



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche
ed Ambientali

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

XXXV CICLO – AA 2021/2022

Induzione di chiralità
ed effetto dello ione specifico in sistemi
supramolecolari di porfirine

Fiorenzo Neri

Supervisor:

Prof. Andrea Romeo

Coordinatore:

Prof.ssa Concetta De Stefano

Contenuti

Prefazione

1 - Introduzione

Chimica supramolecolare	3
Le porfirine	6
Effetto dello ione specifico – serie di Hofmeister	34
Chiralità	40
<i>Chiralità nei sistemi porfirinici</i>	44
Riferimenti Bibliografici	54

2 - Demetallazione acida della

porfirina ZnTMpyP catalizzata da polielettroliti

Introduzione	71
Risultati e discussioni	73
<i>Effetto della concentrazione di polimero</i>	79
<i>Effetto della concentrazione idrogenionica</i>	83
<i>Effetto del protocollo di mescolamento</i>	85
<i>Effetto della temperatura</i>	86
<i>Impiego di altri polimeri</i>	91
<i>Meccanismo di reazione</i>	97
Conclusioni	104
Sezione sperimentale	105
Riferimenti bibliografici	107

3 - Effetto dello ione specifico sul processo di aggregazione di porfirine

Introduzione	113
Risultati e discussioni	117
<i>Caratterizzazione spettroscopica della porfirina t-H₂P_{agg}</i>	117
<i>Effetto dei cationi sul processo di aggregazione della porfirina t-H₂P_{agg}</i>	120
<i>Effetto degli anioni sul processo di aggregazione della porfirina t-H₂P_{agg}</i>	130
<i>Effetto dei cationi sulla formazione degli aggregati J della porfirina TPPS₄</i>	143
Conclusioni	160
Sezione sperimentale	163
Riferimenti bibliografici	165

4 - Chirogenesi supramolecolare di aggregati porfirinici

Introduzione	173
Risultati e discussioni	176
<i>Induzione di chiralità con PGA</i>	176
<i>Impiego di altri polimeri</i>	195
<i>Formazione di eteroaggregati chirali</i>	197
Conclusioni	206
Sezione sperimentale	208
Riferimenti bibliografici	211

5 - Interazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$ con DPDS

Introduzione	219
Risultati e discussioni	221
<i>Caratterizzazione spettroscopica del sistema $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$ – DPDS</i>	221
<i>Competizione tra DPDS e forza ionica</i>	229
<i>Modello strutturale</i>	233
Conclusioni	237
Sezione sperimentale	238
Riferimenti bibliografici	241

Prefazione

Il *self-assembly* è un processo chiave nell'organizzazione e nel funzionamento dei sistemi viventi e svolge un ruolo critico nell'evoluzione della vita sulla Terra. Esso può portare alla formazione di specifiche architetture che possiedono nuove caratteristiche come la chiralità, un'intrigante proprietà che, partendo dal livello molecolare, può essere espressa anche a livello mesoscopico. Complesse strutture chirali possono dare luogo a diverse proprietà ottiche, elettroniche e magnetiche che possono essere sfruttate in un'ampia varietà di settori. Questo progetto di tesi si inquadra nell'affascinante mondo della chimica supramolecolare e si propone di dare un contributo alla comprensione di alcune proprietà esibite da sistemi porfirinici aggregati.

Nel capitolo 2 viene descritta una dettagliata indagine spettroscopica e cinetica del processo di demetallazione acida di uno zinco derivato di una porfirina cationica condotto in condizioni inusuali di pH e per mezzo dell'azione catalitica esercitata da polielettroliti ad alta densità di carica. Uno studio sistematico condotto con polivinilsolfonato ha permesso la proposizione di un complesso meccanismo di reazione validato da simulazioni numeriche.

Il capitolo 3 verte sullo studio del processo di *self-assembly* di porfirine in soluzione acquosa. Un dettagliato studio cinetico condotto sia sulla formazione di clusters di una porfirina dicationica che sugli aggregati di tipo J di una porfirina tetraanionica, ha permesso di evidenziare il ruolo chiave assunto dalla natura del contro-ione del sale impiegato per indurre i processi di aggregazione. L'esistenza di un effetto dello ione specifico è stata evidenziata mediante correlazioni con i parametri termodinamici di Marcus e con la serie di Hofmeister.

Nel capitolo 4 viene evidenziata la capacità di clusters porfirinici otticamente inattivi di comportarsi da sonda chirottica per interazione con biopolimeri carichi.

L'amplificazione della chiralità varia in funzione della struttura e dimensione dei clusters, parametri determinati dalla natura del sale impiegato nel promuovere il processo cinetico di aggregazione. I clusters preformati chirali sono stati anche impiegati come template cationico per la formazione di eteroaggregati con una porfirina tetraanionica evidenziando la possibilità di indurre la formazione di aggregati J chirali in condizioni inusuali.

Nel capitolo 5 viene illustrata la peculiare interazione non covalente di una porfirina dicationica con un legante dianionico che determina la formazione di una struttura supramolecolare contraddistinta da emissione di fluorescenza e da un marcato *splitting* eccitonico con intenso accoppiamento elettronico tra i cromofori. Studi effettuati su alcuni metallo derivati della porfirina insieme ai risultati ottenuti mediante esperimenti di diffusione di luce depolarizzata, hanno permesso la proposizione di un modello strutturale di tipo J.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 - Chimica Supramolecolare

La Chimica Supramolecolare è uno dei settori della ricerca scientifica multidisciplinare più attivi e fruttuosi degli ultimi decenni come testimoniato dal recente premio Nobel conferito nel 2016 a Feringa, Sauvage e Stoddart per gli studi condotti sulle macchine molecolari.¹⁻³ La “chimica delle interazioni non covalenti” o anche “la chimica delle interazioni intermolecolari” sono soltanto alcune delle definizioni più comuni per meglio specificare la chimica supramolecolare, la quale si occupa dello studio della formazione di strutture complesse costituite dall’associazione di più specie con una particolare attenzione che viene rivolta alle nuove proprietà esibite da questi sistemi e derivanti dalla maggiore complessità acquisita.⁴ Il suo sviluppo richiede quindi l’impiego di tutte le risorse teoriche e sperimentali della chimica molecolare combinate con manipolazioni ben progettate delle interazioni non covalenti così da potere formare nuove entità denominate “supramolecolari”, ovvero supramolecole aventi caratteristiche ben definite e atte a svolgere funzioni e realizzare processi anche complessi. La natura riesce quindi a superare i limiti della sintesi organica nella realizzazione di specie complesse adottando una logica molecolare che permette di evitare l’uso di legami covalenti e prevede invece l’impiego di modalità di interazione tramite forze intermolecolari. I sistemi supramolecolari sono infatti essenziali per la sopravvivenza di ogni organismo essendo alla base dei complessi processi biologici, della struttura e della funzionalità di moltissimi enzimi, del riconoscimento antigene-anticorpo, della trasmissione neuronale, della trascrizione e traduzione del DNA nonché del trasporto attivo attraverso le membrane lipofile. Il concetto ed il termine di chimica supramolecolare furono introdotti da Jean-Marie Lehn nel 1978,⁵ sulla base di lavori precedentemente condotti in cui veniva introdotto il termine di “supermolecole”, ossia entità chimiche originate da interazioni molto più

deboli dei legami covalenti.⁶ Da allora il concetto di chimica supramolecolare è stato riformulato in varie occasioni, ad esempio:

*“La chimica supramolecolare può essere definita come la chimica al di là della molecola, che si occupa delle entità organizzate ottenute dall’associazione di due o più specie chimiche tenute insieme da forze intermolecolari”.*⁷

Gran parte della chimica supramolecolare è nata, tra la metà e la fine degli anni '60, dagli sviluppi della sintesi dei leganti macrociclici per cationi metallici. In tal senso bisogna menzionare le quattro classi di leganti, di fondamentale importanza, preparati dai gruppi di Curtis, Busch, Jäger e Pedersen. Concettualmente questi sistemi possono essere considerati come uno sviluppo dei macrocicli di origine naturale (ionofori, eme, porfirine ecc.). Accanto a questi si devono annoverare anche i ciclofani (primi anni '50), gli sferandi e i carcerandi progettati da D. Cram ed ovviamente non ultimo, il mirabile contributo di Lehn che sintetizzò i criptandi alla fine degli anni '60.

Le specie supramolecolari sono caratterizzate sia dalla disposizione spaziale dei loro componenti, dalla loro architettura o sovrastruttura, sia dalla natura dei legami intermolecolari necessari alla loro formazione. Esse possiedono proprietà strutturali, conformazionali, termodinamiche, cinetiche e dinamiche ben definite. In questi sistemi, si possono distinguere vari tipi di interazioni che presentano diversi gradi di forza, direzionalità, dipendenza dalla distanza e dagli angoli: coordinazione degli ioni metallici, forze elettrostatiche, legame idrogeno, interazioni di van der Waals, interazioni donatore-accettore, ecc.

Le interazioni possono essere (i) deboli o moderate, come nei legami idrogeno, (ii) forti o molto forti, come nel caso della coordinazione di ioni metallici. Le prime determinano associazioni di stabilità paragonabili alle specie enzima-substrato, mentre le seconde rendono disponibili, per mezzo di

un singolo ione metallico, forze di legame che si trovano nel dominio dei complessi antigene-anticorpo (o superiori), dove sono coinvolte molte interazioni individuali.

Le forze intermolecolari sono tuttavia più deboli dei legami covalenti, così che le specie supramolecolari risultano termodinamicamente meno stabili, cineticamente più labili e dinamicamente più flessibili delle singole molecole. Inoltre, l'instaurarsi di queste interazioni è in grado di garantire versatilità e stabilità agli addotti supramolecolari risultanti. Le interazioni deboli sono quindi alla base dei fenomeni di "riconoscimento molecolare", i quali si possono realizzare tra molecole che hanno caratteristiche stereoelettroniche complementari. Questa condizione richiede la presenza di gruppi funzionali i cui dipoli possono interagire in modo complementare ed inoltre, che le conformazioni delle specie interagenti siano adatte.

Generalmente l'adattamento conformazionale finalizzato al raggiungimento di una geometria ottimale per l'interazione intermolecolare comporta un costo entropico. Pertanto, se uno o entrambi i partners che entrano a far parte del complesso supramolecolare sono già "pre-organizzati", ovvero hanno delle limitazioni conformazionali opportune, tutto ciò può accrescere sia la selettività del processo di riconoscimento che la forza dell'interazione.

L'individuazione dei meccanismi di complementarità che presiedono un processo di associazione molecolare è quindi di fondamentale importanza sia per la comprensione del funzionamento dei sistemi biologici naturali sia per lo sviluppo di nuovi sistemi supramolecolari artificiali.

1.2 - Le porfirine

Le porfirine naturali sono un'importante classe di composti che svolgono un ruolo primario nella vita delle cellule animali e vegetali essendo presenti nel sito attivo di molti sistemi biologici costituendone la parte non proteica (gruppo prostetico - eme). Nelle emoproteine (Figura 1) esse svolgono diverse funzioni tra cui: il trasporto di ossigeno nel sangue (emoglobina), la riserva di ossigeno nel muscolo (mioglobina), il coinvolgimento nella catena di trasporto degli elettroni (citocromo c), il coinvolgimento nel metabolismo degli xenobiotici (citocromo P450), la decomposizione del perossido di idrogeno (catalasi) e l'ossidazione del triptofano (triptofano 2,3-diossigenasi).⁸

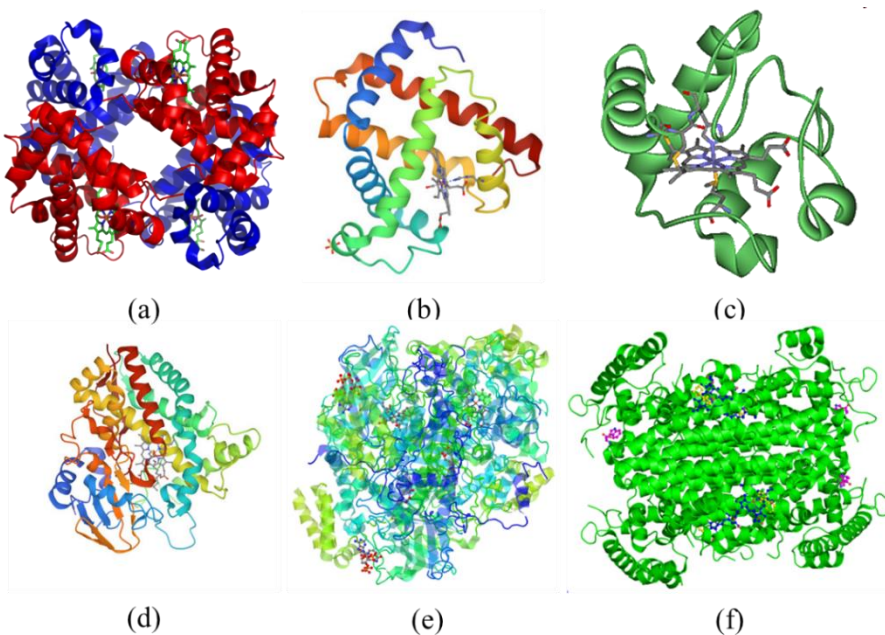


Figura 1. Struttura di alcune emoproteine contenenti il gruppo prostetico eme: (a) emoglobina,⁹ (b) mioglobina,¹⁰ (c) citocromo c,¹¹ (d) citocromo P450,¹² (e) catalasi,¹³ (f) triptofano 2,3-diossigenasi.¹⁴

Un'altra importante funzione biologica delle porfirine è quella delle clorine naturali, come la clorofilla a e b (Figura 2) le quali nei cloroplasti delle piante assolvono il ruolo da assorbitori di energia e sono parte essenziale del complesso apparato preposto alla trasformazione dell'energia solare in energia chimica, ossia del processo di fotosintesi clorofilliana.¹⁵

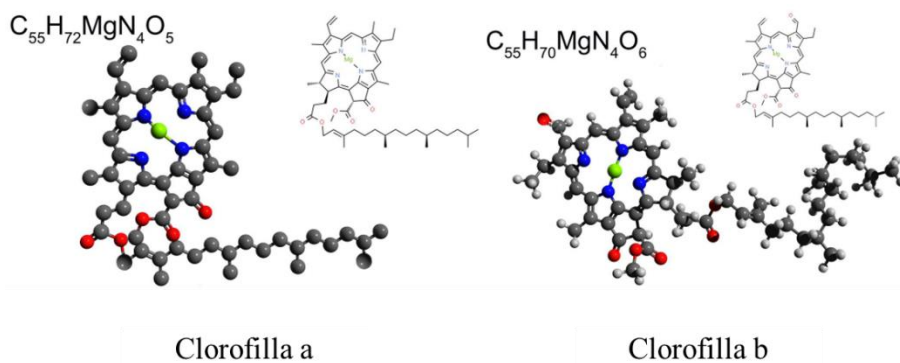


Figura 2. Struttura molecolare della clorofilla a e b.

Dunque, le porfirine ricoprono ruoli vitali nei sistemi biologici, ma una notevole importanza assumono anche i derivati di sintesi specialmente per la grande propensione di questa classe di molecole a dare luogo a reazioni fotoindotte di trasferimento elettronico. Pertanto, queste molecole trovano impiego in una straordinaria varietà di applicazioni tra cui: (i) progettazione di sistemi mimetici di sistemi naturali;¹⁶⁻¹⁹ (ii) sonde spettroscopiche per la definizione della struttura e delle dinamiche degli acidi nucleici o dei polipeptidi;²⁰⁻²³ (iii) celle solari, dove vengono utilizzati come sensibilizzatori per la titania nanostrutturata in celle di terza generazione (DSSC, *Dye Sensitized Solar Cells*);²⁴⁻²⁹ (iv) sensori chimici nei quali l'interazione tra porfirine ed analita può essere elaborata da una grande varietà di meccanismi di trasduzione determinando sensori con proprietà diverse che trovano un'ampia gamma di applicazioni in aria e in soluzione;^{30,31} (v) ottica non lineare, dove le specifiche proprietà ottiche del macrociclo tetrapirrolico, unitamente alle conoscenze teoriche e spettroscopiche vengono combinate con

le moderne metodologie sintetiche;³² (vi) elettrocromismo, ossia la proprietà di cambiare colore, in modo reversibile, quando ad esse viene applicata una differenza di potenziale;³³ (vii) fotocatalizzatori nei sistemi per la trasformazione, conservazione ed accumulo di energia.^{34,35} Inoltre, grazie all'elevata sensibilità nei confronti delle cellule tumorali e alla loro capacità di agire da sensibilizzatori per la fotoproduzione di ossigeno singoletto (specie estremamente reattiva e agente ad attività citotossica)³⁶ i derivati porfirinici rivestono un ruolo sempre più importante nella terapia fotodinamica (PDT)³⁷⁻⁴⁰ di tumori cutanei e nella terapia a cattura neutronica del boro (BNCT).^{41,42}

Le porfirine, dal punto di vista strutturale, sono una classe di composti macrociclici costituiti da quattro unità pirroliche legate tra loro mediante ponti metinici. La molecola capostipite delle porfirine è la porfina (Figura 3).

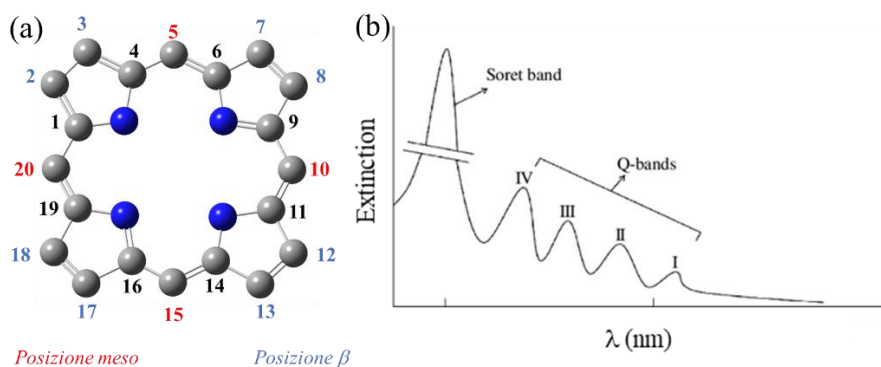


Figura 3. (a) Struttura della porfina e (b) spettro generico di assorbimento UV/Vis.

Tutte le porfirine si prestano ad un elevato numero di modificazioni chimiche tramite sintesi che portano all'introduzione di opportuni gruppi funzionali sia sugli anelli pirrolici (posizioni β) sia nelle posizioni *meso* (5, 10, 15, 20) dell'anello, nonché mediante la coordinazione di opportuni ioni metallici all'interno della cavità macrociclica.

In letteratura sono riportate diverse procedure di sintesi mirate ad ottenere porfirine simmetriche e nelle quali vengono adoperati una vasta

gamma di sostituenti. Rothemund nei primi anni '30 realizzò la prima sintesi "one pot" impiegando pirrolo ed un gran numero di aldeidi in metanolo o piridina a varie temperature (Figura 4).⁴³

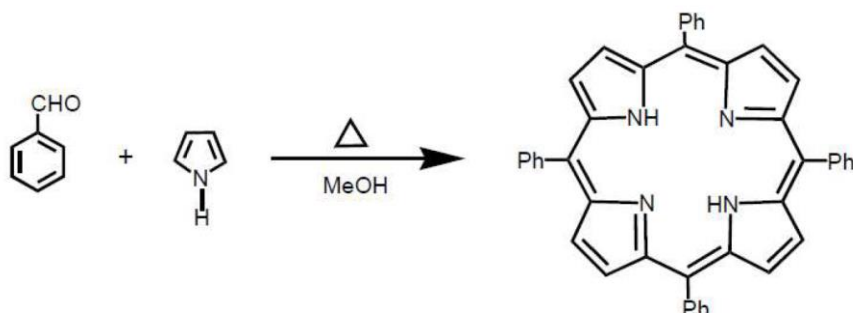


Figura 4. Schema di sintesi di una porfirina *meso*-sostituita (tetrafenilporfirina) secondo il metodo di Rothemund.

Attualmente i metodi sintetici più comunemente impiegati sono due. Il primo, sviluppato da Adler e Longo negli anni '60,⁴⁴ è sostanzialmente un perfezionamento della sintesi originale di Rothemund e prevede lo svolgimento di una reazione di condensazione tra aldeidi e pirrolo in solvente acido in condizioni di riflusso ed all'aria per circa 30 minuti, una metodica che in genere fornisce rese di circa il 20% per le porfirine tetraariliche (Figura 5).

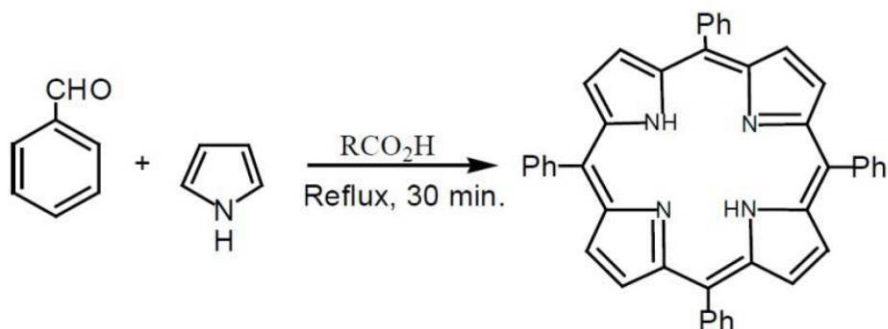


Figura 5. Schema di sintesi di una porfirina *meso*-sostituita (tetrafenilporfirina) secondo il metodo di Adler.

Il secondo approccio sintetico, noto come metodo Lindsey,⁴⁵ consiste di un processo che avviene in due fasi caratterizzato da condizioni di reazione più

blande e da una maggiore resa (Figura 6). Nella prima fase, la reazione di condensazione tra pirrolo e aldeidi, catalizzata da acido trifluoroacetico (TFA) o boro trifluoruro eterato ($\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$) porta alla formazione di un composto porfirinogeno, che viene successivamente convertito in porfirina mediante ossidazione con 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzochinone (DDQ). Un vantaggio importante del metodo di Lindsey riguarda la possibilità di potere impiegare anche aldeidi instabili in ambiente acido ed il cui utilizzo è precluso con il metodo di Adler-Longo.

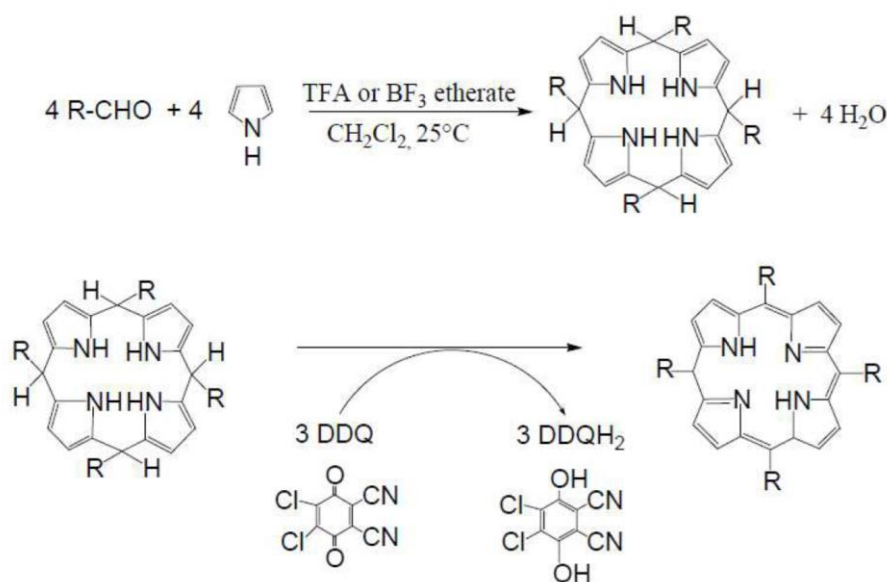


Figura 6. Schema di sintesi in due fasi ed a temperatura ambiente di una generica porfirina *meso*-sostituita secondo il metodo di Lindsey.

