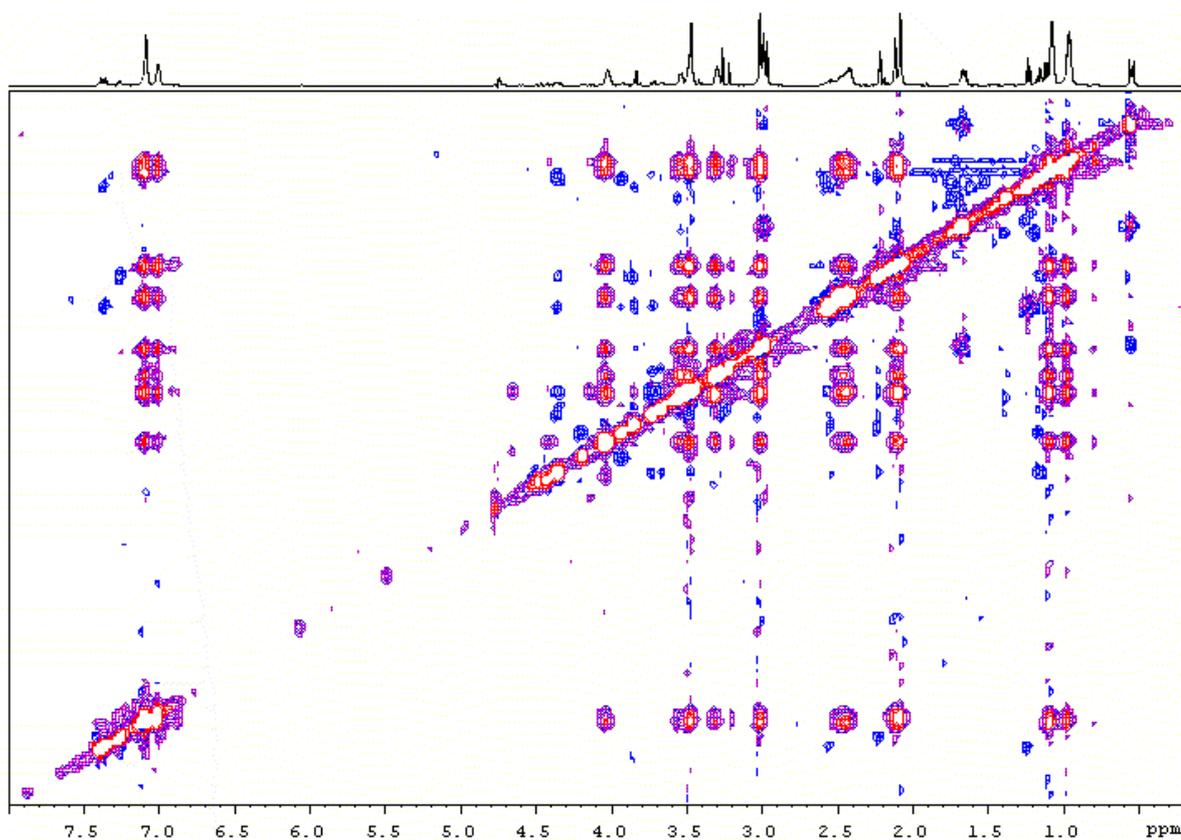


Figura 5.4: 2D NOESY ad un tempo di contatto di 400ms di un campione di Metolachlor ($4.7 \times 10^{-2}\text{M}$) in una soluzione 0.22mM di DSA in D_2O . I crosspeaks negativi del monomero appaiono in blu; i crosspeaks dell'aggregato appaiono in rosso. Questo spettro non dà alcuna informazione.

Diminuendo il tempo di contatto a 100ms è ancora visibile spin diffusione sui crosspeaks dell'aggregato. Solo con un tempo di contatto di 10ms non è più presente spin diffusione e si

osserva per l'aggregato una serie di crosspeaks NOE positivi, intensi e ben definiti; i contatti NOE del monomero, chiaramente, non sono più visibili (figura 5.5).

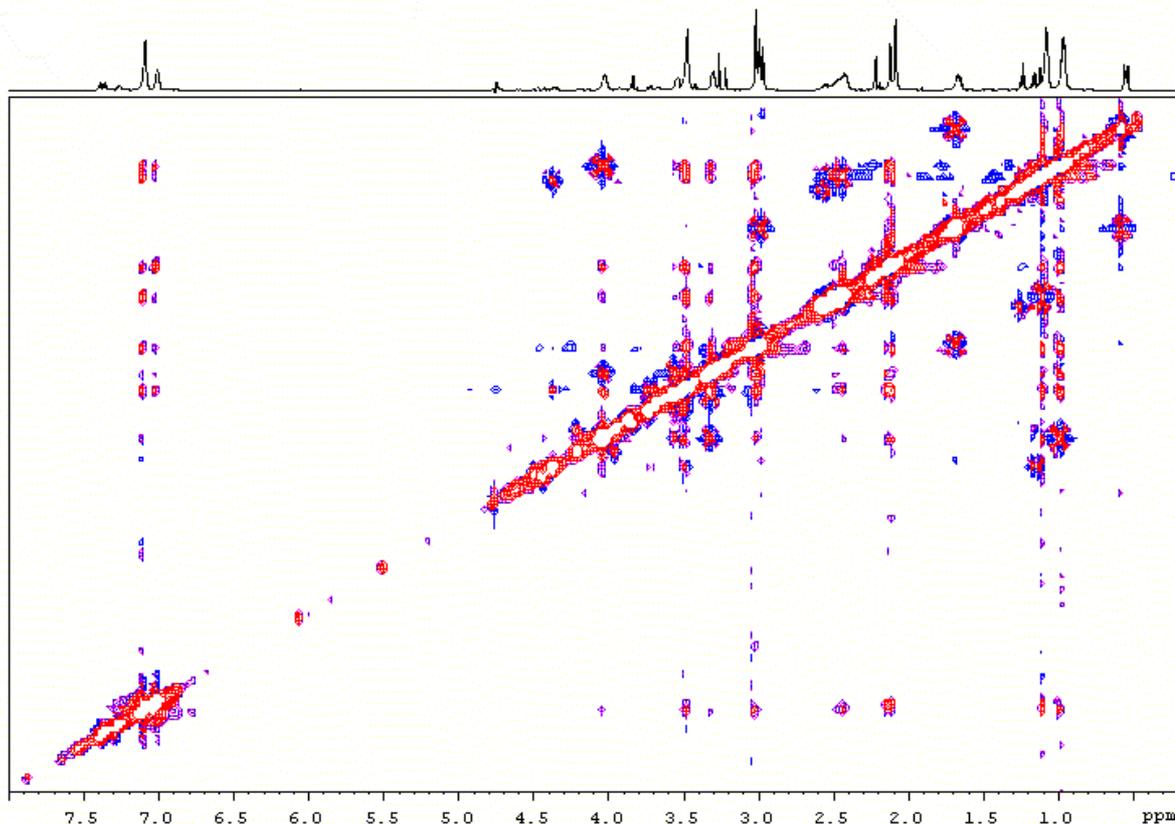


Figura 5.5: 2D NOESY ad un tempo di contatto di 10ms di un campione di Metolachlor ($4.7 \times 10^{-2} \text{M}$) in una soluzione 0.22mM di DSA in D_2O .

5.5 *Esperimenti 2D NOESY condotti sui 3-fenil-2-nitropropanoati di etile*

Gli esperimenti 2D NOESY a diversi tempi di contatto (10-400ms) eseguiti sui 3-fenil-2-nitropropanoati di etile hanno condotto ai seguenti risultati:

- i contatti NOE relativi alla specie monomerică appaiono tutti negativi;
- i contatti NOE relativi all' aggregato appaiono in parte positivi e in parte negativi.

Tale risultato, diverso da quello ottenuto nel caso delle cloroacetammidi, può essere spiegato considerando che gli aggregati dei nitropropanoati possono assumere diverse conformazioni in equilibrio tra loro, infatti, come mostrato precedentemente nel paragrafo 4.3, rispetto alla scala dei tempi NMR l'equilibrio tra il monomero e l'aggregato è estremamente lento, mentre l'equilibrio tra le diverse conformazioni dell'aggregato è sufficientemente lento¹⁰ da permettere di osservare le diverse specie presenti; ciò si traduce nello spettro 2D NOESY in contatti NOE, generalmente molto piccoli, positivi o negativi a seconda della maggiore o minore mobilità della conformazione in cui si trova l'aggregato.

Gli esperimenti 2D NOESY mostrano, per entrambe le classi di composti studiate, la presenza di aggregati ordinati ad elevato peso molecolare. In particolare, i risultati ottenuti per i nitropropanoati confermano la presenza di equilibri complessi tra più specie aggregate, al contrario, le cloroacetammidi mostrano contatti NOE coerenti: negativi per la specie monomerică e positivi per l'aggregato con evidenti effetti di spin diffusione entro un ampio intervallo di tempi di contatto (20-400ms).

Riferimenti bibliografici

1. Freeman, R. *A handbook of Nuclear Magnetic Resonance* **1988**, Langman Scientific & Technical, New York (USA).
2. Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, 71 4546-4553.
3. Noggle, J. H.; Schirmer, R. E. *The Nuclear Overhauser Effect, chemical applications* **1971**, Academic Press, New York (USA).
4. Sanders, J. K. M.; Hunter, B. K. *Modern NMR Spectroscopy* **1993**, Oxford University Press.
5. Braun, S.; Kalinowski, H. O.; Berger, S. *150 and More Basic NMR Experiments. A practical course* **1998**, Wiley-VCH.
6. Homans, S. W. *A Dictionary of Concepts in NMR* **1989**, Oxford University Press.
7. a) Viel, S.; Mannina, L.; Segre, A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2515-2519; b) Zandomeneghi, G.; Luisi, P. L.; Mannina, L.; Segre, A.L. *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3710-3725.
8. Neuhaus, D.; Williamson, M. *The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis* **1989** VCH Publishers: New York.
9. Bonaccio, S.; Capitani, D.; Segre, A. L.; Walde, P.; Luisi, P. L. *Langmuir* **1997**, 13, 1952-1956.
10. Pople, J. A.; Schneider, W. G.; Bernstein, H. J. *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance* **1959**, McGrawHill Book Company, p. 218-230.

Capitolo 6: Studi di diffusione mediante NMR

6.1 Introduzione

Questo capitolo ha un duplice scopo: introdurre le basi teoriche della diffusione (*self-diffusion*) e spiegare come la Risonanza Magnetica Nucleare a gradienti di campo pulsato (Pulsed Field Gradient PFG) possa essere utilizzata per le misure di diffusione.

La descrizione sarà limitata alla diffusione isotropa in un mezzo omogeneo anche se alcune conclusioni possono essere generalizzate al caso di diffusione anisotropa. Poiché le dimostrazioni matematiche legate alla diffusione sono piuttosto complesse ed esulano dallo scopo di questa tesi, verranno enunciati i principali risultati omettendone le dimostrazioni. Per una trattazione completa dell'argomento si rimanda ad eccellenti testi presenti in letteratura.^{1,2} Il libro di Callaghan³ in particolare nei capitoli 6 e 7 descrive in dettaglio come si possa studiare la diffusione usando metodi NMR.

6.2 Diffusione

Allo stato liquido la diffusione è definita come il moto traslazionale casuale di molecole o ioni derivante dall'energia termica molecolare in condizioni di equilibrio termodinamico. Come tale, differisce dalla mutua diffusione e dalla convezione, che sono dovute, rispettivamente, ai gradienti di concentrazione e di temperatura; tali forme di trasporto non verranno ulteriormente approfondite; per una descrizione completa si rimanda a testi specifici.^{1,2,4}

Nel 1828 Brown definì la diffusione come lo spostamento netto delle molecole nel tempo dovuto agli urti casuali tra le stesse. La diffusione traslazionale, da non confondersi con la spin diffusione né con la diffusione rotazionale, è la principale forma di trasporto. Come verrà spiegato in seguito, il moto traslazionale di una molecola in soluzione può essere descritto mediante un cammino casuale a tre dimensioni.

Nel caso di diffusione in tre dimensioni in un mezzo isotropo non delimitato, Einstein mostrò che lo spostamento medio di una molecola che diffonde in un tempo t è dato da:

$$\bar{s} = \sqrt{6Dt} \quad (6.1)$$

dove D è il coefficiente di diffusione della molecola ed il fattore 6 è legato ai tre gradi di libertà associati alla diffusione in tre dimensioni. Il coefficiente di diffusione traslazionale per particelle non cariche a diluizione infinita è legato alla viscosità del mezzo mediante l'equazione di Einstein-Smoluchowski:

$$D = \frac{kT}{f} \quad (6.2)$$

dove k è la costante di Boltzmann, T è la temperatura assoluta ed f è un fattore di frizione idrodinamica. Per una sfera che si muove in un flusso laminare, il fattore di frizione f è dato dall'equazione di Stokes:

$$f = 6\pi\eta R_H \quad (6.3)$$

dove η rappresenta la viscosità del mezzo ed R_H il raggio idrodinamico. Il raggio idrodinamico di una molecola può essere messo in relazione al suo volume specifico parziale \bar{v} e al peso molecolare M secondo l'equazione:

$$R_H = \sqrt[3]{\frac{3M\bar{v}}{4\pi N}} \quad (6.4)$$

dove N è il numero di Avogadro. Il volume specifico parziale può essere determinato sperimentalmente, e k può essere espressa come:

$$k = \frac{R}{N} \quad (6.5)$$

dove R è la costante dei gas.

Dalla combinazione delle equazioni (6.2), (6.3), (6.4) e (6.5) si ha che:

$$D = \frac{RT}{2^{1/3} (3\pi)^{4/3} \eta N^{2/3} (\bar{v}M)^{1/3}} \quad (6.6)$$

dove si vede che il rapporto tra i coefficienti di diffusione di due particelle sferiche che diffondono nello stesso mezzo dipende dal rapporto dei loro pesi molecolari:

$$\frac{D_1}{D_2} = \sqrt[3]{\frac{M_2}{M_1}} \quad (6.7)$$

È da notare che questa analisi⁵ è valida solo nel caso di particelle sferiche in soluzione diluita, altrimenti l'equazione (6.3) deve essere modificata e il fattore di frizione f deve essere corretto per tenere conto della forma della particella e dell'effetto della concentrazione.^{4,6}

6.3 Studi di diffusione

Le principali tecniche che possono essere utilizzate per lo studio dei moti diffusionali sono: il Light Scattering, i traccianti radioattivi, il Neutron Scattering e le tecniche NMR di rilassamento e a gradienti di campo pulsato applicato allo Spin Echo (Pulsed Gradient Spin Echo PGSE). Queste tecniche differiscono significativamente in sensibilità⁷ e operano su scale di tempi molto diverse. La tecnica del Light Scattering verrà trattata in dettaglio nel prossimo capitolo, di seguito verrà brevemente descritto l'utilizzo dei traccianti radioattivi,

del Neutron Scattering e dell'analisi dei tempi di rilassamento via NMR. La tecnica PGSE verrà ampiamente descritta nel paragrafo 6.4.

6.3.1 I traccianti radioattivi

Questa tecnica è stata utilizzata per determinare i coefficienti di diffusione prima dell'avvento del PFG NMR. La tecnica dei traccianti radioattivi richiede una distribuzione macroscopica dell'ordine dei millimetri e per questo può essere applicata solo a molecole sottoposte a diffusione rapida. Inoltre, questa tecnica ha molti limiti: le molecole marcate con isotopi radioattivi (traccianti) devono essere preparate e questo richiede tempo e competenze; il coefficiente di diffusione del tracciante potrebbe non corrispondere a quello della specie chimica principale a meno che la sua concentrazione non sia molto bassa; il campione viene contaminato e sono possibili effetti isotopici.⁸

6.3.2 Neutron Scattering

Questa tecnica è sensibile alla correlazione tra le posizioni dei nuclei in un intervallo di pochi nanometri ed è particolarmente efficace poiché misura direttamente la funzione di correlazione di Van Hove.⁹ Questa funzione determina la natura dello scattering anelastico che si manifesta quando, raggi X, luce o neutroni colpiscono un insieme di particelle in movimento. In particolare, la funzione di Van Hove descrive la probabilità $P(\vec{r}_0|\vec{r},t)$ di trovare un centro di scattering in posizione \vec{r} al tempo t dato un eventuale centro di scattering in \vec{r}_0 al tempo $t = 0$. Quando si utilizzano neutroni polarizzati, dalla separazione tra le sezioni di scattering polarizzato e non polarizzato si ricavano due probabilità, $P(\vec{r}_0|\vec{r},t)$ e $P_s(\vec{r}_0|\vec{r},t)$ dove l'ultimo termine è una funzione di autocorrelazione che rappresenta la probabilità che uno stesso centro di scattering posizionato in \vec{r}_0 al tempo $t = 0$ sia posizionato in \vec{r} al tempo t .¹⁰ Questa tecnica è un valido strumento per lo studio delle correlazioni tra coppie di nuclei e delle distribuzioni molecolari su scala microscopica.

6.3.3 Studi di diffusione mediante tecniche NMR

Esistono principalmente due modi per determinare i coefficienti di diffusione via NMR: l'analisi dei tempi di rilassamento (metodo indiretto) e l'NMR a gradienti di campo pulsato (metodo diretto). L'analisi del rilassamento nucleare e la tecnica PFG sono legate al moto molecolare su due scale di tempi molto differenti. Quindi, anche se il coefficiente di diffusione traslazionale può essere stimato in entrambi i casi, le due stime saranno in accordo solo a determinate condizioni.

Poiché il tempo di rilassamento degli spin nucleari dipende dal tempo di correlazione delle molecole e, di conseguenza, dai dettagli della diffusione molecolare, esso rappresenta, in

generale, un valido metodo di studio del moto molecolare in un liquido e, in particolare, della diffusione. Il rilassamento è sensibile alla diffusione rotazionale, mentre la tecnica PFG è sensibile alla diffusione traslazionale. Il primo metodo dà informazioni su una scala di tempi che va dai micro ai nanosecondi, che è l'ordine di grandezza del tempo di correlazione del nucleo, mentre la tecnica PFG opera su scale di tempi che vanno dai millisecondi ai secondi. Sia la traslazione che la rotazione delle molecole possono influenzare l'intensità e la direzione del vettore internucleare per nuclei di differenti molecole in un liquido e ciò causa delle fluttuazioni nelle energie di interazione tra diversi dipoli magnetici. Queste fluttuazioni portano ad un rilassamento spin-reticolo di tipo dipolo-dipolo. I tempi di rilassamento NMR possono essere utilizzati per stimare la diffusione rotazionale mediante opportune equazioni. Comunque, potrebbero sorgere diverse complicazioni a causa dei contributi di altri meccanismi di rilassamento, ad esempio: la rotazione degli spin, l'accoppiamento scalare in T_1 , l'impossibilità di separare il contributo traslazionale da quello rotazionale in T_1 e possibili contributi in T_1 di impurezze paramagnetiche in tracce. Inoltre, nel caso di molecole grandi, la presenza di molteplici tempi di correlazione come quelli dovuti a moti segmentali, rende difficile l'interpretazione dei dati di rilassamento.

Tipicamente, vengono analizzati i dati di rilassamento per determinare τ_c , il tempo di correlazione rotazionale di una *probe* (sonda). τ_c può essere così correlato alla viscosità della soluzione e, quindi, al coefficiente di diffusione traslazionale mediante l'equazione di Debye:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta R_H^3}{3kT} \quad (6.8)$$

dove R_H è il raggio idrodinamico introdotto precedentemente. Riarrangiando le equazioni (6.2), (6.3) e (6.8), si ottiene il coefficiente di diffusione traslazionale, D . È necessario comunque tenere conto di un certo numero di supposizioni: bisogna conoscere il meccanismo di rilassamento della *probe* ed essere in grado di discriminare tra i contributi intra ed inter molecolari al rilassamento, inoltre, è necessario che la *probe* stessa, sia sferica se si vuole caratterizzare la sua dinamica di rotazione mediante un unico tempo di correlazione. Quest'ultima supposizione è legata all'equazione di Debye che resta valida solo se la *probe* percepisce la soluzione come un continuo e ciò non è necessariamente vero e dipende dalle dimensioni della *probe* rispetto alle molecole della soluzione.

Da quanto detto, si comprende come lo studio dei tempi di rilassamento può essere utilizzato per determinare il coefficiente di diffusione di una molecola solamente in casi specifici, in contrasto con la tecnica PFG-NMR che stima il coefficiente di diffusione in modo diretto.

Un altro approccio alle misure di diffusione mediante l'analisi dei tempi di rilassamento si basa sullo studio di nuclei quadrupolari, cioè nuclei che hanno numero quantico di spin $I > 1/2$. Quando tali nuclei sono covalentemente legati alla molecola, l'interazione nucleare di quadrupolo solitamente supera di gran lunga tutte le altre e, poiché è un'interazione intramolecolare, solo il contributo rotazionale su T_1 è importante. Una trattazione completa del moto isotropo ed anisotropo viene data da Huntress.^{11,12}

6.4 La tecnica PGSE

6.4.1 Osservazioni preliminari

Uno dei metodi più utili per lo studio della diffusione è l'NMR a gradienti di campo pulsato (PFG-NMR).^{13,14} Originariamente, come notato da Stilbs nella sua fondamentale rassegna sulla tecnica PGSE,¹⁵ tale metodo era esclusivamente utilizzato nel dominio dei tempi. Lo sviluppo della spettroscopia NMR in trasformata di Fourier¹⁶ (FT NMR) e i primi lavori di Vold e collaboratori¹⁷ e di James and McDonald¹⁸ contribuirono all'avvento della versione della tecnica PGSE nel dominio delle frequenze. L'insieme delle applicazioni analitiche di questa nuova versione furono dimostrate da Stilbs e Moseley.¹⁹ Attualmente la tecnica PGSE è utilizzata per lo più nel dominio delle frequenze, la cosiddetta tecnica FT-PGSE alla quale si farà riferimento nei paragrafi seguenti.

In linea di principio, poiché un nucleo attivo all'NMR viene univocamente identificato dalla sua frequenza di Larmor, in NMR la sensibilità al moto è necessariamente correlata al moto dei nuclei. La scala dimensionale della tecnica PFG copre il divario tra la tecnica di Neutron Scattering polarizzato ed il dominio macroscopico. Infatti, PFG osserva distribuzioni molecolari comprese tra 0.1 μm e 100 μm .²⁰

Tabella 6.1 Intervallo di distribuzioni molecolari, tempi di misura e coefficienti di diffusione caratteristici delle tre principali tecniche utilizzate per le misure di diffusione

Tecnica	Intervallo		
	Tempi di misura	Distribuzioni molecolari	Coefficienti di diffusione
Traccianti radioattivi	Molto variabile ^[a]	$> 1000 \mu\text{m}^{[b]}$	$> 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} [b]$
Polarized neutron scattering ^[c]	$\approx 10 \text{ ns}^{[d]}$	$< 0.01 \mu\text{m}^{[d,e]}$	$> 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} [d]$
PFG-NMR	$1 \text{ ms} - 1000 \text{ ms}^{[a]}$	$0.1 - 100 \mu\text{m}^{[c,e]}$	$10^{-14} - 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} [a,b]$

^[a] Rif. 15; ^[b] Rif. 7; ^[c] Rif. 20; ^[d] I limiti indicati si riferiscono al Neutron Scattering convenzionale ma possono essere aumentati di due ordini di grandezza se si utilizza la tecnica Neutron Spin Echo. Vedi Rif. 3 e 14; ^[e] Rif. 14; ^[f] Rif. 3.

Su questa scala dimensionale è possibile osservare soluzioni di macromolecole, strutture mesofasiche di cristalli liquidi, emulsioni e aggregati biologici altamente dispersi.