Generalmente, all'aumentare del grado di sostituzione del sistema porfirinico, segue un aumento della solubilità in solventi organici e al tempo stesso aumenta l'impedimento sterico che causa una parziale perdita di planarità del sistema macrociclico. Inoltre, studi cristallografici hanno dimostrato che la presenza di sostituenti sull'anello comporta delle variazioni nella dimensione del *core* porfirinico (Figura 7).⁴⁶

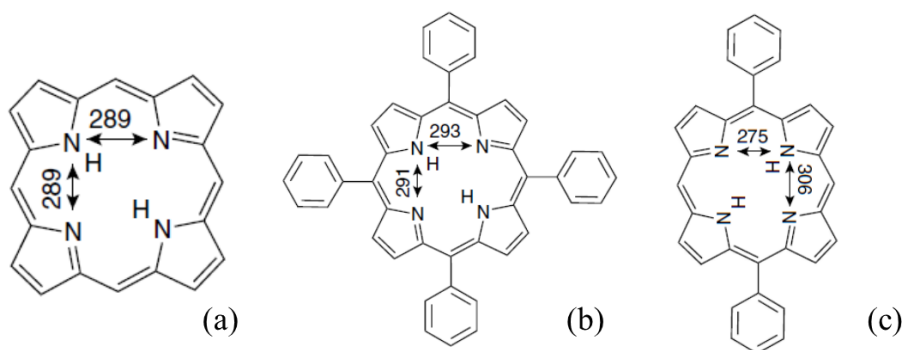


Figura 7. Determinazione, mediante studi cristallografici, della variazione delle dimensioni (in pm) delle cavità porfiriniche in funzione dei sostituenti presenti sull'anello. (a) porfina;⁴⁷⁻⁴⁹ (b) 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP);^{50,51} (c) 5,15-difenilporfirina. Figura adattata da Bond et al.⁴⁶

La sensibilità del *core* porfirinico alla presenza di sostituenti riveste un grande impatto sulla forza del legame idrogeno intramolecolare e sulla velocità di trasferimento del protone. Nella molecola di base sono presenti 22 elettroni di cui 18 conferiscono l'aromaticità al sistema. Il carattere aromatico di questi sistemi è evidente negli spettri NMR. Infatti, quest'ultimi sono caratterizzati da segnali dei protoni *meso* e β a campi bassi, in un intervallo compreso tra 8 e 10 ppm. Tale intervallo è indice della presenza di protoni soggetti a deschermaggio ad opera della corrente ad anello della porfirina. Invece, i segnali dei protoni N-H, situati all'interno del *core* porfirinico, si trovano a campi più alti rispetto al segnale N-H del pirrolo (8 ppm) a causa dell'effetto di schermo esercitato dal campo magnetico indotto (Figura 8).

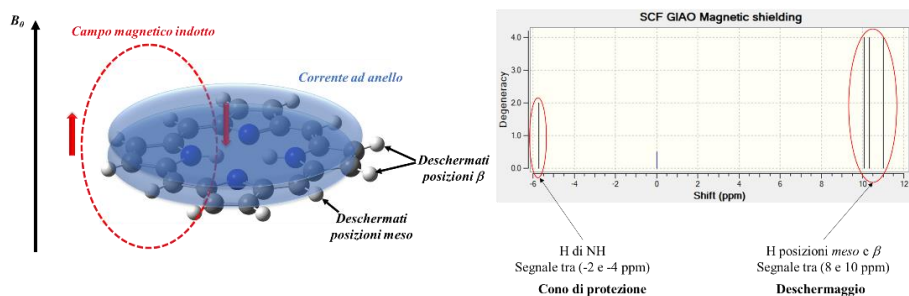


Figura 8. Schema rappresentativo della corrente ad anello di una porfirina e simulazione di uno spettro NMR mediante software Gaussian09 (*Basic set: B3LYP 6-31++G(d,p)*).

Nella sua forma di base libera la porfirina presenta, al centro dell'anello, gli atomi di azoto imminici, i quali possono essere soggetti ad attacco sia da parte di agenti elettrofili che eventualmente essere protonati per dar luogo a specie mono- e dicationiche.⁵²⁻⁵⁴ I gruppi N–H sono invece leggermente acidi, possono essere deprotonati in presenza di basi forti e presentano un equilibrio tautomerico.^{55,56} I due protoni interni possono essere disposti tra i quattro azoti in diversi modi (Figura 9). Nella forma *trans* (1), i protoni sono posizionati sugli anelli pirrolici opposti, mentre nelle posizioni *cis* (1a) sono disposti sui pirroli adiacenti. Naturalmente, a causa delle interazioni repulsive, gli isomeri *trans* sono quelli termodinamicamente più stabili (Tabella 1).

Tabella 1. Energie relative espresse in kcal/mol e momento di dipolo calcolato (B3LYP/6-31G**) per gli isomeri *cis* e *trans* della porfirina.⁵⁷

<i>Isomero</i>	<i>Energia Relativa (kcal/mol)</i>	<i>Momento di dipolo (D)</i>
<i>trans</i> (1)	0.0 (0.0)	0
<i>Cis</i> (1a)	8.2 (7.8)	2.10

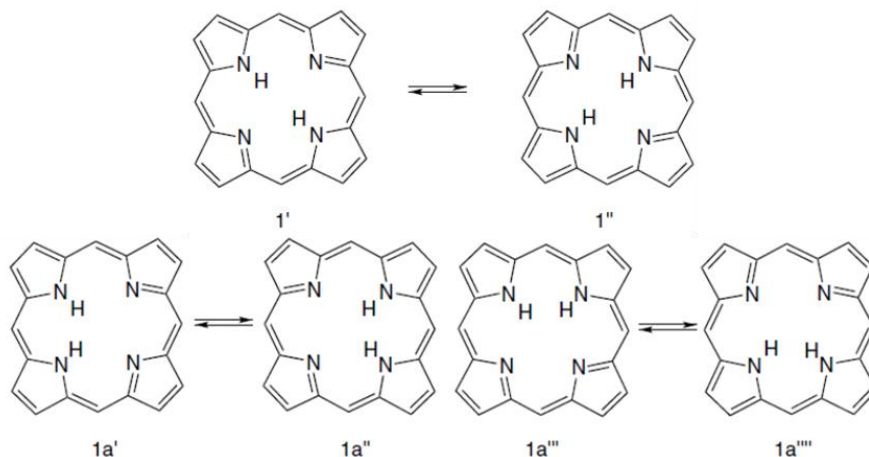


Figura 9. Isomeri *trans* (sopra) e *cis* (sotto) della porfina. Adattata da Kadish et al.⁵⁷

L'acidificazione del *core* porfirinico determina importanti effetti sulla geometria della molecola. Infatti, la protonazione comporta una perdita di planarità del sistema sia per ridurre la repulsione elettrostatica sia per diminuire l'impedimento sterico.⁵² Per quanto riguarda la formazione delle specie acide la presenza di due siti suscettibili di protonazione suggerisce la possibilità di ottenere specie sia mono (pK_{a1}) che diacide (pK_{a2}) come descritto in Figura 10.

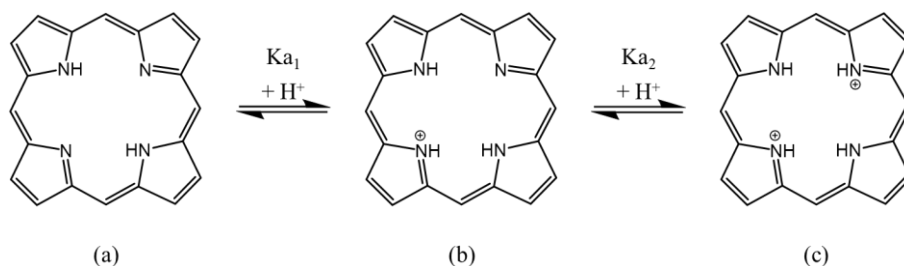
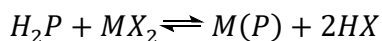


Figura 10. Schema semplificato della protonazione della forma base libera di una porfina (a) alle forme monoacida (b) e diacida (c).

In realtà la forma monoacida non è una specie facilmente isolabile a causa degli equilibri di protonazione in quanto la facilità di addizione del secondo protone è senz'altro maggiore di quella del primo.⁵² Questo comportamento è alquanto inusuale poiché in linea di principio una specie

basica dovrebbe potere subire una protonazione successiva con difficoltà maggiore rispetto alla precedente. Tale andamento è interpretabile con una minore aromaticità della specie monoacida rispetto la base libera. Al contrario, l'aggiunta di un secondo protone è in grado di determinare una maggiore delocalizzazione di carica e quindi di stabilità. È inoltre possibile fare delle considerazioni circa i requisiti sterici del sistema: l'addizione del primo protone risulta essere difficile in quanto i gruppi –NH puntano verso il centro della porfirina, determinando così una disposizione stericamente impedita. La distorsione dell'anello porfirinico generato nella forma monoacida può invece giustificare la maggiore disponibilità del sito basico all'attacco del secondo protone.⁵² La forma monoacida delle porfirine non è dunque facilmente isolabile né distintamente osservabile ed i primi studi condotti da Aronoff e Calvin⁵⁸ conclusero che la forma monoacida non poteva essere osservata a causa della sua stabilità in un intervallo limitato di pH. Soltanto successivamente venne caratterizzata la specie monoacida della tetrafenilporfirina (TPP) stabilizzata attraverso l'interazione con anioni ingombranti e debolmente coordinanti⁵⁹ e un derivato della TPP recante una struttura “*capped*” su una faccia del core.⁶⁰

Le porfirine sono una classe di leganti macrociclici e come tali possono coordinare un gran numero di ioni metallici.⁶¹ Lo schema generale per la formazione di metallo derivati prevede la reazione tra la forma base libera H₂P ed un sale del tipo MX₂, per formare M(P):



Questo processo è chiamato “metallazione” mentre quello contrario “demetallazione”.^{61,62}

I complessi di carattere tipicamente ionico, come ad esempio quelli di sodio, potassio o calcio, vengono facilmente decomposti dall'acqua. La facilità di demetallazione di quelli a carattere covalente varia invece

considerevolmente da caso a caso: il magnesio può essere rimosso con acido acetico, lo zinco ed il ferro(II) con gli acidi minerali diluiti, mentre altri come il ferro(III), il rame, il cobalto e il nichel richiedono un trattamento più energico. In generale i metalli i cui legami con il nucleo porfirinico sono molto forti possono sostituire i metalli legati più debolmente mediante reazione di “transmetallazione”.⁶³ La configurazione elettronica dello ione metallico assume una grande importanza poiché impone diverse geometrie alle metalloporfirine.⁶⁴ Tra queste, le più comuni sono la geometria planare quadrata per la tetra-coordinata, la piramidale quadrata per la penta-coordinata e l’ottaedrica per l’esa-coordinata (Figura 11).

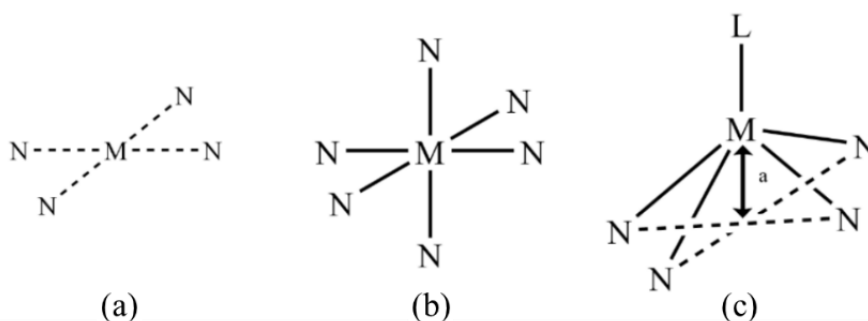
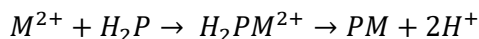
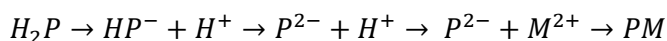


Figura 11. Rappresentazione schematica delle geometrie più comuni per le metalloporfirine: (a) planare quadrata; (b) ottaedrica; (c) piramidale quadrata.

La velocità di formazione di un derivato metallico dipende da alcuni fattori tra i quali: (i) natura dello ione metallico; (ii) presenza di leganti in soluzione; (iii) proprietà del solvente; (iv) natura dei sostituenti presenti sul macrociclo porfirinico.⁶⁵ Numerosi studi sono stati rivolti alla comprensione del meccanismo della reazione di metallazione che in linea di principio può avvenire secondo due possibili processi elaborati sulla base delle reazioni S_N2 e S_N1 , ossia il meccanismo A ed il meccanismo B.⁶¹ Il meccanismo A prevede l’inserzione del metallo nel core porfirinico, con la formazione di una specie H_2PM^{2+} che in seguito subisce deprotonazione per generare la specie PM :



Il meccanismo B invece prevede stadi successivi di deprotonazione fino alla formazione di una specie monoanionica o dianionica, la quale è in grado di coordinare lo ione metallico:



Sulla base del meccanismo A in passato è stata postulata la possibilità di formazione di un complesso 1:1 tra lo ione metallico e la porfirina geometricamente deformata, denominato “*sitting-atop*” (SAT) e che costituirebbe il “*rate determining step*” del processo.⁶⁶ In questo contesto, un ruolo importante assume anche la desolvatazione dello ione metallico nel permettere l’interazione con la cavità porfirinica. Nella fase successiva, uno ione immediatamente adiacente al sito di reazione si inserisce nel macrociclo porfirinico con formazione del metallo derivato. Il modello descritto è stato ampiamente dibattuto in letteratura e ad oggi, nonostante l’evidenza in varie condizioni sperimentali di vari complessi di tipo SAT⁶⁷⁻⁷² non si è arrivata ad una definizione unica del meccanismo di metallazione.

La stabilità dei derivati metallici delle porfirine dipende dalle dimensioni relative del raggio ionico dello ione metallico e di quella della cavità del macrociclo, pertanto se ne deduce che metalloporfirine costituite da ioni metallici di dimensioni paragonabili alla cavità risultano essere più stabili e viceversa.⁷³ Ioni metallici quali Zn(II), Cu(II), Ni(II), Co(III) ecc. sono in grado di adattarsi perfettamente nella cavità del macrociclo e danno luogo alla formazione di metalloporfirine coplanari o “*in-plane*”. La maggior parte dei derivati metallici di porfirine che si trovano nei sistemi naturali appartengono a questa categoria. Ioni metallici con raggi più grandi di 80-90 pm come La(III), Ag(II), Bi(III) ecc. portano alla formazione di metalloporfirine “*out of plane*” in cui il macrociclo porfirinico risulta distorto con formazione di un complesso di tipo SAT. Queste specie sono cineticamente labili e

termodinamicamente meno stabili ed inoltre possiedono caratteristiche strutturali e fotofisiche peculiari ben diverse dalle metalloporfirine “*in-plane*” (Figura 12).

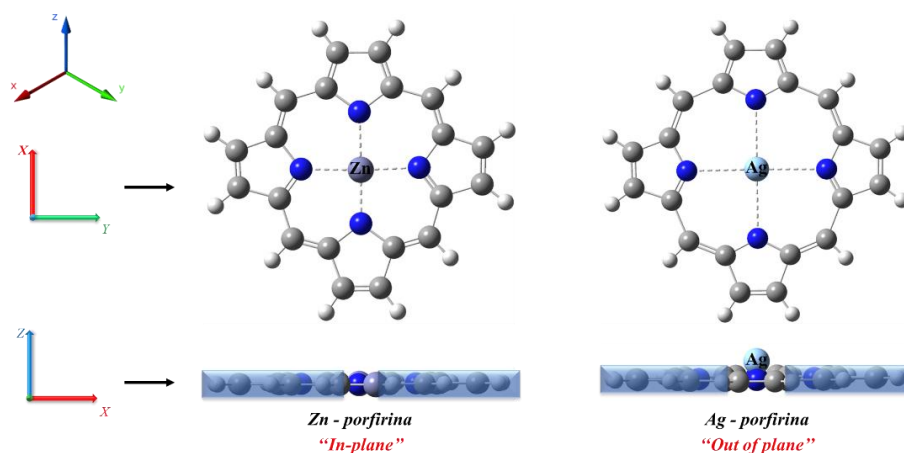
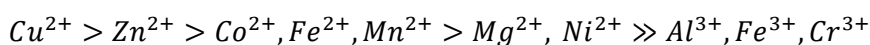
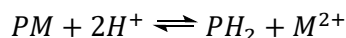


Figura 12. Rappresentazione 3D di una metalloporfirina caratterizzata da una struttura “*in-plane*” e “*out of plane*”.

Molti gruppi di ricerca^{61,74,75} hanno dimostrato che la velocità di metallazione in soluzione acquosa dipende dalla natura dello ione, dai leganti presenti in soluzione e dai sostituenti sull’anello porfirinico e segue approssimativamente il seguente ordine:⁶¹



Tra i vari metodi impiegati per verificare la stabilità degli ioni metallici nelle metalloporfirine c’è il processo di dissociazione o “demetallazione acida”, la cui espressione generale è descrivibile nel modo seguente:



Nelle metalloporfirine in cui il legame è caratterizzato da un minore carattere covalente, come nel caso dello ione Mg^{2+} , la demetallazione acida risulta essere un processo estremamente veloce. Uno studio di demetallazione acida condotto in soluzione acquosa sulla porfirina ZnTMpyP ha evidenziato

una diversa efficienza dell'acido impiegato e strettamente correlata alla natura dell'anione:^{76,77}



In generale, le colorazioni delle soluzioni di porfirina derivano da un sistema di elettroni π altamente coniugato che conferisce proprietà peculiari agli spettri di assorbimento elettronico. Infatti, lo spettro UV/Vis di una tipica porfirina presenta un'intensa banda nell'intervallo 400 - 500 nm dovuta alla transizione al secondo stato elettronico eccitato ($S_0 \rightarrow S_2$), chiamata banda di Soret o banda B ($\epsilon \approx 10^5 M^{-1} cm^{-1}$) e delle bande ad intensità minore nell'intervallo 600 - 700 nm dovute alla transizione al primo stato elettronico eccitato ($S_0 \rightarrow S_1$), chiamate bande Q ($\epsilon \approx 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) (Figura 13). Il numero e l'intensità relativa delle bande Q sono estremamente diagnostici nella determinazione dei cambiamenti strutturali e/o del coordinamento dell'anello macrociclico.

Infatti, la protonazione o la coordinazione con alcuni metalli, comporta un aumento del grado di simmetria del sistema rispetto alla porfirina base libera. Formalmente si ha il passaggio da una simmetria D_{2h} ad una D_{4h} e ciò comporta una diminuzione delle bande Q da quattro a due. Le bande B e Q sono originate da transizioni $\pi - \pi^*$ e trovano la loro spiegazione nel modello dei quattro orbitali proposto da Martin Gouterman nel 1963.⁷⁸

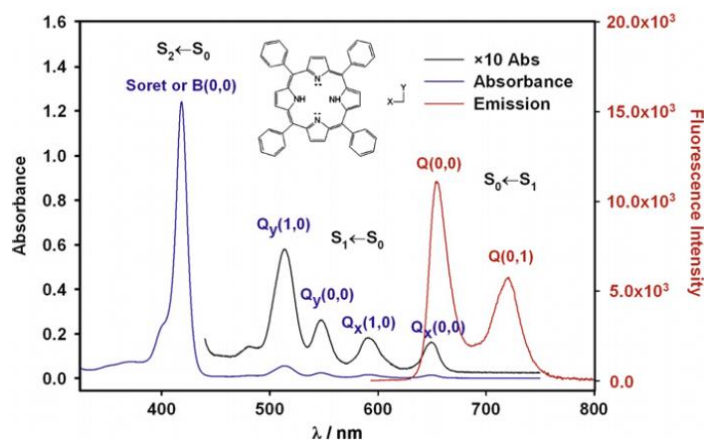


Figura 13. Spettro di assorbimento (blu e nero) e di emissione di fluorescenza ($\lambda_{\text{exc}} = 418 \text{ nm}$; rosso) della porfirina TPP in toluene. Adattata da Uttamlal et al.⁷⁹

Le porfirine sono molecole fotosensibilizzanti, ossia possono assorbire la luce e utilizzarla per eseguire delle reazioni chimiche. Tutte le reazioni fotochimiche delle porfirine si verificano nei loro stati eccitati e la formazione di queste specie può essere spiegato attraverso il diagramma di Jablonski mostrato in Figura 14.

I fotosensibilizzatori nel loro stato fondamentale di singoletto possono assorbire un fotone di luce in modo da passare al loro stato eccitato di singoletto. Quest'ultimo può tornare al suo stato fondamentale mediante un processo di decadimento radiativo, chiamato fluorescenza, oppure può andare incontro al processo di *intersystem crossing* e passare allo stato eccitato di tripletto, dal quale può tornare allo stato fondamentale di singoletto mediante un processo di decadimento radiativo che prende il nome di fosforescenza. L'emissione di fluorescenza è evidenziata dalla presenza di una tipica doppia banda nella regione tra i 600 - 700 nm, originata dalle transizioni Q (0,0) e Q (0,1) (Figura 13).⁷⁹

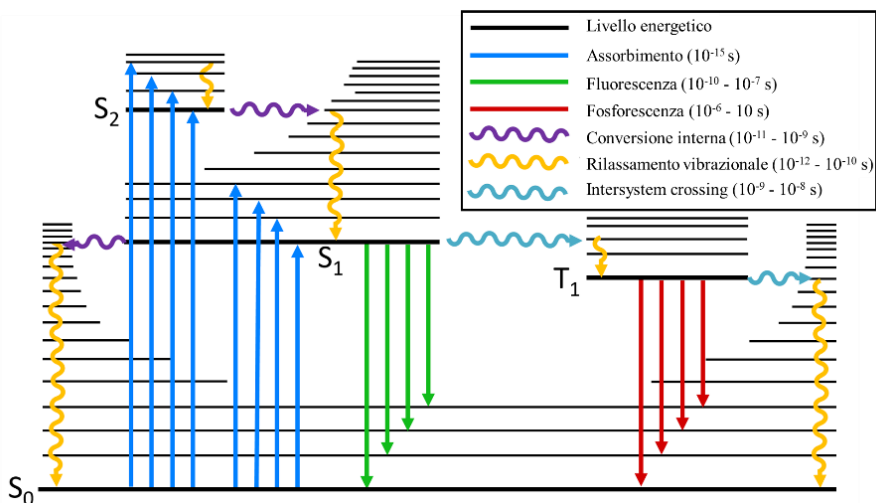


Figura 14. Diagramma di Jablonski.

Una fondamentale importanza dal punto di vista applicativo è data dalla transizione $T_1 \rightarrow S_0$ la quale viene sfruttata per la terapia fotodinamica (PDT). La collisione tra la porfirina nel suo stato di tripletto e una molecola di ossigeno (3O_2) provoca l'eccitazione di quest'ultima al suo stato di singoletto (1O_2) e la disattivazione del cromoforo allo stato fondamentale (Figura 15).

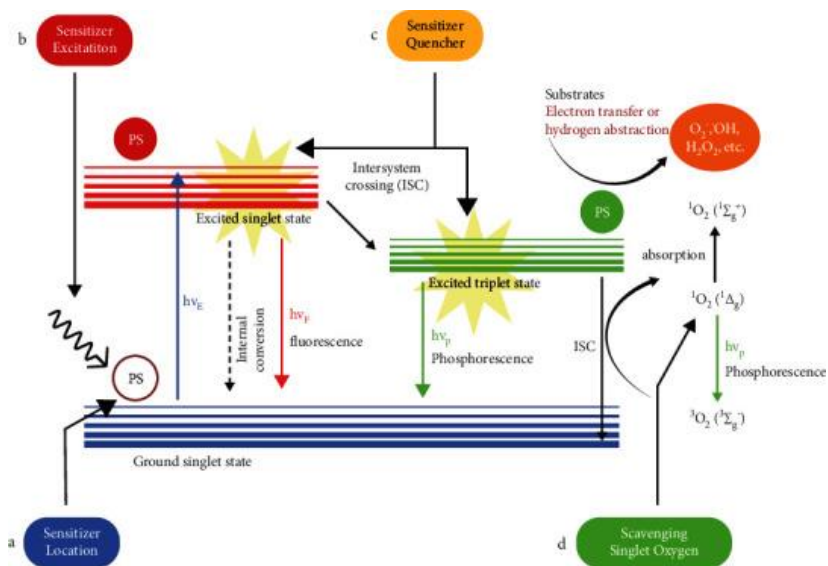


Figura 15. Diagramma di Jablonski per la formazione di ossigeno singoletto attraverso l'interazione con una porfirina nel suo stato di tripletto. Figura data da Maharjan et al.⁸⁰

L'ossigeno singoletto è un radicale libero molto reattivo e presenta attività citotossica. Le porfirine presentano una certa selettività nei confronti dei tessuti tumorali, ragione per la quale, dopo che il farmaco è stato iniettato nel paziente ed in seguito ad irradiazione, si ha una generazione locale di $^1\text{O}_2$ ed altre specie in grado di distruggere le cellule tumorali.⁸⁰⁻⁸²

Le porfirine rappresentano candidati molto versatili come elementi costitutivi da impiegare nella progettazione di sistemi in grado di imitare i processi fotosintetici o nella creazione di nuovi materiali funzionali.⁸³ Gli *arrays* di porfirine possono essere ottenuti attraverso un approccio covalente o mediante autoassemblaggio non covalente, nonché mediante una combinazione dei due. Esempi interessanti di *arrays* covalenti di porfirine sono stati sintetizzati da Osuka e collaboratori con l'intento di poterli impiegare nello sviluppo di nuovi materiali fotonici e dispositivi molecolari. Oligomeri multiporfinici covalenti sono stati progettati utilizzando diversi leganti idrocarburici di lunghezza idonea al fine di realizzare, attraverso la formazione di legami nelle posizioni *meso*, delle architetture di tipo lineare o anche più complesse di tipo ciclico e/o reticolare.⁸⁴⁻⁸⁶ Ancora più interessanti sono i lunghi *arrays* di porfirine *rod-like* in cui fino a 128 unità porfiniche sono fuse tra loro attraverso le posizioni *meso*, senza l'ausilio di alcun legante (Figura 16).⁸⁷

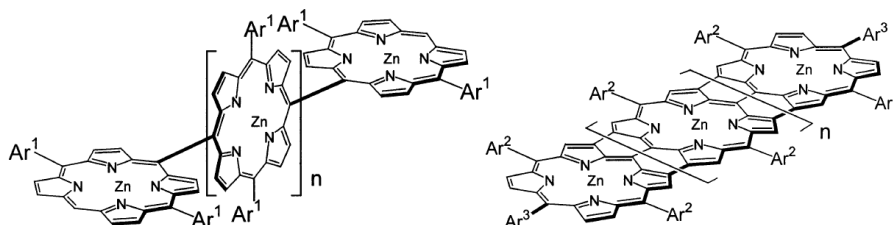


Figura 16. Array di porfirine ortogonale con n fino a 126 unità ed array lineare con n fino a 12 unità. Adattata da Kim et al.⁸⁷

Questo tipo di *array* evidenzia uno *splitting* della banda di Soret a causa dell'accoppiamento eccitonico. All'aumentare del numero di unità di porfirine,

la banda Soret a bassa energia subisce spostamento batocromico ed ipercromico, mentre quella ad alta energia rimane pressoché invariata, risultando, in tal modo, un progressivo aumento dell'energia dello *splitting*.

Le interazioni elettroniche ed eccitoniche vengono dunque regolate con precisione posizionando i cromofori porfirinici in degli arrangiamenti ben definiti esibendo una promettente capacità di raccolta della luce. L'approccio di tipo non covalente è una valida alternativa per costruire *arrays* di porfirine costituiti da una moltitudine di legami ad idrogeno^{88,89} o attraverso legami mediati da metalli coordinati al *core* porfirinico. A tale riguardo, un eccellente esempio è rappresentato dal *self-assembly* di metalloporfirine riportato da Kobuke.⁹⁰ In particolare, a partire dal dimero (Figura 17a) di una zinco porfirina recante un residuo imidazolico in posizione *meso*, sono stati realizzati una varietà di *arrays* polimerici e ciclici la cui struttura e proprietà sono molto simili a quelle riscontrate nei sistemi LH (complessi *light-harvesting*) (Figura 17b).

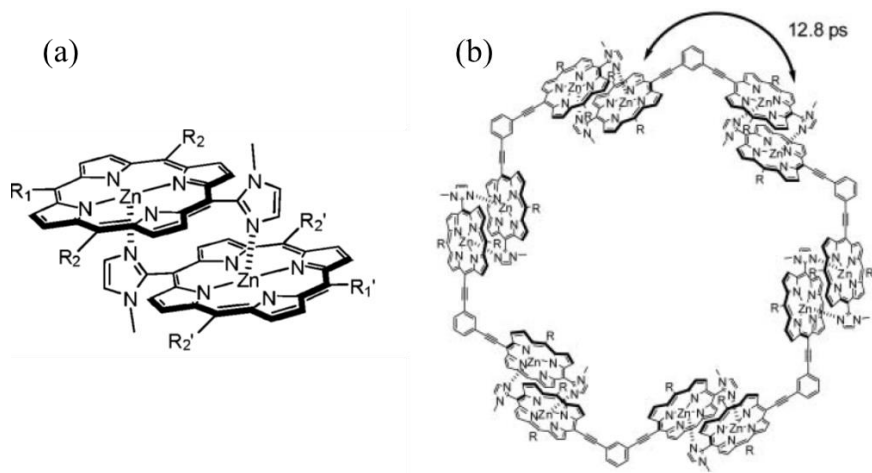


Figura 17. Struttura di dimero della imidazolil-zinco porfirina (a) e macroanello supramolecolare di porfirina (b). Figura adattata da Satake et al.⁹⁰

Le porfirine rappresentano degli ottimi *building blocks* in quanto sono relativamente semplici da sintetizzare e risultano essere piuttosto stabili. Esse,

dipendentemene dalle loro proprietà steriche ed elettroniche, possono spontaneamente dare luogo a fenomeni di *self assembly* per formare dimeri o aggregati superiori attraverso interazioni non covalenti. Questo aspetto è ormai ben noto nella chimica delle porfirine ed esercita un notevole impatto su molte proprietà chimico-fisiche di queste molecole. In particolare, la possibilità di apportare delle variazioni alla struttura mesoscopica delle specie risultanti attraverso una scelta appropriata dei componenti molecolari, consente di progettare e realizzare materiali in grado di esibire proprietà e funzioni specifiche.⁹¹ In questi sistemi aggregati sono possibili variazioni significative delle proprietà fotofisiche sulla base dell'interazione dei momenti dipolari di transizione dei cromofori che sono coinvolti nella formazione della struttura. Da un punto di vista teorico queste interazioni sono state interpretate attraverso il modello di accoppiamento degli eccitoni proposto da Kasha negli anni '60.⁹² La formazione di sistemi aggregati, siano essi dimeri, trimeri o aggregati più complessi, comporta una perturbazione, in termini di energia, degli stati di transizione relativi al monomero. In virtù delle interazioni dei momenti dipolari di transizione dei monomeri, si ottiene una stabilizzazione energetica dello stato eccitato dell'aggregato con conseguente *splitting* eccitonico di energia che fa riferimento all'orbitale LUMO ed è dipendente dalle diverse geometrie che i monomeri assumono avvicinandosi reciprocamente per dare l'interazione. Questo fenomeno dovrebbe essere rigorosamente descritto mediante una trattazione meccanico quantistica dettagliata, ma è possibile approssimare l'interazione di risonanza dello stato eccitato considerando l'interazione elettrostatica reciproca dei momenti di dipolo di transizione. In tale modo, si ottengono due forme limite per la disposizione dei momenti di dipolo, una *face-to-face* ed una *head-to-tail*. Nel primo caso (Figura 18), ossia nel caso in cui i dipoli di transizione sono paralleli tra di loro, la disposizione fuori fase corrisponde elettrostaticamente ad un abbassamento di energia; E' (energia dello stato eccitato dell'aggregato con momenti di dipolo fuori fase) risulta inferiore a E (energia dello stato eccitato del monomero), mentre nel

caso in cui i momenti di dipolo sono in fase, l'interazione determina repulsione e l'energia dello stato eccitato E'' risulta maggiore di E . In accordo con regole di selezione quantomeccaniche e poiché il momento di transizione è dato dalla somma vettoriale dei singoli momenti dipolari di transizione nella molecola risultante, si ha che le transizioni dallo stato fondamentale allo stato eccitonico E' sono proibite, mentre le transizioni dallo stato fondamentale allo stato eccitonico E'' sono permesse. L'effetto dello *splitting* eccitonico è prontamente osservabile dal punto di vista spettroscopico. Infatti, come è immediatamente evidente dal diagramma, la transizione elettronica singoletto-singoletto nel dimero sarà spostata verso il blu (*blue-shift*) rispetto a quella del monomero. Nel secondo caso, la disposizione dei dipoli di transizione in fase conduce ad un'attrazione elettrostatica che genera lo stato eccitato E' , mentre la disposizione fuori fase dei dipoli di transizione determina una repulsione producendo lo stato E'' . La transizione dallo stato fondamentale allo stato eccitonico E'' risulta proibita. Dal punto di vista spettroscopico, la transizione elettronica nel dimero sarà spostata verso il rosso (*red-shift*) rispetto a quella del monomero. Generalmente in letteratura, gli aggregati che presentano i monomeri in una geometria parallela *face-to-face* sono denominati come "aggregati H" (la lettera H sta per *hypsochromic*), mentre se la geometria è del tipo *head-to-tail* sono definiti "aggregati J" (la lettera J sta per Jelly, uno dei primi scienziati che ha studiato queste strutture) o talvolta anche "*Scheibe-type*".

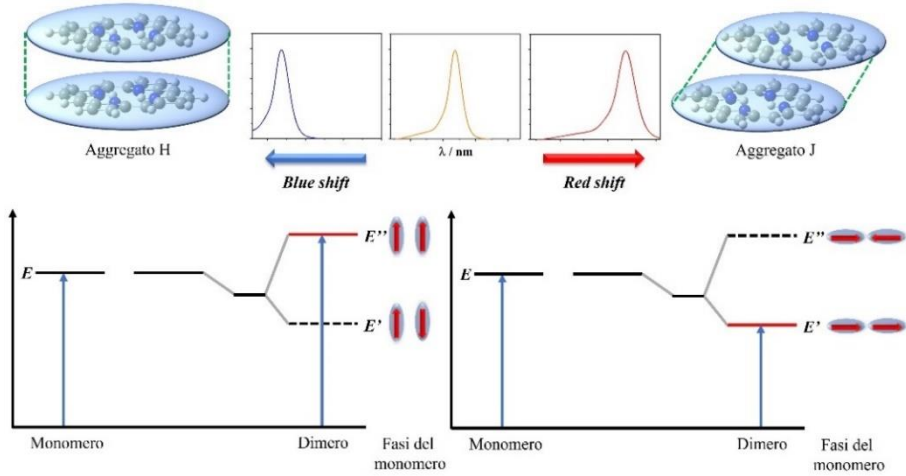


Figura 18. Diagramma dei livelli energetici dello stato eccitato del monomero e degli aggregati secondo una disposizione parallela *face-to-face* (a sinistra) e *head-to-tail* (a destra). La freccia blu indica le transizioni consentite.

L'energia relativa allo *splitting* degli eccitoni corrisponde alla differenza tra i due livelli $\Delta E = (E'' - E')$ e può essere calcolata mediante l'equazione:

$$\Delta E = 4 \left(\frac{N-1}{N} \right) \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(\frac{\mu^2}{R^3} \right) (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

dove N è il numero di monomeri, μ è il momento di transizione elettronico del monomero, R è la distanza tra i centri di massa dei cromofori e θ è l'angolo di inclinazione tra l'asse molecolare che collega i centri dei cromofori nell'aggregato e il momento di transizione di ciascun cromoforo. Un'attenta analisi dell'equazione mostra come l'energia dello *splitting* degli eccitoni dipende da: (i) dal numero di aggregati N ; (ii) è proporzionale al quadrato del momento di transizione del monomero ($\Delta E \propto \mu^2$) e (iii) è inversamente proporzionale al cubo della distanza tra i monomeri ($\Delta E \propto R^{-3}$). La teoria prevede anche che per un angolo $\theta = \arccos(1/\sqrt{3}) = 54.7^\circ$ (denominato "angolo magico"), i dipoli non sono interagenti per cui l'energia dello *splitting* eccitonico sarà uguale a zero e non sarà possibile osservare alcun spostamento delle bande di assorbimento. Questo è l'angolo per il quale

l'aggregato cambierà da una disposizione di tipo J a una di tipo H, come mostrato nella Figura 19.

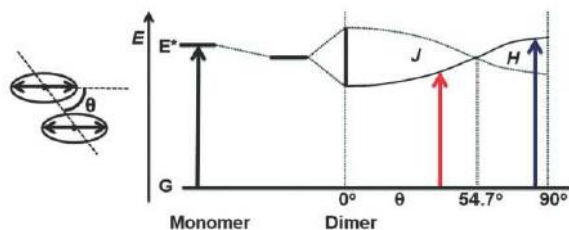


Figura 19. Diagramma energetico dello *splitting* eccitonico per un dimero molecolare avente i dipoli di transizione coplanari in funzione dell'angolo θ .

La formazione di aggregati molecolari determina quindi importanti effetti negli spettri di assorbimento, ma notevoli conseguenze sono osservabili anche in fotoluminescenza (Figura 20). Nel caso di un aggregato di tipo H per il quale lo stato eccitato è quello ad energia maggiore E'' , generalmente è possibile osservare un *quenching* della fluorescenza nello spettro di emissione degli aggregati. Infatti, dallo stato eccitato E'' segue una rapida conversione interna al livello dell'eccitone a più bassa energia E' . Poiché la transizione da E' allo stato fondamentale è proibita, il sistema si disattiva tramite un decadimento non radiativo o va incontro al processo di *intersystem-crossing* passando allo stato eccitato di tripletto. Sperimentalmente si riscontra un'emissione di fluorescenza spostata verso il rosso e caratterizzata da un notevole spostamento Stokes e bassa resa quantica. Nel caso degli aggregati di tipo J, l'emissione avviene dal livello a minore energia E' e conseguentemente essi sono caratterizzati da un ridotto spostamento Stokes e da un'elevata resa quantica.

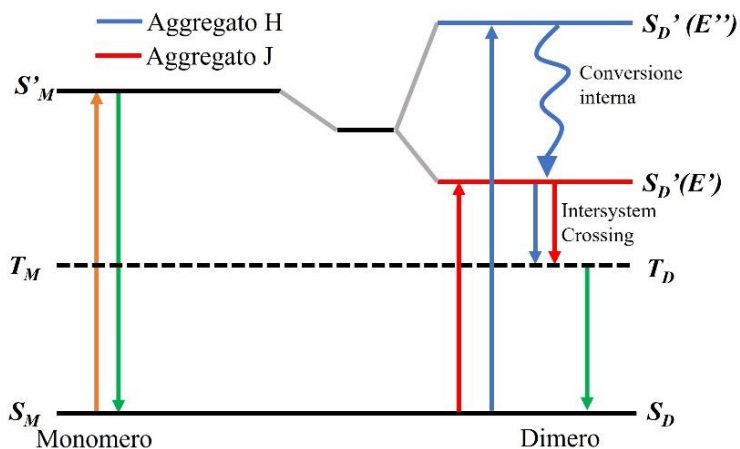


Figura 20. Diagramma di Jablonski per aggregati H (linea blu) e J (linea rossa). Le frecce arancioni e verdi indicano i percorsi comuni.

La scoperta degli aggregati J avvenuta negli anni '30, rappresenta una delle più importanti pietre miliari della chimica dei *dyes* e dunque la premessa per la nascita della chimica supramolecolare. Le intriganti proprietà ottiche degli aggregati J (in particolare, bande di assorbimento molto strette e spostate verso il rosso rispetto a quelle del monomero e la loro capacità di delocalizzare e far migrare gli eccitoni) e la loro prospettiva di applicazione, hanno spinto gli scienziati a dedicarsi a questo settore e numerosi sono stati i contributi pubblicati. L'importanza degli aggregati J è stata realmente compresa quando alcuni aggregati di cianine trovarono una prima applicazione come sensibilizzanti nel processo fotografico con gli alogenuri di argento.^{93,94} Da allora, l'interesse scientifico per gli aggregati J è cresciuto continuamente e un numero enorme di aggregati di coloranti è stato preparato e le loro proprietà ottiche, fotofisiche e strutturali sono state studiate intensamente.⁹⁵⁻⁹⁷ Studi più sofisticati sulle proprietà elettroniche degli aggregati J rivelano che gli stati eccitati sono formati da estesi domini di dipoli di transizione molecolari coerentemente accoppiati, il che depone a favore dell'aggregazione J come fenomeno archetipo di una proprietà emergente dei sistemi a livello supramolecolare o su nanoscala.⁹⁸

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati aggregati J di una vasta gamma di coloranti, come cianine, merocianine, squaraine, clorofille, porfirine, ftalocianine e perilene bisimmide.⁹⁵ Per quanto concerne gli studi di aggregati J costituiti da porfirine, una considerevole mole di lavoro è stata svolta sulla porfirina *meso*-tetrakis(4-solfonatofenil)porfirina (TPPS₄).⁹⁹ A valore di pH neutro, la base libera è nella sua forma tetraanionica a causa della presenza di quattro sostituenti solfonatofenilici carichi negativamente nelle posizioni *meso* dell'anello macrociclico e presenta un equilibrio monomero/dimero in funzione del valore di forza ionica e della concentrazione.^{100,101} In condizioni appropriate di pH (< 1) e forza ionica, questa porfirina è in grado di formare *arrays* stabilizzati attraverso l'instaurarsi di un network di legami a idrogeno che intercorre tra i gruppi solfonati anionici di una porfirina e gli atomi di azoto protonati del *core* di una porfirina vicina.^{102,103} In letteratura sono stati riportati numerosi esempi sia di aggregati di tipo H (*face-to-face*) che di tipo J (*head-to-tail*) di porfirina TPPS₄ ed un ampio dibattito è attualmente in corso riguardo alla disposizione dei monomeri all'interno di questi aggregati.^{104,105} Diverse tecniche sono state impiegate per caratterizzare gli aggregati J ed in particolare la spettroscopia UV/Vis si è dimostrata uno strumento semplice in grado di valutare sia la cinetica di aggregazione che i cambiamenti nelle strutture elettroniche. Gli aggregati J di TPPS₄ sono stati anche studiati attraverso una varietà di tecniche di diffusione di luce che forniscono dettagli sulle dimensioni e sulla forma dell'aggregato, costituendo dunque uno strumento fondamentale per analizzare questi sistemi supramolecolari. In particolare, studi combinati di diffusione elastica della luce (ELS, *Elastic Light Scattering*) e diffusione dinamica della luce (DLS, *Dynamic Light Scattering*) hanno evidenziato la formazione di strutture cilindriche di tipo *rod-like* con un diametro di 70 nm e una lunghezza di 0,6 μm.¹⁰⁶ Dati di scattering di raggi X a piccolo angolo (SAXS, *Small-Angle X-ray Scattering*) hanno suggerito un modello che prevede la formazione di cilindri cavi con l'aggregato J costituito da 26 molecole di porfirina che si auto-

assemblano in una configurazione ad anello nel piano della sezione trasversale del cilindro ed un'aggregazione di tipo H che viene stabilita tra gli strati del cilindro.¹⁰⁷ Nonostante siano state suggerite diverse disposizioni spaziali per chiarire l'intima struttura degli aggregati della porfirina TPPS₄, non è sorprendente ancora oggi l'apparente contrasto tra i dati riportati in letteratura. Infatti, le dimensioni e la struttura degli aggregati colloidali dipendono in modo significativo dai parametri del mezzo quale concentrazione, forza ionica, pH e temperatura nonché dal protocollo di mescolamento dei reagenti e non ultimo la "storia" del campione. È stato infatti dimostrato che, ottimizzando le proprietà del mezzo, è possibile ottenere aggregati di forma e dimensioni controllate. In particolare, il cambiamento strutturale da *frattale* a *nanorods* può avvenire semplicemente agendo sul potenziale di interazione intermolecolare. In particolare, un basso valore di forza ionica ed un'elevata concentrazione di porfirina inducono la porfirina TPPS₄ ad auto-assemblarsi in disposizioni tipo *rod-like*, mentre a bassa concentrazione di porfirina ed elevata forza ionica, la schermatura del potenziale di repulsione sembrerebbe essere responsabile della formazione di strutture *fractal-like*.¹⁰⁸ Altri studi, effettuati in particolari condizioni di pH e forza ionica hanno dimostrato che la porfirina solfonata è in grado di formare strutture di tipo frattalico di varia dimensione.¹⁰⁹ La TPPS₄ non è ovviamente l'unica porfirina in grado di formare aggregati di natura frattalica. Infatti, nel passato, la porfirina dicationica *trans-bis*(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina (*t*-H₂P_{agg}) è stata oggetto di ampi studi a causa del peculiare comportamento delle sue soluzioni acquose. All'aggiunta di sale, questa specie forma estesi aggregati di natura frattalica che sono stati ampiamente studiati in svariate condizioni sperimentali attraverso diverse tecniche di diffusione della luce.¹¹⁰ Una delle caratteristiche più comuni degli oggetti frattalici consiste nel fatto che essi si presentano come strutture "autosimilari", vale a dire invarianti sotto certe trasformazioni di scala. Questo significa che selezionando una porzione di un frattale e andando ad esaminarla nei suoi dettagli più piccoli, esso risulterà sempre somigliante

all'oggetto originale.¹¹¹ Si definisce quindi frattalico, un sistema la cui morfologia è indipendente dalla scala di osservazione e che può essere ottenuto tramite ripetizione casuale di un'unità iniziale (Figura 21). Un oggetto frattalico viene descritto tramite una legge di scala che mette in relazione la massa del sistema M con il corrispondente raggio R :¹¹¹

$$M \propto R^{d_f}$$

dove d_f è il coefficiente di Hausdorff o dimensione frattalica, ed è un numero non intero e minore di 3. Tale coefficiente, può essere ricavato sperimentalmente tramite misure di intensità di scattering¹¹² e rappresenta una misura del grado di porosità di un frattale.

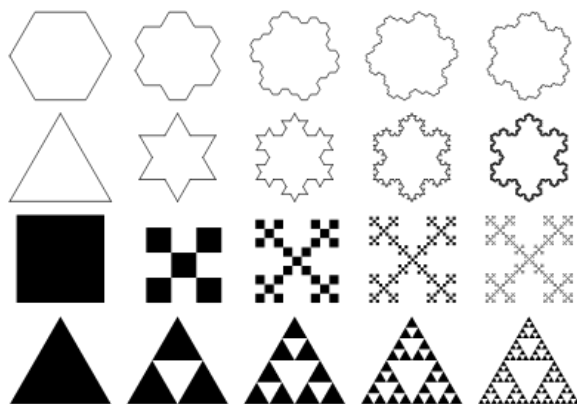


Figura 21. Frattale visto come oggetto auto-similare.