6.4.2 *Principi*

La tecnica PGSE sonda il moto di una particella misurando il suo spostamento a due tempi distinti: $t = t_0$ e $t = t_0 + \Delta$, dove Δ è chiamato tempo di diffusione, in pratica, dà informazioni sullo spostamento delle particelle che avviene durante il periodo di tempo Δ lungo l'asse del gradiente. Questa informazione può essere correlata al coefficiente di diffusione. Comunque, è importante notare che questa tecnica non dà alcuna indicazione diretta del modo in cui la particella si muove nel passare dalla posizione iniziale a quella finale. In particolare, la tecnica PGSE è legata alla funzione di autocorrelazione $P_s(\vec{r}_0|\vec{r}, t)$ che rappresenta una probabilità condizionale che verifica l'equazione di diffusione.

Si consideri la probabilità $P_1(\vec{r}, t)$ di trovare una particella in posizione \vec{r} al tempo t , data da:

$$P_1(\vec{r}, t) = \int \rho(r_0) P(\vec{r}_0|\vec{r}, t) d\vec{r}_0 \quad (6.9)$$

dove, $\rho(r_0)$ è la densità della particella e, quindi, $\rho(r_0)P(\vec{r}_0|\vec{r}, t)$ è la probabilità che la particella parta da una posizione \vec{r}_0 ed arrivi ad \vec{r} in un tempo t . Integrando su \vec{r}_0 vengono prese in considerazione tutte le possibili posizioni iniziali. $P_1(\vec{r}, t)$ descrive la probabilità di trovare una particella in una certa posizione ad un certo tempo ed è quindi, assimilabile ad una concentrazione.

Dalla seconda legge della diffusione di Fick si ha che:

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \bar{\nabla}^2 \cdot c(\vec{r}, t) \quad (6.10)$$

dove $c(\vec{r}, t)$ è la concentrazione espressa in termini di numero di particelle per unità di volume e D è il coefficiente di diffusione. Tale legge può essere riscritta in termini di probabilità $P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t)$ con la condizione iniziale che:

$$P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t) = \delta_D(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (6.11)$$

dove, δ_D è la funzione delta di Dirac. Perciò $c(\vec{r}, t)$ può essere sostituito da $P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t)$ e la (6.10) diviene:

$$\frac{\partial P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t)}{\partial t} = D \bar{\nabla}^2 P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t) \quad (6.12)$$

$P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t)$ è detto *propagatore della diffusione*. Nel caso di diffusione in tre dimensioni in un mezzo isotropo ed omogeneo, la (6.12) può essere risolta utilizzando le seguenti condizioni al contorno:

$$\lim_{\vec{r} \rightarrow \infty} P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t) = 0 \quad (6.13)$$

e la soluzione è data da:

$$P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t) = (4\pi Dt)^{-3/2} \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}_0)^2}{4Dt}\right) \quad (6.14)$$

Questa relazione può essere letta come segue: in un sistema infinitamente grande, la funzione di distribuzione radiale degli spin rispetto ad un tempo di riferimento arbitrario è Gaussiana. È da notare che la (6.14) non dipende dalla posizione iniziale \vec{r}_0 ma solo dalla distribuzione netta, \vec{R} , denominata distribuzione dinamica e definita come:

$$\vec{R} = \vec{r} - \vec{r}_0 \quad (6.15)$$

La soluzione dell'equazione (6.12) diviene molto più complicata nel caso in cui la distribuzione delle particelle sia vincolata;³ in tal caso, $P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t)$ non sarà Gaussiana e dipenderà dalla geometria del mezzo.

Si consideri, ora, $\rho(\vec{r}_0)$, la probabilità che uno spin parta da una posizione \vec{r}_0 al tempo $t = 0$.

Per definizione si ha che:

$$\int \rho(\vec{r}_0) d\vec{r}_0 = 1 \quad (6.16)$$

Dunque, la distribuzione quadratica media è data da:

$$\langle (\vec{r} - \vec{r}_0)^2 \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} (\vec{r} - \vec{r}_0)^2 \rho(\vec{r}_0) P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t) d\vec{r}_0 d\vec{r} \quad (6.17)$$

utilizzando $P(\vec{r}_0 | \vec{r}, t)$ ricavata dall'equazione (6.14) e risolvendo la (6.17) in base Cartesiana, si ha:

$$\bar{s}^2 = \langle (\vec{r} - \vec{r}_0)^2 \rangle = nDt \quad (6.18)$$

dove \bar{s} è la posizione media, introdotta nella (6.1), n è uguale a 2, 4 o 6 per la diffusione a una, a due o a tre dimensioni, rispettivamente e D è il coefficiente di diffusione. Dalla (6.18) si vede che la distribuzione media varia linearmente col tempo, ciò non è valido nel caso di diffusione vincolata in cui la posizione delle molecole è condizionata dalla geometria del mezzo. Di conseguenza, in questo caso, il valore di D misurato, non è il vero coefficiente di diffusione ma è un *coefficiente di diffusione apparente*, D_{app} .

Si possono distinguere principalmente tre tipi di vincoli che influenzano il moto molecolare: il primo si ha quando, durante l'osservazione del suo moto, una molecola incontra delle barriere in diverse occasioni; nel secondo caso, durante il tempo in cui si misura la diffusione, la molecola può legarsi ad una molecola più grande, riducendo, quindi, il coefficiente di diffusione; terzo, la molecola ha un'elevata probabilità di incontrare altre molecole durante il tempo di osservazione. In tutti e tre i casi viene utilizzato il coefficiente di diffusione apparente.

6.4.3 Approccio macroscopico

Le misure di diffusione mediante NMR si basano sull'utilizzo dei gradienti di campo magnetico, tali gradienti, possono essere applicati lungo una delle tre coordinate cartesiane. Ovviamente, nel caso di diffusione isotropa i risultati saranno gli stessi. In questa trattazione, comunque, si assumerà che il campo magnetico statico sia allineato lungo l'asse z e si considererà il gradiente sulla componente z del campo magnetico esterno.

Matematicamente, queste assunzioni si traducono in:

$$\vec{B}_0 = B_0 \vec{e}_z \quad (6.19)$$

e

$$\vec{g} \equiv \nabla B_0 \equiv \frac{\partial B_0}{\partial x} \vec{e}_x + \frac{\partial B_0}{\partial y} \vec{e}_y + \frac{\partial B_0}{\partial z} \vec{e}_z = \frac{\partial B_0}{\partial z} \vec{e}_z \quad (6.20)$$

Una buona trattazione del problema si trova nel lavoro di Canet²¹ e nella monografia di Kimmich.²²

Il campo magnetico effettivo \vec{B}_{eff} sperimentato da uno spin nucleare posizionato in \vec{r} è dato da:

$$\vec{B}_{eff}(\vec{r}) = \vec{B}_0 + \vec{g} \cdot \vec{r} \quad (6.21)$$

È possibile semplificare la (6.21) considerando solo un unico gradiente costante lungo l'asse z, in questo modo si ha che:

$$\vec{g} = g\vec{e}_z \quad (6.22)$$

e il campo magnetico effettivo sperimentato da uno spin nucleare diviene funzione unicamente della sua componente z e sarà dato da:

$$\vec{B}_{eff}(\vec{z}) = \vec{B}_0 + \vec{g} \cdot \vec{z} = (B_0 + gz)\vec{e}_z \quad (6.23)$$

In maniera analoga, la frequenza di Larmor di uno spin nucleare sarà funzione unicamente della componente z:

$$\omega(z) = -n\gamma(B_0 + gz) \quad (6.24)$$

dove γ è il rapporto giromagnetico dello spin nucleare osservato (e. g. ^1H) ed n è l'ordine di coerenza quantica considerato. Chiaramente, la (6.24) è valida solamente nel tempo in cui è applicato l'impulso del gradiente. È importante notare che l'applicazione di un gradiente omogeneo di ampiezza nota su un campione, impone una marcatura spaziale sulla frequenza di Larmor dello spin nucleare rispetto alla direzione del gradiente stesso.

Verranno sottolineate ora, alcune differenze tra il metodo a gradiente statico rispetto e quello con gradienti ad impulsi. Come detto in precedenza, la dipendenza spaziale della frequenza di Larmor viene generata dalla presenza del campo magnetico a gradienti; in senso stretto, tale gradiente può essere sia continuo che ad impulsi. Storicamente, il metodo a gradiente statico fu il primo ad essere utilizzato ma vi sono diverse ragioni per le quali i gradienti ad impulsi di campo magnetico risultano più convenienti dei gradienti statici.²³ Price li ha recentemente riassunti come segue:²⁰

- Poiché durante l'acquisizione il gradiente non è applicato, la larghezza di linea non viene allargata dal gradiente stesso, cioè, la risoluzione spettrale viene preservata ed il metodo è adatto per la misura di coefficienti di diffusione di più di una specie simultaneamente;
- La potenza della radiofrequenza non deve essere aumentata per compensare l'allargamento di banda causato dal gradiente;
- L'utilizzo di gradienti più ampi consente di misurare coefficienti di diffusione più piccoli;
- Il periodo di tempo durante il quale viene misurata la diffusione è ben definito, poiché il gradiente è applicato ad impulsi; ciò è particolarmente importante per gli studi di diffusione vincolata;

- Mediante i gradienti ad impulsi è, normalmente, possibile separare gli effetti di diffusione dal rilassamento spin-spin.

Nelle misure di diffusione mediante PGSE è necessario tenere presente che oltre al gradiente di campo magnetico ad impulsi, possono essere presenti gradienti di *background*, dovuti a disomogeneità del campo magnetico principale o a differenze di suscettività magnetica all'interno del campione. Comunque, in un mezzo omogeneo, i gradienti ad impulsi applicati sono generalmente molto più forti dei gradienti di *background*.

6.5 *Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY)*

Una review completa dei requisiti di base del DOSY, per l'acquisizione dei dati ed il processing è stata redatta da Johnson.²⁴ Il DOSY richiede fundamentalmente dei datasets degli spettri NMR a gradienti di campo pulsato di alta qualità, una appropriata registrazione dell'intensità e della frequenza delle righe di risonanza e l'eliminazione completa di artefatti dalla forma delle righe.

In questo paragrafo verranno trattati i punti salienti del DOSY che sono il processing e la visualizzazione dei dati di diffusione secondo lo schema introdotto da Morris e Johnson.²⁵

6.5.1 *Analisi dei dati e processing*

Una serie di spettri PFG-NMR vengono registrati con un valore ben preciso dell'intensità del gradiente; i dati derivanti da questi spettri vengono propriamente invertiti^{19d} mediante una *Trasformata Inversa di Laplace* per ottenere una mappa bidimensionale che mostra, sull'asse delle ascisse i chemical shifts e sull'asse delle ordinate i coefficienti di diffusione.

Possono essere considerati, essenzialmente, due casi a seconda che il sistema analizzato sia discreto oppure continuo. Nel caso di un sistema discreto è assolutamente necessario conoscere con esattezza il campione, poiché i soli dati iniziali non sono sufficienti per distinguere una distribuzione continua da una serie discreta di componenti allo stesso chemical shift. In caso di dubbio riguardo alla natura della soluzione, Morris e Johnson raccomandano di usare preventivamente un metodo che tratti distribuzioni continue.²⁶

Molti sistemi di interesse, come polimeri e vescicole, sono caratterizzati da distribuzioni continue di coefficienti di diffusione. Il primo programma utilizzato per l'analisi DOSY di dati polidispersi è CONTIN che esegue una *Trasformata Inversa di Laplace* dei dati acquisiti.²⁷ L'uso di CONTIN nelle applicazioni DOSY è relativamente semplice poiché richiede l'immissione di un valore di soglia ed il programma fornisce direttamente lo spettro di Laplace. Per la visualizzazione dei dati, CONTIN impiega una procedura di smoothing che rappresenta il maggior limite di questo programma poiché provoca l'allargamento di tutti i

picchi cosicché anche componenti monodispersi mostrano una considerevole larghezza di riga.²⁸

È necessario sottolineare che DOSY è fondamentalmente un modo di visualizzare dati di diffusione derivanti da PFG NMR. Negli ultimi anni l'acronimo DOSY è divenuto sinonimo non solo della modalità di visualizzare i dati, ma anche della corrispondente sequenza di impulsi e dell'hardware associati all'esperimento di diffusione NMR i cui risultati possono essere eventualmente visualizzati su una mappa bidimensionale. Esistono in letteratura diversi lavori che trattano il DOSY come un esperimento vero e proprio. L'utilizzo del DOSY come aiuto per l'assegnazione spettrale è ampiamente riconosciuto, esistono comunque altri metodi di processing consultabili in letteratura.²⁹

6.6 *Misure di diffusione condotte sulle Cloroacetammidi*

Al fine di stimare le dimensioni dei complessi π - π a cui le cloroacetammidi danno luogo in soluzione acquosa è stata utilizzata la spettroscopia di Diffusion-Ordered NMR (DOSY). Come spiegato nei precedenti paragrafi i dati di diffusione contenuti nei datasets PFG-NMR possono essere convenientemente visualizzati come uno spettro pseudo 2D NMR con i chemical shifts in una direzione (asse orizzontale) ed i coefficienti di diffusione sull'altra (asse verticale). In questo modo, i composti possono essere distinti in maniera chiara secondo le loro dimensioni effettive.

La visualizzazione DOSY è solo uno dei modi utilizzati per questa applicazione e risulta particolarmente conveniente in questo studio poiché permette di visualizzare simultaneamente le dimensioni effettive del monomero e degli aggregati in modo da poterli comparare.³⁰

La figura 6.1 mostra lo spettro ¹H-detected DOSY di una soluzione 5mM di Acetochlor in D₂O.

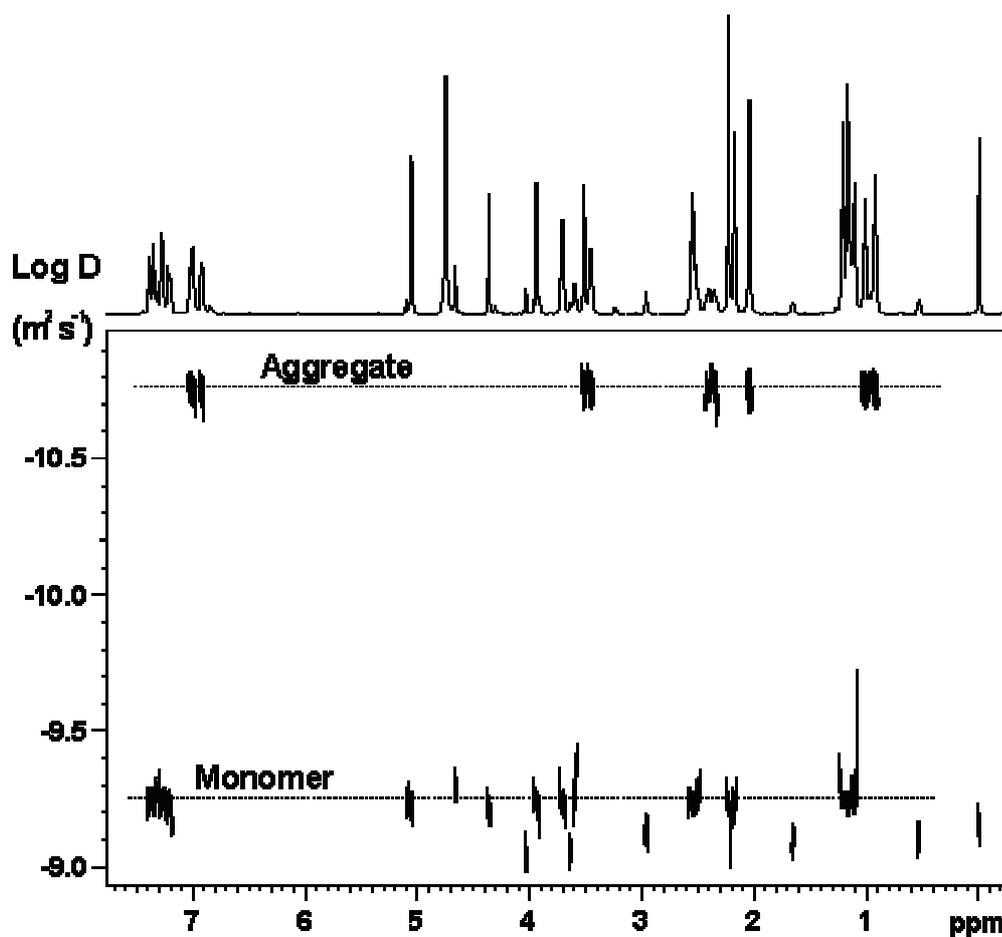


Figura 6.1: Spettro ^1H -detected DOSY a 600.13MHz di una soluzione 5mM di Acetochlor in D_2O a 300K. Lo spettro monodimensionale corrispondente è mostrato in proiezione orizzontale.

Lo spettro in figura 6.1 è stato processato imponendo che il comportamento di tutti i segnali fosse descritto da un solo decadimento esponenziale. Risultati simili sono stati ottenuti per gli altri due composti (dati non mostrati). Lo spettro monodimensionale corrispondente è mostrato nella proiezione orizzontale: tutti i segnali appaiono ben risolti e possono essere classificati secondo il loro coefficiente di diffusione. Inoltre, sul decadimento dei segnali è stato eseguito un fitting non lineare con il metodo dei minimi quadrati basato sull'algoritmo SIMPLEX. In figura 6.2 vengono mostrate le curve di decadimento tipiche per le risonanze della specie monomerica e dell'aggregato per un campione di Acetochlor 5mM in D_2O ; tali curve mostrano il logaritmo dell'intensità del segnale in funzione del quadrato della forza del gradiente.

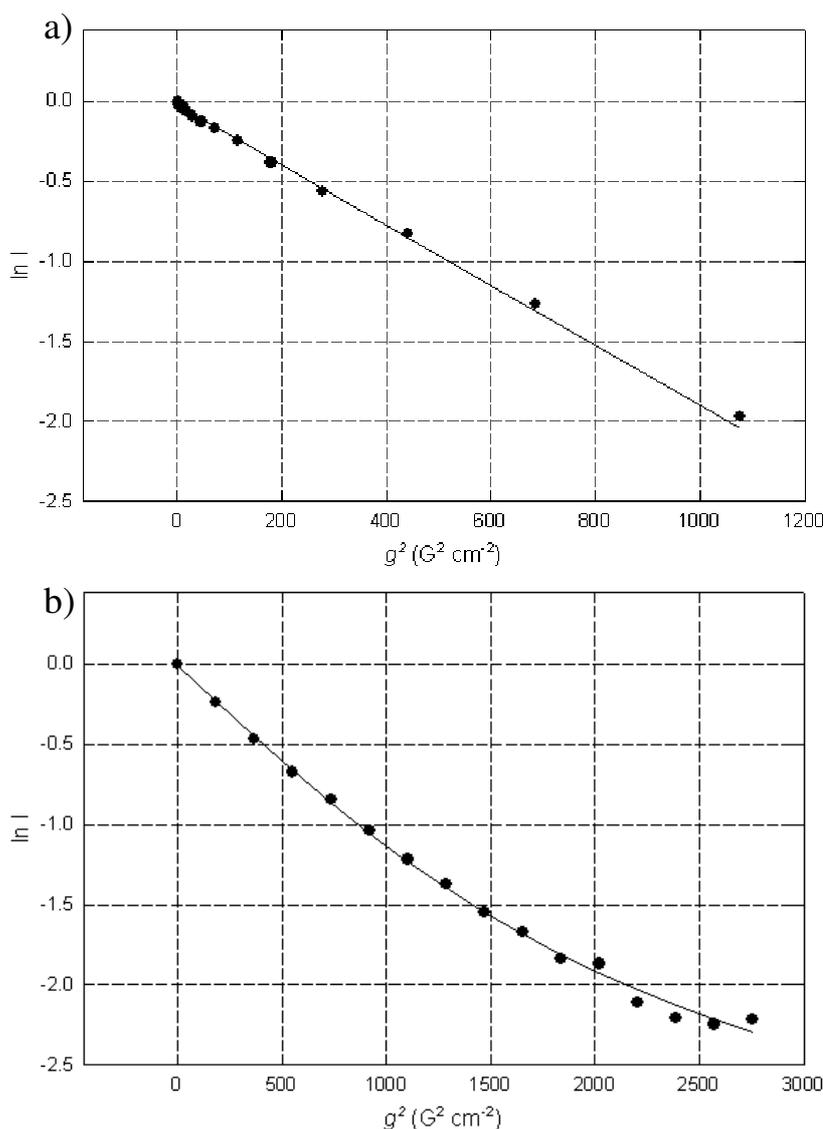


Figura 6.2: Tipiche curve di decadimento ottenute per le risonanze della specie monomerica (a) e dell'aggregato (b) di una soluzione 5mM di Acetochlor in D₂O a 300K. I punti indicano i dati sperimentali mentre le linee rappresentano il miglior fitting.

In questa rappresentazione grafica, i decadimenti mono-esponenziali vengono rappresentati da una retta. Nel nostro caso, la figura 6.2a mostra effettivamente il decadimento mono-esponenziale delle risonanze della specie monomerica, mentre la figura 6.2b mostra un decadimento bi- o multi-esponenziale per l'aggregato.

Questi esperimenti di diffusione permettono di chiarire due aspetti importanti: primo, mostrano che, per ogni composto studiato, tutte le "risonanze extra" sono caratterizzate dallo stesso coefficiente di diffusione e ciò significa che appartengono tutte alla stessa specie; secondo, il coefficiente di diffusione dell'aggregato appare molto minore rispetto a quello della specie monomerica, in media, da uno a due ordini di grandezza, ciò indica che la dimensione effettiva dei complessi è molto maggiore di quella della molecola singola ed

esclude la possibilità che i complessi siano formati dallo stacking di due sole molecole; infatti, un complesso dimerico avrebbe un coefficiente di diffusione molto simile a quello del monomero.

La tabella 6.2 mostra i coefficienti di diffusione per la specie monomerica e per l'aggregato ottenuti dagli esperimenti DOSY condotti sulle tre cloroacetammidi in esame:

Tabella 6.2: Coefficienti di diffusione e raggi idrodinamici della specie monomerica e dell'aggregato dei tre composti studiati determinati mediante esperimenti di diffusione via NMR.

Composto	D_{NMR} (x 10⁻¹¹ m²s⁻¹)	R_H (nm)
<i>Monomero</i>		
Acetochlor	53	≈0.4
Metolachlor	51	≈0.4
Pretilachlor	50	≈0.4
<i>Aggregato</i>		
Acetochlor	1.7	≈11
Metolachlor	1.3	≈15
Pretilachlor	1.9	≈10

I valori dei raggi idrodinamici riportati nell'ultima colonna della Tabella 6.2 sono stati ottenuti dall'equazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (6.25)$$

dove D è il coefficiente di diffusione, k è la costante di Boltzmann, T è la temperatura di lavoro ($T=300\text{K}$), η è la viscosità del solvente ($\eta_{\text{D}_2\text{O}} = 1.1095\text{cP}$) ed R è il raggio idrodinamico. È comunque necessario ribadire che la (6.25) dà una buona stima del raggio idrodinamico R nel caso di particelle sferiche in soluzioni diluite, quindi, nel caso dei composti in esame, il valore ottenuto è solo una stima approssimativa.

6.6.1 Misure di diffusione NMR di campioni a diverse concentrazioni

Nel capitolo 3 è stato descritto il comportamento delle cloroacetammidi in soluzione acquosa al variare della concentrazione. Dall'osservazione degli spettri ^1H monodimensionali di campioni di Metolachlor a diverse concentrazioni era evidente la formazione di due diversi sistemi aggregati.

A concentrazioni comprese tra 2 e 8mM si osserva la prima forma aggregata, mentre tra 12 e 35mM si ha una seconda forma di aggregazione.

Misure di diffusione via NMR su campioni di Metolachlor in cui è presente ciascuna delle due forme aggregate hanno consentito di stimare le dimensioni dei due aggregati e di comprenderne il meccanismo di formazione.