Analisi condotte tramite raggi X, microscopia elettronica e simulazioni al computer hanno portato alla definizione di differenti modelli di crescita per gli aggregati frattalici. Il primo importante modello di crescita è stato proposto da Witten e Sanders.¹¹³ Questi autori, attraverso uno studio di simulazione al computer, hanno dimostrato che mediante un moto di “*random-walk*” si può formare un aggregato che presenta caratteristiche frattaliche nella sua struttura. Il modello proposto consiste nel rilasciare una particella dal perimetro di un cerchio nel cui centro ne è presente un'altra che rappresenta il seme di crescita

del cluster (Figura 22). La particella che viene rilasciata dal perimetro effettuerà un cammino “*random-walk*” fino a quando non urterà una delle particelle poste al centro del cerchio, aggregandosi e diventando parte integrante di un cluster che continuerà la sua crescita fino a quando saranno presenti monomeri in soluzione. Tale modello di aggregazione prende il nome di *Diffusion Limited Aggregation* (DLA) e può essere considerato alla base di molti processi di crescita. Esso è caratterizzato da un valore ben preciso di dimensione frattalica ($d_f = 2.5$).

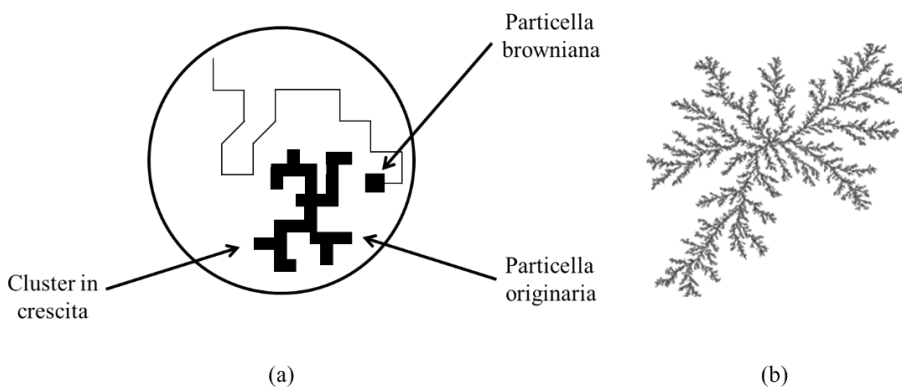


Figura 22. (a) Simulazione di crescita tramite meccanismo di DLA per un aggregato secondo il modello proposto da Witten e Sander. (b) Frattale risultante da questo tipo di crescita.

Una variante del modello precedentemente descritto è costituita dal processo di *Diffusion Limited Cluster-Cluster Aggregation* (DLCCA). Secondo tale modello si parte da una configurazione iniziale di particelle, le quali sono fatte muovere secondo un cammino “*random-walk*”. Attraverso gli urti successivi tra le particelle e i clusters di dimensione intermedia che da esse vengono generati, si formano strutture sempre più grandi con proprietà auto-similari. Questo modello di crescita è caratterizzato da un valore di dimensione frattalica minore ($d_f = 1.75$). Un ulteriore importante processo di crescita è il *Reaction Limited Aggregation* (RLA) nel quale l’aggregazione tra le varie particelle è vincolata ad un meccanismo di attivazione (generalmente termica). Condizione necessaria perché abbia inizio il processo di aggregazione è il

superamento di una barriera energetica rappresentata da interazioni di natura repulsiva. La probabilità che due particelle si possano aggregare dopo un singolo urto risulta più bassa, è quindi necessario un numero maggiore di collisioni. Tale modello di crescita è caratterizzato da un valore intermedio di dimensione frattalica ($d_f = 2.1$). Il coefficiente di dimensione frattalica viene ricavato attraverso misure di intensità di luce diffusa $I(q)$ in funzione del vettore d'onda scambiato q . L'intensità di scattering è proporzionale al prodotto tra il fattore di forma dell'unità monomera $P(q)$ e il fattore di struttura $S(q)$:¹¹⁴ $I(q) \propto P(q)S(q)$. In particolari condizioni sperimentali ed in un determinato intervallo di q (regime di Porod) si ha che $I(q) \propto S(q) \propto q^{-d_f}$ per cui riportando in un grafico con scala logaritmica l'intensità di scattering $I(q)$ in funzione di q si ottiene una retta la cui pendenza è pari a $-d_f$. Anche se inizialmente le tecniche di scattering venivano impiegate solo per esaminare gli aspetti geometrici degli aggregati, oggi esse rappresentano un ottimo strumento per esplorare le proprietà dinamiche di queste strutture, fornendo una relazione dettagliata tra le loro proprietà idrodinamiche e statiche. In particolare, negli studi di aggregazione sulla porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ di cui sopra, le misure di scattering elastico e dinamico della luce indicano la presenza di grandi clusters monodispersi aventi caratteristiche di frattale realizzato tramite processo DLA.¹¹⁵ Le cinetiche di aggregazione, seguite per mezzo di esperimenti UV/Vis e monitorando la dipendenza temporale della concentrazione di monomero hanno fornito importanti dettagli sul comportamento cinetico dei clusters.¹¹⁵ E' stato anche dimostrato come al variare della concentrazione di sale utilizzata per indurre l'aggregazione (quindi variando il potenziale di interazione) è possibile modulare la struttura e la dinamica di crescita degli aggregati.¹¹⁶ A tale proposito, la Figura 23 mostra come è possibile accedere a diversi processi di crescita al variare delle condizioni di forza ionica: (i) DLA ($d_f = 2.45$) nell'intervallo $0.06\text{M} \leq [\text{NaCl}] \leq 0.1\text{M}$; (ii) RLA ($d_f = 2.05$) nell'intervallo $0.15\text{M} \leq [\text{NaCl}] \leq 0.25\text{M}$; (iii) DLCCA ($d_f = 1.7$) a forza ionica elevata $[\text{NaCl}] \geq 0.4\text{M}$.

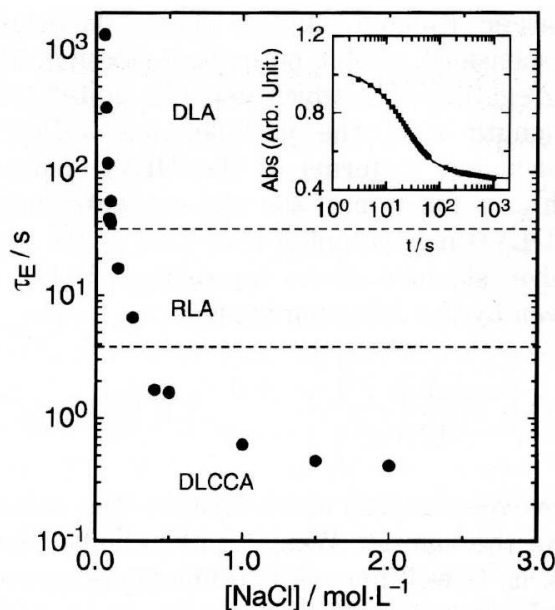


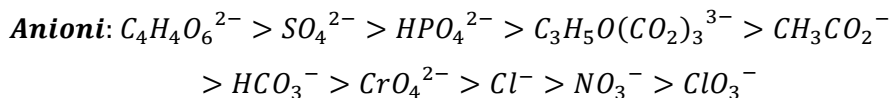
Figura 23. Variazione del tempo medio di aggregazione al variare della concentrazione di sale. Nell'inset un tipico profilo cinetico in assorbimento per la formazione di questo genere di aggregati. Figura adattata da Monsù Scolaro et al.¹¹⁶

Ulteriori studi hanno evidenziato che, nel caso di questa porfirina, la cinetica di aggregazione non inizia a partire da un semplice monomero, ma essa prevede un preliminare stadio iniziale di tipo RLA dopo il quale, a un certo punto, si verifica un passaggio al regime DLA.¹¹⁷ Inoltre, la dipendenza delle cinetiche di aggregazione al variare della temperatura, unitamente alla metodologia di preparazione dei campioni, che può determinare la formazione di nuclei preformati in grado di influenzare drasticamente il processo di crescita,¹¹⁸ sottolinea l'importanza della necessità di controllare al meglio tutti i parametri che svolgono un ruolo primario in tutti gli stadi di un processo di *self assembly*.

1.3 - Effetto dello ione specifico - serie di Hofmeister

La formazione di strutture mediante *self-assembly*, come detto in precedenza, offre la possibilità di ottenere nuovi materiali funzionali. In questo tipo di processo il controllo dei vari parametri in grado di influenzare il meccanismo riveste un ruolo di fondamentale importanza. In letteratura sono riportati numerosi studi in soluzione che dimostrano come, attraverso l'aumento della forza ionica, si favorisce il processo di aggregazione. Questo effetto può essere facilmente compreso considerando che gli elettroliti aggiunti alla soluzione sono in grado di schermare le cariche presenti sui substrati e conseguentemente riducono la repulsione elettrostatica. Un esempio è dato da alcuni peptidi anfifilici, i quali, in funzione della forza ionica portano alla formazione di nanotubi o di una struttura aperta simile all'amiloide.¹¹⁹ Secondo la teoria di Debye-Huckel, la natura dell'elettrolita non comporta alcuna differenza poiché l'interazione tra gli ioni si basa sulla carica molecolare, ossia sull'interazione elettrostatica che essi esercitano.¹²⁰ In letteratura sono riportati numerosi studi che hanno evidenziato come le caratteristiche strutturali dell'aggregato finale possano essere determinate attraverso l'impiego di uno specifico ione.¹²¹⁻¹²³ Un esempio è costituito dal peptide (EAK16(II)GGH), che è in grado di formare fibre la cui lunghezza dipende dalla tipologia di anione che costituisce il sale impiegato per indurre il processo.¹²⁴ Gli effetti specifici degli ioni, identificati con acronimo SIE (*Specific Ions Effects*), sono noti da circa un secolo e sono oggetto di studio in vari campi: scienze mediche, biologiche, chimiche e industriali. Tuttavia, data la complessità dei sistemi resta impossibile prevedere quando e come sarà presente un effetto dovuto agli ioni.

I SIE furono studiati per la prima volta da Lewith e Hofmeister intorno al 1890. Essi studiarono un elevato numero di anioni e li ordinarono in funzione della loro capacità di precipitare le proteine del siero del sangue e dell'albumina in soluzione acquosa.^{125,126}



Il simbolo “>” indica una maggiore capacità di precipitare la proteina (tale effetto prende il nome di *salting-out*) e di conseguenza, la possibilità di impiegare una concentrazione minore di ioni al fine di indurre la precipitazione.

Hofmeister ipotizzò che il comportamento di ogni ione derivasse dalla sua capacità di assorbire acqua.¹²⁶ Su questa base, gli ioni sono stati successivamente classificati rispettivamente cosmotropici (fortemente idratati, ordinano le molecole d'acqua all'interno della soluzione) e caotropici (debolmente idratati, interrompono l'ordine della struttura dell'acqua nella soluzione). La serie di Hofmeister ordina gli ioni dal più cosmotropico (che precipitano le proteine, “*salting-out*”) al più caotropico (mantengono in soluzione le proteine, “*salting-in*”). Tuttavia, mentre i termini cosmotropico e caotropico dipendono esclusivamente dall'identità dello ione, i termini “*salting-in*” e “*salting-out*” dipendono dal sistema che si considera. Nel corso degli anni sono state osservate SIE che seguono lo stesso ordine o un ordine simile in vari sistemi biologici,^{127,128} nei polimeri,¹²⁹⁻¹³² ed in sistemi non acquosi.¹³³⁻¹³⁵ Tale fenomeno è stato comunemente definito come “effetto di Hofmeister” o più semplicemente “serie di Hofmeister”. Tuttavia, numerosi studi hanno riportato un effetto SIE in vari sistemi che si discosta dall'andamento sopracitato, un esempio è la serie liotropica.¹³⁶ Questa serie si basa sul calore di idratazione degli ioni ed è stata anche usata in modo intercambiabile con la serie di Hofmeister, a causa della somiglianza del loro

ordinamento come mostrato in Figura 24. Un parametro utilizzato per spiegare quantitativamente l'effetto SIE è il coefficiente di viscosità B . Poiseuille, notò che l'aggiunta di alcuni sali all'acqua aumenta la viscosità mentre altri sali la diminuiscono.¹³⁷ Jones e Dole formularono una relazione tra la variazione di viscosità e le interazioni elettrostatiche esercitate dai sali.¹³⁸ Da tale relazione si evince che le interazioni elettrostatiche che agiscono per aumentare la viscosità di una soluzione, variano con la radice quadrata della concentrazione. Il loro risultato è stato espresso dall'equazione:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + A\sqrt{c} + Bc$$

Dove c è la concentrazione dell'elettrolita η e η_0 sono rispettivamente la viscosità della soluzione e dell'acqua. Il coefficiente A è correlato alle forze interioniche, mentre il termine B è attribuito alle interazioni ione-solvente. Il termine (B) è ormai riconosciuto come parametro atto a fornire una misura quantitativa di SIE; esso tra l'altro, è stato il primo criterio impiegato per interpretare il ruolo “*breaking/making* della struttura dell'acqua” espletato dagli ioni.¹³⁹ Mentre i coefficienti A sono sempre positivi, i coefficienti B assumono valori sia positivi che negativi. In particolare, questi valori dipendono dalla temperatura, il che suggerisce una relazione tra l'influenza dello ione sulla struttura del solvente e l'entropia presente nel sistema. Più il valore di tale parametro è negativo, più lo ione agisce come “*structure-breaking*”.

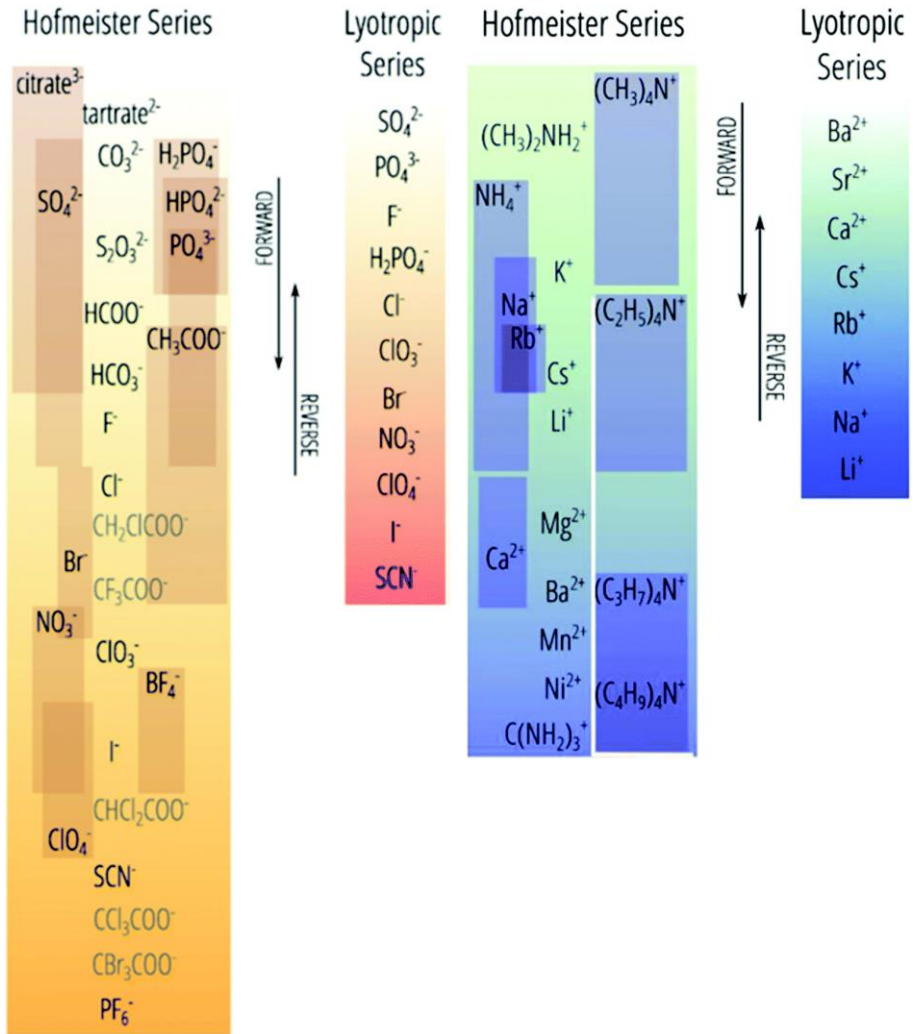


Figura 24. Serie di Hofmeister e serie liotropica di cationi ed anioni in acqua con alcune deviazioni, riportate nelle barre, che mostrano le variazioni di posizione riportate tra diverse pubblicazioni. L'estremità superiore (di cationi e anioni) riporta gli ioni che storicamente sono chiamati cosmotropici, ovvero che favoriscono la precipitazione delle proteine in soluzione acquosa. Gli ioni posti nell'estremità inferiore prendono il nome di caotropici e tendono a solubilizzare le proteine. Figura adattata da Mazzini et al.¹⁴⁰

La natura dell'effetto di uno ione su un sistema è determinata dalle proprietà dello ione, nonché dal soluto e dal solvente. In passato, Collins e Washabaugh avevano elencato una serie di proprietà delle soluzioni saline tra

le quali la dimensione degli ioni, la polarizzabilità e l'energia libera di idratazione seguono e spiegano l'andamento della serie di Hofmeister.¹⁴¹ Tuttavia, le variazioni e le eccezioni sono frequenti, per cui non sono stati stabiliti dei parametri universali per gli ioni Hofmeister. In un recente lavoro Leontidis riporta che la serie di Hofmeister ha comunque origine da una combinazione di parametri, tra cui distribuzione di carica ionica, dimensione, forma e idrofobicità (Figura 25).¹⁴²

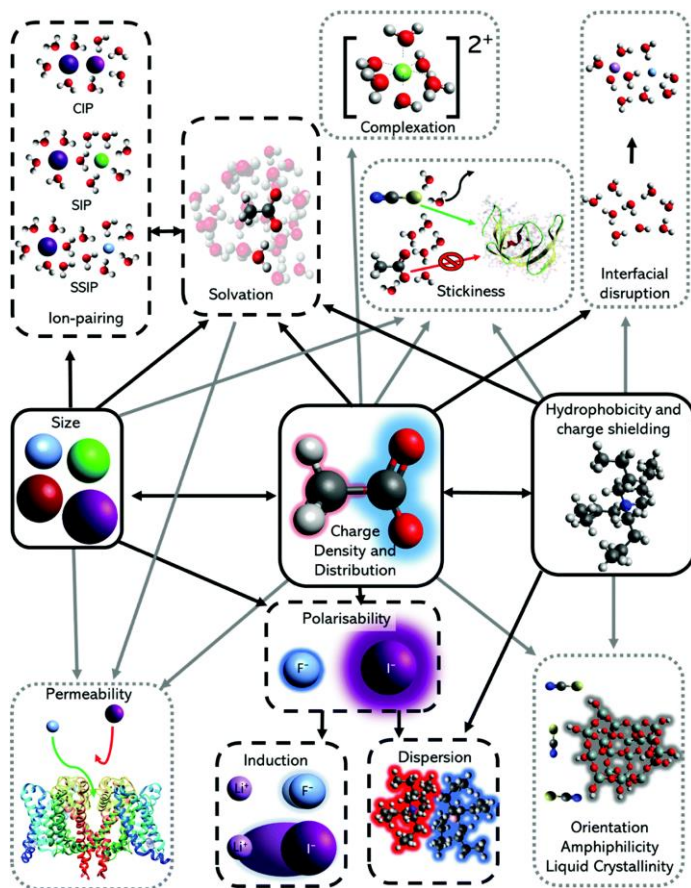


Figura 25. Schema delle principali proprietà dello ione (riquadro nero pieno) correlate agli effetti che forniscono un contributo maggiore (riquadro nero tratteggiato) e agli effetti che forniscono un contributo minore (riquadro grigio tratteggiato). Figura adattata da Gregory et al.¹⁴³

È noto come gli effetti di Hofmeister influenzano vari fenomeni, tra cui la tensione superficiale,¹⁴⁴ il potenziale zeta,¹⁴⁵ il legame ionico delle proteine,¹⁴⁶ le forze molecolari,^{146,147} ecc.. Tra questi fenomeni, un ruolo particolare assume l'effetto esercitato sul legame idrogeno dell'acqua. Infatti, tale interazione può rivestire un ruolo chiave nella stabilizzazione degli aggregati come sottolineato in un recente lavoro riportato in letteratura riguardo a studi cinetici relativi al processo di aggregazione di una porfirina anionica. Gli autori dimostrano la sussistenza di una correlazione tra le costanti di velocità, la serie di Hofmeister degli anioni e l'energia libera di Gibbs per il legame idrogeno.¹⁴⁸

1.4 - Chiralità

La chiralità, definita come *“la proprietà di un oggetto di non essere sovrapponibile alla sua immagine speculare”* è una caratteristica intrinseca dei sistemi biologici, che si è espressa in natura ad ogni livello strutturale da quello subatomico a quello galattico. Essa comprende le molecole, le supramolecole, *assembly* a livello micro- e macroscopico e persino le galassie, con dimensioni che vanno dagli angstrom agli anni luce.¹⁴⁹ Su questa scala, anche il nostro sistema galattico è chirale, con i corpi celesti che si muovono tutti coerentemente su orbite circolari perfette e chirali. La chiralità, coinvolta sulla terra fin dall'origine della vita e ampiamente sfruttata nel corso dell'evoluzione, ha una moltitudine di ruoli nei sistemi biologici, dalla discriminazione alla regolazione, un aspetto intrigante che incuriosisce gli scienziati ormai da anni.

I mattoni molecolari della vita quali aminoacidi e nucleotidi sono chirali, così come le loro forme polimeriche. La chiralità delle molecole biologiche è principalmente legata alla disposizione fissa di quattro gruppi diversi attorno a un atomo centrale stereogenico. Questa peculiarità è fondamentale per veicolare informazioni specifiche (gli aminoacidi L- e non D- vengono assorbiti dal nostro organismo, l'odore e il sapore delle molecole L- e D- sono diversi) ma ne limita il ruolo biologico. Al contrario, i biopolimeri chirali che presentano complesse correlazioni spaziali tra i costituenti monomerici sono flessibili e la loro chiralità conformazionale può essere modulata con profonde conseguenze sul loro significato biologico. In generale, per la chiralità si possono riconoscere due livelli importanti: quello molecolare e quello supramolecolare ed entrambi sono di fondamentale importanza per la vita quotidiana. Ad esempio, l'interazione di due forme enantiomeriche con il recettore biologico viene trasmessa in modo differente e può portare a effetti diversi ed a volte anche indesiderati. Ad esempio il carvone esiste come due

enantiomeri: l'*R*-(-)-carvone, che profuma come foglie di menta, e la sua immagine speculare *S*-(+)-carvone, il quale odora di semi di cumino; oppure l'*R*-(+)-limonene profuma di arancia mentre l'*S*-(-)-limonene profuma di limone. Il fatto che i due enantiomeri vengano percepiti in modo diverso è prova che nel sistema olfattivo ci sono dei recettori “chirali”, ossia che permettono una risposta diversa a seconda dell'enantiomero che percepiscono. Inoltre, anche le forme enantiomeriche dei farmaci possono comportarsi in modo molto diverso con i recettori nell'organismo causando degli effetti negativi, come nel caso della talidomide. L'enantiomero *R*(+) del principio attivo della talidomide ha infatti effetti sedativi e antinausea, mentre l'enantiomero *S*(-) ha tossicità elevata di carattere teratogeno sul feto tanto da provocare gravi malformazioni. Parimenti a quanto osservato per la chiralità molecolare a livello biologico, lo studio dell'espressione della chiralità a livello supramolecolare è particolarmente intrigante. Segnali chiroici sono osservati in sistemi molecolari che sono opportunamente classificati come (i) molecole intrinsecamente chirali, a causa della presenza di un centro chirale o di un asse chirale (Figura 26a e b)^{150,151} e (ii) sistemi in cui unità molecolari achirali sono disposte in strutture supramolecolari dove la chiralità può emergere grazie alla complessazione di tipo *host-guest* (Figura 26c) o attraverso il *self-assembly* molecolare (Figura 26d).^{152,153} L'organizzazione supramolecolare delle molecole produce interessanti segnali chiroici, come il dicroismo circolare indotto (ICD) e il dicroismo circolare elettronico da accoppiamento eccitonico (ECD). Il trasferimento di chiralità può avvenire da composti chirali non racemici (*host* - ad esempio, ciclodestrina, sistemi biomolecolari, ecc.) a molecole achirali (*guest* - un cromoforo) durante l'organizzazione molecolare o supramolecolare, come illustrato nella Figura 26c.¹⁵³ Il trasferimento di chiralità viene rilevato attraverso la formazione di un segnale di dicroismo circolare indotto (ICD) nella regione spettrale dell'assorbimento del *guest* (tipicamente nel visibile o nel vicino UV).¹⁵⁴ Il segnale emerge principalmente a causa delle interazioni *host-guest* che comportano: (i) la riduzione della

simmetria strutturale del *guest* achirale a causa dell'*host* chirale secondo un fenomeno che è chiamato chiralità strutturalmente indotta; oppure (ii) l'accoppiamento tra i momenti di dipolo di transizione dell' *host* e del *guest* senza alcuna perturbazione strutturale importante del *guest*.^{153,155} Gli spettri ICD sono di grande interesse, poiché forniscono indicazioni sulla configurazione assoluta del componente chirale, che spesso è trasparente nella regione UV-Vis. Ancora più interessante è il fatto che l'ICD fornisce informazioni sull'orientamento relativo delle molecole *host* e *guest* nel complesso. Gli spettri CD bisegnati osservati nei sistemi chirali supramolecolari derivano invece dall'accoppiamento dipolare degli eccitoni tra cromofori identici o molto simili tra loro. Nell'ICD, i dipoli interagenti corrispondono a transizioni attinenti all'*host* e al *guest* che si verificano tipicamente in diverse regioni dello spettro. Conseguentemente lo spettro ICD osservato nella regione spettrale che interessa il *guest* non è bisegnato, ma mostra una banda positiva o negativa. Naturalmente, nei sistemi in cui è presente più di un singolo cromoforo, le interazioni intercromoforiche possono sommarsi ai fenomeni di ICD, dando luogo a caratteristiche dello spettro ben più complesse.