Su una soluzione 25mM di Metolachlor in D₂O è stato eseguito un esperimento di diffusione il cui DOSY è riportato in figura 6.3:

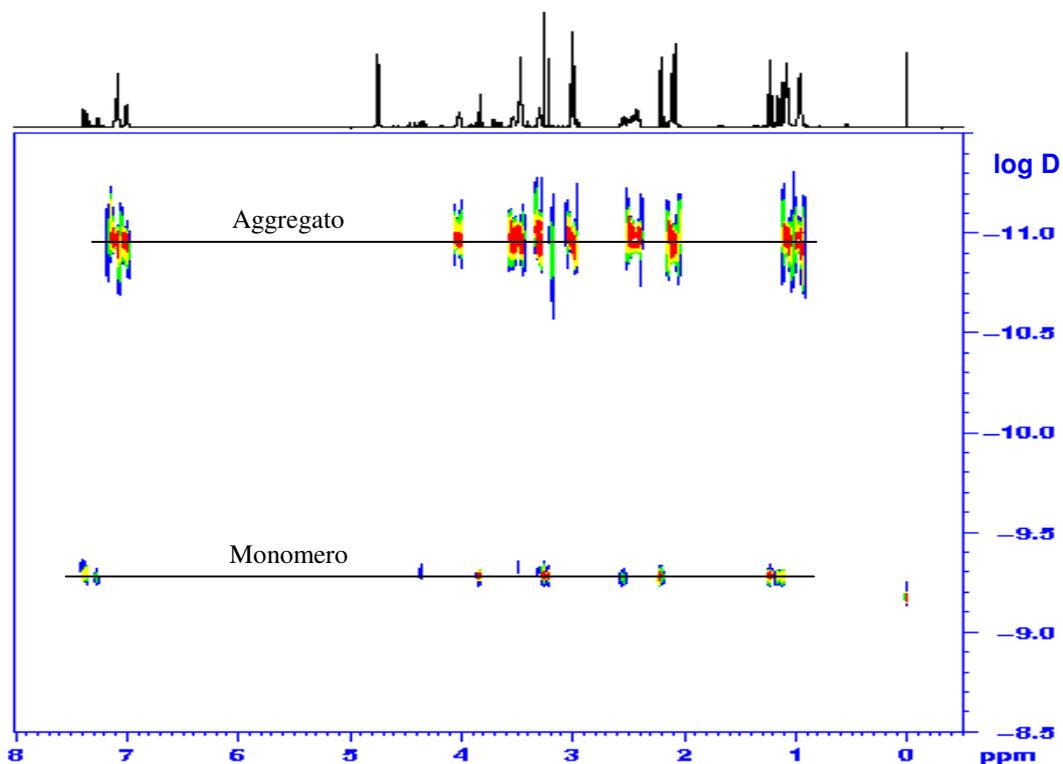


Figura 6.3: Spettro ¹H-detected DOSY a 600.13MHz di una soluzione 25mM di Metolachlor in D₂O a 300K. Lo spettro monodimensionale corrispondente è mostrato in proiezione orizzontale.

È stato poi effettuato un ulteriore esperimento, mantenendo i medesimi parametri spettrali, su un campione 5mM di Metolachlor in D₂O (figura 6.4).

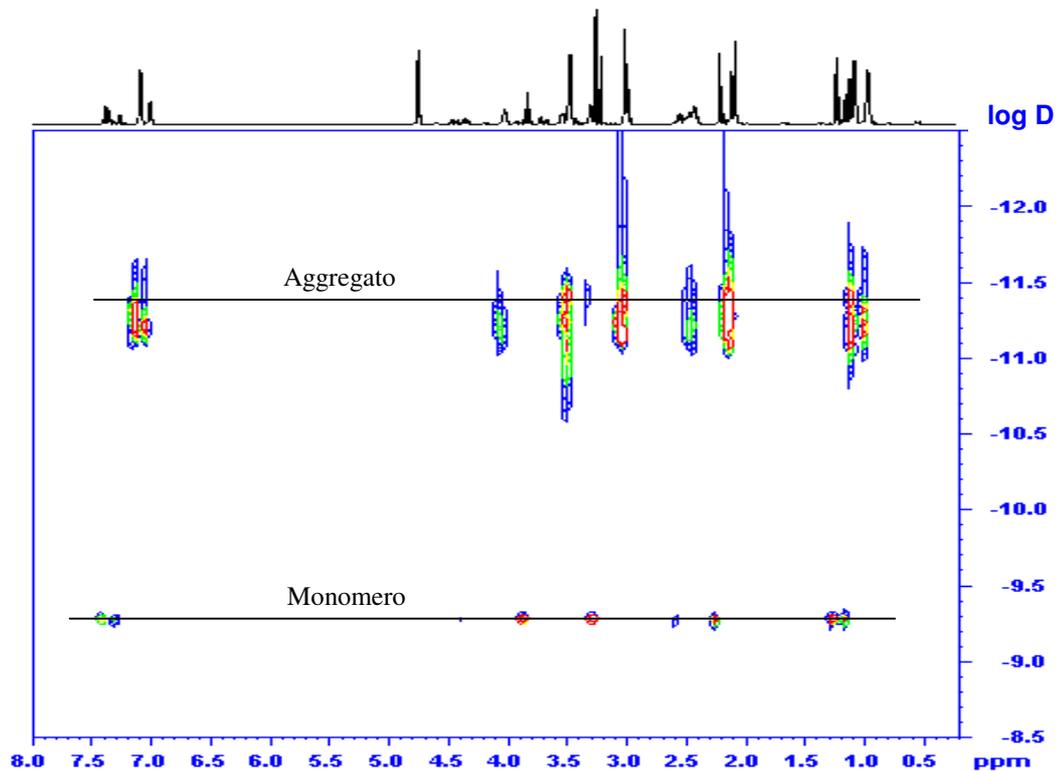


Figura 6.4: Spettro ^1H -detected DOSY a 600.13MHz di una soluzione 5mM di Metolachlor in D_2O a 300K. Lo spettro monodimensionale corrispondente è mostrato in proiezione orizzontale.

Sul decadimento dei segnali dei due campioni è stato eseguito un fitting non lineare con il metodo dei minimi quadrati e sono stati ottenuti i seguenti valori dei coefficienti di diffusione e dei raggi idrodinamici corrispondenti:

Metolachlor 25mM: $D = 1.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ $R=18 \text{ nm}$

Metolachlor 5mM $D = 6.3 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ $R=31 \text{ nm}$

Da questi valori si deduce che gli aggregati che si formano a basse concentrazioni (2-8mM), hanno dimensioni maggiori rispetto a quelli che si formano a concentrazioni più elevate (12-35mM).

Si può, quindi, concludere che: dalle singole molecole si formano inizialmente aggregati di grandi dimensioni che successivamente si sfaldano a formare aggregati più piccoli che rimangono tali anche a concentrazioni elevate (35mM).

Inoltre, è importante considerare che nel campione a minore concentrazione non è stato possibile raggiungere un decadimento totale dell'intensità delle risonanze e si è arrivati solo ad una diminuzione del 75%, ciò significa che nel campione sono presenti strutture aggregate di dimensioni notevoli, non rilevabili nell'esperimento DOSY, per insufficienza dei gradienti, ma che comportano una mancanza sul decadimento di ~25%.

6.7 Misure di diffusione condotte sui 3-fenil-2-nitropropanoati di etile

L'analisi della diffusione via NMR sui 3-fenil-2-nitropropanoati di etile ha permesso di stimare il coefficiente di diffusione della specie monomerica e dell'aggregato e di osservare quanto già detto per le cloroacetammidi: tutte le "risonanze extra" sono caratterizzate dallo stesso coefficiente di diffusione e questo risulta maggiore di un ordine di grandezza rispetto a quello del monomero.

In tabella 6.3 vengono riportati i valori ottenuti per i composti in esame.

Tabella 6.3: Coefficienti di diffusione e raggi idrodinamici della specie monomerica e dell'aggregato dei composti studiati determinati mediante esperimenti di diffusione via NMR.

Composto	D_{NMR} ($\times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	R_{H} (nm)
<i>Monomero</i>		
R	60	≈ 0.3
RCH ₃	59	≈ 0.3
ROCH ₃	57	≈ 0.3
R(CH ₃) ₂	57	≈ 0.3
<i>Aggregato</i>		
R	7.7	≈ 3
RCH ₃	4.2	≈ 5
ROCH ₃	1.5	≈ 13
R(CH ₃) ₂	2.1	≈ 9

I valori dei coefficienti di diffusione ottenuti risultano, in media, maggiori di quelli ottenuti per le cloroacetammidi, quindi, gli aggregati formati dai nitropropanoati hanno dimensioni minori. Anche in questo caso, non è stato possibile raggiungere un decadimento totale dell'intensità delle risonanze, quindi nei campioni sono presenti strutture aggregate di grandi dimensioni, non rilevabili nell'esperimento DOSY ma visibili negli spettri monodimensionali (vedi capitolo 4), nei quali si osserva nel tempo una graduale perdita di risoluzione sui segnali degli aggregati dovuta proprio alla formazione di queste strutture di dimensioni notevoli.

In conclusione, la spettroscopia DOSY si è rivelata un valido strumento di indagine della grandezza e del comportamento dei complessi π - π in soluzione acquosa. È ora possibile

escludere che si tratti di complessi dimerici o di aggregati non ordinati, infatti, i coefficienti di diffusione ottenuti sono notevolmente più piccoli rispetto a quelli dei corrispondenti monomeri e ad ogni risonanza è associato un unico valore di coefficiente di diffusione. Nel caso delle cloroacetammidi, inoltre, è stata confermata l'esistenza di due forme aggregate presenti in due intervalli di concentrazione successivi; in particolare, la prima forma ha dimensioni maggiori della seconda.

Riferimenti bibliografici

1. Crank, J. *The mathematics of diffusion*; 2nd ed.; Clarendon Press: Oxford, **1975**.
2. Tyrrell, H. J. V.; Harris, K. R. *Diffusion in liquids: A theoretical and experimental study*; Butterworths: London & Boston., **1984**.
3. Callaghan, P. T. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*; Oxford University Press: New York, **1991**.
4. Cussler, E. L. *Diffusion; Mass transfer in Fluid systems*; Cambridge University Press: Cambridge, **1984**.
5. Waldeck, A. R.; Kuchel, P. W.; Lennon, A. J.; Chapman, B. E. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, 30, 39-68.
6. Hansen, J. P.; McDonald, I. R. *Theory of simple liquids*; Academic Press: London, **1976**.
7. Callaghan, P. T. *Austr. J. Phys* **1984**, 37, 359-387.
8. Stilbs, P.; Lindman, B. *J. Phys. Chem.* **1981**, 85, 2587-2589.
9. Van Hove, L. *Phys. Rev.* **1954**, 95, 249.
10. Balcar, E.; Lovesey, S. W. *The theory of magnetic neutron and photon scattering*; Oxford University Press: New York, **1989**.
11. Huntress, W. T., Jr. *J. Phys. Chem.* **1969**, 73, 103-111.
12. Huntress, W. T., Jr. *Adv. Magn Reson.* **1970**, 4, 1-37.
13. Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 288-291.
14. Kärger, J.; Pfeifer, H.; Heink, W. *Adv. Magn. Reson.* **1988**, 12, 1-89.
15. Stilbs, P. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, 19, 1-45.
16. Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions*; Oxford University Press: New York, **1987**.
17. Vold, R. L.; Waugh, J. S.; Klein, M. P.; Phelps, D. E. *J. Chem. Phys.* **1968**, 48, 3831-3832.
18. James, T. L.; McDonald, G. G. *J. Magn. Reson.* **1973**, 11, 58-61.
19. a) Stilbs, P.; Moseley, M. E. *Chem. Scr.* **1978-79**, 13, 26-28; b) Stilbs, P.; Moseley, M. E. *Chem. Scr.* **1980**, 15, 215-216; c) Stilbs, P.; Moseley, M. E. *Chem. Scr.* **1980**, 15, 176-179; d) Stilbs, P. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 2135-2137.
20. Price, W. S. *Concepts Magn. Reson.* **1997**, 9, 299-336.
21. Canet, D. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, 30, 101-135.

22. Kimmich, R. *NMR tomography, Diffusometry and Relaxometry*; Springer: Berlin, **1997**.
23. Fukushima, E.; Roeder, S. B. W. *Experimental Pulse NMR: A nuts and bolts approach*; Addison-Wesley Publishing: Reading (Massachusetts), **1981**.
24. Johnson, C. S., Jr. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, 34, 203-256.
25. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3139-3141.
26. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4291-4299.
27. Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.* **1982**, 27, 229-242.
28. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Jr.; Wong, T. C. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 603-608.
29. a) Stilbs, P.; Paulsen, K.; Griffiths, P. C. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 8180-8189; b) Antalek, B.; Hewitt, M. J.; Windig, W.; Yacobucci, P. D.; Mourey, T.; Le, K. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, 40, S60-S71; c) Huo, R.; Wehrens, R.; Duynhoven, J. V.; Buydens, L. M. C. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 490, 231-251; d) Armstrong, G. S.; Loening, N. M.; Curtis, J. E.; Shaka, A. J.; Mandelshtam, V. A. *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 139-148.
30. Viel, S.; Mannina, L.; Segre, A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2515-2519.

Capitolo 7: Misure di Dynamic Light Scattering (DLS)

7.1 Introduzione

Le tecniche di Light Scattering (statico o dinamico) sono metodi fisici utilizzati per lo studio della struttura di macromolecole in soluzione. Tali metodi sono stati ampiamente utilizzati nello studio di polimeri sintetici, proteine, polisaccaridi, particelle colloidali e aggregati polimolecolari, come micelle, micelle inverse, vescicole e altre forme di aggregazione di tensioattivi (surfactant).

In questo capitolo verranno presentati i principi della tecnica, la teoria, l'analisi dei dati e i limiti del metodo, al fine di dare una corretta interpretazione ai risultati ottenuti nel corso di questo studio.

7.2 Teoria del Light Scattering

Quando un raggio di luce passa attraverso un mezzo polarizzabile, come l'aria, un solvente o una soluzione di macromolecole, esso viene diffuso in ogni direzione. Quando la luce interagisce con la materia, il campo elettrico della radiazione induce una polarizzazione oscillatoria degli elettroni nelle molecole, le quali, divenendo sorgenti secondarie di radiazione, emettono luce (luce diffusa).

La geometria di un tipico esperimento di scattering è schematicamente mostrata in figura 7.1.

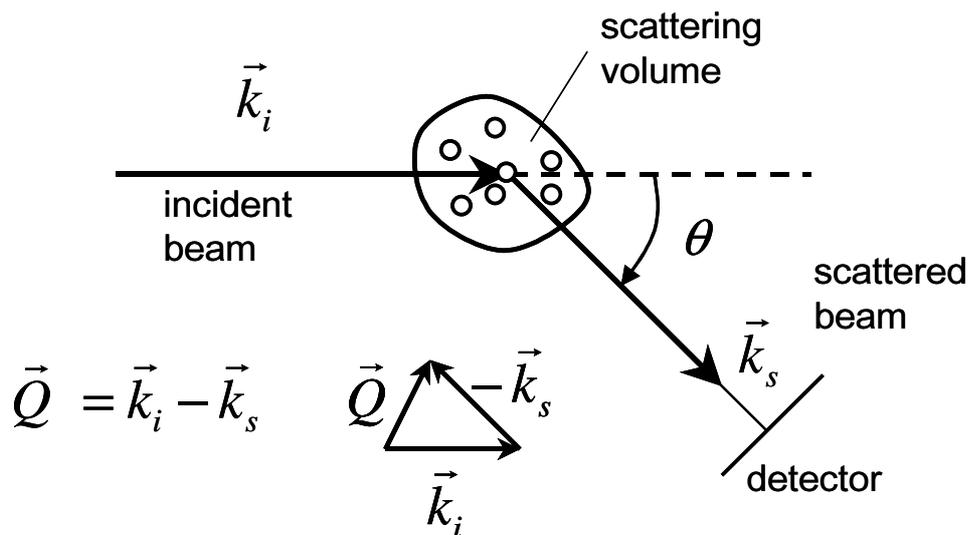


Figura 7.1: Rappresentazione schematica dell'esperimento di Light Scattering.

Un raggio incidente di luce laser, monocromatico e verticalmente polarizzato, di lunghezza d'onda λ_i e vettore d'onda \vec{k}_i (dove $|\vec{k}_i| = \frac{2\pi n}{\lambda_i}$ e n è l'indice di rifrazione della soluzione) illumina il volume di scattering V_s contenente N particelle. La luce diffusa, con vettore d'onda \vec{k}_s (dove $|\vec{k}_s| = \frac{2\pi n}{\lambda_s}$) viene osservata ad un angolo di scattering θ , ad una certa distanza dal volume di scattering.

Il vettore di scattering \vec{Q} svolge un ruolo fondamentale nella descrizione del fenomeno di scattering; il suo modulo, nel caso di scattering elastico o quasi-elastico è dato da:

$$|\vec{Q}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (7.1)$$

L'intensità della luce diffusa è una funzione complessa che dipende da molti fattori e può essere descritta dalla seguente relazione¹:

$$I_s \propto I_0 \frac{n_0^2}{\lambda^4} \left(\frac{dn}{dC}\right)^2 N(R) \cdot R^6 \cdot P(R, \theta) \cdot S(R, \theta, \text{concentrazione}) \quad (7.2)$$

dove, I_0 è l'intensità della luce incidente, n_0 è l'indice di rifrazione del solvente, λ è la lunghezza d'onda (nel vuoto), dn/dC è l'incremento dell'indice di rifrazione (n è riferito alla soluzione), $N(R)$ è il numero di particelle di raggio R , R è il raggio della particella, $P(R, \theta)$ è un fattore di forma della particella che descrive gli effetti di interferenza all'interno della particella sulla dipendenza angolare dell'intensità di scattering e fornisce informazioni sulla struttura e sulla forma delle macromolecole, $S(R, \theta, \text{conc.})$ è un fattore di struttura mediato nel tempo che descrive gli effetti di interferenza tra particelle; dipende dalla concentrazione e per soluzioni diluite $S \rightarrow 1$.

Nell'equazione (7.2) si possono individuare i fattori principali che influenzano l'intensità della luce diffusa di un campione diluito contenente particelle in grado di produrre scattering della luce: il fattore di contrasto ottico (all'indice di rifrazione delle particelle), il numero, la grandezza e la forma delle particelle, nonché la loro interazione. Si noti anche la dipendenza angolare della intensità di luce diffusa.

In particolare, il segnale tipico delle particelle in sospensione potrà essere rilevato sperimentalmente solo se l'indice di rifrazione delle particelle (gli "scatters") risulti sufficientemente diverso da quello del solvente. Si usa spesso l'indice di rifrazione relativo, cioè $m = n_p/n_s$ (gli indici P ed S si riferiscono alle particelle e al solvente, rispettivamente).

Come corollario, sistemi particella/solvente con indice di rifrazione relativo molto vicino a uno risulteranno difficilmente visibili in un esperimento di Light Scattering, poiché produrranno un segnale debole rispetto al background di luce diffusa dalle molecole del solvente.

La dipendenza dalla concentrazione (N nella formula 7.2) e dalla dimensione (quindi polarizzabilità, R^6 nella formula 7.2) indicano la dipendenza della luce diffusa da proprietà estensive quali il numero di scatters e il volume di materia che diffonde la luce (volume² o analogamente R^6). In particolare, a parità di altri fattori, risulta chiaro che particelle grandi diffondono la luce in modo notevolmente maggiore rispetto a particelle piccole. Nei casi in cui i fattori P ed S risultino circa uno (particelle piccole rispetto alla lunghezza d'onda della radiazione incidente e soluzioni diluite, rispettivamente), l'equazione (7.2) indica che la luce diffusa varia come la sesta potenza del raggio di particelle sferiche. In altre parole, in questa approssimazione (Rayleigh regime) una particella di raggio 5 nm diffonde un milione di volte meno luce di una particella di raggio 50 nm. Da qui la conclusione, valida in molti casi e usata spesso come regola empirica, che la tecnica di Light Scattering è straordinariamente sensibile alla presenza di particelle grandi, più che alle piccole.

Mentre la discussione del fattore di struttura S esula dallo scopo di questa tesi (per soluzioni diluite si consideri approssimabile all'unità), è opportuno introdurre il significato del fattore di forma $P(R, \theta)$.

Il fattore P è introdotto per tener conto della forma della particella, ed ha rilevanza solo nel caso in cui le dimensioni delle particelle siano comparabili alla lunghezza d'onda λ della radiazione. Infatti, il fattore P tiene conto essenzialmente della interferenza intraparticellare sulla radiazione diffusa emessa da una certa particella. Le particelle con dimensioni molto minori di λ sono da considerarsi puntiformi ai fini dell'esperimento, in tal caso P tende a uno e la radiazione diffusa è isotropa. Viceversa, particelle di dimensioni comparabili alla lunghezza d'onda λ della radiazione, sono caratterizzate da una dipendenza angolare della luce diffusa, dipendenza che può essere predetta sulla base della forma di tali particelle. Esistono infatti delle forme funzionali di P sulla base di una certa geometria della particella (sfera, sfera cava, bastoncino, etc.). In tali casi P varia – anche di alcuni ordini di grandezza – con la dimensione tipica della particella e con l'angolo. In particolare vi sono valori che annullano P , producendo un minimo di luce diffusa.

In conclusione, l'analisi della luce diffusa a diversi angoli permette di ottenere utili informazioni sulla natura delle particelle sospese in una certa fase, e di trarne delle informazioni qualitative e quantitative, come verrà esposto di seguito.

Nel nostro studio sono stati utilizzati esclusivamente esperimenti di Light Scattering dinamico (DLS), perciò, da qui in avanti ci si riferirà solo alla descrizione di questo metodo, lasciando gli approfondimenti sul Light Scattering statico a testi specialistici.²

7.3 Teoria del Dynamic Light Scattering

In un esperimento di Dynamic Light Scattering (DLS), denominato anche quasi-elastic Light Scattering (QELS) o photon correlation spectroscopy (PCS), le fluttuazioni temporali della luce diffusa attorno al suo valor medio vengono registrate ed analizzate al fine di stimare la grandezza delle particelle di scattering e la loro “size distribution”. Tali fluttuazioni sono originate dai moti browniani delle particelle che si muovono continuamente e casualmente in soluzione a seconda della loro grandezza: piccole particelle generano fluttuazioni rapide, mentre particelle grandi, a diffusione lenta, generano fluttuazioni lente dell’intensità.

L’analisi delle oscillazioni casuali dell’intensità è eseguita generalmente attraverso una stima della funzione di autocorrelazione del campo elettrico della luce diffusa nel tempo, definita come:³

$$G_1(\tau) = \langle E_s(t + \tau) \cdot E_s(t) \rangle \quad (7.3)$$

dove $E_s(t)$ e $E_s(t+\tau)$ rappresentano l’intensità del campo elettrico della luce diffusa al tempo t e $t + \tau$, rispettivamente, e descrivono il grado di correlazione di una quantità dinamica in un periodo di tempo τ .