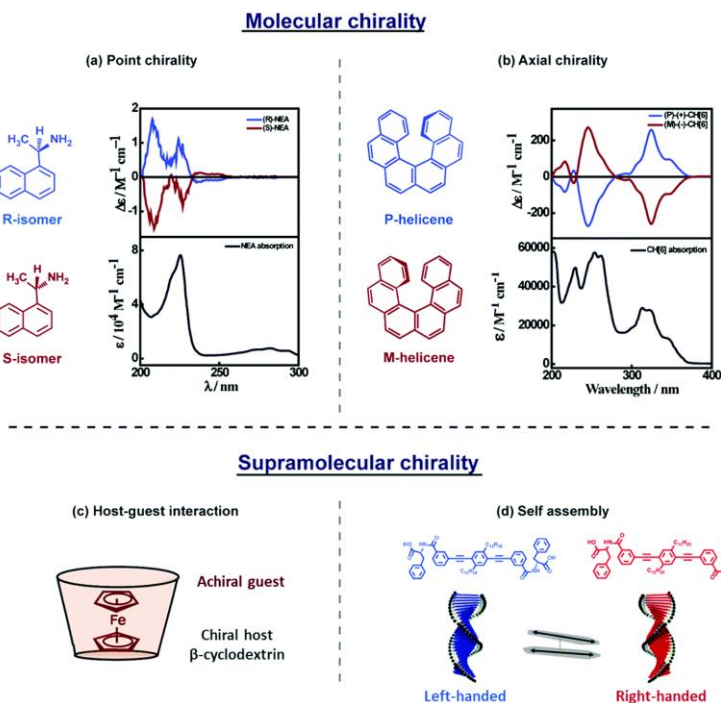


Figura 26. Descrizione generale della chiralità molecolare (*a* e *b*) e supramolecolare (*c* e *d*). (*a* e *b*) spettro di assorbimento (pannello inferiore) e spettro CD (pannello superiore) di sistemi molecolari che mostrano un centro stereogenico (*a*)¹⁵⁰ e molecole che hanno chiralità assiale (*b*), ovvero molecole che non hanno uno stereocentro, ma la chiralità che emerge è dovuta alla struttura come in P- e M-eliceni.¹⁵¹ (*c* e *d*) Chiralità supramolecolare derivante da interazioni non covalenti: (*c*) complesso di inclusione *host-guest*, rappresentato dal ferrocene all'interno della cavità di una ciclodestrina che evidenzia ICD;¹⁵³ (*d*) *self-assembly* di molecole in elica destrorsa e sinistrorsa caratterizzate da ECD.¹⁵² Figura adattata da Nakai et al.¹⁵¹

La perturbazione strutturale di un componente achirale può avvenire in vari modi. Distinguere questi contributi con l'analisi sperimentale è difficile nonché delicato dal punto di vista teorico. In verità, un *host* chirale può indurre una perturbazione strutturale dominante su una molecola achirale determinando così la formazione di una conformazione con una specifica chiralità. In alternativa, un *host* chirale può indurre l'organizzazione di cromofori achirali in modo elicoidale, dando luogo a un segnale CD da accoppiamento eccitonico con effetti Cotton bisegnati interpretabili in base alla “*chirality rule*” proposta da Nakanishi.¹⁵⁶

1.4.1 - Chiralità nei sistemi porfirinici

Nell'ambito dell'espressione della chiralità supramolecolare indotta dal processo di *self-assembly* di molecole achirali, un posto di rilievo occupano le porfirine. Un intrigante metodo per ottenere sistemi porfirinici aggregati chirali è proprio l'interazione non covalente tra porfirine achirali ed una vasta gamma di *bias* chirali tra cui si possono annoverare piccole molecole, biomacromolecole, polimeri, aggregati chirali e così via che verranno discussi a seguire riportando degli opportuni esempi. Questa strategia ha il pregio di aumentare la versatilità dei sistemi supramolecolari porfirinici nonché ne semplifica la sua realizzazione se confrontata alla laboriosità della sintesi di porfirine chirali. Inoltre, poiché il trasferimento di chiralità si realizza per mezzo di varie interazioni deboli, questi sistemi chirali possono essere facilmente modulati per esprimere caratteristiche diverse in risposta a stimoli esterni nel momento in cui si procede all'*assembly* molecolare. Estremamente importante, può risultare il rapporto con cui si mescolano unità chirali e porfirine achirali al momento di procedere alla realizzazione della specie finale, in quanto trovano applicazione i noti principi della "*majority rule*" e del "*sergeants and soldiers*", effetti che influenzano l'amplificazione chirale a livello della supramolecola.^{157,158} Il primo è generalmente associato alla miscelazione di due enantiomeri, con la chiralità supramolecolare che è controllata dalla chiralità dell'enantiomero presente in leggero eccesso. In tal senso, Aida et al. hanno riportato un valido esempio di amplificazione dei segnali chirali nel caso di un polimero supramolecolare di porfirina.¹⁵⁹ Il secondo effetto si riferisce a sistemi in cui una minima quantità di unità chirale può controllare la chiralità supramolecolare dell'*assembly* finale. A questo riguardo, Meijer et al. hanno dimostrato che quando un "*sergente*" chirale (Zn(II)-porfirina) è mescolato con un "*soldato*" achirale (Cu(II)-porfirina),

l'avvolgimento degli aggregati elicoidali formati segue la chiralità molecolare del "sergente".¹⁶⁰

Le molecole chirali, come aminoacidi, ammine chirali, alcoli chirali e zuccheri, possono essere utilizzate per indurre la chiralità supramolecolare con porfirine achirali, spesso verificata dalla presenza di segnali CD nella regione di assorbimento dei cromofori.¹⁶¹⁻¹⁶⁴ È stato dimostrato come la porfirina TPPS₄, in seguito all'aggiunta di vari aminoacidi, forma aggregati J chirali sottolineando, tra l'altro, gli effetti gerarchici che portano alla loro formazione.¹⁶⁵ È stato realizzato in acqua un *assembly* gerarchico di un aggregato multi-metalloporfirina/calix[4]arene dimostrando che l'interazione non covalente può attivare un processo di trasferimento chirale a lungo raggio fino alla porfirina centrale (Figura 27). Questi risultati ribadiscono l'importanza della sintesi non covalente come strategia efficiente per la costruzione di complessi *arrays* supramolecolari con specifiche proprietà elettroniche e chirali.¹⁶⁶

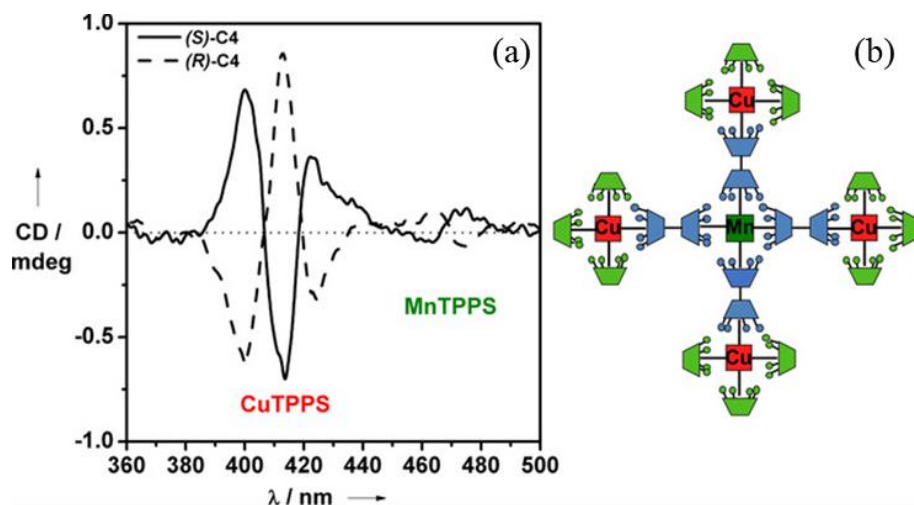


Figura 27. (a) Spettri di dicroismo circolare a pH 2.0, degli aggregati 1:4:4:12-(MnTPPS/BC4/CuTPPS/(R)-C4) (linea tratteggiata) e 1:4:4:12-(MnTPPS/BC4/CuTPPS/(S)-C4) (linea intera). (b) Rappresentazione grafica della struttura chirale multicomponente chirale. Figura adattata da Randazzo et al.¹⁶⁵

Le biomacromolecole, come le proteine, il DNA e i polisaccaridi, sono state efficacemente impiegate come templanti per indurre molecole achirali ad esibire chiralità.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Purrello et al. hanno svolto un lavoro eccellente sull'indagine del processo di aggregazione di porfirine sotto il controllo di biomacromolecole.¹⁷⁰⁻¹⁷³ In presenza di poligluttammato, sono stati realizzati eteroaggregati chirali di porfirina che hanno espresso la proprietà di “memoria chirale”, ovvero viene ad essere conservata anche dopo che la matrice chirale viene ad essere completamente rimossa dalla soluzione. Liu et al. hanno invece dimostrato come il *self-assembly* e la chiralità supramolecolare indotta della TPPS₄ su polilisina è strettamente correlata al rapporto polimero/porfirina e all'ordine di mescolamento.¹⁷⁴ Diverse modalità di preorganizzazione di ZnTPPS₄ (zinco(II) meso-tetrakis-(4-solfonatofenil)porfirina) su polilisina influenzano la cinetica di demetallazione, la protonazione e la chiralità degli aggregati della porfirina a pH acido. In particolare, è stato dimostrato come il processo porta alla formazione di aggregati J altamente ordinati sulle catene di polilisina più lunghe.¹⁷⁵ Il gruppo di ricerca di Shi ha studiato a lungo l'aggregazione delle porfirine in spazio confinato formato da polimero *block*.^{176,177} Ad esempio, la complessazione tra la TPPS₄ e il poli(etilenglicole)-block-poli(L-lisina) (PEG-b-PLL) ha portato alla formazione di aggregati sia di tipo “*wrapping*” sia “*pending*” con chiralità supramolecolare al variare della procedura di mescolamento (Figura 28). Rimuovendo con il poli(sodio-stirenesolfonato) (PSS) il PEG-b-PLL, gli aggregati mantengono memoria chirale evolvendo verso forme più complesse di tipo J.¹⁷⁸

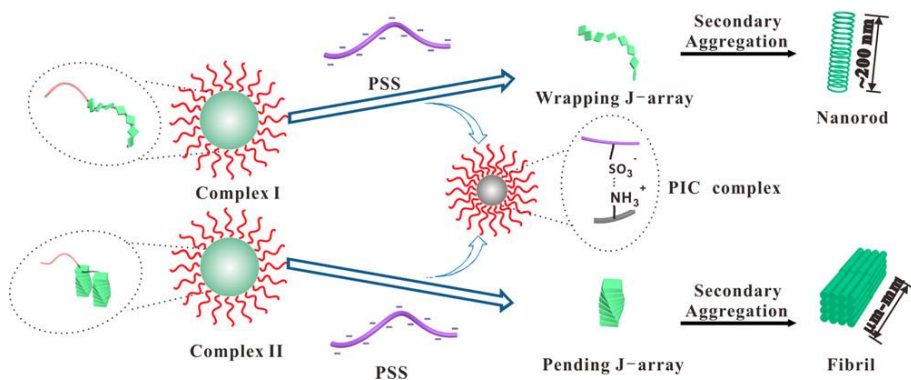


Figura 28. Illustrazione della rimozione dell'array di tipo J di TPPS₄ dal complesso PEG-*b*-PLL/TPPS₄ mediante PSS. Figura adattata da Li et al.¹⁷⁷

L'interazione delle porfirine con aggregati chirali (formati da componenti chirali) per mezzo di interazioni non covalenti induce a porsi la seguente domanda: quale è l'importanza relativa della chiralità molecolare intrinseca e della chiralità supramolecolare nel determinare la chiralità delle porfirine? Zhang e Liu et al. hanno tentato di rispondere a questa domanda assemblando aggregati J di TPPS₄ su un template formato da un anfifilico cationico chirale per mezzo di gelazione supramolecolare (Figura 29). La chiralità degli aggregati J di porfirina è risultata essere influenzata dalla chiralità supramolecolare degli *assemblies* piuttosto che dalla chiralità molecolare intrinseca. Questo lavoro ha dimostrato che il trasferimento di chiralità avviene a livello dell'*assembly* supramolecolare.¹⁷⁹ Nanoparticelle di carbonio chirali (*nanodots*) sono state facilmente preparate mediante sintesi idrotermale assistita da microonde ed utilizzate come template per la formazione di aggregati porfirinici supramolecolari chirali, dimostrando che è possibile utilizzare e trasferire l'informazione chirale.¹⁸⁰ Specie chirali possono indurre le porfirine achirali a formare aggregati otticamente attivi; successivamente, gli aggregati chirali di porfirina così preparati possono essere impiegati come templanti per l'*imprinting* chirale. Purrello et al. hanno preparato eteroaggregati di porfirina chirale, prodotti dalla meso-tetrakis(4-N-metilpiridil) porfirina (TMPyP) e dalla Cu(II) meso-tetrakis(4-

solfonatofenil)porfirina (CuTPPS₄) mediante un effetto di imprinting in presenza di L-3,4-diidrossifenilalanina (L-DOPA). È stato evidenziato come le porfirine possono agire da template per la generazione di strutture chirali durante la conversione ossidativa dell'amminoacido in melanina.¹⁸¹

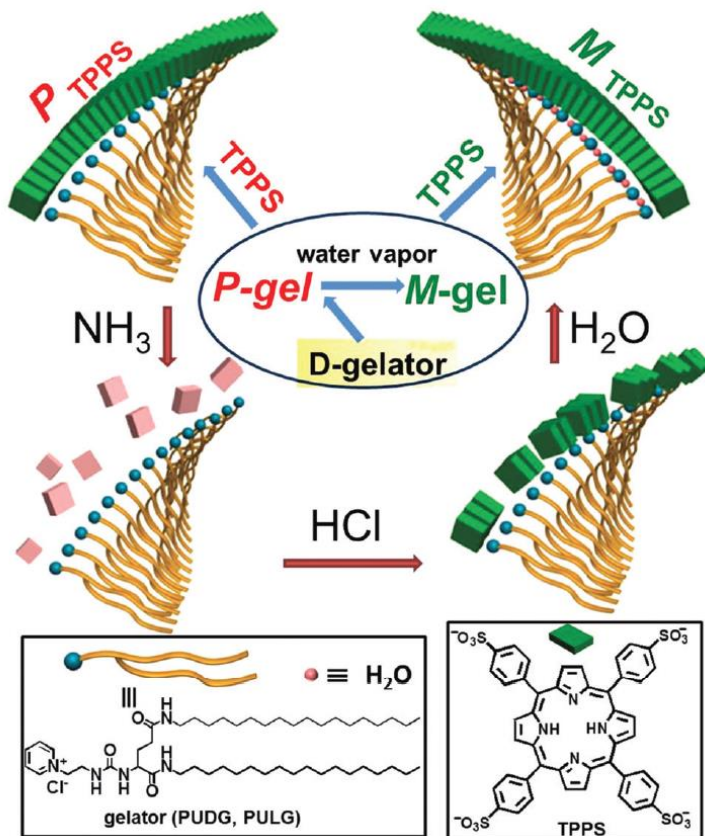


Figura 29. Struttura molecolare della porfirina TPPS₄ e del gelificatore (PUDG o PULG). Figura adattata da Wang et al.¹⁷⁹

Oltre che per mezzo di specie otticamente attive, le porfirine achirali possono formare aggregati supramolecolari chirali attraverso il processo di *self-assembly*. Questo fenomeno viene definito “*symmetry breaking*” o rottura spontanea della simmetria ed è importante per ottenere *assemblies* con una chiralità preferenziale.^{182,183} Tra le varie porfirine achirali, la TPPS₄ è la specie più intrigante per generare chiralità supramolecolare durante il processo di *self-*

assembly e molti esempi sono stati riportati in letteratura. In assenza di qualsiasi *bias* chirale, il segnale dicroico generalmente evidenzia un effetto Cotton positivo bisegnato,¹⁸⁴ la cui entità e rapporto tra le bande è strettamente legato alle condizioni sperimentali utilizzate per la preparazione degli aggregati.¹⁸⁵ Il primo tentativo di spiegare questo fenomeno è stato effettuato da El-Hachemi et al. che hanno riportato come, tracce di contaminazione di microrganismi non rilevabili presenti in acqua ultrapura, sono sufficiente a selezionare il segno chirale emergente nella rottura di simmetria spontanea che si verifica all'atto della formazione degli aggregati.¹⁸⁶ Da allora molti studi sono stati rivolti alla comprensione del fenomeno della chiralità spontanea negli aggregati J e delle risposte in tal senso sono state correlate anche ad osservazioni relative alla loro struttura intima.^{104,105,187} Una proprietà particolarmente interessante di questi sistemi aggregati è però la possibilità di indurre l'insorgenza della chiralità anche utilizzando forze fisiche che agiscono come *bias* chirali. Il vortice è un noto esempio di chiralità macroscopica ed è stato applicato per indirizzare la formazione di strutture macroscopiche elicoidali durante l'*assembly* di molecole achirali. Il senso elicoidale destrorso o sinistrorso viene ad essere determinato in funzione del senso di rotazione. Un mirabile esempio in tal senso è stato riportato da Ribò et al. in relazione alla formazione di aggregati J della porfirina 5-fenil-10,15,20-tris(4-solfonatofenil)porfirina (TPPS₃) la cui diversa chiralità supramolecolare è stata selezionata sulla base del verso della rotazione dell'evaporatore rotante.¹⁸⁸ Questo risultato è stato confermato dagli spettri di dicroismo circolare nonché è stato direttamente osservato grazie a misure AFM, dimostrando che gli aggregati J di una porfirina achirale possano formare strutture elicoidali simili a *nanoribbons* evidenziando una chiralità supramolecolare su scala nanometrica.¹⁸⁹ D'Urso et al. hanno successivamente studiato il comportamento della porfirina TPPS₄ sottolineando come gli aggregati J rispondono dinamicamente ai vortici creati dall'agitazione con il segnale di dicroismo circolare che si inverte con il senso di agitazione e la sua intensità

aumenta. Un'agitazione prolungata determina, sulla parete della cuvetta, la deposizione di aggregati la cui chiralità dipende dal senso di agitazione.¹⁹⁰ Sebbene l'agitazione, e quindi l'effetto di un vortice, possa indurre molecole achirali a formare *assemblies* chirali, è stato dimostrato che l'avvolgimento degli aggregati elicoidali supramolecolari può essere orientato applicando forze rotazionali e gravitazionali durante il processo di *self-assembly*. In particolare, Micali et al. hanno dimostrato che l'applicazione di forze rotazionali e di levitazione magnetica all'inizio del processo di aggregazione della TPPS₃, porta alla selezione della chiralità nella fase di nucleazione del processo di *self-assembly* della porfirina, la quale viene poi amplificata durante la crescita degli aggregati (Figura 30).¹⁹¹ Altri studi sono stati effettuati avvalendosi di sistemi a miscelazione microfluidica dimostrando che la chiralità indotta può essere controllata influenzando efficacemente la fase di nucleazione nelle primissime fasi del processo di aggregazione (< 20 ms), ottenendo una chiralità opposta rispetto a quella riscontrata con miscelazione normale.¹⁹² Liu et al. hanno invece applicato una piattaforma microfluidica versatile progettata per indurre microvortici chirali laminari in grado di indurre una rapida selezione idrodinamica del *bias* chirale (< 10 ms) correlato al senso di rotazione. L'informazione chirale indotta sui primi nuclei aggregati di porfirina TPPS₄ viene amplificata durante il processo di aggregazione determinando il controllo della chiralità in *gels* supramolecolari o nanotubi.¹⁹³ Scolaro et al. hanno affrontato un altro aspetto fondamentale che ha profonde implicazioni sulla formazione degli aggregati J della porfirina TPPS₄ evidenziando il ruolo dei parametri cinetici nell'espressione e nella trasmissione della chiralità^{148,164,194-196} suggerendo in taluni casi, come la dimensione dei nanoaggregati e l'amplificazione chirale sono correlati alla velocità del processo di aggregazione.¹⁸⁵ Il processo cinetico è dunque estremamente importante e condizionato da effetti gerarchici, da qui l'importanza di adottare un idoneo protocollo di mescolamento dei reagenti e

la conseguente valutazione dei parametri cinetici sull'espressione della chiralità degli aggregati J.¹⁹⁷

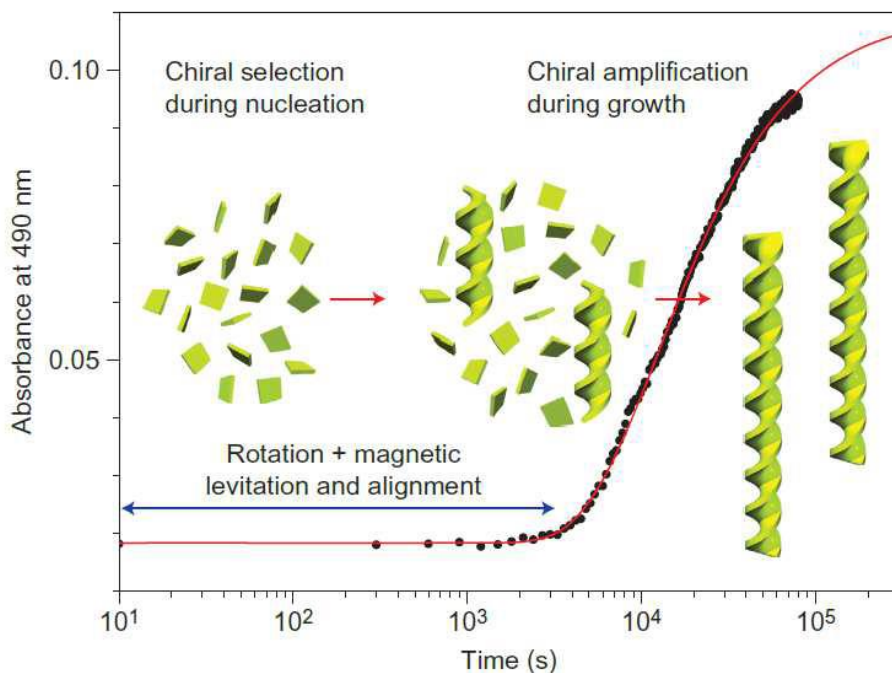


Figura 30: Modello per la selezione e l'amplificazione chirale per l'aggregazione della porfirina TPPS₃. Figura adattata da Micali et al.¹⁹¹