In un esperimento di DLS, comunque, la funzione di autocorrelazione del campo elettrico, G_1 , non viene misurata direttamente ma è ottenuta dalla funzione di autocorrelazione della luce diffusa, G_2 , definita come:

$$G_2(\tau) = \langle I_s(t + \tau) \cdot I_s(t) \rangle \quad (7.4)$$

Le due funzioni sono correlate dalla relazione di Siegert:⁴

$$G_2(\tau) = B \cdot [1 + \beta \cdot g_1^2(\tau)] \quad (7.5)$$

dove B rappresenta la linea di base e β è un parametro ottico. In figura 7.2 viene riportata la rappresentazione schematica di un esperimento di DLS:

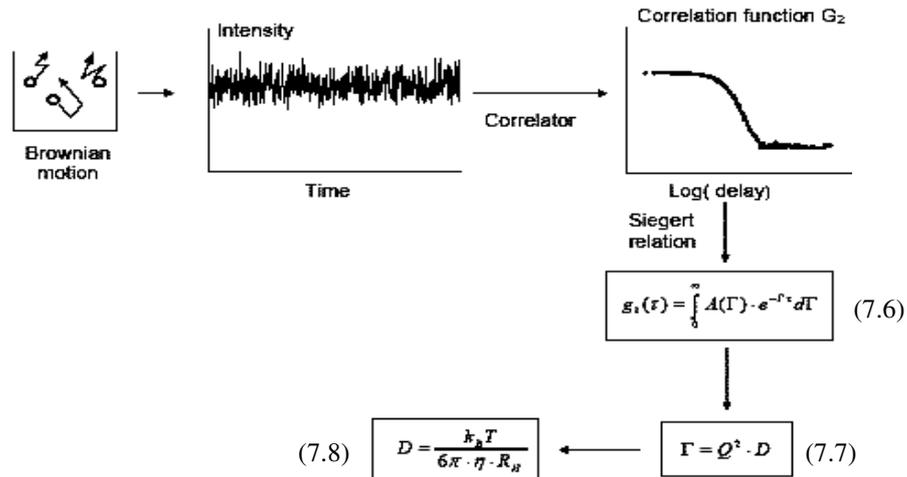


Figura 7.2: Diagramma schematico di un esperimento di Dynamic Light Scattering.

A causa del moto browniano delle particelle di scattering, la radiazione diffusa fluttua attorno ad un valore medio (dipendente secondo l'equazione (7.2) dalla natura del campione e dall'angolo di osservazione). La luce, raccolta da un fotomoltiplicatore o un fotodiodo, viene convertita in un segnale elettrico. Il correlatore calcola la funzione di autocorrelazione (G_2), campionando il segnale a diversi tempi, τ , generandone una media (eq. 7.4). Tale valore, o il corrispondente valore calcolato, g_1 (eq. 7.5), vengono utilizzati per le successive analisi. E' possibile mostrare che per una popolazione di particelle di scattering monodispersa, la funzione di correlazione g_1 è rappresentata da un decadimento monoesponenziale a cui è associata una costante di velocità $\Gamma = Q^2 \cdot D$ (eq. 7.7), dove Q è il vettore di scattering e D è il coefficiente di diffusione delle particelle. Risulta quindi che Γ dipende dall'angolo di osservazione e dal coefficiente di diffusione delle particelle D . Se una popolazione di particelle di scattering è polidispersa, la funzione di correlazione g_1 conterrà informazioni su ciascuna popolazione e sarà espressa dall'integrale su tutti i possibili valori di Γ , che, a loro volta, dipendono dai coefficienti di diffusione delle particelle come evidenziato dall'equazione (7.7). Il raggio idrodinamico R_H della "sfera equivalente" viene calcolato mediante la relazione di Stokes-Einstein (eq. 7.8) che correla il coefficiente di diffusione al raggio di particelle sferiche (k_B è la costante di Boltzmann, T è la temperatura e η è la viscosità del solvente).

Quindi, conoscendo la lunghezza d'onda della luce, l'angolo di scattering, la temperatura, la viscosità e l'indice di rifrazione del solvente, è possibile ottenere la *size distribution* delle particelle (Particle Size Distribution, PSD), per inversione di Laplace della equazione (7.6).

E' evidente che piccole particelle hanno un coefficiente di diffusione D maggiore e quindi un valore di Γ grande, che corrisponde ad un decadimento rapido della funzione di correlazione. Al contrario, particelle grandi genereranno un decadimento lento della funzione di correlazione.

7.4 *Analisi dei dati*

Numerosi metodi vengono utilizzati per l'analisi dei dati sperimentali al fine di ottenere informazioni riguardo alla dimensione media e alla *size distribution* delle particelle di un campione.

In questo paragrafo saranno discussi brevemente i due metodi di analisi più comunemente usati: la "analisi dei cumulanti" e CONTIN.

7.4.1 *Analisi dei cumulanti*

E' utilizzata generalmente per sistemi relativamente monodispersi, fu introdotta da Koppel⁵ e utilizza il logaritmo della funzione di correlazione del campo elettrico, $\ln[g_1(\tau)]$ sottoforma di uno sviluppo in serie di potenze di τ , secondo l'equazione:^{3,6}

$$\ln[g_1(\tau)] = \text{const} - \langle \Gamma \rangle \cdot \tau + \frac{\mu_2}{2} \cdot \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \cdot \tau^3 + \dots \quad (7.9)$$

L'analisi è generalmente condotta utilizzando un fitting polinomiale cubico ed ottenendo due parametri: il valore di *z-average*, $\langle \Gamma \rangle$ e l'indice di polidispersità P-Index, correlato all'ampiezza della *size distribution* e calcolato da $\mu_2 / \langle \Gamma \rangle^2$.

Dal valore di $\langle \Gamma \rangle$ viene calcolato tramite le equazioni (7.7) e (7.8) il corrispondente *z-average* raggio idrodinamico, che rappresenta la grandezza media delle particelle. Questo valore è, in linea di principio, differente dal raggio ottenuto dalla media pesata sul numero di particelle a causa della natura dell'esperimento DLS: le particelle sono pesate a seconda della loro abilità a diffondere la luce. Il secondo valore ottenuto è l'indice di polidispersità P-Index che rappresenta una misura dell'ampiezza della *size distribution*; all'aumentare di P la distribuzione si allarga.

I due parametri ottenuti dall'analisi dei cumulanti contengono informazioni riguardanti la distribuzione ma non danno alcuna informazione riguardo alla forma o ai dettagli della distribuzione. Inoltre, in casi particolarmente sfavorevoli, il metodo dei cumulanti è di basso valore pratico, a causa del fatto che la funzione (7.9) non produce un buon fitting dei dati sperimentali (i.e. g_1), ad esempio per campioni fortemente polidispersi.

7.4.2 CONTIN

Al fine di ottenere maggiori informazioni sulla *size distribution* delle particelle è necessario effettuare una *Trasformata Inversa di Laplace* dell'equazione (7.6) attraverso cui viene calcolata la funzione di distribuzione $A(\Gamma)$ della variabile Γ (legata a sua volta al coefficiente di diffusione mediante la relazione $\Gamma = DQ^2$).

Tra i diversi approcci seguiti per risolvere la trasformata di Laplace, il programma CONTIN è quello più ampiamente utilizzato.⁷ Tale programma impiega una procedura di smoothing che tende a ridurre la curvatura nella funzione $A(\Gamma)$. CONTIN è un programma complesso che esegue due cicli: nel primo effettua un'analisi non pesata e seleziona un set di parametri di prova, mentre nel secondo esegue un'analisi pesata dei dati e propone un set di parametri ottimali basati su sofisticati test statistici. CONTIN è particolarmente adatto all'analisi di risultati bimodali largamente distribuiti, di distribuzioni continue e di picchi secondari dove è presente un componente che diffonde la luce per meno del 10% del picco principale. E' invece meno adatto alla risoluzione di distribuzioni bimodali a picchi vicini o a riprodurre strette distribuzioni monomodali.

Il programma CONTIN, come ogni altro programma di analisi dei dati DLS, fornisce una distribuzione pesata *sull'intensità*: ogni specie è pesata sul contributo che apporta alla luce diffusa, in accordo alla equazione (7.2). In altre parole, il fattore preesponenziale, $A(\Gamma)$, rappresenta la dipendenza dell'intensità della luce diffusa dall'angolo di osservazione, dal raggio e dalla forma delle particelle come discusso in precedenza. La maggiore conseguenza di ciò è che la distribuzione calcolata dipende dall'angolo di osservazione e, in generale, tende a sovrastimare le particelle grandi.

7.5 *Vantaggi e limiti della tecnica*

Il DLS è un metodo indiretto per stimare la dimensione media, la polidispersità e la *size distribution* di una popolazione di particelle. E' una tecnica veloce, non invasiva e non distruttiva, può essere utilizzata in molti campi di ricerca e caratterizzare vari tipi di particelle. D'altra parte, è necessario sottolineare alcuni punti che risultano cruciali per una corretta analisi dei dati:

- L'importanza di utilizzare soluzioni diluite. L'equazione di Stokes-Einstein (7.8) dà una misura del raggio indipendente dalla concentrazione solo per sospensioni diluite, inoltre, per sospensioni concentrate sorge la possibilità di scattering multiplo per il quale la procedura schematizzata in Figura 7.2 non è più valida. Nel caso di particelle create dall'aggregazione di piccoli monomeri (es. micelle), questo costituisce una

limitazione cruciale, poiché il campione non può essere diluito al di sotto di un certo valore: gli aggregati scompaiono al di sotto di una concentrazione critica.

- Il campione deve essere preparato in assenza di polvere, poiché le particelle di polvere – a causa della loro dimensione – possono contribuire fortemente all'intensità della luce diffusa e, di conseguenza, pregiudicare la *size distribution* pesata sull'intensità.
- Le particelle non dovrebbero sedimentare, almeno nella scala dei tempi della misura (pochi minuti), altrimenti la composizione del campione nel volume di scattering varia durante l'esperimento.
- Il problema principale è legato al fatto che le *size distributions* sono rilevate in termini di intensità, che dipende da un gran numero di parametri ed in particolare dal quadrato del volume della particella. Per una interpretazione più accurata dei fenomeni in studio sarebbe necessario ottenere una *size distribution* pesata sul numero di particelle, ma ciò è complicato sia dal fatto che bisogna fare assunzioni sulla forma delle particelle, sia dal fatto che i risultati della trasformata inversa di Laplace vanno interpretati con cautela, a causa della natura "mal-condizionata" del problema matematico che è alla base di tale procedura.

7.6 Risultati e discussione delle misure di Dynamic Light Scattering

Sono stati condotti esperimenti di Dynamic Light Scattering su soluzioni acquose (D₂O) delle molecole in esame, cloroacetammidi e 3-fenil-2-nitropropanoati di etile, a 298K.⁸

La preparazione dei campioni è stata eseguita come segue: un'opportuna quantità di composto è stata pesata direttamente nella cuvetta cilindrica di analisi DLS; sono stati aggiunti 750µl di D₂O e successivamente il campione è stato agitato a mano per 30s. Il campione, immediatamente dopo l'agitazione, appare come una dispersione di microgocce di composto in acqua. Sono state effettuate misure in momenti diversi per osservare il comportamento del sistema nel tempo:

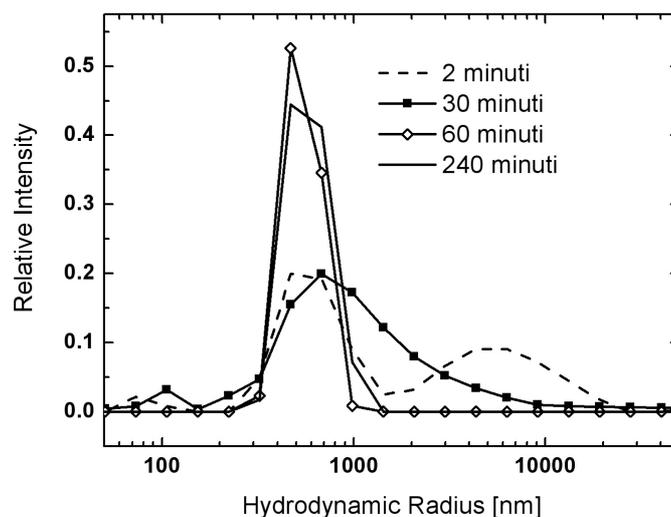


Figura 7.3: Andamento nel tempo del segnale DLS (CONTIN, 90°) relativo ad un campione di Metolachlor (3.2 mg/ml) in D₂O a 298K.

In figura 7.3 sono riportate le size distribution di un campione di Metolachlor disperso in D₂O, ottenute mediante analisi CONTIN a un angolo di scattering pari a 90°. Immediatamente dopo l'agitazione (t = 2 minuti), il campione, che appare visivamente come un'emulsione grossolana, è caratterizzato da una size distribution ampia e bimodale, con un picco centrato intorno a 500-600 nm e un altro intorno a 4-10 μm. Questo secondo picco rappresenta verosimilmente le gocce macroscopiche di soluto disperso nella fase acquosa. Dopo trenta minuti (curva con quadrati pieni), si nota uno shift della size distribution verso valori minori, in un intervallo da 500 nm a circa 3 μm, in seguito a sedimentazione del particolato a dimensioni maggiori. A circa un'ora dalla dispersione del campione (curva con rombi vuoti) l'analisi DLS mostra chiaramente un arricchimento della fase dispersa in un componente relativamente monodisperso, di dimensioni inferiori a un micron, il cui picco risulta centrato intorno ai 500 nm. Tale situazione si mantiene stabile per le successive ore (curva continua). All'ispezione visiva, la dispersione appare limpida ed è presente una certa quantità di prodotto sedimentato sul fondo della cuvetta. Nella valutazione dei dati non è stato impiegato il metodo dei cumulanti in quanto risultava difficile ottenere risultati soddisfacenti (alto errore di fitting dovuto all'ampiezza delle distribuzioni).

Parallelamente al Metolachlor, tutti gli altri campioni sono stati analizzati in modo analogo. I dati ottenuti sui vari campioni analizzati dopo quattro ore dall'agitazione manuale sono mostrati in Figura 7.4 e i risultati riportati schematicamente in Tabella 7.1.

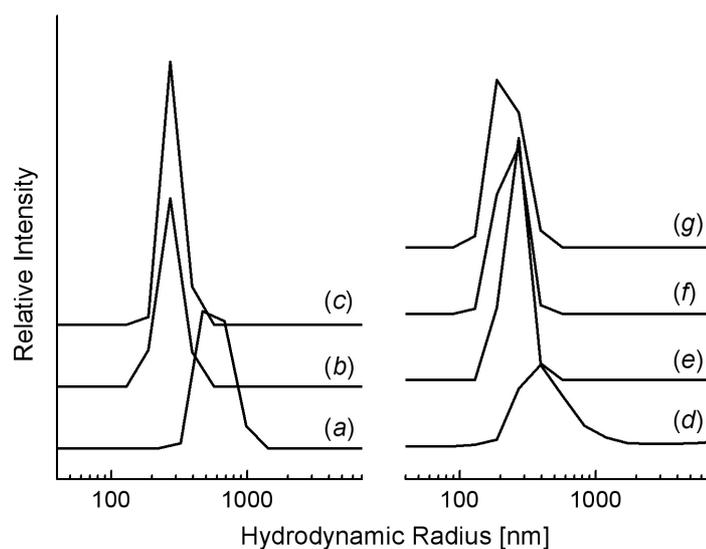


Figura 7.4: Analisi DLS (CONTIN, 90°) di alcuni campioni sospesi in D₂O, dopo circa 4 ore dalla preparazione del campione. **(a)** Metolachlor; **(b)** Pretilachlor; **(c)** Acetochlor; **(d)** ROCH₃; **(e)** RCH₃; **(f)** R(CH₃)₂; **(g)** R.

I valori dei coefficienti di diffusione D (ottenuti mediante DLS), riportati nell'ultima colonna della Tabella 7.1 sono stati ottenuti dall'equazione di Stokes-Einstein (7.8), utilizzando i parametri relativi alla D₂O ($n = 1.328$, $\eta = 1.1095$ cP) e scegliendo come valore di riferimento il raggio più probabile ($R_{H, max}$) della relativa size distribution.

Tabella 7.1: Risultati ottenuti dalle misure di dynamic Light Scattering (CONTIN, 90°) su soluzioni acquose dei composti in esame in D₂O a 298K.

	Campione	Concentrazione nominale [mg/mL]	Luce diffusa (90°) [kcps]	Intervallo [nm]	$R_{H, max}$ [nm]	Coefficiente di diffusione [m ² s ⁻¹]
(a)	Metolachlor	3.7	220	400-1500	700	2.79E-13
(b)	Pretilachlor	1.0	56	150-500	250	7.81E-13
(c)	Acetochlor	0.5	125	200-500	300	6.51E-13
(d)	ROCH ₃	1.6	31	200-1500	400	4.88E-13
(e)	RCH ₃	0.6	13	150-400	300	6.51E-13
(f)	R(CH ₃) ₂	0.8	50	150-450	250	7.81E-13
(g)	R	1.2	70	150-500	200	9.76E-13

Le misure di DLS sui campioni analizzati sono risultate di non banale esecuzione, nonostante le elevate prestazioni dello strumento impiegato. In generale, si è osservata una debole intensità di luce diffusa che, per essere registrata, ha richiesto condizioni operative piuttosto difficili. In particolare, per innalzare il livello di luce diffusa, si è dovuto irradiare il campione con un fascio di luce laser molto ampio (aumento del volume di scattering), quindi il rapporto segnale/rumore risultava diminuito (i.e., il livello di luce diffusa emergente dal background era basso).

La qualità della funzione di correlazione anche se non eccellente (Figura 7.5), è stata giudicata in tutti i casi sufficiente al fine di proseguire nell'analisi dei dati, così da ottenere la size distribution con il metodo CONTIN.

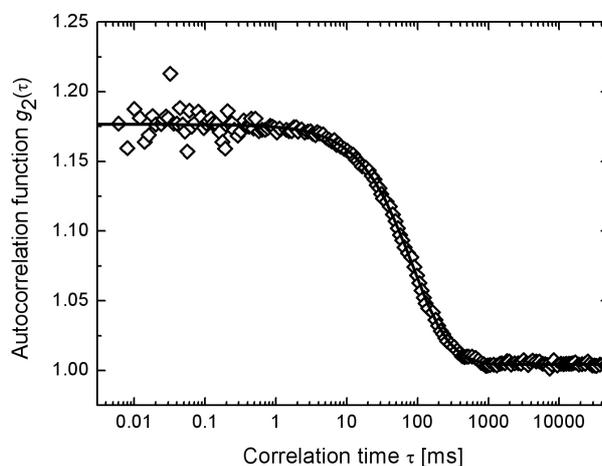


Figura 7.5: Funzione di autocorrelazione (90°) del campione ROCH_3 disperso in D_2O alla concentrazione nominale totale di 1.6 mg/mL (dati riportati in Figura 7.4 e Tabella 7.1). Il valore della funzione $g_2(\tau)$, estrapolato a tempo di correlazione zero equivale a circa 1.17. Idealmente la funzione $g_2(\tau)$ varia da 2 ad 1. Si noti anche la “rumorosità” della funzione a tempi di correlazione brevi. La linea continua rappresenta un esempio di fitting dei dati sperimentali.

7.7 Confronto tra i risultati DLS e DOSY

Dai risultati mostrati in tabella 7.1 si osserva che i raggi idrodinamici medi e, di conseguenza, i coefficienti di diffusione appaiono notevolmente diversi da quelli ottenuti mediante misure di diffusione via NMR e precisamente appaiono superiori di circa due ordini di grandezza.

Un risultato così diverso può essere spiegato considerando quanto detto nei paragrafi precedenti a proposito dei limiti della tecnica DLS: se nei campioni è presente un numero elevato di aggregati piccoli e dinamici, come confermano i dati DOSY e lo studio delle

proprietà chimico-fisiche, insieme ad aggregati molto complessi e con dimensioni notevoli, come invece si evince dalle misure DLS, la tecnica DLS sovrastima le forme più grandi e in presenza di queste non è in grado di osservare piccoli aggregati di tipo micellare.

Gli aggregati non osservabili mediante tecniche NMR, perché di dimensioni troppo elevate e troppo rigidi, vengono invece misurati via DLS, quindi, i coefficienti di diffusione ricavati da queste misure sono associabili a quegli aggregati che, nel caso delle cloroacetammidi conducono ad una perdita totale di parte del segnale nei campioni a diverse concentrazioni, mentre nel caso dei nitropropanoati di etile, portano ad una graduale perdita di risoluzione dei segnali dell'aggregato.

In conclusione, i dati DLS risultano complementari ai dati NMR e sottolineano la presenza di particelle ad alto numero di aggregazione e la facilità con cui molecole idrofobe possono restare segregate dall'ambiente acquoso e trovare una via di interazione intermolecolare energeticamente favorevole alla auto-associazione.

Riferimenti bibliografici

1. van Holde, K. E. *Physical Biochemistry* 2nd ed. **1985**, Englewood Cliffs, N.J, Prentice-Hall, Inc.
2. Fennell Evans, D.; Wennerström, H. *The Colloidal Domain: where, Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet* **1994**, Wiley VCH, New York.
3. Berne, B. J. P. R. *Dynamic Light Scattering* **1976**, John Wiley & Sons, Inc. New York.
4. a) Schätzel, K. *Dynamic Light Scattering* **1993**, Vol. 1, pp. 76-148, Clarendon Press, Oxford; b) Schurtenberger, P. N. *Environmental Particles* **1993**, Vol. 2, pp. 37-115, H.P.V, B. J. L. ed., Lewis, Boca Raton.
5. Koppel, D. E. *J.Chem. Phys.* **1972**, 57, 4814-4820.
6. Schmitz, K. S. *An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules* **1990**, Vol. 1. Academic Press, Inc, San Diego.
7. a) Provencher, S. W. *Macromol. Chem. Phys.* **1979**, 180, 201-209; b) Provencher, S. W. *Computer Phys. Comm.* **1982**, 27, 213-227.
8. Le misure di Dynamic Light Scattering sono state eseguite dal Dott. Pasquale Stano del gruppo del Prof. P.L. Luisi, Cattedra di Biochimica, Dipartimento di Biologia, Università di Roma III

Capitolo 8: Proprietà chimico-fisiche delle soluzioni acquose di Metolachlor

8.1 *Introduzione*

Il comportamento mostrato dal Metolachlor in soluzione acquosa è stato fin qui descritto mediante tecniche spettroscopiche; l'analisi mediante NMR sia mono che bidimensionale, le misure di diffusione e di Dynamic Light Scattering evidenziano l'aggregazione mediante π - π stacking intermolecolare.

Nei paragrafi che seguono vengono descritte alcune proprietà chimico-fisiche di soluzioni acquose di Metolachlor ed i dati termodinamici ad esse associate.^{1,2}

8.2 *Tensione superficiale*

Ciascuna molecola interna alla massa di un liquido è soggetta alle forze attrattive delle molecole che la circondano in ogni direzione e la risultante di queste forze è statisticamente nulla. Per le molecole che costituiscono lo strato superficiale del liquido, invece, le sollecitazioni non sono ugualmente distribuite in tutte le direzioni perché, nella fase gassosa il numero di molecole presenti nell'unità di volume è assai minore che nella fase liquida; ciò fa sì che le sollecitazioni che agiscono su ciascuna molecola presente in superficie abbiano risultante non nulla diretta verso l'interno del liquido e, di conseguenza, la superficie del liquido tende a contrarsi.³

Gli effetti di superficie possono essere espressi dal lavoro necessario a far variare l'area superficiale di una quantità infinitesima $d\sigma$; secondo le equazioni di Helmholtz e di Gibbs; si ha, infatti:

$$dA = \gamma d\sigma \quad \text{e} \quad dG = \gamma d\sigma \quad (8.1)$$

dove dA e dG rappresentano entrambi il lavoro utile a far variare l'area superficiale di una quantità infinitesima $d\sigma$ e quindi a modificare l'energia del sistema, in condizioni diverse; infatti, si ricorda che $A = A(V,T)$ mentre $G = G(P,T)$.⁴

Il coefficiente γ si definisce *tensione superficiale* ed è il lavoro necessario per variare di 1cm^2 la superficie di contatto tra due fasi fluide, di norma il liquido ed il vapore sovrastante.

L'equilibrio tra la fase liquida (massiva) e la fase superficiale (attiva) può essere descritto mediante relazioni termodinamiche.