Un'altra intrigante proprietà delle porfirine è che esse si trovano spesso ad auto-assemblarsi in uno spazio confinato, come l'interfaccia aria/acqua, un'emulsione, un gel supramolecolare o altre strutture ordinate. Aggregati J chirali di TPPS₄ sono stati osservati all'interfaccia aria/acqua contenente TPPS₄ e anfifilici achirali carichi positivamente.¹⁹⁸ Emulsioni o vescicole forniscono uno spazio confinato dove è possibile fare crescere aggregati in modo controllato e favorire la comparsa di chiralità supramolecolare. Chen and Liu hanno dimostrato come aggiungendo goccia a goccia una soluzione in cloroformio della porfirina Zn(II) *meso*-tetra(4-piridil)-21H,23H-porfirina (ZnTPyP) ad una soluzione acquosa di cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB) è possibile formare diverse nanostrutture a base di ZnTPyP tra le quali i *nanorods* hanno evidenziato una spiccata attività chirotica (Figura 31).¹⁹⁹

Scolaro et al. hanno dimostrato che è possibile controllare le dimensioni e le proprietà ottiche degli aggregati J della porfirina TPPS₄ utilizzando microemulsioni e che la loro chiralità può trasmettersi dal livello nano- fino al livello mesoscopico.²⁰⁰ Gli stessi autori hanno poi proposto un approccio diverso basato su tecnica litografica e che consente di ottenere con successo una distribuzione ordinata di strutture submicrometriche a base di aggregati supramolecolari di TPPS₄ in posizioni precise e controllabili e con l'ulteriore vantaggio del controllo spaziale locale della chiralità.²⁰¹

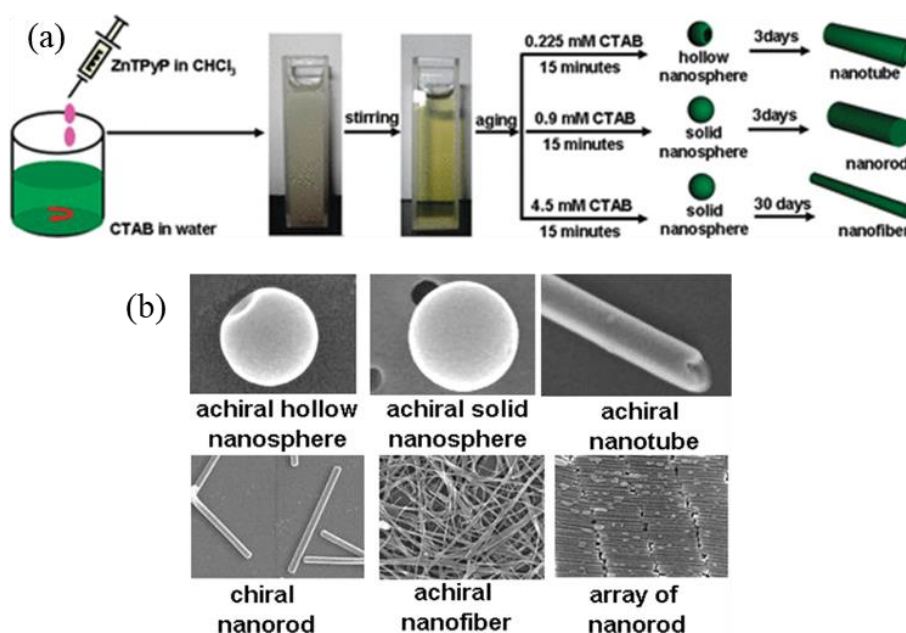


Figura 31. (a) Illustrazione schematica che mostra la sintesi controllata di varie nanostrutture di porfirina per mezzo di un processo di *self-assembly* assistito da tensioattivi, mediante l'impiego di un mezzo oleoso/acquoso e (b) relative strutture risultanti. Figura adattata da Zhai et al.¹⁹⁸

Il riconoscimento di enantiomeri è una delle sfide più impegnative da affrontare per lo sviluppo di sensori chimici. L'abbondanza e la versatilità della chimica delle porfirine consentono di estendere la stereoselettività a diversi composti. In passato alcuni studi sono stati condotti su porfirine come sonde per distinguere vari tipi di acidi nucleici rivelando come l'identità l'identità del

metallo, inserito nel *core* porfirinico, e la composizione del DNA determinano modalità e specificità del legame.²⁰²⁻²⁰⁵ Studi più recenti hanno invece puntato l'attenzione sull'impiego di metalloporfirine sia cationiche che anioniche come sonde spettroscopiche in grado di percepire selettivamente la forma Z-DNA.²⁰⁶ Ulteriori studi hanno poi sottolineato l'importanza dell'impiego di queste specie nel riconoscere, in maniera molto selettiva e sensibile, brevi tratti di Z-DNA sinistrorso incorporati nelle sequenze B-Z-B.^{207,208} In quest'ambito, con successo è stata anche progettata una porfirina di zinco(II) con quattro spermine coniugate in posizione *meso* al fine di ottenere una molecola multifunzionale in grado di rilevare, indurre e stabilizzare la forma Z-DNA.²⁰⁹ In passato è stato anche dimostrato come la porfirina *trans-bis*(N-metilpiridinio-4-yl)difenilporfirina (*t*-H₂P_{agg}) e il suo derivato di Cu(II) (*t*-CuP_{agg}) sono in grado di formare estesi aggregati supramolecolari chirali sugli acidi nucleici.^{210,211} Più recentemente, alcuni studi hanno evidenziato come la porfirina *t*-CuP_{agg} sia nella sua forma di semplice dimer²¹² che in forma di estesi aggregati di natura frattalica^{213,214} agisce da sensore chirottico in grado di rilevare la conformazione e la chiralità di un biopolimero quale il poliglutamato.

1.5 - Riferimenti bibliografici

- (1) Feringa, B. L. The Art of Building Small: From Molecular Switches to Motors (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, 56 (37), 11060.
- (2) Sauvage, J.-P. From Chemical Topology to Molecular Machines (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, 56 (37), 11080.
- (3) Stoddart, J. F. Mechanically Interlocked Molecules (MIMs)—Molecular Shuttles, Switches, and Machines (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, 56 (37), 11094.
- (4) Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*; Wiley, **1995**.
- (5) Lehn, J. M. In *Chemistry for the Welfare of Mankind*; Tsuruta, T.; Tamaru, K.; Tamai, Y.; Takahashi, N.; Kitano, Y.; Echigoya, E., Eds.; Pergamon, **1979**.
- (6) Lehn, J.-M. Alkali Metal Complexes with Organic Ligands, Berlin, Heidelberg, **1973**; p 1.
- (7) Lehn, J.-M.; Rigault, A. Helicates: Tetra- and Pentanuclear Double Helix Complexes of CuI and Poly(bipyridine) Strands. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1988**, 27 (8), 1095.
- (8) Wöhrle, D. Book Review: The colors of life: an introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds. L. R. Milgrom. Oxford University Press, Oxford, 1997. 249 pp., paperback, £49.50. ISBN 0-19-855380-3. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1997**, 1 (4), 395.
- (9) Paoli, M.; Liddington, R.; Tame, J.; Wilkinson, A.; Dodson, G. Crystal Structure of T State Haemoglobin with Oxygen Bound At All Four Haems. *Journal of Molecular Biology* **1996**, 256 (4), 775.
- (10) Carver, T. E.; Brantley Re Jr Fau - Singleton, E. W.; Singleton Ew Fau - Arduini, R. M.; Arduini Rm Fau - Quillin, M. L.; Quillin Ml Fau - Phillips, G. N., Jr.; Phillips Gn Jr Fau - Olson, J. S.; Olson, J. S. A novel site-directed mutant of myoglobin with an unusually high O₂ affinity and low autooxidation rate. (0021-9258 (Print)).
- (11) Banci, L.; Bertini, I.; Gray, H. B.; Luchinat, C.; Reddig, T.; Rosato, A.; Turano, P. Solution Structure of Oxidized Horse Heart Cytochrome c. *Biochemistry* **1997**, 36 (32), 9867.
- (12) Lee, C. W.; Yu, S.-C.; Lee, J.-H.; Park, S.-H.; Park, H.; Oh, T.-J.; Lee, J. H. Crystal Structure of a Putative Cytochrome P450 Alkane Hydroxylase (CYP153D17) from *Sphingomonas* sp. PAMC 26605 and Its Conformational Substrate Binding. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, 17 (12).
- (13) Putnam, C. D.; Arvai, A. S.; Bourne, Y.; Tainer, J. A. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism | Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology* **2000**, 296 (1), 295.
- (14) Zhang, Y.; Kang, S. A.; Mukherjee, T.; Bale, S.; Crane, B. R.; Begley, T. P.; Ealick, S. E. Crystal Structure and Mechanism of Tryptophan 2,3-Dioxygenase, a Heme Enzyme Involved in Tryptophan Catabolism and in Quinolinate Biosynthesis. *Biochemistry* **2007**, 46 (1), 145.

-
- (15) Govindjee, U. *Photosynthesis VI: Energy Conversion by Plants and Bacteria*; Elsevier Science, **2012**.
- (16) Balaban, T. S. Tailoring porphyrins and chlorins for self-assembly in biomimetic artificial antenna systems. *Accounts of chemical research* **2005**, *38* (8), 612.
- (17) Zhao, L.; Qu, R.; Li, A.; Ma, R.; Shi, L. Cooperative self-assembly of porphyrins with polymers possessing bioactive functions. *Chemical Communications* **2016**, *52* (93), 13543.
- (18) Morgan, B.; Dolphin, D. In *Metal complexes with tetrapyrrole ligands I*; Springer, **1987**.
- (19) Pramatarova, L. *On Biomimetics*; IntechOpen, **2011**.
- (20) Sigel, A.; Sigel, H. *Metal Ions in Biological Systems: Volume 33: Probing of Nucleic Acids by Metal Ion Complexes of Small Molecules*; Taylor & Francis, **1996**.
- (21) Gibbs, E. J.; Tinoco, I.; Maestre, M. F.; Ellinas, P. A.; Pasternack, R. F. Self-assembly of porphyrins on nucleic acid templates. *Biochemical and biophysical research communications* **1988**, *157* (1), 350.
- (22) Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J. Porphyrin and Metalloporphyrin. *Metal Ions in Biological Systems: Volume 33: Probing of Nucleic Acids by Metal Ion Complexes of Small Molecules* **1996**, *33*, 367.
- (23) Balaz, M.; De Napoli, M.; Holmes, A. E.; Mammana, A.; Nakanishi, K.; Berova, N.; Purrello, R. A cationic zinc porphyrin as a chiroptical probe for Z-DNA. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (26), 4006.
- (24) Campbell, W. M.; Jolley, K. W.; Wagner, P.; Wagner, K.; Walsh, P. J.; Gordon, K. C.; Schmidt-Mende, L.; Nazeeruddin, M. K.; Wang, Q.; Grätzel, M. et al. Highly Efficient Porphyrin Sensitizers for Dye-Sensitized Solar Cells. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (32), 11760.
- (25) Urbani, M.; Grätzel, M.; Nazeeruddin, M. K.; Torres, T. Meso-substituted porphyrins for dye-sensitized solar cells. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (24), 12330.
- (26) Sekaran, B.; Misra, R. β -Pyrrole functionalized porphyrins: Synthesis, electronic properties, and applications in sensing and DSSC. *Coordination Chemistry Reviews* **2022**, *453*, 214312.
- (27) Higashino, T.; Imahori, H. Porphyrins as excellent dyes for dye-sensitized solar cells: recent developments and insights. *Dalton transactions* **2015**, *44* (2), 448.
- (28) Li, L.-L.; Diau, E. W.-G. Porphyrin-sensitized solar cells. *Chemical society reviews* **2013**, *42* (1), 291.
- (29) Birel, Ö.; Nadeem, S.; Duman, H. Porphyrin-based dye-sensitized solar cells (DSSCs): a review. *Journal of fluorescence* **2017**, *27* (3), 1075.
- (30) Di Natale, C.; Monti, D.; Paolesse, R. Chemical sensitivity of porphyrin assemblies. *Materials Today* **2010**, *13* (7), 46.
- (31) Paolesse, R.; Nardis, S.; Monti, D.; Stefanelli, M.; Di Natale, C. Porphyrinoids for chemical sensor applications. *Chemical reviews* **2017**, *117* (4), 2517.
- (32) Senge, M. O.; Fazekas, M.; Notaras, E. G. A.; Blau, W. J.; Zawadzka, M.; Locos, O. B.; Ni Mhuircheartaigh, E. M. Nonlinear Optical Properties of Porphyrins. *Advanced Materials* **2007**, *19* (19), 2737.
-

- (33) Rosseinsky, D. R.; Monk, P. M. S.; Mortimer, R. J. *Electrochromic Materials and Devices*; Wiley, **2015**.
- (34) Cao, L.-M.; Lu, D.; Zhong, D.-C.; Lu, T.-B. Prussian blue analogues and their derived nanomaterials for electrocatalytic water splitting. *Coordination Chemistry Reviews* **2020**, *407*, 213156.
- (35) Liang, Z.; Wang, H.-Y.; Zheng, H.; Zhang, W.; Cao, R. Porphyrin-based frameworks for oxygen electrocatalysis and catalytic reduction of carbon dioxide. *Chemical Society Reviews* **2021**, *50* (4), 2540.
- (36) Pandey, R. K.; Shiau, F.-Y.; Medforth, C. J.; Dougherty, T. J.; Smith, K. M. Syntheses, stability, and tumoricidal activity of porphyrin dimers and trimers with ether linkages. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31* (51), 7399.
- (37) Geraldes, C. F. G. C.; Castro, M. M. C. A.; Peters, J. A. Mn (III) porphyrins as potential MRI contrast agents for diagnosis and MRI-guided therapy. *Coordination Chemistry Reviews* **2021**, *445*, 214069.
- (38) Tian, J.; Huang, B.; Nawaz, M. H.; Zhang, W. Recent advances of multi-dimensional porphyrin-based functional materials in photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews* **2020**, *420*, 213410.
- (39) Tsolekile, N.; Nelana, S.; Oluwafemi, O. S. Porphyrin as diagnostic and therapeutic agent. *Molecules* **2019**, *24* (14), 2669.
- (40) Qindeel, M.; Sargazi, S.; Hosseinikhah, S. M.; Rahdar, A.; Barani, M.; Thakur, V. K.; Pandey, S.; Mirsafaei, R. Porphyrin-Based Nanostructures for Cancer Theranostics: Chemistry, Fundamentals and Recent Advances. *ChemistrySelect* **2021**, *6* (48), 14082.
- (41) Hiramatsu, R.; Kawabata, S.; Miyatake, S.-I.; Kuroiwa, T.; Eason, M. W.; Vicente, M. G. H. Application of a novel boronated porphyrin (H₂OCP) as a dual sensitizer for both PDT and BNCT. *Lasers in Surgery and Medicine* **2011**, *43* (1), 52.
- (42) Hu, K.; Yang, Z.; Zhang, L.; Xie, L.; Wang, L.; Xu, H.; Josephson, L.; Liang, S. H.; Zhang, M.-R. Boron agents for neutron capture therapy. *Coordination Chemistry Reviews* **2020**, *405*, 213139.
- (43) Rothmund, P. FORMATION OF PORPHYRINS FROM PYRROLE AND ALDEHYDES. *Journal of the American Chemical Society* **1935**, *57* (10), 2010.
- (44) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *The Journal of Organic Chemistry* **1967**, *32* (2), 476.
- (45) Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. Rothmund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52* (5), 827.
- (46) Bond, A. D.; Feeder, N.; Redman, J. E.; Teat, S. J.; Sanders, J. K. M. Molecular Conformation and Intermolecular Interactions in the Crystal Structures of Free-Base 5,15-Diarylporphyrins. *Crystal Growth & Design* **2002**, *2* (1), 27.
- (47) Webb, L. E.; Fleischer, E. B. Crystal Structure of Porphine. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, *43* (9), 3100.
- (48) B, C.; Tulinsky, A. Redetermination of the Structure of Porphine. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (12), 4144.

- (49) Saltsman, I.; Goldberg, I.; Balasz, Y.; Gross, Z. Porphine and pyrrole-substituted porphyrin from cyclocondensation of tripyrrane with mono-substituted pyrroles. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (2), 239.
- (50) Kano, K.; Fukuda, K.; Wakami, H.; Nishiyabu, R.; Pasternack, R. F. Factors Influencing Self-Aggregation Tendencies of Cationic Porphyrins in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (31), 7494.
- (51) S. J. Silvers; A. Tulinsky. The crystal and molecular structure of triclinic tetraphenylporphyrin. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89* (13), 3331.
- (52) Stone, A.; Fleischer, E. B. The molecular and crystal structure of porphyrin diacids. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90* (11), 2735.
- (53) Kalyanasundaram, K. Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyrridyl- and tetrakis(N-methylpyridiniumyl)porphyrins. *Inorganic Chemistry* **1984**, *23* (16), 2453.
- (54) Karaman, R.; Bruice, T.; Bruice, T. Unusual behavior of 5,10,15,20-tetraphenylporphine diacid toward oxygen Brønsted bases. *Inorganic Chemistry* **1992**, *31*, 2455.
- (55) Abraham, R. J.; Hawkes, G. E.; Smith, K. M. N-H tautomerism in porphyrins: an NMR study. *Tetrahedron Letters* **1974**, *15* (16), 1483.
- (56) Eaton, S. S.; Eaton, G. R. Kinetic isotope effect on proton tautomerism in tetraarylporphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99* (5), 1601.
- (57) Kadish, K. M.; Guillard, R.; Smith, K. M. *Handbook Of Porphyrin Science: With Applications To Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology And Medicine (Volumes 6-10)*; World Scientific, **2010**.
- (58) Aronoff, S.; Calvin, M. THE PORPHYRIN-LIKE PRODUCTS OF THE REACTION OF PYRROLE WITH BENZALDEHYDE¹. *The Journal of Organic Chemistry* **1943**, *8* (3), 205.
- (59) De Luca, G.; Romeo, A.; Scolaro, L. M.; Ricciardi, G.; Rosa, A. Evidence for tetraphenylporphyrin monoacids. *Inorganic chemistry* **2007**, *46* (15), 5979.
- (60) Almarsson, Ö.; Blaskó, A.; Bruice, T. C. Studies on a hydrocarbon capped free base tetraphenylporphyrin and its conjugate acids - first observation of a monoprotinated tetraphenylporphyrin $\text{[CapTPP(H}_3\text{)}^+\text{CF}_3\text{CO}_2^-]$. *Tetrahedron* **1993**, *49* (45), 10239.
- (61) Hambright, P. The coordination chemistry of metalloporphyrins. *Coordination Chemistry Reviews* **1971**, *6* (2), 247.
- (62) Buchler, J. W. Coordination chemistry of metal tetrapyrrole complexes — unusual geometries and stoichiometries. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2000**, *04* (04), 337.
- (63) Baker, H.; Hambright, P.; Wagner, L.; Ross, L. Metal ion interactions with porphyrins. I. Exchange and substitution reactions. *Inorganic Chemistry* **1973**, *12* (9), 2200.
- (64) Fleischer, E. B. Structure of porphyrins and metalloporphyrins. *Accounts of Chemical Research* **1970**, *3* (3), 105.
- (65) Self, R. H.; Hambright, P. Hard and soft porphyrins: equilibrium constants for Cd²⁺ and Pb²⁺ with water-soluble free base porphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2000**, *4* (3), 256.

- (66) Fleischer, E. B.; Wang, J. H. The Detection of a Type of Reaction Intermediate in the Combination of Metal Ions with Porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82 (14), 3498.
- (67) Horváth, O.; Huszánk, R.; Valicsek, Z.; Lendvay, G. Photophysics and photochemistry of kinetically labile, water-soluble porphyrin complexes. *Coordination chemistry reviews* **2006**, 250 (13-14), 1792.
- (68) Inada, Y.; Sugimoto, Y.; Nakano, Y.; Itoh, Y.; Funahashi, S. Formation and Deprotonation Kinetics of the Sitting-Atop Complex of Copper (II) Ion with 5, 10, 15, 20-Tetraphenylporphyrin Relevant to the Porphyrin Metalation Mechanism. Structure of Copper (II)- Pyridine Complexes in Acetonitrile As Determined by EXAFS Spectroscopy. *Inorganic chemistry* **1998**, 37 (21), 5519.
- (69) Inamo, M.; Kamiya, N.; Inada, Y.; Nomura, M.; Funahashi, S. Structural Characterization and Formation Kinetics of Sitting-Atop (SAT) Complexes of Some Porphyrins with Copper (II) Ion in Aqueous Acetonitrile Relevant to Porphyrin Metalation Mechanism. Structures of Aquacopper (II) and Cu (II)- SAT Complexes As Determined by XAFS Spectroscopy. *Inorganic Chemistry* **2001**, 40 (22), 5636.
- (70) De Luca, G.; Romeo, A.; Scolaro, L. M.; Ricciardi, G.; Rosa, A. Sitting-atop metalloporphyrin complexes: experimental and theoretical investigations on such elusive species. *Inorganic chemistry* **2009**, 48 (17), 8493.
- (71) Harrach, G.; Valicsek, Z.; Horváth, O. Water-soluble silver(II) and gold(III) porphyrins: The effect of structural distortion on the photophysical and photochemical behavior. *Inorganic Chemistry Communications* **2011**, 14 (11), 1756.
- (72) Burmistrov, V. A.; Trifonova, I. P.; Islyaikin, M. K.; Semeikin, A. S.; Koifman, O. I. Push-Pull Effect at Formation of Sitting-Atop Metal-Porphyrin Complex in Solvating Media: H-Bonding and Electrostatic Repulsion. *ChemistrySelect* **2022**, 7 (1), e202103677.
- (73) Smith, K. M. *PORPHYRINS AND METALLOPORPHYRINS*: Elsevier, **1975**.
- (74) Fleischer, E. B.; Choi, E. I.; Hambright, P.; Stone, A. Porphyrin Studies: Kinetics of Metalloporphyrin Formation. *Inorganic Chemistry* **1964**, 3 (9), 1284.
- (75) Stein, T. P.; Plane, R. A. Incorporation of zinc ion into a synthetic water-soluble porphyrin. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, 91 (3), 607.
- (76) Hambright, P.; Shears, B.; Shad, B. Acid-catalyzed solvolysis reactions of zinc porphyrins having various basicities and zinc N-methylporphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, 93 (3), 776.
- (77) Shah, B.; Hambright, P. Acid catalyzed solvolysis reactions of zinc porphyrins. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1970**, 32 (10), 3420.
- (78) Gouterman, M.; Wagnière, G. H.; Snyder, L. C. Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. *Journal of Molecular Spectroscopy* **1963**, 11 (1), 108.
- (79) Uttamlal, M.; Sheila Holmes-Smith, A. The excitation wavelength dependent fluorescence of porphyrins. *Chemical Physics Letters* **2008**, 454 (4), 223.
- (80) Maharjan, P. S.; Bhattarai, H. K. Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death. *Journal of oncology* **2022**, 2022, 7211485.
- (81) Michael, H.; Pawel, M. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*; Artech, **2008**.