L'isoterma di adsorbimento di Gibbs (eq. 8.2) correla la variazione della tensione superficiale della soluzione, $\delta\gamma$, all'attività del soluto; nei limiti di soluzioni diluite l'attività è approssimabile alla concentrazione ($a_2 \cong c_2$):²

$$d\gamma = -R \cdot T \cdot \Gamma_2 \cdot d \ln c_2 \quad (8.2)$$

dove c_2 è la concentrazione molale del soluto e Γ_2 è la concentrazione superficiale in eccesso. Γ_2 può essere maggiore, minore o uguale a zero, a seconda che la concentrazione di soluto in fase superficiale sia in eccesso, in difetto o equivalente rispetto alla concentrazione della fase massiva. Alcune sostanze che hanno $\Gamma_2 > 0$ sono dette tensioattivi; esse avranno un andamento caratteristico.

Nelle soluzioni di tensioattivi, l'aumentare della concentrazione provoca una diminuzione della tensione superficiale fino ad un valore minimo, corrispondente alla concentrazione critica. Si possono avere, a seconda della cooperatività del processo, micelle vere e proprie, il cui limite di solubilità corrisponde alla *concentrazione micellare critica* (CMC); non è detto, però, che questa sia la regola. Si possono avere concentrazioni di associazione non critiche, come nel caso dei sali biliari (*limiting association concentration*), oppure *noncritical multimer concentration* (NMC); entrambe le definizioni si riferiscono ad aggregati formati da poche unità, il cui numero di aggregazione cresce con la concentrazione totale di soluto.⁵ Nel corso di questa Tesi ci si riferirà alla NMC del Metolachlor in acqua.

Riportando la tensione superficiale, γ , in funzione del logaritmo della concentrazione molale di Metolachlor in acqua, si ottiene una curva caratteristica con un andamento decrescente, seguito da un plateau (figura 8.1).

Una descrizione dettagliata dello strumento utilizzato e delle misure effettuate si trova nella parte sperimentale della tesi (capitolo 10).

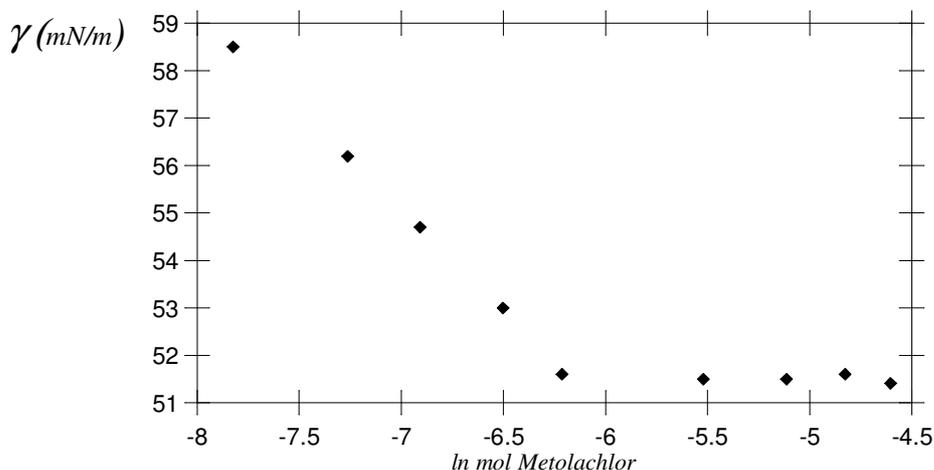


Figura 8.1: Variazione della tensione superficiale, γ , in funzione della concentrazione molale di Metolachlor (mol/mg) in H₂O.

8.2.1 Determinazione della NMC

Il valore di concentrazione a cui si osserva una variazione di pendenza della curva, è la NMC del Metolachlor in H₂O; raggiunto questo valore si ha la formazione di aggregati in soluzione e la saturazione della superficie da parte di molecole di Metolachlor, infatti, i valori di tensione superficiale sono all'incirca costanti al di sopra della NMC.

Il grafico in figura 8.1 mostra per il Metolachlor un valore di NMC pari a 2.0mM.

8.2.2 Concentrazione superficiale in eccesso ed area all'interfaccia

Mediante l'isoterma di Gibbs (eq. 8.2) è possibile ottenere ulteriori informazioni sul comportamento del Metolachlor all'interfaccia; è stata calcolata la concentrazione superficiale in eccesso, Γ_2 , in prossimità della NMC. Graficamente, è possibile ricavare il Γ_2 dal coefficiente angolare della retta γ in funzione del $\ln(c_2)$, che meglio approssima l'andamento nel tratto premicellare.

E' importante notare come l'andamento di γ in funzione di $\ln(c_2)$ non sia lineare; quindi, poiché Γ_2 è la tangente alla curva essa non è invariante con la composizione. Volendo esaminare l'andamento dei dati di tensione superficiale alle varie concentrazioni investigate, si possono trarre le seguenti considerazioni:

- 1) A concentrazioni molto basse, sono presenti poche molecole all'interfase e, quindi, lo spazio a disposizione per ciascuna di loro è grande (Γ sarà piccola);
- 2) All'aumentare della concentrazione, le molecole all'interfase tendono ad avvicinarsi, quindi, lo spazio a disposizione per ciascuna specie diminuisce, fino a raggiungere un valor minimo (Γ sarà grande);

Si possono definire i due stati come "liquido espanso" e "liquido compresso".⁶

Il valore massimo di Γ_2 ottenuto per il Metolachlor in acqua è 1.68×10^{-3} mol/m².

Una volta noto Γ_2 , è possibile calcolare l'area che la molecola occupa all'interfaccia aria - soluzione dalla seguente relazione:

$$A = \frac{10^{20}}{N_a \cdot \Gamma_2} \quad (8.3)$$

dove A è l'area per molecola, N_a il numero di Avogadro e Γ_2 la massima concentrazione superficiale in eccesso.

Il valore dell' area per molecola, ottenuto per il Metolachlor in acqua a 25°C è pari a 98.7 \AA^2 .

Un valore così elevato è congruente con la lunghezza delle catene laterali polari della molecola di Metolachlor che si dispongono sulla superficie.

8.2.3 *Termodinamica di aggregazione del Metolachlor*

La variazione di energia libera associata al processo di aggregazione può essere scritta nel seguente modo:

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln(X_{NMC}) \quad (8.4)$$

dove R è la costante universale dei gas, T la temperatura assoluta e X_{NMC} è la NMC espressa in frazione molare. Questa equazione è in accordo con il modello a separazione di fase, secondo il quale gli aggregati molecolari vengono considerati una fase vera e propria dispersa nel mezzo solvente; a tutti gli effetti, l'approssimazione a separazione di fase suppone che la NMC sia equivalente ad un prodotto di solubilità.

Per il Metolachlor si ha che $\Delta G = -15,4$ kJ/mol.

Il modello a separazione di fase può essere utilizzato per confrontare i processi di aggregazione, ΔG^0 , e di adsorbimento, ΔG^0_{ads} , mediante la seguente equazione:

$$\Delta G^0_{ads} = \Delta G^0 - \left(\frac{\pi_{NMC}}{\Gamma_2} \right) \quad (8.5)$$

dove π_{NMC} è la pressione superficiale, ed è la differenza tra la tensione superficiale del solvente e quella della soluzione alla NMC. I dati ottenuti per il Metolachlor sono riportati di seguito:

$$\Pi_{NMC} = 20.58 \text{ mN/m}$$

$$\Delta G^0_{ads} = -3.15 \text{ kJ/mol}$$

8.3 *Proprietà colligative: abbassamento del punto di congelamento*

L'abbassamento crioscopico è una proprietà colligativa che permette di determinare sperimentalmente il peso molecolare, soprattutto per le molecole di dimensioni medio-piccole, i coefficienti di attività di una specie in soluzione⁷ e il numero di aggregazione in sistemi aggreganti.

La variazione del punto di gelo, ΔT , si ottiene dalla misura di una differenza di potenziale che viene convertita in variazione di temperatura tramite una calibrazione con soluzioni acquose di NaCl a molalità nota.⁸ Una descrizione dettagliata dei principi su cui si basa la tecnica e dello strumento si trova nella parte sperimentale della tesi (capitolo 10).

L'equazione dell'abbassamento crioscopico descrive la dipendenza della variazione di temperatura dalla concentrazione del campione:

$$\Delta T = \nu \cdot K_C \cdot c_m \quad (8.6)$$

dove v è il numero di cariche presenti, che si formano per ionizzazione del soluto, K_C è la costante crioscopica del solvente e c_m è la concentrazione della soluzione espressa in molalità. La differenza di potenziale misurata è proporzionale alla concentrazione del campione secondo l'equazione:

$$\Delta V = vK'c_m \quad (8.7)$$

dove K' è una costante di conversione. Mettendo in relazione la (8.6) e la (8.7) si ha:

$$K' = \left(\frac{\Delta V}{\Delta T} \right) K_C \quad (8.8)$$

Infine, nota K' , è possibile calcolare l'abbassamento del punto di gelo del campione in esame, attraverso la seguente equazione:

$$\Delta T = K'c_m \quad (8.9)$$

Le misure sono state condotte su soluzioni acquose di Metolachlor a diverse concentrazioni comprese tra 10mM e 1mM.

La variazione della temperatura di congelamento in funzione della concentrazione di Metolachlor è riportata in figura 8.2:

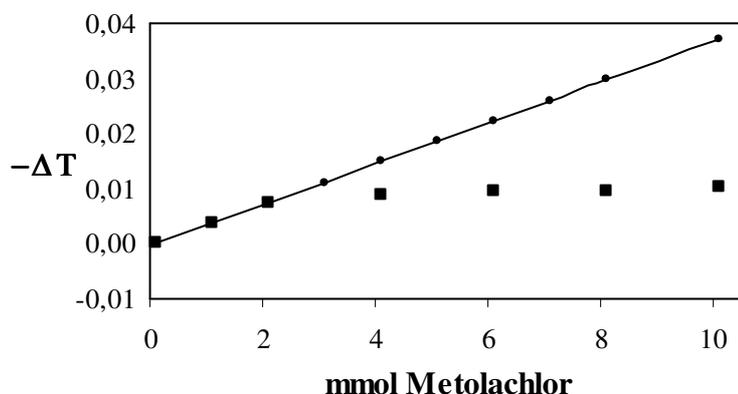


Figura 8.2: Variazione della temperatura di congelamento in funzione della concentrazione di Metolachlor espressa in molalità: la retta rappresenta l'andamento del ΔT delle soluzioni di NaCl a titolo noto.

Si osserva come per valori di concentrazione inferiore alla NMC la variazione di temperatura abbia lo stesso andamento delle soluzioni standard di NaCl, mentre oltre la NMC il ΔT rimane costante.

8.3.1 Coefficiente osmotico

Il coefficiente osmotico, ϕ , è stato calcolato dalle misure di abbassamento di punto di gelo, ΔT , in accordo con la seguente equazione:⁷

$$\phi = \frac{0.1278 \cdot \Delta T}{m \cdot \nu} \cdot (4.207 + 2.1 \cdot 10^{-3} \cdot \Delta T) \quad (8.10)$$

dove ν , numero degli ioni, nel caso del Metolachlor è pari a 1 ed m è la molalità.

In figura 9.3 viene riportato l'andamento ottenuto:

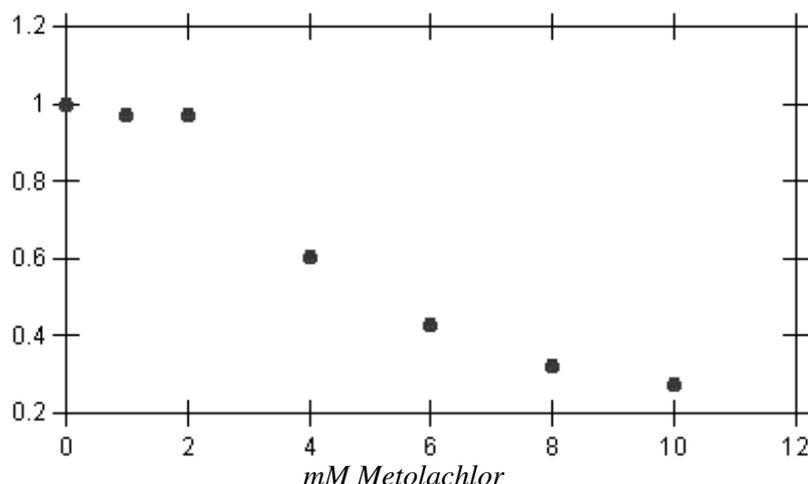


Figura 8.3: Coefficiente osmotico della soluzione di Metolachlor in acqua in funzione della molalità, calcolato dall'abbassamento del punto di gelo.

Dalla figura si osserva un andamento linearmente decrescente fino alla NMC (2.0 mM) e una diminuzione rapida del coefficiente osmotico con l'aumentare della concentrazione. Ciò conferma la presenza di un fenomeno di aggregazione.

8.3.2 Coefficiente di attività

Conoscendo il coefficiente osmotico è possibile determinare il coefficiente di attività del soluto:

$$\ln \gamma_{\pm} = (\phi - 1) \cdot \left(1 + \frac{1}{M_0} \int_{m=0}^{m^{1/2}} \frac{dm^{1/2}}{m^{1/2}} \right) \quad (8.11)$$

dove M_0 è il peso molecolare del solvente. Poiché l'integrale nell'equazione (8.11) diverge quando $m^{1/2}$ si avvicina allo zero, il limite inferiore dell'integrazione è stato sostituito da un valore diverso da zero,⁹ in particolare con il valore della concentrazione iniziale, in questo modo i valori di γ_{\pm} sono significativi nell'intero intervallo di concentrazione. Inoltre, per molecole non cariche $m^{1/2}$ viene sostituito da m ; la (8.11) diventa:

$$\ln \gamma = (\phi - 1) \cdot \left(1 + \frac{1}{M_0} \int_{m_0}^m \frac{dm}{m} \right) \quad (8.11a)$$

Dall'equazione (8.11a) è stato ottenuto il grafico che descrive la variazione del coefficiente di attività in funzione della concentrazione di Metolachlor in acqua:

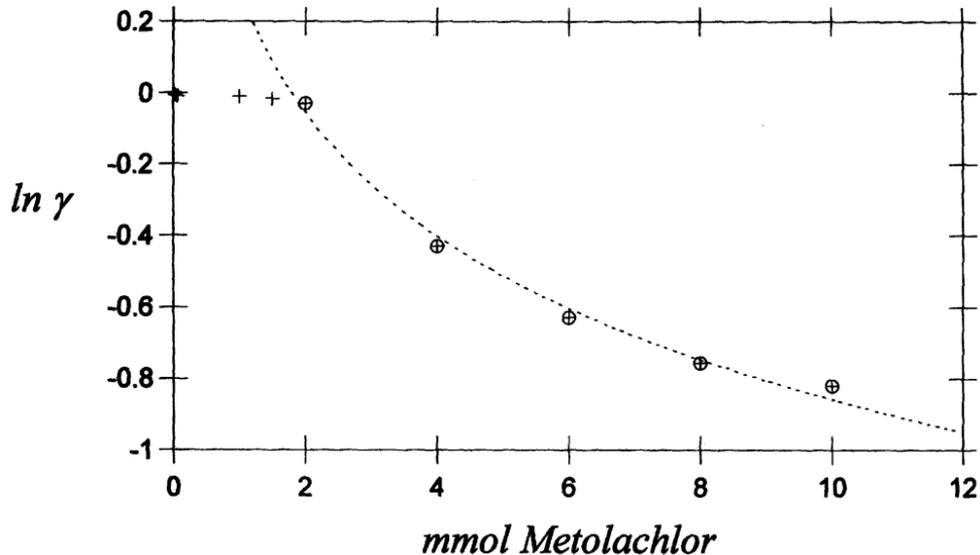


Figura 8.4: Coefficiente di attività in funzione della concentrazione molale di Metolachlor.

Dal grafico si osserva che: al di sotto della concentrazione corrispondente alla NMC la soluzione mostra comportamento ideale ($\gamma=1$); all'aumentare della concentrazione, oltre la NMC, vi è una notevole diminuzione del coefficiente di attività dovuto alla formazione di aggregati.

8.3.3 Calcolo del numero di aggregazione medio

Si può descrivere la termodinamica del processo di aggregazione attraverso il modello ad azione di massa¹⁰ per il quale il tensioattivo in forma molecolare coesiste all'equilibrio con la forma aggregata. Tale modello risulta particolarmente adatto per sistemi con catene laterali brevi, come nel caso del Metolachlor e, se usato correttamente, può essere utilizzato per il calcolo del numero di aggregazione.¹¹ Da questo modello risulta che:

$$\frac{\Delta G_a}{N} = -\frac{R \cdot T}{N} (\ln K_N) = -\frac{R \cdot T}{N} \ln \left[\frac{c_a}{(c_1)^N} \right] \quad (8.12)$$

dove N è il numero di aggregazione medio, K_N è la costante di equilibrio associata al processo di aggregazione e c_1 e c_a , sono rispettivamente le concentrazioni del monomero e degli aggregati.

Quindi, mentre il modello a separazione di fase, introdotto nella discussione sulla tensione superficiale, si riferisce ad un aggregato molecolare di numero di aggregazione non

specificato o, comunque, indefinito, il modello ad azione di massa si riferisce al trasferimento di un monomero dal bulk della soluzione ad un aggregato che contiene, in media, N molecole. Considerando i coefficienti di attività ottenuti dall'equazione (8.11a), la costante di equilibrio associata all'aggregazione, K_N , risulta essere uguale a:¹²

$$K_N = \frac{\gamma_a \cdot c_a}{(\gamma_1 \cdot c_1)^N} \quad (8.13)$$

dove γ_a e γ_1 sono i coefficienti di attività, rispettivamente, della specie in forma aggregata e monomerica ed N è il numero di aggregazione.

Sapendo che $c_1 = c_{tot}((\gamma_a - \gamma_1)/\gamma_a)$ e che $c_a = c_{tot}(\gamma_1/\gamma_a)$, con le opportune sostituzioni, si ottiene l'equazione da cui è possibile ricavare il numero di aggregazione, N :

$$\ln K_N + N \ln c_{tot} \cdot (\gamma_a - \gamma_1) = \ln c_{tot} \gamma_1 + (N - 1) \cdot \ln \gamma_a \quad (8.14)$$

Riportando su un grafico il $\ln c_{tot}(\gamma_a - \gamma_1)$ in funzione di $\ln c_{tot} \gamma_1$ si ottiene una retta che ha per coefficiente angolare il valore di aggregazione medio, N .

Dai valori dei coefficienti di attività ottenuti il numero di aggregazione medio per il Metolachlor risulta essere pari a 11 ± 2 .

8.4 *Misure di viscosità*

Quando un liquido fluisce in un capillare gli strati di liquido che lo compongono scivolano uno sull'altro; la forza, f , associata a questo processo è:

$$f = \eta \cdot A \frac{\partial v_x}{\partial z} \quad (8.15)$$

dove η è la viscosità, A l'area dello strato di liquido e v la velocità di moto.

In un capillare la relazione tra la viscosità e la velocità di scorrimento del fluido è esprimibile nel modo seguente:

$$\eta = \frac{(\pi \cdot r^4 \cdot t \cdot h \cdot g \cdot d)}{(8 \cdot L \cdot V)} \quad (8.16)$$

dove r è il raggio del capillare, t il tempo di scorrimento, h l'altezza del liquido, g la costante gravitazionale, d la densità del liquido, V il volume del capillare ed L la sua lunghezza.

Essendo r , h , g , V ed L delle costanti, si può considerare, per agevolare i calcoli, la viscosità relativa, η_{rel} , definita nel seguente modo:

$$\eta_{rel} = \frac{d \cdot t}{d_0 \cdot t_0} \quad (8.17)$$

dove d_0 e t_0 sono, rispettivamente, la densità ed il tempo di scorrimento di un liquido di riferimento, nel nostro caso l'acqua.

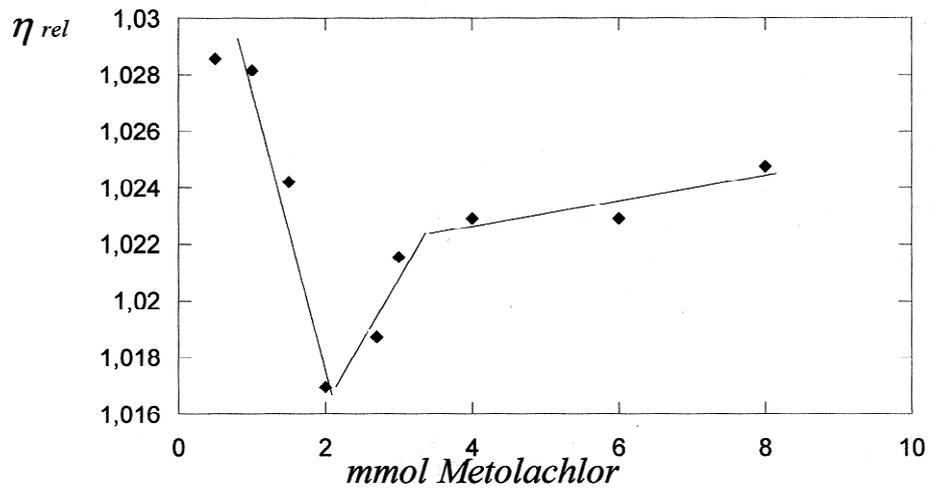


Figura 8.5: Viscosità relativa in funzione della concentrazione di Metolachlor in acqua a 25°C.

Dal grafico mostrato in figura 8.5 si osserva che la viscosità del sistema varia nettamente in corrispondenza della NMC e ciò indica l'inizio dell'aggregazione. Inoltre, si vede che la viscosità a concentrazioni superiori alla NMC risulta minore di quella delle soluzioni a concentrazione minore della NMC. Tale comportamento può essere compreso considerando che: all'aumentare del tensioattivo in forma molecolare, parte di esso passa in soluzione e parte tende ad adsorbire all'interfase, nel caso di un capillare, l'interfase sarà soluzione-vetro. L'adsorbimento sulle pareti di vetro del capillare fa sì che il numero effettivo di molecole presente in soluzione sia minore, il volume effettivo del capillare sia minore e il tipo di forze che agiscono all'interfase sia modificato.

8.4.1 Calcolo del Volume idrodinamico

Secondo la teoria di Einstein si considera un soluto come se fosse composto da sfere solide disperse in un continuo; questa approssimazione è valida quando le dimensioni del soluto sono molto maggiori di quelle del solvente.

Qualunque sia la sua forma, la particella di soluto ruota durante il moto trascinando con sé un certo volume di solvente, conseguentemente, il volume occupato dalla particella stessa risulta essere maggiore di quello reale: si parla, allora, di *volume idrodinamico* associato alla particella in moto.

E' stato calcolato il volume idrodinamico medio degli aggregati del Metolachlor in acqua a partire dall'equazione di Vand che descrive la variazione della viscosità al di sopra della NMC:¹³

$$\frac{\log \eta_{rel}}{c} = A_3 + Q' \log \eta_{rel} \quad (8.18)$$

dove, η_{rel} è la viscosità relativa calcolata nel paragrafo precedente, c è la concentrazione, A_3 è una costante legata al volume dell'aggregato e Q' è un parametro che tiene conto delle interazioni tra gli aggregati e del moto browniano. A_3 viene calcolato graficamente, riportando il $\ln \eta_{rel}/c$ in funzione di $\ln \eta_{rel}$. Naturalmente i dati si riferiscono a concentrazioni superiori alla NMC e la curva è stata riportata in scala.

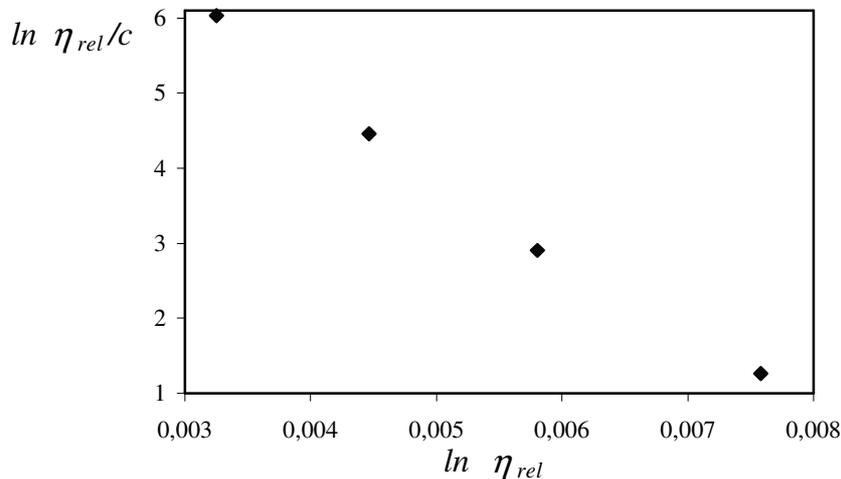


Figura 8.6: $\ln \eta_{rel}/c$ in funzione di $\ln \eta_{rel}$ a 25°C

La curva mostra un andamento lineare all'aumentare della concentrazione, a temperatura costante.¹⁴

Una volta noto A_3 è possibile calcolare il volume idrodinamico, ovvero il volume occupato dal monomero in forma aggregata, circondato dalla shell di idratazione:

$$V = \frac{2.303}{a_1} \cdot A_3 \quad (8.19)$$

dove a_1 è un fattore di forma che vale 7.5 per oggetti ellissoidali.

Per il Metolachlor è stato stimato un volume idrodinamico pari a 2,7 litri/mole; è bene notare che per ottenere tale dato sono state compiute una serie di approssimazioni, infatti, non è stata presa in considerazione la variazione di volume conseguente all'aggregazione e il fattore di

forma, a_1 , è valido per grandi ellissoidi e quindi nel caso di piccoli aggregati si introduce un errore.

Considerando i dati con la dovuta cautela, ne risultano raggi idrodinamici degli aggregati prossimi a circa 3nm. Tale valore è in ragionevole accordo con i dati di diffusione ottenuti da misure NMR. E' importante anche notare che confrontando tra loro i volumi idrodinamici e quelli parziali molari è possibile, in linea di principio, valutare il numero di molecole di acqua legate al Metolachlor. Supponendo che la densità del soluto sia la stessa che in forma nativa e trattando opportunamente i dati, il numero di molecole di solvatazione, \bar{n} , è ottenuto da:

$$\bar{n} = \frac{V_\eta - v_2}{18.00} \quad (8.20)$$

Dove V_η è il volume idrodinamico e v_2 è il volume parziale molare.

Nel caso presente \bar{n} è pari a circa 2-3 molecole per testa polare.

L'analisi delle proprietà chimico-fisiche del sistema costituito dal Metolachlor in soluzione acquosa a diverse concentrazioni è in accordo con i dati ottenuti mediante tecniche spettroscopiche e conferma la formazione di aggregati molecolari, in particolare:

- mediante misure di tensione superficiale è stata determinata la NMC, l'area superficiale per molecola e la variazione di energia libera legata ai processi di aggregazione e di adsorbimento.
- dalle misure di crioscopia è stata determinata la variazione del punto di gelo in seguito alla formazione dell'aggregato, il coefficiente osmotico, il coefficiente di attività e il numero di aggregazione medio.
- mediante misure di viscosità è stato calcolato il volume idrodinamico medio dell'aggregato ed è stata effettuata una stima del raggio idrodinamico medio e del numero di solvatazione.

Riferimenti bibliografici

1. Le misure sono state eseguite presso il laboratorio del Prof. La Mesa, Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza".
2. Recenti pubblicazioni sullo studio di sistemi aggregati mediante proprietà chimico-fisiche: a) Capalbi, A.; Gente, G.; La Mesa, C. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2004**, 246, 99-108; b) Antonelli, M. L.; Capalbi, A.; Gente, G.; Palacios, A. C.; Sallustio, S.; La Mesa, C. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2004**, 246, 127-134.
3. Adamson, A.W. *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th Ed., **1990**, Wiley, New York, Cap. III, p.75;
4. Atkins, P.W. *Chimica Fisica*, 3rd Ed., **1997**, Zanichelli, Milano, Cap. XVIII, p.927.
5. Roda, A.; Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 6362-6370.
6. Adamson, A. W.; *Physical Chemistry of Surfaces*, Cap. II, 4, 5th ed. Wiley, New York **1990**.
7. Desnoyers, J. E.; Caron, G.; De Lisi, R.; Roberts, D.; Roux, A.; Perron, G. *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 1397-1406.
8. Robinson, R.A.; Stokes, R.H. *Electrolyte Solutions*, 2nd ed.; Academic, New York, **1959**, p.484.
9. Rajagopalan, N; Vadnere, M.; Lindenbaum, S. *J. Solution Chem.* **1981**, 10, 785-789.
10. a) Mukerjee, P. *Physical Chemistry: Enriching Topics from Colloid and Surface Science* Van Holfen, H., Mysels, K. J., Eds.; Theorex: La Jolla, CA, **1975**; Chapter 9; b) Rosenholm, J. B.; Burchfield, T. E.; Hepler, L. J. *J. Colloid Interscience Sci.* **1980**, 78, 191-194.
11. Burchfield, T. E.; Woolley, E. M. *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 2155-2163.
12. a) La Mesa, C. *Colloid Polim. Sci.* **1990**, 268, 959-963; b) Sesta, B.; La Mesa, C. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 1450-1454.
13. a) Vand, V. *J. Phys. Chem.* **1948**, 52, 277-299; b) Ekwall, P.; Salyom, P. *Kolloid. Z. Z. Polym.* **1969**, 233, 945-956; c) Fontell, K. *Kolloid. Z. Z. Polym.* **1971**, 246, 614-625.
14. Ekwall, P.; Holberg, P. *Acta Chem. Scand.* **1965**, 19, 573-580.

Capitolo 9: Tentativo di simulazione dell'aggregazione mediante metodi di Dinamica Molecolare

In questo capitolo verranno presentati i principi teorici che sono alla base della Dinamica Molecolare, gli algoritmi maggiormente utilizzati per la risoluzione delle equazioni del moto e per l'imposizione di vincoli al sistema in studio ed i risultati ottenuti dalle simulazioni effettuate sulla molecola di Metolachlor.

È però necessario premettere che i dati ottenuti sono presentati solamente per rigore scientifico ma non hanno condotto ai risultati sperati. Nelle conclusioni del capitolo verranno elencati i principali limiti delle simulazioni effettuate e i probabili “errori” commessi nella scelta del campo di forze utilizzato.

9.1 *Introduzione*

La Dinamica Molecolare, DM, è una tecnica computazionale che permette di studiare, mediante simulazioni al computer, l'evoluzione temporale di modelli di sistemi molecolari a partire dalla risoluzione delle equazioni classiche del moto di Newton. Le funzioni di potenziale empiriche usate per rappresentare questi modelli di sistemi molecolari sono basate su una descrizione semplificata delle interazioni atomiche ottenute attraverso la parametrizzazione di dati sperimentali. Da questi potenziali si ricavano le forze che agiscono sulle particelle e, tramite i principi della meccanica classica, l'evoluzione del sistema nel tempo.

Dalle traiettorie così ottenute si possono calcolare le proprietà strutturali e termodinamiche del sistema simulato; infatti, il movimento degli atomi che compongono la struttura molecolare durante una simulazione di DM riproduce il loro stato di moto costante alla temperatura considerata e permette di campionare lo spazio conformazionale accessibile al sistema durante il tempo della simulazione. Questo calcolo è possibile in accordo con l'ipotesi ergodica che stabilisce l'equivalenza (per tempi molto lunghi) tra la media sul tempo e quella sull'insieme statistico. Le simulazioni permettono di studiare processi chimici e biologici, di predire le proprietà di proteine modificate e di analizzare le interazioni tra piccole molecole e macromolecole.^{1,2}

9.2 Limiti ed approssimazioni

Come tutte le tecniche di calcolo che studiano modelli di sistemi fisici anche la dinamica molecolare è soggetta ad assunzioni ed approssimazioni, è importante conoscerle per evitare di sovrastimare la capacità e i risultati del metodo.

I problemi sono fondamentalmente di due tipi:

1. la scelta accurata delle dimensioni dello spazio delle fasi accessibili al sistema simulato.
2. l'accuratezza del modello molecolare o del campo di forze che viene usato per simulare il sistema.

Tabella 9.1: Livelli di approssimazioni di modelli usati in DM.

Modello	Gradi di libertà		Esempi di	
	trattati	rimossi	proprietà	campi di forze
quanto- meccanico	nuclei ed elettroni	nucleoni	reazioni chimiche	coulombiano
con atomi polarizzabili	atomi, dipoli	elettroni	legami di substrati carichi	modello ionico
con atomi non polarizzabili	atomi di soluto e solvente	dipoli	idratazione	OPLS, GROMOS ³
con atomi del soluto	atomi del soluto	atomi del solvente	conformazione in fase gassosa	MM2
con gruppi di atomi come sfere rigide	tutti i gruppi atomici	singoli atomi	struttura terziaria di macromolecole (proteine)	LW

9.3 Le equazioni del moto

Si può avere la descrizione completa del moto di un sistema di particelle usando l'equazione di Schrödinger dipendente dal tempo:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}, t) = -i\frac{\hbar}{2\pi} \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\mathbf{r}, t) \quad (9.1)$$

dove l'operatore di Hamilton H è composto da un termine di energia cinetica

$-(\hbar^2/8\pi^2 m_i)\partial^2/\partial r_i^2$ per ogni particella i -esima con massa m_i del sistema e da un termine di interazione tra le particelle $V(r_1, r_2, \dots, r_N) \equiv V(\mathbf{r})$.

Tutte le informazioni sul sistema sono allora date dalla funzione d'onda $\Psi(\mathbf{r}, t)$ che soddisfa l'equazione (9.1). Come si è visto precedentemente questo tipo di descrizione per sistemi molto grandi non è attualmente utilizzabile, perciò si ricorre ad approssimazioni. È possibile dividere il sistema in due tipi di particelle: nuclei ed elettroni, il cui moto può essere separato usando l'approssimazione di Born-Oppenheimer.

Così, è possibile descrivere il sistema come un insieme di masse puntiformi in un campo di potenziale *effettivo* ed in più si può ragionevolmente pensare di descrivere a temperatura ambiente il moto dei nuclei con le leggi della meccanica classica, tranne i più leggeri (H ed He) per i quali è necessaria una trattazione quantistica. Si possono formulare le equazioni del moto in vari modi: per la dinamica molecolare si usa il più semplice, cioè quello di Newton:

$$\dot{\mathbf{r}}_i(t) = \mathbf{v}_i(t) \quad (9.2)$$

$$m_i \dot{\mathbf{v}}_i(t) = \dot{\mathbf{F}}_i(t) \quad (9.3)$$

con r_i v_i rispettivamente le coordinate cartesiane e le velocità di una particella i -esima di massa m_i e $F_i(t)$ la forza che agisce sulla particella i -esima, che per sistemi conservativi è funzione delle sole coordinate:

$$\mathbf{F}_i \equiv -\frac{\partial}{\partial \mathbf{x}_i} V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \equiv V(\mathbf{r}) \quad (9.4)$$

Le formulazioni Lagrangiana ed Hamiltoniana vengono usate per descrivere in modo semplice ed elegante alcuni aspetti metodologici della DM come vincoli, accoppiamento termico, etc.

Le equazioni (9.2) e (9.3) vengono integrate numericamente usando opportuni algoritmi.

9.4 *La funzione di potenziale*

Poiché il metodo simulativo della DM si basa sulle equazioni di Newton il punto cruciale è la scelta della funzione di potenziale V . Questa in genere è funzione delle coordinate atomiche r_i e di un certo numero di parametri $s \equiv (s_1, s_2, \dots, s_M)$ e si presenta come la somma di vari contributi classificati a seconda del numero di atomi coinvolti:

$$V(\mathbf{r}_i; \mathbf{s}) = \sum_i V^{(1)}(\mathbf{r}_i; \mathbf{s}) + \sum_{i,j} V^{(2)}(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j; \mathbf{s}) + \dots + \sum_{\text{tutti}} V^{(N)}(\mathbf{r}; \mathbf{s}) \quad (9.5)$$

dove il primo termine rappresenta le interazioni ad 1 atomo, il secondo quelle a 2, fino alle interazioni a N atomi.

Si può dividere la funzione di potenziale in tre parti:

- (a) Legame: stretching del legame covalente, bending degli angoli, diedri propri e impropri.
- (b) Non-legame: Lennard-Jones o Buckingham e Coulomb o Coulomb modificata.
- (c) Speciali: vincoli sulle posizioni e sulle distanze.

Un esempio di funzione (campo di forze) molto usata nelle librerie di molti programmi di simulazione di dinamica molecolare è la seguente:

$$\begin{aligned}
V(r_1, r_2, \dots, r_N) = & \sum_{\text{legami}} \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angoli}} \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
+ & \sum_{\text{diedri impropri}} \frac{1}{2} K_\xi (\xi - \xi_0)^2 + \sum_{\text{diedri}} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
+ & \sum_{\text{coppie}(i,j)} \left[\left(\frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} \right] + \text{Termini} \\
& \text{Speciali}
\end{aligned} \tag{9.6}$$

Il primo termine rappresenta lo stretching di legame tra due atomi legati covalentemente secondo un potenziale armonico dove b_0 è la lunghezza che corrisponde al minimo di energia e K_b è la costante di forza del legame. Questi due valori dipendono ovviamente dal tipo di legame ovvero dalla coppia di atomi. Conseguentemente a questo potenziale corrisponderà una forza:

$$\mathbf{F}_i(\mathbf{r}_{ij}) = k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij}) \frac{-\mathbf{r}_{ij}}{r_{ij}} \tag{9.7}$$

Il secondo termine è un'interazione a tre corpi relativa all'energia dovuta alla deformazione dell'angolo di valenza; anche questo è un potenziale armonico dove ϑ_0 è l'angolo di valenza di riferimento e K_ϑ la costante di forza. Anche in questo caso si avrà una forza corrispondente:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{dV(\vartheta_{ijk})}{d\mathbf{r}_i} \quad \mathbf{F}_k = -\frac{dV(\vartheta_{ijk})}{d\mathbf{r}_k} \quad \mathbf{F}_j = -\mathbf{F}_i - \mathbf{F}_k \tag{9.8}$$

dove:

$$\vartheta_{ijk} = \arccos \frac{(\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{r}_{kj})}{r_{ij} r_{kj}} \tag{9.9}$$

La numerazione i, j, k è secondo la sequenza del legame covalente degli atomi, con j atomo centrale.

Il secondo e terzo termine sono usati per descrivere le interazioni a quattro termini, ovvero i cosiddetti *diedri propri* e *diedri impropri*. Il diedro proprio è usato per mantenere planari i gruppi planari, come per esempio gli anelli aromatici o per evitare che i gruppi tetraedrici si rivoltino nella loro immagine speculare. Il diedro improprio A-X-Y-B è definito come l'angolo tra il piano passante tra gli atomi A, X e Y ed il piano passante per gli atomi X, Y e B.

Anche questo è un potenziale di tipo armonico. Il termine relativo ai diedri propri si riferisce ai normali angoli diedri (in accordo con la convenzione IUPAC/IUB) con φ l'angolo tra i piani

ijk e jkl , dove lo zero corrisponde alla configurazione cis, cioè i e l sullo stesso lato. Nell'equazione (9.6) K_ϕ è la costante di forza, n la molteplicità dei minimi e δ la fase.

L'ultimo termine nella (9.6) si riferisce ancora ad interazioni a coppie, descrivendo quelle relative ad atomi non legati; ovvero le interazioni di van der Waals e Coulombiane tra gli atomi i e j aventi carica q_i e q_j posti ad una distanza r_{ij} . In questo caso si sono rappresentate le interazioni di van der Waals con una funzione LJ per cui nella matrice dei parametri di non-legame LJ si avrà:

$$C_{ij}^{(6)} = (C_{ii}^{(6)} * C_{jj}^{(6)})^{1/2} \quad C_{ij}^{(12)} = (C_{ii}^{(12)} * C_{jj}^{(12)})^{1/2} \quad (9.10)$$

la cui forza corrispondente è data da:

$$\mathbf{F}_{ij}(\mathbf{r}_{ij}) = \left(12 \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - 6 \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \right) \frac{\mathbf{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (9.11)$$

Alternativamente si possono usare le funzioni di Buckingham⁴ che hanno un termine repulsivo più flessibile e realistico:

$$V_{bh} \approx A_{ij} \exp(-B_{ij}r_{ij}) - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (9.12)$$

la cui forza corrispondente è data da:

$$\mathbf{F}_i(r_{ij}) = \left[-A_{ij}B_{ij}r_{ij} \exp(-B_{ij}r_{ij}) - 6 \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \frac{\mathbf{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (9.13)$$

Nel caso di atomi legati covalentemente o separati da due legami le interazioni di non legame non vengono generalmente calcolate mentre qualora siano separati da tre legami, i parametri sono ridotti per evitare le forti repulsioni che si avrebbero a corte distanze. Il secondo termine del potenziale a due corpi di non legame è l'interazione Coulombiana da cui deriva la forza:

$$F_i(r_{ij}) = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}^2} \frac{\mathbf{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (9.14)$$

I parametri utilizzati in questi campi di forza possono essere ottenuti in due modi. Il primo metodo consiste nel correlare questi parametri con i risultati di calcoli quantistici ab initio su piccoli aggregati molecolari; ma spesso i campi di forza così ottenuti non sono soddisfacenti a causa delle molte approssimazioni che è necessario compiere. Si possono alternativamente tarare i parametri del campo di forza con dati sperimentali (strutture cristallografiche, energie e dinamiche di reticolo, dati spettroscopici, proprietà di liquidi come densità ed entalpia di vaporizzazione, energia libera di solvatazione, dati di NMR, etc.).^{5,6,7,8}

9.5 Condizioni al contorno

Quando si simula un sistema molecolare sorge il problema di definire lo spazio di simulazione. In genere si pone il sistema che si vuole simulare in una scatola (cubica o comunque di una qualsiasi forma purché consenta di riempire tutto lo spazio) e si applicano le condizioni periodiche (CP).

Le condizioni periodiche al contorno (o *Periodic boundary conditions*, PBC) riportano la simulazione di un sistema molecolare in una griglia periodica fatta di sotto unità identiche; così si può includere l'influenza del solvente o di un intorno cristallino e con ciò aumentare il rigore e il realismo del modello molecolare.

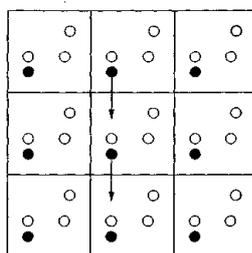


Figura 9.1: Esempio di scatola cubica periodica.

9.6 Vincoli in DM

Si possono applicare vari tipi di vincoli nelle simulazioni di DM, i più comuni sono: quelli che bloccano le posizioni di determinati atomi, detti di *Position Restrain* (PR) e quelli che eliminano le vibrazioni dei legami ad alta frequenza come l'algoritmo SHAKE.

Position Restrain

Si rende spesso utile, durante una simulazione, bloccare le posizioni di alcuni atomi. Questo si può ottenere in due modi: il primo consiste nell'aggiungere dei vincoli perfetti al sistema riducendo il numero di gradi di libertà totali (*position constraint*); il secondo consiste nell'usare un potenziale fittizio, generalmente armonico, che costringa le posizioni di un atomo (*position restrain*). Quindi, in un caso si bloccano le coordinate interne e nell'altro le coordinate cartesiane.

Algoritmo SHAKE

L'uso di vincoli in DM nasce dalla necessità di eliminare le vibrazioni dei legami ad alta frequenza che richiedono passi di integrazione brevi ed aumentano in maniera consistente il tempo di calcolo. Il metodo più comunemente utilizzato è il cosiddetto SHAKE:⁹ questo è una procedura iterativa che dopo ogni passo di integrazione varia le posizioni iniziali $r'_i(t + \Delta t)$ degli atomi finché tutte le condizioni di vincolo non vengano soddisfatte nelle nuove posizioni $r_i(t + \Delta t)$.

L'uso di SHAKE se consente di aumentare il passo di integrazione di 2-4 volte presenta comunque alcuni svantaggi:

- (a) può dare problemi di convergenza quando viene applicato a grandi gruppi planari;
- (b) costituisce generalmente un collo di bottiglia computazionale nella parallelizzazione dell'algoritmo;
- (c) in alcune applicazioni il vincolo dei legami costituisce un modello fisico non realistico.

9.7 Algoritmi per l'integrazione delle equazioni del moto

La Dinamica Molecolare simula l'evoluzione di un sistema finito di particelle attraverso l'integrazione delle equazioni del moto di Newton. Per integrare queste equazioni differenziali del secondo ordine si utilizzano metodi numerici alle differenze finite, non esistendo la soluzione analitica.

È possibile differenziare i vari algoritmi per la precisione del calcolo (ordine dell'algoritmo), per l'occupazione di memoria e per il tipo di rappresentazione. La natura degli algoritmi deriva dallo sviluppo in serie di Taylor di $r_i(t + \Delta t)$ e $r_i(t - \Delta t)$. L'algoritmo più usato è quello di Verlet,^{10,11} sebbene esistano anche algoritmi più accurati.^{12,13,14} Una variante dell'algoritmo di Verlet molto usato nei programmi di DM è il cosiddetto *leap-frog*, questo algoritmo è molto efficiente dal punto di vista computazionale, poiché richiede meno CPU e memoria rispetto ad altri più avanzati.

9.8 Controllo della temperatura

Per avere una simulazione che riproduca le condizioni sperimentali è necessario che la temperatura e la pressione vengano mantenute costanti, ciò si ottiene trattandole come variabili indipendenti e non come proprietà derivate. Il metodo comunemente usato per il controllo della temperatura è quello del bagno termico o bagno di Berendsen;¹⁵ l'algoritmo simula l'accoppiamento del sistema con un bagno termico esterno T_0 e la forza dell'interazione tra questo e il sistema è determinata da una costante di tempo τ che può essere opportunamente scelta.

9.9 Determinazione di parametri strutturali

Una volta generata attraverso la DM la traiettoria del sistema, si possono ottenere informazioni sulle sue proprietà strutturali. A seconda della natura del sistema stesso (macromolecola, fluido, ...) si effettuano analisi di diverso tipo.

Un'informazione utile che si può ottenere dalla simulazione di una molecola, è l'entità della deviazione delle posizioni atomiche dalla struttura iniziale (*Rmsd*). Si calcola la deviazione quadratica media (*root mean square deviation*, RMSD) di tutti o solo di alcuni atomi in una molecola, a partire da una struttura di riferimento.

Altrimenti, se il sistema si trova all'equilibrio, si può mediare nel tempo il valore della RMSD, per ottenere informazioni sulla deviazione del singolo atomo (o residuo) rispetto alla posizione di riferimento.

9.10 *Simulazione di Dinamica Molecolare sul Metolachlor*¹⁶

9.10.1 *Struttura della molecola: topologia e gruppi di carica*

Per uno dei quattro isomeri del Metolachlor (isomero SS) è stata costruita la topologia manualmente: dopo aver costruito la struttura con il programma Insight II, sono stati numerati in successione tutti gli atomi della molecola ed è stato compilato un elenco dei legami, delle coppie (atomi a tre legami di distanza), degli angoli e dei diedri propri ed impropri. Successivamente, sono state calcolate le cariche atomiche con il programma¹⁷ Gaussian 99 e sono stati costruiti i gruppi di carica in modo tale che la carica totale della molecola risultasse zero.

9.10.2 *Minimizzazione dell'energia*

Ciascuno dei quattro isomeri del Metolachlor (SS/RR, SR/RS) è stato sottoposto ad un processo di minimizzazione dell'energia nel vuoto.