-
- (82) *Handbook of Photodynamic Therapy*; WORLD SCIENTIFIC, **2015**, DOI:doi:10.1142/9774 doi:10.1142/9774.
- (83) Drain, C. M.; Varotto, A.; Radivojevic, I. Self-Organized Porphyrinic Materials. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (5), 1630.
- (84) Osuka, A.; Maruyama, K.; Mataga, N.; Asahi, T.; Yamazaki, I.; Tamai, N. Geometry dependence of intramolecular photoinduced electron transfer in synthetic zinc-ferric hybrid diporphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (12), 4958.
- (85) Osuka, A.; Shimidzu, H. meso, meso-Linked Porphyrin Arrays. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36* (1-2), 135.
- (86) Lin, V. S. Y.; DiMagno, S. G.; Therien, M. J. Highly Conjugated, Acetylenyl Bridged Porphyrins: New Models for Light-Harvesting Antenna Systems. *Science* **1994**, *264* (5162), 1105.
- (87) Kim, D.; Osuka, A. Photophysical Properties of Directly Linked Linear Porphyrin Arrays. *The Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107* (42), 8791.
- (88) Drain, C. M.; Russell, K. C.; Lehn, J.-M. Self-assembly of a multi-porphyrin supramolecular macrocycle by hydrogen bond molecular recognition. *Chemical Communications* **1996**, DOI:10.1039/CC9960000337 10.1039/CC9960000337(3), 337.
- (89) MichaeláDrain, C. Self-assembly of a multi-porphyrin supramolecular macrocycle by hydrogen bond molecular recognition. *Chemical Communications* **1996**, (3), 337.
- (90) Satake, A.; Kobuke, Y. Artificial photosynthetic systems: assemblies of slipped cofacial porphyrins and phthalocyanines showing strong electronic coupling. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5* (11), 1679.
- (91) Li, X.; Zhang, L.; Mu, J.; Qiu, J. Fabrication and Properties of Porphyrin Nano- and Micro-particles with Novel Morphology. *Nanoscale Research Letters* **2008**, *3* (5), 169.
- (92) Kasha, M.; Rawls, H. R.; Ashraf El-Bayoumi, M. The exciton model in molecular spectroscopy. **1965**, *11* (3-4), 371.
- (93) T. H. James; Mees, C. E. K. *The Theory of the photographic process*; 4th ed., **1977**.
- (94) Tani, T. *Photographic Sensitivity: Theory and Mechanisms*; Oxford University Press, **1995**.
- (95) Kobayashi, T. *J-aggregates*; World Scientific, **1996**.
- (96) Kobayashi, T. *J-aggregates*; World Scientific, **2012**.
- (97) Würthner, F.; Kaiser, T. E.; Saha-Möller, C. R. J-aggregates: from serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (15), 3376.
- (98) Hecht, M.; Würthner, F. Supramolecularly engineered J-aggregates based on perylene bisimide dyes. *Accounts of Chemical Research* **2020**, *54* (3), 642.
- (99) Ohno, O.; Kaizu, Y.; Kobayashi, H. J-aggregate formation of a water-soluble porphyrin in acidic aqueous media. *The Journal of chemical physics* **1993**, *99* (5), 4128.
- (100) Pasternack, R. F.; Huber, P. R.; Boyd, P.; Engasser, G.; Francesconi, L.; Gibbs, E.; Fasella, P.; Cerio Ventura, G.; Hinds, L. d. Aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (13), 4511.
-

- (101) Krishnamurthy, M.; Sutter, J. R.; Hambright, P. Monomer–dimer equilibration of water-soluble porphyrins as a function of the co-ordinated metal ion. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1975**, DOI:10.1039/C39750000013 10.1039/C39750000013(1), 13.
- (102) Ribó, J. M.; Crusats, J.; Farrera, J.-A.; Valero, M. L. Aggregation in water solutions of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, DOI:10.1039/C39940000681 10.1039/C39940000681(6), 681.
- (103) Rubires, R.; Crusats, J.; El-Hachemi, Z.; Jaramillo, T.; López, M.; Valls, E.; Farrera, J.-A.; Ribó, J. M. Self-assembly in water of the sodium salts of meso-sulfonatophenyl substituted porphyrins. *New Journal of Chemistry* **1999**, *23* (2), 189.
- (104) Short, J. M.; Berriman, J. A.; Kübel, C.; El-Hachemi, Z.; Naubron, J. V.; Balaban, T. S. Electron Cryo-Microscopy of TPPS4· 2HCl Tubes Reveals a Helical Organisation Explaining the Origin of their Chirality. *ChemPhysChem* **2013**, *14* (14), 3209.
- (105) El-Hachemi, Z.; Escudero, C.; Acosta-Reyes, F.; Casas, M. T.; Altoe, V.; Aloni, S.; Oncins, G.; Sorrenti, A.; Crusats, J.; Campos, J. L. Structure vs. properties—Chirality, optics and shapes—In amphiphilic porphyrin J-aggregates. *Journal of Materials Chemistry C* **2013**, *1* (20), 3337.
- (106) Collings, P. J.; Gibbs, E. J.; Starr, T. E.; Vafek, O.; Yee, C.; Pomerance, L. A.; Pasternack, R. F. Resonance light scattering and its application in determining the size, shape, and aggregation number for supramolecular assemblies of chromophores. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (40), 8474.
- (107) Gandini, S. C. M.; Gelamo, E. L.; Itri, R.; Tabak, M. Small angle X-ray scattering study of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin in aqueous solution: A self-aggregation model. *Biophysical journal* **2003**, *85* (2), 1259.
- (108) Micali, N.; Villari, V.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. From Fractal to Nanorod Porphyrin J-Aggregates. Concentration-Induced Tuning of the Aggregate Size. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (16), 8289.
- (109) Micali, N.; Mallamace, F.; Romeo, A.; Purrello, R.; Monsù Scolaro, L. Mesoscopic structure of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphine J-aggregates. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (25), 5897.
- (110) Mallamace, F.; Micali, N.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F.; Romeo, A.; Terracina, A.; Trusso, S. Porphyrin aggregation in aqueous solutions: small angle and quasielastic light scattering results. *Journal of Molecular Structure* **1996**, *383* (1), 255.
- (111) Mandelbrot, B. B. *Fractals, Form, Chance, and Dimension*; John Wiley & Sons, Ltd, **1977**.
- (112) Mallamace, F.; Micali, N. Long-range order in disperse systems. *La Rivista del Nuovo Cimento (1978-1999)* **1992**, *15* (6), 1.
- (113) Witten, T. A.; Sander, L. M. Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon. *Physical Review Letters* **1981**, *47* (19), 1400.
- (114) Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*; Dover Publications, **2013**.
- (115) Micali, N.; Monsù Scolaro, L.; Romeo, A.; Mallamace, F. Fractal aggregation in aqueous solutions of porphyrins. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **1998**, *249* (1), 501.

-
- (116) L. Monsù Scolaro; A. Romeo; F. Mallamace; N. Micali; Purello, R. Aggregation Phenomena in Porphyrin Aqueous Solutions. *Il Nuovo Cimento D* **1998**, 20D.
- (117) Mallamace, F.; Monsu' Scolaro, L.; Romeo, A.; Micali, N. Crossover in the Kinetic Growth Process of Porphyrin Aggregation. *Physical Review Letters* **1999**, 82 (17), 3480.
- (118) Monsù Scolaro, L.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Mazzaglia, A.; Mallamace, F.; Micali, N. Nucleation effects in the aggregation of water-soluble porphyrin aqueous solutions. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **2002**, 304 (1), 158.
- (119) Shao, H.; Parquette, J. R. Controllable Peptide–Dendron Self-Assembly: Interconversion of Nanotubes and Fibrillar Nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48 (14), 2525.
- (120) Atkins, P. W.; De Paula, J.; Keeler, J. *Atkins' Physical Chemistry*; Oxford University Press, **2018**.
- (121) Li, C.; Liu, C.; Li, M.; Xu, X.; Li, S.; Qi, W.; Su, R.; Yu, J. Structures and Antifouling Properties of Self-Assembled Zwitterionic Peptide Monolayers: Effects of Peptide Charge Distributions and Divalent Cations. *Biomacromolecules* **2020**, 21 (6), 2087.
- (122) Iscen, A.; Schatz, G. C. Hofmeister Effects on Peptide Amphiphile Nanofiber Self-Assembly. *The Journal of Physical Chemistry B* **2019**, 123 (32), 7006.
- (123) Cao, M.; Wang, Y.; Ge, X.; Cao, C.; Wang, J.; Xu, H.; Xia, D.; Zhao, X.; Lu, J. R. Effects of Anions on Nanostructuring of Cationic Amphiphilic Peptides. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 115 (41), 11862.
- (124) Yang, H.; Pritzker, M.; Fung, S. Y.; Sheng, Y.; Wang, W.; Chen, P. Anion Effect on the Nanostructure of a Metal Ion Binding Self-Assembling Peptide. *Langmuir* **2006**, 22 (20), 8553.
- (125) Hofmeister, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **1888**, 24 (4), 247.
- (126) Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, 9 (1), 19.
- (127) Wright, E. M.; Diamond, J. M. Anion selectivity in biological systems. *Physiological Reviews* **1977**, 57 (1), 109.
- (128) Lo Nostro, P.; Ninham, B. W. Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology. *Chemical Reviews* **2012**, 112 (4), 2286.
- (129) Zhang, Y.; Furyk, S.; Bergbreiter, D. E.; Cremer, P. S. Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (41), 14505.
- (130) Murdoch, T. J.; Humphreys, B. A.; Willott, J. D.; Gregory, K. P.; Prescott, S. W.; Nelson, A.; Wanless, E. J.; Webber, G. B. Specific Anion Effects on the Internal Structure of a Poly(N-isopropylacrylamide) Brush. *Macromolecules* **2016**, 49 (16), 6050.
- (131) Murdoch, T. J.; Humphreys, B. A.; Johnson, E. C.; Webber, G. B.; Wanless, E. J. Specific ion effects on thermoresponsive polymer brushes: Comparison to other architectures. *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, 526, 429.
-

- (132) Humphreys, B. A.; Wanless, E. J.; Webber, G. B. Effect of ionic strength and salt identity on poly(N-isopropylacrylamide) brush modified colloidal silica particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, *516*, 153.
- (133) Bilaničová, D.; Salis, A.; Ninham, B. W.; Monduzzi, M. Specific Anion Effects on Enzymatic Activity in Nonaqueous Media. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (38), 12066.
- (134) Collu, M.; Carucci, C.; Salis, A. Specific Anion Effects on Lipase Adsorption and Enzymatic Synthesis of Biodiesel in Nonaqueous Media. *Langmuir* **2020**, *36* (32), 9465.
- (135) Peruzzi, N.; Ninham, B. W.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. Hofmeister Phenomena in Nonaqueous Media: The Solubility of Electrolytes in Ethylene Carbonate. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (49), 14398.
- (136) Voet, A. Quantative Lyotropy. *Chemical Reviews* **1937**, *20* (2), 169.
- (137) J. L.-M. Poiseuille. Experimental Investigations on the Flow of Liquids in Tubes of Very Small Diameter. **1847**, *21*, 76.
- (138) Jones, G.; Dole, M. THE VISCOSITY OF AQUEOUS SOLUTIONS OF STRONG ELECTROLYTES WITH SPECIAL REFERENCE TO BARIUM CHLORIDE. *Journal of the American Chemical Society* **1929**, *51* (10), 2950.
- (139) Frank, H. S.; Evans, M. W. Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes. *The Journal of Chemical Physics* **1945**, *13* (11), 507.
- (140) Mazzini, V.; Craig, V. S. J. Specific-ion effects in non-aqueous systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2016**, *23*, 82.
- (141) Collins, K. D.; Washabaugh, M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1985**, *18* (4), 323.
- (142) Leontidis, E. Investigations of the Hofmeister series and other specific ion effects using lipid model systems. *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**, *243*, 8.
- (143) Gregory, K. P.; Elliott, G. R.; Robertson, H.; Kumar, A.; Wanless, E. J.; Webber, G. B.; Craig, V. S. J.; Andersson, G. G.; Page, A. J. Understanding specific ion effects and the Hofmeister series. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2022**, *24* (21), 12682.
- (144) dos Santos, A. P.; Diehl, A.; Levin, Y. Surface Tensions, Surface Potentials, and the Hofmeister Series of Electrolyte Solutions. *Langmuir* **2010**, *26* (13), 10778.
- (145) Wojciechowski, K.; Bitner, A.; Warszyński, P.; Żubrowska, M. The Hofmeister effect in zeta potentials of CTAB-stabilised toluene-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *376* (1), 122.
- (146) Collins, K. D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* **2004**, *34* (3), 300.
- (147) Boström, M.; Tavares, F. W.; Finet, S.; Skouri-Panet, F.; Tardieu, A.; Ninham, B. W. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. *Biophysical Chemistry* **2005**, *117* (3), 217.
- (148) Occhiuto, I. G.; Zagami, R.; Trapani, M.; Bolzonello, L.; Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Collini, E.; Monsù Scolaro, L. The role of counter-anions in the kinetics and chirality of porphyrin J-aggregates. *Chemical Communications* **2016**, *52* (77), 11520.

- (149) Hegstrom, R. A.; Kondepudi, D. K. The handedness of the universe. *Scientific American* **1990**, *262* (1), 108.
- (150) Plusquellic, D. F.; Lavrich, R. J.; Petralli-Mallow, T.; Davis, S.; Korter, T. M.; Suenram, R. D. High resolution spectroscopic studies of 1-(1-naphthyl)ethylamine in S0 and S1: exploring the dependence of circular dichroism on conformational structure. *Chemical Physics* **2002**, *283* (1), 355.
- (151) Nakai, Y.; Mori, T.; Inoue, Y. Theoretical and Experimental Studies on Circular Dichroism of Carbo[n]helicenes. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116* (27), 7372.
- (152) Kar, S.; Swathi, K.; Sissa, C.; Painelli, A.; Thomas, K. G. Emergence of Chiroptical Properties in Molecular Assemblies of Phenyleneethynylenes: The Role of Quasi-degenerate Excitations. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2018**, *9* (16), 4584.
- (153) Kobayashi, N.; Opallo, M. Disposition of ferrocenes in β - or γ -cyclodextrin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1990**, DOI:10.1039/C39900000477 10.1039/C39900000477(6), 477.
- (154) Allenmark, S. Induced circular dichroism by chiral molecular interaction. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry* **2003**, *15* (5), 409.
- (155) Zhang, X.; Nau, W. M. Chromophore alignment in a chiral host provides a sensitive test for the orientation–intensity rule of induced circular dichroism. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39* (3), 544.
- (156) Berova, N.; Polavarapu, P. L.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Volume 1: Instrumentation, Methodologies, and Theoretical Simulations*; John Wiley & Sons, **2011**.
- (157) Green, M. M.; Park, J. W.; Sato, T.; Teramoto, A.; Lifson, S.; Selinger, R. L. B.; Selinger, J. V. The macromolecular route to chiral amplification. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (21), 3138.
- (158) Yan, X.; Wang, Q.; Chen, X.; Jiang, Y. B. Supramolecular chiral aggregates exhibiting nonlinear CD–ee dependence. *Advanced Materials* **2020**, *32* (41), 1905667.
- (159) Toyofuku, K.; Alam, M. A.; Tsuda, A.; Fujita, N.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Aida, T. Amplified chiral transformation through helical assembly. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (34), 6476.
- (160) Helmich, F.; Smulders, M. M. J.; Lee, C. C.; Schenning, A. P. H. J.; Meijer, E. W. Effect of stereogenic centers on the self-sorting, depolymerization, and atropisomerization kinetics of porphyrin-based aggregates. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (31), 12238.
- (161) Zhang, L.; Tian, Y.; Liu, M. Ionic liquid induced spontaneous symmetry breaking: emergence of predominant handedness during the self-assembly of tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS) with achiral ionic liquid. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (38), 17205.
- (162) Savioli, M.; Stefanelli, M.; Magna, G.; Zurlo, F.; Caso, M. F.; Cimino, R.; Goletti, C.; Venanzi, M.; Di Natale, C.; Paolesse, R. Tunable Supramolecular Chirogenesis in the Self-Assembling of Amphiphilic Porphyrin Triggered by Chiral Amines. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21* (22), 8557.

- (163) Randazzo, R.; Mammana, A.; D'Urso, A.; Lauceri, R.; Purrello, R. Reversible “chiral memory” in ruthenium tris (phenanthroline)–anionic porphyrin complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (51), 9879.
- (164) Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Zagami, R.; Micali, N.; Scolaro, L. M. Kinetic effects of tartaric acid on the growth of chiral J-aggregates of tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin. *Chemical Communications* **2012**, *48* (40), 4872.
- (165) Randazzo, R.; Gaeta, M.; Gangemi, C. M. A.; Fragalà, M. E.; Purrello, R.; D'Urso, A. Chiral recognition of L- and D-amino acid by porphyrin supramolecular aggregates. *Molecules* **2018**, *24* (1), 84.
- (166) Gaeta, M.; Sortino, G.; Randazzo, R.; Pisagatti, I.; Notti, A.; Fragalà, M. E.; Parisi, M. F.; D'Urso, A.; Purrello, R. Long-Range Chiral Induction by a Fully Noncovalent Approach in Supramolecular Porphyrin–Calixarene Assemblies. *Chemistry–A European Journal* **2020**, *26* (16), 3515.
- (167) Cao, Y.; Duan, Y.; Han, L.; Che, S. Hierarchical chirality transfer in the formation of chiral silica fibres with DNA–porphyrin co-templates. *Chemical Communications* **2017**, *53* (41), 5641.
- (168) Sargsyan, G.; Leonard, B. M.; Kubelka, J.; Balaz, M. Supramolecular ssDNA templated porphyrin and metalloporphyrin nanoassemblies with tunable helicity. *Chemistry–A European Journal* **2014**, *20* (7), 1878.
- (169) Balaz, M.; Tannir, S.; Varga, K. Chiral multichromophoric supramolecular nanostructures assembled by single stranded DNA and RNA templates. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *349*, 66.
- (170) Bellacchio, E.; Lauceri, R.; Gurrieri, S.; Scolaro, L. M.; Romeo, A.; Purrello, R. Template-imprinted chiral porphyrin aggregates. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (47), 12353.
- (171) Lauceri, R.; Raudino, A.; Scolaro, L. M.; Micali, N.; Purrello, R. From achiral porphyrins to template-imprinted chiral aggregates and further. Self-replication of chiral memory from scratch. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (6), 894.
- (172) Lauceri, R.; Purrello, R. Transfer, Memory and Amplification of Chirality in Porphyrin Aggregates. *Supramolecular Chemistry* **2005**, *17* (1-2), 61.
- (173) Rosaria, L.; D'Urso, A.; Mammana, A.; Purrello, R. Chiral memory: Induction, amplification, and switching in porphyrin assemblies. *Chirality* **2008**, *20* (3-4), 411.
- (174) Zhang, L.; Liu, M. Supramolecular chirality and chiral inversion of tetraphenylsulfonato porphyrin assemblies on optically active polylysine. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113* (42), 14015.
- (175) Gaeta, M.; Raciti, D.; Randazzo, R.; Gangemi, C. M. A.; Raudino, A.; D'Urso, A.; Fragalà, M. E.; Purrello, R. Chirality enhancement of porphyrin supramolecular assembly driven by a template preorganization effect. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (33), 10656.
- (176) Zhao, L.; Xiang, R.; Ma, R.; Wang, X.; An, Y.; Shi, L. Chiral conversion and memory of TPPS J-aggregates in complex micelles: PEG-b-PDMAEMA/TPPS. *Langmuir* **2011**, *27* (18), 11554.
- (177) Li, A.; Zhao, L.; Hao, J.; Tao, Q.; Ma, R.; Zhang, Z.; An, Y.; Shi, L. A strategy to stabilize the confined chiral TPPS J-aggregate by ionic block copolymer. *Colloid and Polymer Science* **2013**, *291* (12), 2975.

- (178) Li, A.; Zhao, L.; Hao, J.; Ma, R.; An, Y.; Shi, L. Aggregation behavior of the template-removed 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin chiral array directed by poly (ethylene glycol)-block-poly (l-lysine). *Langmuir* **2014**, *30* (16), 4797.
- (179) Wang, Q.; Zhang, L.; Yang, D.; Li, T.; Liu, M. Chiral signs of TPPS co-assemblies with chiral gelators: role of molecular and supramolecular chirality. *Chemical Communications* **2016**, *52* (84), 12434.
- (180) Dorđević, L.; Arcudi, F.; D'Urso, A.; Cacioppo, M.; Micali, N.; Bürgi, T.; Purrello, R.; Prato, M. Design principles of chiral carbon nanodots help convey chirality from molecular to nanoscale level. *Nature communications* **2018**, *9* (1), 1.
- (181) Gaeta, M.; Randazzo, R.; Villari, V.; Micali, N.; Pezzella, A.; Purrello, R.; d'Ischia, M.; D'Urso, A. En Route to a Chiral Melanin: The Dynamic "From-Imprinted-to-Template" Supramolecular Role of Porphyrin Hetero-Aggregates during the Oxidative Polymerization of L-DOPA. *Frontiers in Chemistry* **2020**, *8*, 616961.
- (182) Sang, Y.; Liu, M. Symmetry Breaking in Self-Assembled Nanoassemblies. *Symmetry* **2019**, *11* (8), 950.
- (183) Buhse, T.; Cruz, J.-M.; Noble-Teran, M. E.; Hochberg, D.; Ribo, J. M.; Crusats, J.; Micheau, J.-C. Spontaneous deracemizations. *Chemical Reviews* **2021**, *121* (4), 2147.
- (184) Rubires, R.; Farrera, J.-A.; Ribó, J. M. Stirring Effects on the Spontaneous Formation of Chirality in the Homoassociation of Diprotonated meso-Tetraphenylsulfonato Porphyrins. *Chemistry – A European Journal* **2001**, *7* (2), 436.
- (185) Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Occhiuto, I.; Zagami, R.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Kinetic control of chirality in porphyrin J-aggregates. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (1), 40.
- (186) El-Hachemi, Z.; Escudero, C.; Arteaga, O.; Canillas, A.; Crusats, J.; Mancini, G.; Purrello, R.; Sorrenti, A.; D'Urso, A.; Ribo, J. M. Chiral sign selection on the J-aggregates of diprotonated tetrakis-(4-sulfonatophenyl) porphyrin by traces of unidentified chiral contaminants present in the ultra-pure water used as solvent. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry* **2009**, *21* (4), 408.
- (187) Vlaming, S. M.; Augulis, R.; Stuart, M. C. A.; Knoester, J.; Van Loosdrecht, P. H. M. Exciton spectra and the microscopic structure of self-assembled porphyrin nanotubes. *The journal of physical chemistry B* **2009**, *113* (8), 2273.
- (188) Ribo, J. M.; Crusats, J.; Sagués, F.; Claret, J.; Rubires, R. Chiral sign induction by vortices during the formation of mesophases in stirred solutions. *Science* **2001**, *292* (5524), 2063.
- (189) Escudero, C.; Crusats, J.; Díez-Pérez, I.; El-Hachemi, Z.; Ribó, J. M. Folding and hydrodynamic forces in J-aggregates of 5-phenyl-10, 15, 20-tris (4-sulfophenyl) porphyrin. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (47), 8032.
- (190) D'Urso, A.; Randazzo, R.; Lo Faro, L.; Purrello, R. Vortexes and nanoscale chirality. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (1), 108.
- (191) Micali, N.; Engelkamp, H.; Van Rhee, P. G.; Christianen, P. C. M.; Scolaro, L. M.; Maan, J. C. Selection of supramolecular chirality by application of rotational and magnetic forces. *Nature Chemistry* **2012**, *4* (3), 201.
- (192) Sorrenti, A.; Rodriguez-Trujillo, R.; Amabilino, D. B.; Puigmartí-Luis, J. Milliseconds make the difference in the far-from-equilibrium self-assembly of

- supramolecular chiral nanostructures. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (22), 6920.
- (193) Sun, J.; Li, Y.; Yan, F.; Liu, C.; Sang, Y.; Tian, F.; Feng, Q.; Duan, P.; Zhang, L.; Shi, X. Control over the emerging chirality in supramolecular gels and solutions by chiral microvortices in milliseconds. *Nature Communications* **2018**, *9* (1), 1.
- (194) Zagami, R.; Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Monsù Scolaro, L. Inverse Kinetic and Equilibrium Isotope Effects on Self-Assembly and Supramolecular Chirality of Porphyrin J-Aggregates. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (1), 70.
- (195) Occhiuto, I. G.; Castriciano, M. A.; Trapani, M.; Zagami, R.; Romeo, A.; Pasternack, R. F.; Monsù Scolaro, L. Controlling J-Aggregates formation and chirality induction through demetallation of a zinc (II) water soluble porphyrin. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (11), 4001.
- (196) Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Zagami, R.; Pollicino, G.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F. Effect of zinc cations on the kinetics of supramolecular assembly and the chirality of porphyrin J-aggregates. *Chemical science* **2017**, *8* (2), 961.
- (197) Castriciano, M. A.; Cardillo, S.; Zagami, R.; Trapani, M.; Romeo, A.; Scolaro, L. M. Effects of the mixing protocol on the self-assembling process of water soluble porphyrins. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (2), 797.
- (198) Zhai, X.; Zhang, L.; Liu, M. Supramolecular assemblies between a new series of gemini-type amphiphiles and TPPS at the air/water interface: aggregation, chirality, and spacer effect. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (22), 7180.
- (199) Qiu, Y.; Chen, P.; Liu, M. Evolution of various porphyrin nanostructures via an oil/aqueous medium: controlled self-assembly, further organization, and supramolecular chirality. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (28), 9644.
- (200) Castriciano, M. A.; Romeo, A.; De Luca, G.; Villari, V.; Scolaro, L. M.; Micali, N. Scaling the chirality in porphyrin J-nanoaggregates. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (4), 765.
- (201) Castriciano, M. A.; Gentili, D.; Romeo, A.; Cavallini, M.; Scolaro, L. M. Spatial control of chirality in supramolecular aggregates. *Scientific reports* **2017**, *7* (1), 1.
- (202) Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Villafranca, J. J. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry* **1983**, *22* (10), 2406.
- (203) Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Villafranca, J. J. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry* **1983**, *22* (23), 5409.
- (204) Gibbs, E. J.; Maurer, M. C.; Zhang, J. H.; Reiff, W. M.; Hill, D. T.; Malicka-Blaszkiewicz, M.; McKinnie, R. E.; Liu, H. Q.; Pasternack, R. F. Interactions of porphyrins with purified DNA and more highly organized structures. *Journal of inorganic biochemistry* **1988**, *32* (1), 39.
- (205) Pasternack, R. F. Circular dichroism and the interactions of water soluble porphyrins with DNA—A minireview. *Chirality* **2003**, *15* (4), 329.
- (206) D'Urso, A.; Mammana, A.; Balaz, M.; Holmes, A. E.; Berova, N.; Lauceri, R.; Purrello, R. Interactions of a Tetraanionic Porphyrin with DNA: from a Z-DNA Sensor to a Versatile Supramolecular Device. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (6), 2046.