È stato possibile minimizzare l'energia (vedi tabella 9.2) solamente per l'isomero SS; il problema non è stato superato neanche ricalcolando il valore delle cariche come suggerito da Torrents et al.¹⁸

La tabella 9.2 mostra i valori energetici (kJ mol^{-1}) ottenuti per l'isomero SS minimizzato:

Tabella 9.2: Risultati ottenuti dalla minimizzazione dell'energia per l'isomero SS del Metolachlor.

Met1(SS)	
Angoli	61.56
Diedri propri	8.75
Diedri impropri	50.27
Lennard-Jones 1-4	1.17
Coulomb 1-4	-158.22
Lennard-Jones (SR)	-133.38
Coulomb (SR)	-8.29
Coulomb (LR)	-112.86
Energia potenziale	-291.00

9.10.3 *Simulazione di Dinamica Molecolare di una molecola di Metolachlor*

Una volta minimizzata l'energia, l'isomero SS è stato sottoposto ad una simulazione di DM.

Inizialmente la simulazione è stata effettuata nel vuoto ad una temperatura di 1000K per 60 ps (figura 9.2).

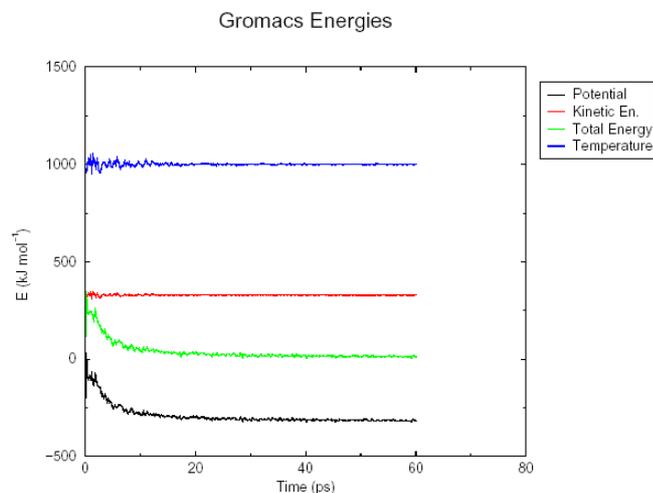


Figura 9.2: Simulazione di DM per l'isomero SS a 1000K per 60ps.

La figura 9.2 mostra l'andamento nel tempo dei valori energetici: l'energia potenziale e l'energia totale della molecola nei primi 10ps raggiungono il valore minimo che poi rimane costante per il resto della simulazione. La temperatura e, quindi, l'energia cinetica restano invariate durante la simulazione.

Successivamente, è stato operato un abbassamento della temperatura a partire da 1000K fino ad arrivare a 300K in 50ps (Simulated Annealing).

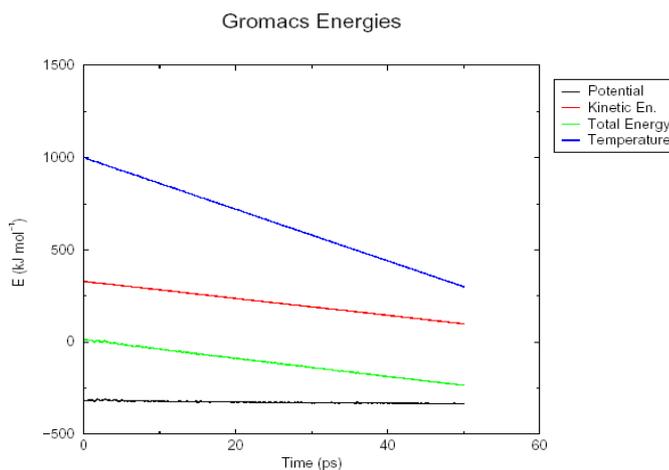


Figura 9.3: Simulated Annealing da 1000K a 300K in 50ps.

Durante la variazione di temperatura l'energia potenziale si mantiene costante confermando il raggiungimento del minimo di energia.

A questo punto è stato possibile aggiungere molecole di acqua al box di simulazione; è stata operata una minimizzazione delle sole molecole di acqua, fissando la molecola di soluto con un position restrain e successivamente è stato minimizzato l'intero sistema (solvente+soluto). Si è proceduto alla simulazione di DM per 200ps e per 2ns a 300k del sistema costituito da una molecola di Metolachlor (isomero SS) e 459 molecole di acqua (figura 9.4).

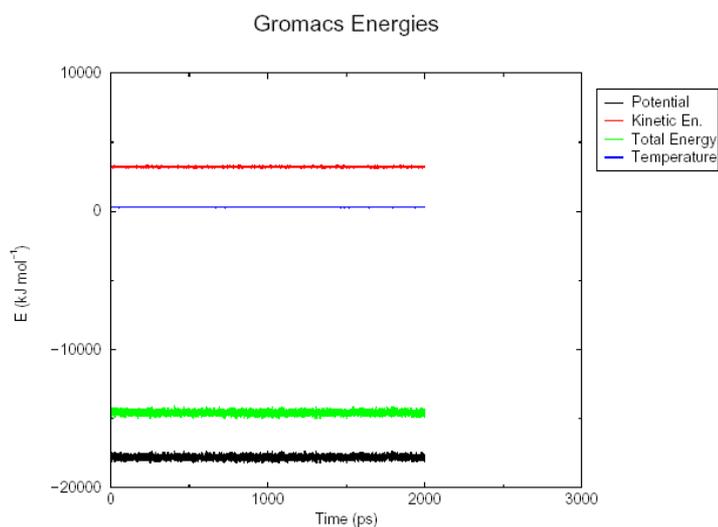


Figura 9.4: Simulazione di DM di una molecola di Metolachlor (isomero SS) e 459 molecole di acqua a 300K per 2ns.

9.10.4 Simulazione di Dinamica Molecolare di due molecole di Metolachlor

E' stata effettuata una simulazione nel vuoto a 1000K di due molecole di Metolachlor senza applicare alcun vincolo. Successivamente è stato operato un Simulated Annealing da 1000K a 300K in 50 ps tenendo conto dei vincoli.

I vincoli applicati derivano dai contatti NOE ottenuti dagli spettri 2D NOESY (capitolo 5). I valori degli integrali delle spots NOESY si traducono in distanze interatomiche alle quali vengono assegnati valori di 3, 4 o 5 Å a seconda che l'interazione sia debole, media o forte.

È stato applicato un potenziale semi-armonico che vincolasse la molecola a soddisfare le distanze NOE.

E' stata poi, aggiunta l'acqua al box di simulazione e, come nel caso della molecola singola di Metolachlor, è stata operata una minimizzazione delle sole molecole di acqua e successivamente la minimizzazione dell'intero sistema (solvente+soluto). Si è proceduto alla simulazione di DM per 2ns a 300k.

Osservando la variazione dei vincoli assegnati al sistema durante la simulazione è possibile individuare degli intervalli di tempo in cui questi restano costanti e, quindi, considerare le disposizioni intermolecolari nei due intervalli di tempo in cui le distanze rimangono costanti; in

figura 9.5 viene mostrata la variazione durante 2ns di uno dei vincoli utilizzati, gli altri due vincoli mostrano variazioni analoghe:

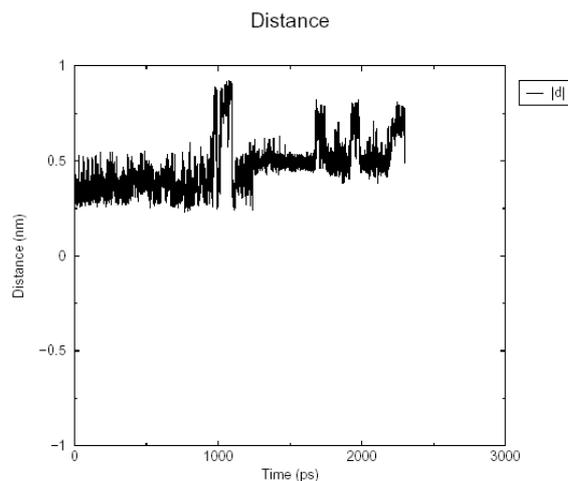


Figura 9.5: Variazione di uno dei vincoli applicati alla DM durante 2ns a 300K.

Nei due intervalli di tempo in cui i vincoli rimangono costanti, tra 0 e 800ps e tra 1450 e 1700ps si ottengono le disposizioni intermolecolari mostrate in figura 9.6:

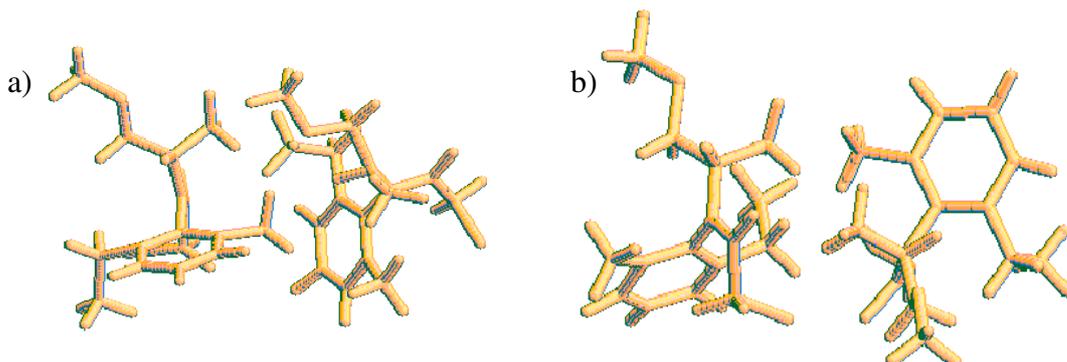


Figura 9.6: Disposizioni intermolecolari tra due molecole di Metolachlor (isomero SS) a 300K tra: **a)** 0 e 800ps; **b)** 1450 e 1700ps.

Dalla struttura mostrata in figura 9.6 è possibile ottenere dei dati strutturali:

RMSF

L'analisi RMSF calcola le fluttuazioni dei singoli atomi durante la simulazione rispetto ad una struttura iniziale di riferimento (figura 9.7a).

RMSD

L'analisi RMSD mostra le deviazioni, durante la simulazione, dell'intera struttura della molecola da una struttura iniziale di riferimento (figura 9.7b). Si vede come le due molecole di Metolachlor compiano delle fluttuazioni notevoli nel corso della simulazione, in particolare, si osserva che gli atomi che si allontanano maggiormente dalla struttura di riferimento sono quelli appartenenti alle

catene laterali, questo è, ovviamente, dovuto alla maggiore mobilità delle catene alchiliche rispetto all'anello aromatico.

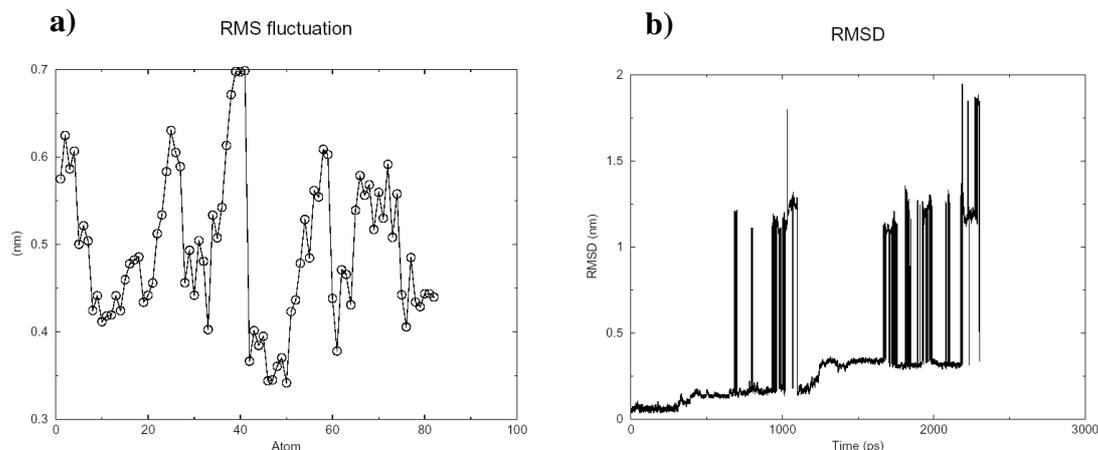


Figura 9.7: a) RMSF; b) RMSD.

9.10.5 Simulazione di Dinamica Molecolare di quattro molecole di Metolachlor

La procedura utilizzata per la simulazione di DM di quattro molecole di Metolachlor è analoga a quella descritta nel paragrafo precedente e può essere riassunta nel modo seguente:

- Simulazione per 60 ps di una molecola nel vuoto a 1000 K;
- Simulated Annealing: 1000 K \rightarrow 300 K in 50 ps;
- dinamica molecolare per 100 ps a 300 K;
- aggiunta dell'acqua al box di simulazione;
- minimizzazione delle sole molecole di acqua;
- minimizzazione dell'intero sistema (solvente + soluto);
- dinamica molecolare per 2 ns a 300 K.

Possibili strutture che soddisfano i dati ottenuti dalla simulazione sono mostrati in figura 9.8:

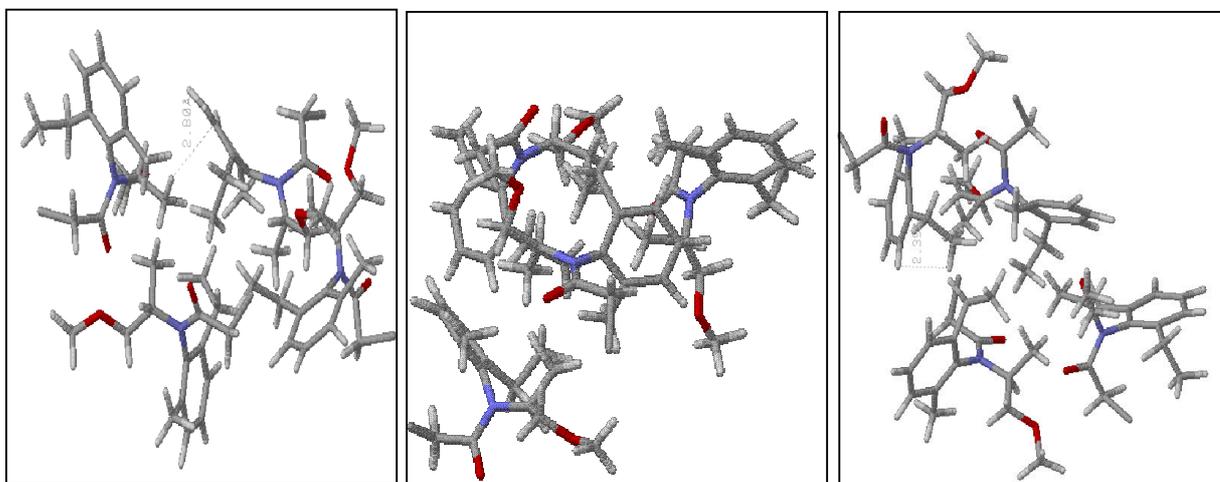


Figura 9.8: Disposizioni intermolecolari ottenute dalla simulazione di DM per 2ns a 300K di quattro molecole di Metolachlor (isomero SS).

Dalle strutture mostrate in figura non è possibile trarre alcuna conclusione rispetto al comportamento del Metolachlor in acqua, infatti, non sono visibili in nessun caso distanze tra gli anelli aromatici compatibili con un'interazione di tipo π - π . Si può però confermare la presenza di aggregazione tra le molecole, che non è legata al fatto che sono stati imposti dei vincoli NMR, infatti, anche nelle simulazioni in assenza di vincoli, le molecole appaiono molto vicine tra loro ma non si è in grado di stabilire l'entità delle interazioni.

Le simulazioni di Dinamica Molecolare effettuate sulla molecola del Metolachlor hanno condotto a delle strutture non in accordo con i dati sperimentali per i seguenti motivi:

- Il campo di forze utilizzato per i calcoli non è ideale per analizzare l'aggregazione di un gran numero di molecole a basso peso molecolare;
- Lo stesso campo di forze non tiene conto in maniera adeguata delle interazioni dipolari; essendo tali interazioni predominanti nella formazione di un complesso π - π , probabilmente, sarebbe necessario utilizzare un campo di forze in cui la funzione legata alle interazioni di van der Waals sia più consistente.
- L'osservazione di due o quattro molecole di Metolachlor in un numero relativamente basso di molecole di acqua non consente di trarre conclusioni ragionevoli sul tipo di aggregazione presente in un sistema reale; un maggior numero di molecole di Metolachlor avrebbe comportato dei tempi di calcolo troppo estesi.

Avendo considerato i limiti delle simulazioni sopra descritte, esse mostrano comunque, che in soluzione acquosa le molecole di Metolachlor tendono ad aggregarsi. Per ottenere informazioni più specifiche sulla struttura degli aggregati occorrerà variare i parametri di calcolo ed, in particolare, utilizzare un più appropriato campo di forze.

Riferimenti bibliografici

1. Rao, S.; Singh, U.; Bash, P. A.; Kollman, P. B. *Nature* **1987**, 328, 551.
2. Van Gunsteren, W. F.; Weiner, P. K. *Computation of free energies for Biomolecular System* Escom Science, Leiden, **1989**, 27-59.
3. Van Gusteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Gromos Manual, BIOMOS, Biomolecular Software, Laboratory of Physical Chemistry, University of Groningen, the Netherlands, **1989**.
4. Van Gusteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.; Rullmann, J. *J. Mol. Phys.* **1981**, 44, 69.
5. Jorgensen, W.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; Klein, R. I. M. *J. Chem. Phys.* **1983**, 23, 327.
6. Lifson, F.; Felder, C.; Shanzer, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 3866.
7. Giglio, E.; Liquori, A.; Mozzarella, L. *Nuovo Chim.* **1969**, 1, 135.
8. Di Nola, A.; Giglio, E. *Acta Crystallogr.* **1970**, 182, 144.
9. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Phys.* **1977**, 23, 327.
10. Verlet, L. *Phys. Rev.* **1967**, 159, 98.
11. Verlet, L. *Phys. Rev.* **1968**, 165, 201.
12. Beeman, D. *J. Comput. Phys.* **1976**, 20, 130.
13. Gear, C. *Numerical Initial Value Problems in Ordinary Differential Equations* Englewood Cliffs, NJ, USA, **1971**.
14. Stanislaw, L. R. S.; Wlodek, T.; Clark, T. W.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9513.
15. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Van Gusteren, W. F.; Di Nola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, 3684.
16. Le misure di Dinamica Molecolare sono state eseguite presso il laboratorio di calcolo del Dott. Manetti, Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza".
17. Frish, M. J.; Frish, A. *Gaussian 99*. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA 15106 USA.
18. Jayasundera, S.; Schmidt, W. F.; Hapeman, C. J.; Torrents, A. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4435.

Capitolo 10: Materiali e metodi

10.1 NMR

Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR monodimensionali, le mappe bidimensionali NOESY e le misure DOSY sono stati ottenuti con uno spettrometro NMR Bruker AVANCE AQS-600 operante a 600.13 MHz e 150MHz rispettivamente per le frequenze di Larmor ^1H e ^{13}C . Lo spettrometro è equipaggiato con una testa Bruker multinucleare equipaggiata di gradienti lungo l'asse z aventi forza pari a $55 \text{ G}\cdot\text{cm}^{-1}$. Per gli esperimenti 1D e 2D sono state utilizzate sequenze di impulsi descritte in letteratura.¹ I chemical shifts degli spettri protonici (scala δ) sono calibrati rispetto al trifluoroacetato di 4,4-dimetil-4-silapentano-1- ammonio (DSA).² In tutti gli esperimenti NMR il numero di scansioni è stato ottimizzato per ottenere il miglior rapporto segnale/rumore e, quando necessario, è stata applicata una leggera presaturazione del segnale HOD residuo.

Gli esperimenti gs-NOESY (gradient selected Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) sono stati eseguiti in modo sensibile alla fase, cioè “*phase sensitive*”, utilizzando una sequenza eco-antieco.¹ I parametri spettrali utilizzati sono i seguenti: un'ampiezza spettrale di 6 kHz in entrambe le dimensioni, 1024 data points e 256 incrementi rispettivamente in f_2 e in f_1 , e 1s di attesa per evitare la saturazione (*relaxation delay*). I dati sono stati processati con una finestra del tipo a campana sinusoidale spostata di 90° (*90° shifted square sine bell window function*) e una matrice di dati 512x512. Nei molteplici esperimenti NOESY si è variato il tempo di contatto da un massimo di 400 ms a un minimo di 10ms.

Gli esperimenti ^1H - ^{13}C gradient-selected -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) con disaccoppiamento ^{13}C GARP (Globally optimized Alternating phase Rectangular Pulses) sono stati registrati in modo eco-antieco sensibile alla fase (*echo-antiecho phase sensitive*) utilizzando una costante di accoppiamento scalare eteronucleare di $^1J_{\text{C-H}} = 150\text{Hz}$ e i seguenti parametri: un'ampiezza spettrale di 6kHz in f_2 e di 20kHz in f_1 , 1024 data points in f_2 , 512 incrementi in f_1 e un *recycle delay* di 1s; i dati sono stati processati con una *sine bell window function* e una matrice di dati 512x512.

Gli esperimenti ^1H - ^{13}C gradient-selected -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) sono stati registrati in valore assoluto (*magnitude mode*) con un delay per l'evoluzione degli accoppiamenti a lunga distanza di 80ms. Sono stati utilizzati i seguenti parametri: un'ampiezza spettrale di 6kHz in f_2 e di 30kHz in f_1 , 1024 data points in f_2 , 512 incrementi in

f_1 e un *recycle delay* di 1s; i dati sono stati processati con una *sine bell window function* e una matrice di dati 512x512.

Gli esperimenti DOSY sono stati eseguiti utilizzando una sequenza di eco stimolato (*stimulated-echo*) che incorpora impulsi a gradiente bipolare e un ritardo per le correnti parassite (*longitudinal eddy current delay*) (BPP-LED).^{3,4} La forza del gradiente è stata incrementata in modo logaritmico in 16 steps dal 2% fino al 95% della forza massima del gradiente. I tempi di diffusione e le durate dell'impulso a gradiente sono stati ottimizzati per ogni esperimento in modo da ottenere una diminuzione del 95% dell'intensità delle risonanze all'ampiezza massima del gradiente; tipicamente, sono stati utilizzati tempi di diffusione tra 400 e 1000ms e un gradiente di impulsi bipolare (seno o rettangolare) compreso tra 1.0 e 2.3ms. Il *longitudinal eddy current delay* è stato mantenuto costante a 5ms mentre il tempo di ritorno (*recovery*) dell'impulso a gradienti è stato fissato a 0.1ms. La linea di base di ogni spettro è stata sistemata dopo un'appropriata apodizzazione, trasformata di Fourier e correzione di fase. Infine, la dimensione della diffusione dello spettro 2D DOSY è stata processata mediante il programma Bruker XwinmrTM (versione 3.5). I coefficienti di diffusione sono stati determinati, come riportato altrove,⁵ mediante un fitting dei minimi quadrati dei dati relativi all'intensità dei segnali (aree) in funzione della forza del gradiente.

10.2 Dynamic Light Scattering (DLS)

Le misure di Dynamic Light Scattering (DLS) sono state eseguite su uno spettrometro Light Scattering ALV costituito da: un laser He-Ne di potenza 25mW (Model 127, Spectra-Physics Lasers, Mountain View, Canada), un Compact Goniometer System ALV DLS/SLS-5000 (ALV, Langen, Germany), due fotodiodi "avalanche" SPCM-AQR (PerkinElmer Optoelectronics, Vaudreuil, Canada) e un Digital Correlator ALV-5000 Multiple-tau (ALV, Langen, Germany). Le cuvette cilindriche sono immerse in un bagno di decalina termostato a 25.0 °C. Le misure di Dynamic Light Scattering (DLS) sono state condotte in D₂O (CIL 99.9 atom % D), ad un angolo di scattering di 90°. Impiegando angoli di scattering diversi i risultati non cambiano qualitativamente, ma nelle condizione di misura adottate, l'impiego dell'angolo 90° minimizza il contributo di stray-light dovuto alla riflessione e alla diffrazione delle interfacce quarzo-decalina e quarzo-campione. I risultati, sono mostrati in termini di size distribution pesata per le intensità (vedi discussione), non sono stati corretti per l'effetto della concentrazione, presumibilmente non decisiva ai fini di determinare l'ordine di grandezza delle particelle sospese. In particolare, una diluizione dei campioni in esame avrebbe degradato ulteriormente il rapporto segnale/rumore, già basso. Nella preparazione dei

campioni si è avuto cura di evitare la presenza di polvere. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando una trasformata inversa di Laplace mediante l'algoritmo CONTIN, incorporato nel pacchetto software proprietario del correlatore ALV DLS/SLS-5000 (Versione 5.3.1 1995).

10.3 Tensione Superficiale

È stato impiegato per le misure un tensiometro *Kruss* modello *K10 T*, che utilizza un anello di Du Noüy. L'anello di platino è stato fiammeggiato al calor rosso prima di ogni misura. La temperatura del sistema è mantenuta a 25 ± 0.1 °C mediante un mantello connesso ad un termostato Heto. All'interno del mantello vengono poste le soluzioni in un beaker di dimensioni opportune.

Le soluzioni acquose di Metolachlor utilizzate per le misure variano in un intervallo compreso tra 10mM e 0.5mM.

I dati sono stati ottenuti da, almeno, cinque determinazioni indipendenti su miscele preparate di fresco. L'accuratezza sui dati è ± 0.2 mN·m⁻¹.

Ulteriori indicazioni sul funzionamento e la taratura dello strumento sono riportate altrove.⁶

10.4 Crioscopia

E' stata utilizzata un'unità crioscopica Knauer, mod. 24.00; con questo strumento è possibile raffreddare velocemente un solvente o una soluzione al di sotto del suo punto di congelamento, senza formazione di ghiaccio. Successivamente si sottopone il campione ad una vibrazione, per circa 1 secondo. L'energia erogata durante la vibrazione induce il congelamento.

L'elemento Peltier produce il raffreddamento per via dell'effetto omonimo; il raffreddamento, o riscaldamento, sono regolati dal verso della corrente nella saldatura.

Lo strumento misura una variazione di potenziale che viene convertita in temperatura tramite calibrazione con soluzioni acquose di NaCl a molalità nota. Specifiche informazioni sull'apparato strumentale e sui metodi di calibrazione possono essere trovate altrove.⁷

10.5 Viscosità

Le misure di viscosità sono state ottenute mediante l'uso di un viscosimetro Ubbelohde, modello 52503, con il quale si misura il tempo di scorrimento necessario affinché il liquido possa passare da una tacca superiore ad una inferiore di un capillare. Il viscosimetro è posto in un bagno ad acqua termostatato mediante un termostato Heto che mantiene la temperatura

entro $\pm 0.005^\circ\text{C}$. I tempi ottenuti hanno una riproducibilità di ± 0.2 s. Le misure sono state ripetute su ogni soluzione almeno quattro volte dopo essere state termostatate.

10.6 Dinamica Molecolare

Tutte le simulazioni sono state effettuate con il programma GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations).^{8,9}

Le coordinate della molecola sono state sottoposte a minimizzazione dell'energia nel vuoto per eliminare eventuali tensioni sulle distanze di legame e ampiezze degli angoli.

La molecola di Metolachlor minimizzata e' stata quindi posizionata al centro di una scatola cubica che è stata omogeneamente riempita di molecole d'acqua.

Per l'acqua si è usato il modello *single point charge (spc)*.¹⁰ Le dimensioni della scatola sono state scelte in modo che la distanza della molecola dalle pareti fosse non inferiore a 0.4 nm. Le lunghezze di legame sono state vincolate ai loro valori di equilibrio con la procedura SHAKE.¹¹ Nel caso dell'acqua SPC anche l'angolo di legame è tenuto bloccato usando un terzo legame tra i due idrogeni. Questo ha consentito di usare un passo d'integrazione pari a 2 fs. La costante dielettrica relativa utilizzata per le interazioni coulombiane è $\epsilon_r = 1$.

La temperatura del sistema è stata mantenuta costante al valore di 300 K usando il metodo dell'accoppiamento debole al bagno termico.¹² Si è utilizzata una costante di accoppiamento $\tau = 0.1$ ps.

Il campo di forze utilizzato è stato costruito manualmente prendendo i valori da OPLS/AMBER ed implementandolo in GROMACS.^{13,14}

10.7 Cromatografie

Le cromatografie su colonna sono state eseguite con gel di silice Merck e Sigma-Aldrich 70-230 mesh. Per la purificazione dei prodotti sono state utilizzate lastre preparative di silice F₂₅₄ Merck dello spessore di 1-2mm a zona di concentrazione. La purezza di reagenti, intermedi di reazione e prodotti è stata controllata mediante TLC (Thin Layer Chromatography, silice F₂₅₄ 5x10cm, Merck).

10.8 Reagenti

I solventi deuterati utilizzati per le misure NMR sono: CDCl₃ (Sigma-Aldrich 99.8 atom % D stabilizzato con argento 0.5% in peso) e D₂O (CIL 99.9 atom % D), lo standard interno utilizzato è il trifluoroacetato di 4,4-dimetil-4-silapentano-1- ammonio (DSA, per gentile

concessione del Prof. Nowick, University of California, Irvine). Metolachlor (miscela di isomeri 98.4% Riedel-de Haën), Acetochlor (97.6% Riedel-de Haën) e Pretilachlor (97% Riedel-de Haën) sono stati acquistati al massimo grado di purezza disponibile in commercio e impiegati direttamente per le misure NMR senza ulteriore purificazione.

I reagenti utilizzati per le sintesi sono:

nitroacetato di etile (97% Sigma-Aldrich), bromuro di tetrabutylammonio (99% Sigma-Aldrich), etildiisopropilammina (ridistillata 99.5% Sigma-Aldrich), bromuro di benzile (98% Sigma-Aldrich), bromuro di 4-metilbenzile (97% Sigma-Aldrich), cloruro di 4-metossibenzele (98% Sigma-Aldrich), cloruro di 2,5-dimetilbenzile (98% Sigma-Aldrich).

I solventi utilizzati per il work-up delle reazioni e per le purificazioni dei prodotti su gel di silice sono di grado RPE della Carlo Erba Reagenti.

10.9 Sintesi

Procedura generale di sintesi di 3-fenil-2-nitropropanoati di etile variamente sostituiti sull'anello aromatico.

La reazione viene condotta sotto atmosfera di azoto e la vetreria utilizzata è stata preventivamente lasciata in stufa a 140°C almeno dodici ore.

In un pallone a due colli da 10ml, munito di setto di gomma, ancorotta magnetica, bolla antispruzzo e palloncino di lattice, si introduce 1ml di nitroacetato di etile. Il sistema viene raffreddato a 0°C mediante un bagno di acqua e ghiaccio. Si aggiungono 0.96ml (0.9eq) dell'opportuno alogenuro di benzile e 0.12g (0.04eq) di bromuro di tetrabutylammonio. Si lascia il sistema in agitazione a 0°C per trenta minuti e successivamente si aggiungono 1.41ml (0.9eq) di etildiisopropilammina. Dopo quindici minuti si osserva la formazione di un precipitato bianco corrispondente all'alogenuro di etildiisopropilammonio. Trascorse tre ore dall'aggiunta della base si lascia arrivare il sistema a temperatura ambiente e si aggiungono 5ml di etere etilico per completare la precipitazione del bromuro di etildiisopropilammonio, si agita e si filtra la soluzione su filtro di carta. Il precipitato nel pallone di reazione viene lavato con due successive aggiunte di 5ml di etere etilico e filtrato. La soluzione eterea viene seccata su Na₂SO₄, filtrata e il sovente viene allontanato a pressione ridotta mantenendo la temperatura del bagno al di sotto dei 35°C.

3-fenil-2-nitropropanoato di etile (composto R).

L'alogenuro utilizzato è bromuro di benzile.

Il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su gel di silice (70-230 mesh) usando come eluente CH_2Cl_2 . Si ottengono 0.74g di prodotto puro, un liquido incolore, pari ad una resa del 41%.

3-(4-metilfenil)-2-nitropropanoato di etile (composto $R\text{CH}_3$)

L'alogenuro utilizzato è bromuro di 4-metilbenzile.

Il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su gel di silice (70-230 mesh) usando come eluente CH_2Cl_2 . Si ottengono 1.40g di prodotto puro, un liquido incolore, pari ad una resa del 73%.

3-(4-metossifenil)-2-nitropropanoato di etile (composto ROCH_3)

L'alogenuro utilizzato è cloruro di 4-metossibenzile.

Il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su gel di silice (70-230 mesh) usando come eluente CH_2Cl_2 . Si ottengono 0.45g di prodotto puro, un liquido incolore, pari ad una resa del 22%.

3-(2,5-dimetilfenil)-2-nitropropanoato di etile (composto $R(\text{CH}_3)_2$).

L'alogenuro utilizzato è cloruro di 2,5-dimetilbenzile.

Il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su gel di silice (70-230 mesh) usando come eluente CHCl_3 . Si ottengono 0.65g di prodotto puro, un liquido incolore, pari ad una resa del 32%.

Riferimenti bibliografici

1. Braun, S.; Kalinowski, H.-O.; Berger, S. *150 and more basic NMR experiments: a practical course*; Wiley-VCH: Weinheim, **1998**.
2. Nowick, J. S.; JKhahshoor, O.; Hashemzadeh, M.; Brower, J. O. *Organic Letters* **2003**, *5*, 3511-3513.
3. Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288-291.
4. Wu, D.; Chen, A.; Johnson, C. S., Jr. *J. Magn. Reson. A* **1995**, *115*, 260-264.
5. a) Stilbs, P. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, *19*, 1-45; Galantini, L.; Giampaolo, S. M.; Mannina, L.; Pavel, N. V.; Viel, S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 4799-4805.
6. Sesta, B.; La Mesa, C. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1450-1454.
7. La Mesa, C. *Colloid Polym. Sci.* **1990**, *268*, 959-963.
8. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.* **1995**, *91*, 43-56.
9. Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* **2001**, *7*, 306-317.
10. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Van Gusteren, W. F.; Hermans J. *Interaction models for water in relation to protein hydration*, Intermolecular forces, Pullman B. **1981**, 331-342.
11. Rychaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *Mol. Phys.* **1988**, *34*, 1311-1327.
12. Frish, M. J.; Frish, A. *Gaussian 99*. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA 15106 USA.
13. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225-11236.
14. Kahn, K.; Bruice, T. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1881-1891.

Conclusioni

I risultati ottenuti nel corso di questa tesi di Dottorato hanno permesso di caratterizzare il comportamento in soluzione acquosa di due classi di composti, le cloroacetammidi e i 3-fenil-2-nitropropanoati di etile e verranno riassunti di seguito.

Gli spettri ^1H monodimensionali di soluzioni acquose a concentrazioni superiori alla solubilità dei composti, mostrano la comparsa di nuove risonanze, tutte a campi alti rispetto ai segnali presenti nelle soluzioni a concentrazione inferiore alla solubilità.

Dall'analisi di queste nuove risonanze si deduce che i composti in esame in soluzione acquosa danno luogo a fenomeni di aggregazione la cui *driving force* è data da interazioni di π - π stacking tra gli anelli aromatici; queste interazioni sono tali da minimizzare l'esposizione all'acqua della parte idrofoba della molecola.

I complessi π - π così formati possono avere struttura parzialmente ordinata in alcuni casi, mentre in altri casi gli aggregati sembrano disordinati. In soluzione, tuttavia, il comportamento delle due famiglie di composti studiati appare differente per ragioni cinetiche tanto che si ritiene opportuno trattare i due casi separatamente.

Cloroacetammidi

Gli spettri ^1H monodimensionali di soluzioni acquose delle cloroacetammidi a diverse concentrazioni mostrano la presenza di due diversi sistemi aggregati presenti in due intervalli di concentrazione successivi. Tali sistemi aggregati hanno una struttura ordinata come dimostra l'elevata risoluzione di queste "risonanze extra". Su questi spettri è evidente, inoltre, una graduale perdita di segnale all'aumentare della concentrazione dovuta alla presenza di aggregati di notevoli dimensioni e rigidi, cioè non visibili via standard NMR di soluzione. Si noti che la perdita di segnale avviene in due steps confermando quindi la presenza di due o più tipi di aggregati.

Gli spettri NMR appaiono ben risolti, la specie monomerica e quella aggregata non mostrano fenomeni di scambio chimico, una specie, dovuta al monomero mostra effetti NOE negativi, l'altra, dovuta agli aggregati mostra NOE positivi e presenza di spin diffusione. L'equilibrio tra il monomero e l'aggregato è sempre estremamente lento.

Le misure di diffusione eseguite con metodi NMR danno informazioni sulle dimensioni della specie osservabile. Queste dimensioni, in funzione anche della concentrazione, sono dell'ordine di 10-15nm e corrispondono a coefficienti di diffusione dell'ordine di

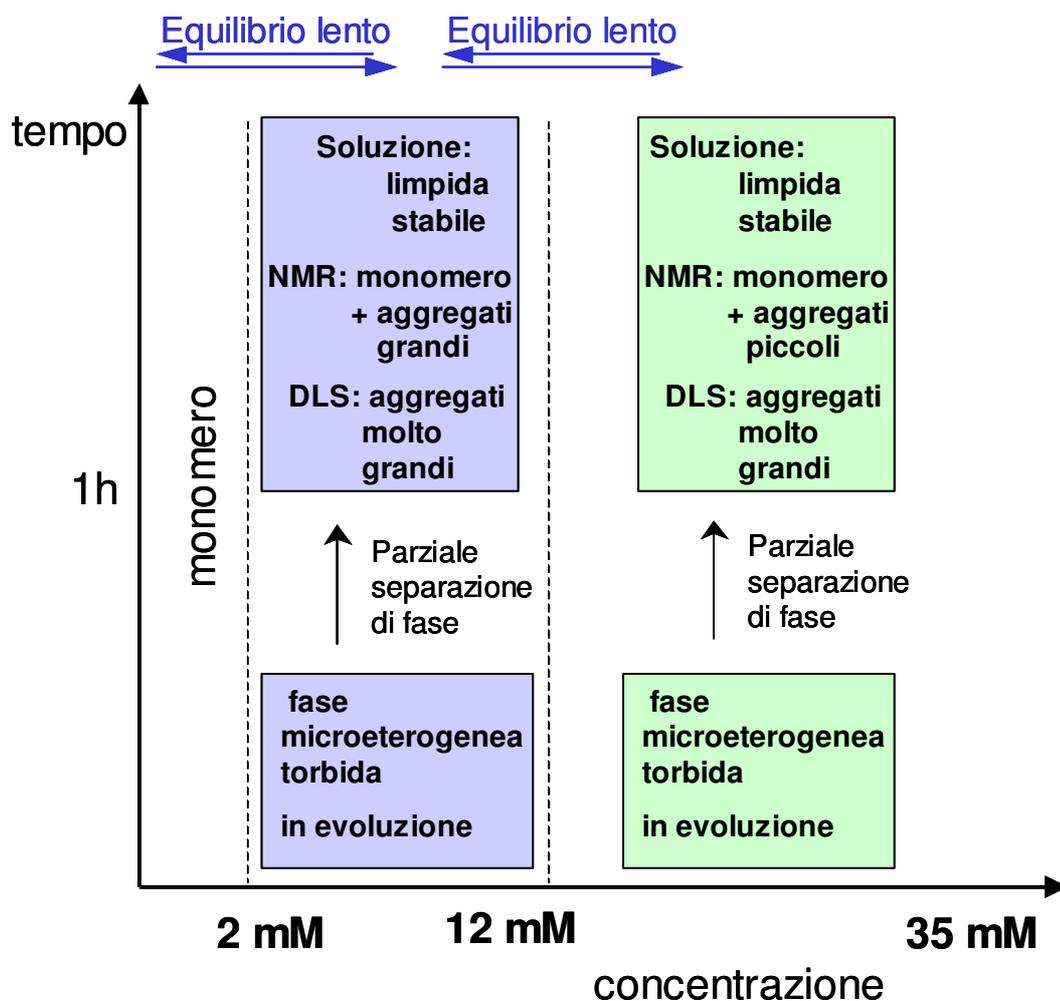
$D \sim 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$. Le misure di Dynamic Light Scattering individuano bene la specie “NMR silent” e permettono di determinare le dimensioni degli aggregati; da $\sim 200 \text{nm}$ a $\sim 700 \text{nm}$ e il loro coefficiente di diffusione $D \sim 5 \times 10^{-13} \text{m}^2/\text{s}$.

Si noti che gli aggregati NMR osservabili, ben caratterizzati con metodi PFG-NMR, mostrano una diminuzione delle dimensioni al crescere della concentrazione.

Il Dynamic Light Scattering ha permesso, invece, di stimare le dimensioni degli aggregati di grandi dimensioni che, pur non essendo visibili mediante tecniche NMR, conducono alla perdita di segnale negli spettri monodimensionali. In taluni casi le misure PFG-NMR mostrano un decadimento solo parziale, fino alla perdita del 75% del segnale; questa osservazione implica che le misure andranno ripetute a gradienti più alti e che le dimensioni indicate dall’NMR sono sicuramente sottostimate.

Infine, a conferma dei dati spettroscopici sono state utilizzate tecniche chimico-fisiche classiche; misure di tensione superficiale, di crioscopia e di viscosità hanno consentito di studiare il sistema da un punto di vista termodinamico e di osservare le variazioni dei parametri chimico-fisici delle soluzioni in funzione dell’aggregazione. Si è quindi pervenuti ad una conferma dei dati di NMC (Non critical Multimer Concentration). In effetti i dati NMR e i dati ottenuti con tecniche chimico-fisiche classiche sono in ottimo accordo.

In conclusione, nelle soluzioni acquose di cloroacetammidi sono presenti tre forme di aggregazione; il monomero; aggregati di notevoli dimensioni osservabili mediante DLS ma non mediante NMR; altri aggregati ordinati di dimensioni minori, osservabili mediante NMR ma non mediante DLS, le cui dimensioni variano con la concentrazione. Si può schematizzare il processo di aggregazione secondo il seguente diagramma:



Schema della formazione di complessi π - π in soluzione acquosa ad opera di cloroacetammidi.

3-fenil-2-nitropropanoati di etile

Dagli spettri ^1H dei nitropropanoati di etile si osserva una graduale diminuzione nel tempo dell'intensità dei segnali risolti e la comparsa di risonanze asimmetriche e larghe. Questa osservazione è stata interpretata come dovuta alla presenza di diversi sistemi aggregati sia ordinati, caratterizzati da risonanze *sharp*, che disordinati, a differente impacchettamento. In questi aggregati complessi lo scambio chimico tra le varie specie appare sufficientemente lento, dello stesso ordine di grandezza dei chemical shifts NMR ($k \approx 1/\Delta\delta_{A,B}$); è possibile, infatti, distinguere la presenza di più specie. Lo scambio chimico tra queste forme è confermato dagli spettri registrati a diverse temperature.

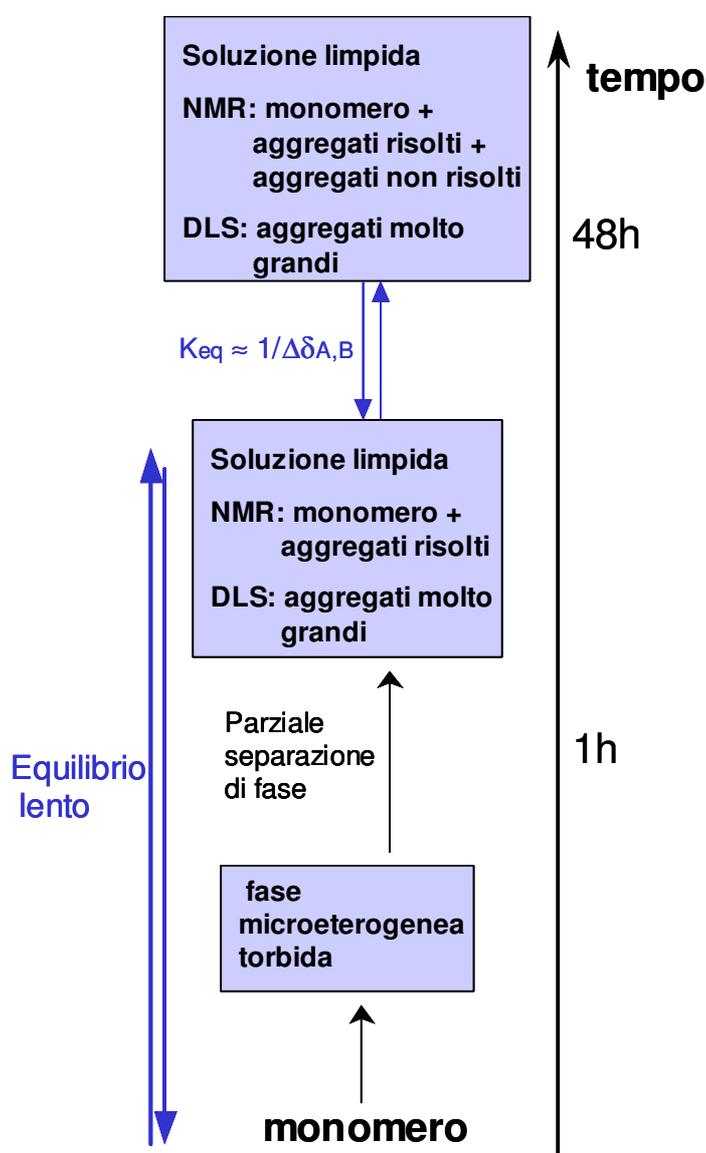
Anche in questo caso, la specie monomerica e quella aggregata non mostrano fenomeni di scambio chimico; i contatti NOE del monomero appaiono negativi, mentre a differenze delle cloroacetammidi, i contatti NOE dell'aggregato appaiono in parte positivi ed in parte negativi.

Ciò e' dovuto alla presenza di scambi sufficientemente lenti tra le diverse specie presenti. Si hanno infatti forme esteree ed enoliche in equilibrio lento e specie a differente impacchettamento. Di conseguenza, i NOE, essenzialmente molto piccoli di valore, possono presentarsi sia positivi che negativi.

Tuttavia, la presenza di stacking π - π è ancora confermata dagli *shift upfield* di tutti i segnali di risonanza.

I dati di diffusione PFG-NMR indicano che gli aggregati dei nitropropanoati di etile hanno dimensioni minori rispetto agli aggregati delle cloroacetammidi.

Si può schematizzare il processo di aggregazione secondo il seguente diagramma:



Schema della formazione di complessi π - π in soluzione acquosa ad opera di 3-fenil-2-nitropropanoati di etile.

In conclusione è stata dimostrata l'esistenza in soluzione di una nuova classe di aggregati, mai precedentemente descritta, in cui le forze idrofobe sono solo una parte delle forze stabilizzanti e le interazioni π - π giocano un ruolo fondamentale.

Ringraziamenti

Il gruppo NMR dell'Area di Ricerca del CNR di Montelibretti, un grazie particolare alla Professoressa AnnaLaura Segre e al Dottor Stephane Viel.

I miei relatori: il Professor Giancarlo Angelini e la Professoressa Barbara Floris.

Il Dottor Pasquale Stano dell'Università di Roma III.

Il Professor Camillo La Mesa dell'Università di Roma "La Sapienza".

Andrea, mio compagno di vita, perché mi è stato indispensabile il suo supporto morale.