-
- (207) D'Urso, A.; Holmes, A. E.; Berova, N.; Balaz, M.; Purrello, R. Z-DNA recognition in B-Z-B sequences by a cationic zinc porphyrin. *Chemistry–An Asian Journal* **2011**, *6* (11), 3104.
- (208) Holmes, A. E.; Choi, J. K.; Francis, J.; D'Urso, A.; Balaz, M. Sulfonated Ni (II) porphyrin improves the detection of Z-DNA in condensed and non-condensed BZB DNA sequences. *Journal of inorganic biochemistry* **2012**, *110*, 18.
- (209) Gangemi, C. M. A.; D'Urso, A.; Tomaselli, G. A.; Berova, N.; Purrello, R. A novel porphyrin-based molecular probe ZnTCPPSp₄ with catalytic, stabilizing and chiroptical diagnostic power towards DNA BZ transition. *Journal of inorganic biochemistry* **2017**, *173*, 141.
- (210) Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (13), 5393.
- (211) Pasternack, R. F.; Giannetto, A.; Pagano, P.; Gibbs, E. J. Self-assembly of porphyrins on nucleic acids and polypeptides. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (20), 7799.
- (212) De Luca, G.; Romeo, A.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F. Conformations of a model protein revealed by an aggregating CuII porphyrin: sensing the difference. *Chemical communications* **2010**, *46* (3), 389.
- (213) Occhiuto, I.; De Luca, G.; Villari, V.; Romeo, A.; Micali, N.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Supramolecular chirality transfer to large random aggregates of porphyrins. *Chemical Communications* **2011**, *47* (21), 6045.
- (214) Occhiuto, I. G.; Samperi, M.; Trapani, M.; De Luca, G.; Romeo, A.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Aggregates of a cationic porphyrin as supramolecular probes for biopolymers. *Journal of inorganic biochemistry* **2015**, *153*, 361.

Capitolo 2

*Demetallazione acida della
porfirina ZnTMpyP
catalizzata da polielettroliti*

2.1 - Introduzione

I fenomeni di aggregazione supramolecolare evidenziati da porfirine e/o metalloporfirine rappresentano un tema di grande interesse perché offrono l'importante possibilità di imitare i centri fotosintetici e di accedere a dispositivi supramolecolari.¹ In questo ambito, le porfirine dotate di una carica elettrica netta possono facilmente interagire con una grande varietà di biopolimeri quali DNA,^{2,3} RNA,^{4,5} semplici polipeptidi⁶⁻¹³ così come anche batteriofagi filamentosi.^{14,15} Un'oculata scelta della matrice biologica di supporto permette la formazione di aggregati porfirinici organizzati a breve o lungo raggio stabilizzati dall'instaurarsi di una moltitudine di interazioni deboli come le forze di van der Waals, il legame idrogeno, le interazioni idrofobiche ed elettrostatiche le quali, in linea di principio, possono essere facilmente modulate variando le proprietà del mezzo. In questo contesto, l'impiego di semplici polielettroliti come matrice di supporto riduce il numero di modalità di interazione del cromoforo con lo *scaffold* agevolando eventuali studi mirati alla proposizione del meccanismo di formazione dell'*assembling* supramolecolare. Uno studio presente in letteratura ha evidenziato come, a seconda delle condizioni di pH, l'elevato campo elettrostatico esercitato da un polimero ad alta densità di carica come il polivinilsolfonato (PVS) sia in grado di stabilizzare la forma diacida della porfirina *meso*-tetrakis(N-metilpiridinio-4-il)porfirina (TMpyP), a valori di pH insoliti nonché esso è in grado di promuovere la formazione di aggregati di tipo H.¹⁶ Sulla scorta dei risultati riportati in letteratura, il presente studio è stato progettato al fine di valutare se un semplice polielettrolita sia in grado di catalizzare il processo di demetallazione acida di porfirine e se ciò possa avvenire anche a valori di pH atipici.

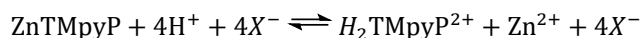
Le metalloporfirine in generale possono perdere i loro ioni metallici centrali in diverse condizioni sperimentali ed a seconda di diversi fattori, come la dimensione e la coordinazione del metallo, il grado di legame covalente e lo stato

di ossidazione.¹⁷ La nostra scelta è ricaduta sull'impiego di alcuni derivati metallici della porfirina tetracationica TMpyP e gli studi condotti hanno evidenziato come lo zinco derivato ZnTMpyP è suscettibile di demetallazione acida in condizioni sperimentali inusuali in presenza di polivinilsolfonato (PVS) o anche polifosfato (PPA). Un dettagliato studio cinetico ha inoltre permesso di verificare quali sono i parametri in grado di influenzare il processo di demetallazione acida consentendo la proposizione di un meccanismo cinetico del processo.

La porfirina ZnTMpyP, tra l'altro, è una tra le metalloporfirine più studiate in letteratura sia per l'importanza che lo zinco assume in biologia, ma anche per la sua applicazione nella fotocatalisi.¹⁸ Pertanto, lo studio della sua tendenza alla demetallazione ed eventualmente all'aggregazione è fondamentale per comprendere meglio il controllo della stabilità delle porfirine (in mezzo acido) nella fotocatalisi, nell'impiego nelle celle di Grätzel (DSSCs), nella terapia fotodinamica e in altri campi tecnologici.

2.2 - Risultati e discussioni

La porfirina ZnTMpyP è solubile in ambiente acquoso ed in bulk è stabile in condizione di pH superiori ad 1.¹⁹ A valori di acidità maggiore la porfirina subisce demetallazione attraverso un processo di solvolisi acida fortemente dipendente dalla natura del controanione (Schema 1).



Schema 1. Equilibrio chimico relativo al processo di demetallazione acida per la porfirina ZnTMpyP proposto da Hambright.²⁰

Il processo di demetallazione avviene senza che sia possibile l'osservazione della formazione della base libera TMpyP in quanto essa, una volta formatasi nelle condizioni sperimentali adottate, viene ad essere contestualmente diprotonata ($\text{pK}_a = 1.8$)^{21,22} con formazione della specie diacida $\text{H}_2\text{TMpyP}^{2+}$ (Figura 1).

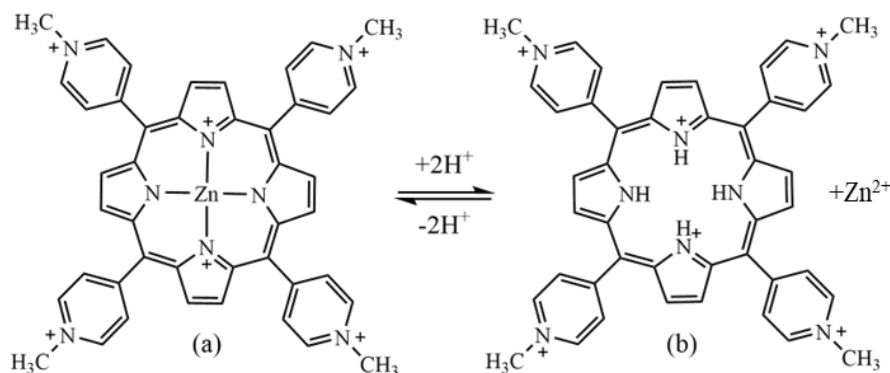


Figura 1. Equilibrio tra la porfirina ZnTMpyP (a) e la sua forma diacida $\text{H}_2\text{TMpyP}^{2+}$ (b).

Nei suoi studi pionieristici Hambright, utilizzando concentrazioni variabili di NaX e HX ha proposto l'espressione di velocità riportata nell'Eq. 1 con la k_s che assume valori di $(6.8 \pm 0.3) \cdot 10^{-2}$ per lo ione Cl⁻ e $(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$ nel caso dello ione Br⁻.

$$\text{Rate} = k_s[\text{ZnTMpyP}][\text{H}^+]^2[\text{X}^-]^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

La porfirina ZnTMpyP è caratterizzata dalla presenza di una banda di Soret o banda B, centrata a 437 nm e due bande Q a 564 e 603 nm (Figura 2a).²³ Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati registrati eccitando a 581 nm, lunghezza d'onda che rappresenta uno dei punti isobestici del processo di demetallazione come verrà meglio chiarito in seguito. Il profilo di emissione di fluorescenza è caratterizzato da un picco a 631 nm ed una componente ad intensità minore, intorno a 669 nm (Figura 2b).²⁴ In comparazione al metallo derivato, la specie diacida $\text{H}_2\text{TMpyP}^{2+}$ presenta uno spostamento batocromico della banda B a 444 nm e delle due bande Q a 592 nm e 641 nm (Figura 2a).¹⁶ Il profilo di emissione di fluorescenza è invece caratterizzato da una doppia banda i cui picchi sono centrati a 663 nm e 710 nm (Figura 2b).¹⁶

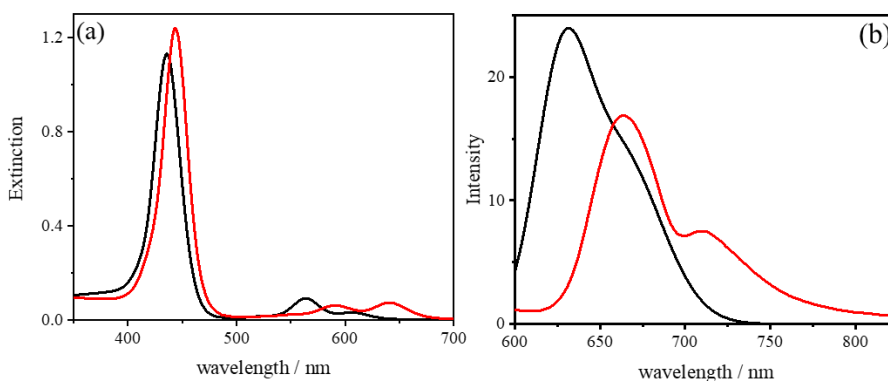


Figura 2. Spettri UV/Vis (a) e di emissione di fluorescenza (b) relativi alle porfirine: ZnTMpyP (linea nera) e $\text{H}_2\text{TMpyP}^{2+}$ (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[\text{ZnTMpyP}] = 5 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 0.5$, $T = 298 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 581 \text{ nm}$.

Come già accennato in fase di introduzione, in letteratura è stata dimostrata la possibilità di stabilizzare la specie diacida $\text{H}_2\text{TMpyP}^{2+}$ a valori di pH inusuali per mezzo di un polimero ad alta densità di carica.¹⁶ Questi risultati ci hanno indotto a progettare una serie di esperimenti volti alla possibilità di catalizzare il processo di demetallazione acida in condizioni sperimentali ($\text{pH} > 0.75$) per le quali, in assenza di templante, il metallo derivato risulta perfettamente stabile nel

tempo. L'aggiunta di moderate quantità di polivinilsolfonato (1 mM) ad una soluzione diluita di porfirina ZnTMpyP induce un moderato spostamento ipsocromico della banda B e batocromico delle due bande Q (Figura 3a). Dall'analisi degli spettri di emissione di fluorescenza si evince un sostanziale *quenching* di intensità delle due bande, in linea con il fatto che esiste una stretta interazione tra i cromofori ed il polimero (Figura 3b). Esperimenti di luce diffusa risonante (RLS – *Resonance Light Scattering*) escludono la formazione di aggregati organizzati sulla superficie del polimero, risultando i profili degli spettri di bassa intensità ed esclusivamente modulati dall'intenso assorbimento del cromoforo. Si può concludere affermando che la porfirina ZnTMpyP, anche per effetto della sua struttura penta-coordinata, è presente in forma dimera (e quindi non riscontrabile con tecnica RLS) o eventualmente come piccolo oligomero la cui formazione può essere mediata dall'interazione delle catene di polimero.

In seguito all'aggiunta di una appropriata quantità di HCl al fine di determinare un valore di pH di 1.5 in soluzione, è possibile riscontrare una variazione cinetica che è facilmente monitorabile sia attraverso spettroscopia UV/Vis nonché di emissione di fluorescenza.

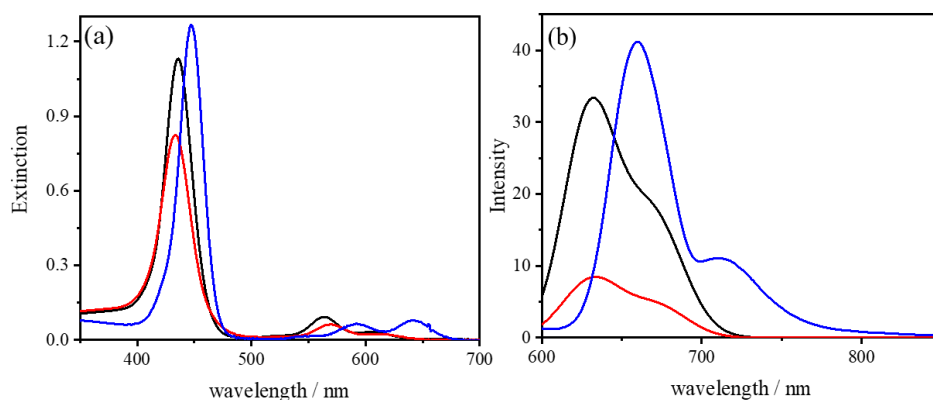


Figura 3. Spettri UV/Vis (a) e di emissione di fluorescenza (b) relativi ai sistemi: ZnTMpyP (linea nera), ZnTMpyP/PVS (linea rossa) e H₂TMpyP²⁺/PVS (linea blu). Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PVS] = 1mM, pH = 1.5, T = 298 K, λ_{exc} 581 nm.

A tal riguardo, in Figura 4 è riportata la variazione cinetica seguita in estinzione da cui è possibile riscontrare l'assenza di specie intermedie in quanto sono osservabili ben tre punti isosbastici. Il processo catalitico di solvolisi acida una volta concluso, conduce alla formazione della specie H_2TMpyP^{2+} la quale è presumibilmente presente non in bulk, ma più verosimilmente monodispersa sulla superficie del polimero. Questa assunzione è sostanziata dall'analisi degli spettri di estinzione e di emissione di fluorescenza della specie ottenuta al termine del processo cinetico, la quale tra l'altro, risulta essere stabile nel tempo. Più precisamente, lo spettro di estinzione evidenzia una banda B centrata a 447 nm ($\Delta\lambda = + 3nm$) e le bande Q a 592 nm e 641 nm (Figure 3a).

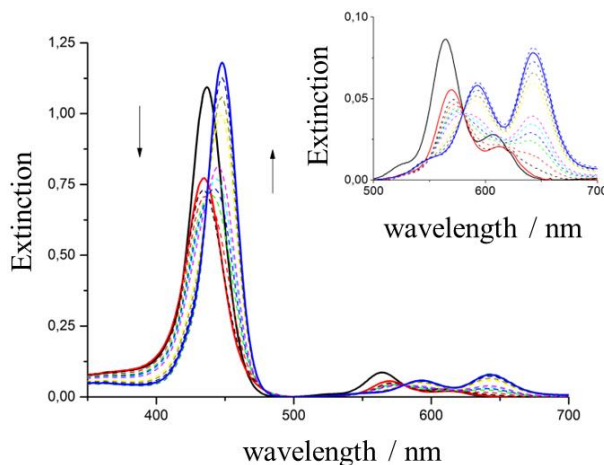


Figura 4. Variazione spettrale UV/Vis corrispondente alla cinetica di solvolisi acida catalizzata da PVS. Nell'inset è riportato l'ingrandimento nella regione 500-700 nm. Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $[PVS] = 1 mM$, $pH = 1.5$, $T = 298 K$, $\lambda_{exc} = 581 nm$.

Questi valori sono diversi rispetto a quelli della specie H_2TMpyP^{2+} presente in bulk e del tutto analoghi a quelli riportati in letteratura per la formazione della specie diacida mediata da PVS a pH inusuali (Tabella 1).¹⁶ Il medesimo discorso è valido per gli spettri di emissione di fluorescenza il cui profilo cambia sostanzialmente sia in termine di posizione delle bande che di rapporto relativo di intensità. Più dettagliatamente, come si evince in Figura 3b, si riscontrano due picchi posizionati a 660 nm e 710 nm in analogia con la formazione della

H₂TMpyP²⁺ sul polimero.¹⁶ Un ulteriore conferma al fatto che la specie in questione è un monomero deriva dalla totale assenza di segnale di luce diffusa risonante, come tra l'altro è da aspettarsi per una specie altamente carica (6+) e quindi con una scarsa tendenza all'auto-aggregazione.

Tabella 1. Caratteristiche spettrali delle porfirine H₂TMpyP²⁺ e ZnTMpyP in assenza ed in presenza di PVS.

<i>Specie</i>	<i>Banda B</i>	<i>Bande Q</i>	<i>Bande fluorescenza</i>
	λ_{max} / nm	λ_{max} / nm	λ_{max} / nm
ZnTMpyP ^[a]	437	564, 603	631, 670
ZnTMpyP / PVS ^[b]	434	569, 610	634, 670
H ₂ TMpyP ^{2+[a]}	444	592, 641	664, 709
H ₂ TMpyP ^{2+ / PVS^[b]}	447	592, 641	660, 710

[a]Ref.²³, [b] Ref.¹⁶

L'analisi cinetica può essere indifferentemente condotta sia mediante spettroscopia UV/Vis che di emissione di fluorescenza. Nel primo caso è preferibile monitorare la formazione della specie diacida H₂TMpyP²⁺ facendo riferimento alla regione delle bande Q e più specificatamente alla lunghezza d'onda di 641 nm, alla quale il metallo derivato non presenta alcun assorbimento (Figura 3**Figura a**). In altre regioni significative dello spettro, come ad esempio le bande B, si ha invece una parziale sovrapposizione degli assorbimenti relativi alle due specie che rende difficile una rigorosa valutazione del profilo cinetico. Nel caso della spettroscopia di emissione di fluorescenza, per le motivazioni addotte in precedenza, la lunghezza d'onda di eccitazione corrispondente a 581 nm è preferibile (isosbestico della cinetica UV/Vis) mentre l'emissione è centrata a 710 nm corrispondente al picco a minore intensità (Figura 3b). L'analisi cinetica dei dati (Figura 5) può essere condotta indifferentemente sia sui dati di estinzione che di emissione di fluorescenza per mezzo di una procedura di fitting non lineare e facendo riferimento all'Eq. 2 di tipo “*stretched*” proposta in letteratura da Pasternack.²⁵

$$E = E_0 + (E_{inf} - E_0)(1 - e^{-(kt)^n}) \quad (\text{Eq. 2})$$

In questa relazione, completamente priva di un tempo di induzione iniziale, si ha che E , E_0 ed E_{inf} rappresentano rispettivamente i valori dell'estinzione al tempo t , all'inizio e al termine del processo di aggregazione; k indica la costante di velocità mentre il parametro n , espresso come funzione di potenza del tempo, rappresenta il fattore di crescita dell'aggregato.

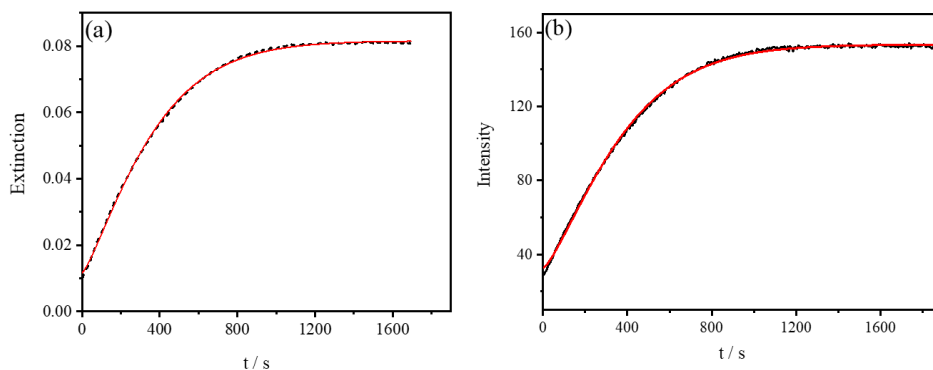


Figura 5. Analisi cinetica condotta attraverso spettroscopia UV/Vis ($\lambda = 641$ nm) (a) e mediante spettroscopia di emissione di fluorescenza ($\lambda_{em} = 710$ nm, $\lambda_{exc} = 581$ nm) (b). Condizioni sperimentali: $[ZnTMPyP] = 5 \mu M$, $[PVS] = 1 mM$, $pH = 1.5$, $T = 298$ K. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2: (a) $k_{stretched} = (2.70 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$; $n = 1.23 \pm 0.01$; $R^2 = 0.999$; (b) $k_{stretched} = (2.47 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$; $n = 1.31 \pm 0.01$; $R^2 = 0.999$.

2.2.1 - Effetto della concentrazione di polimero

Al fine di stabilire le condizioni sperimentali più appropriate per intraprendere lo studio del processo di demetallazione, ovvero quelle in cui la porfirina risulta essere completamente legata al supporto polimerico, sono state preventivamente condotte delle titolazioni al variare della concentrazione di polimero. Tale indagine è stata effettuata attraverso l'ausilio combinato di più tecniche (UV/Vis, emissione di fluorescenza, diffusione di luce risonante) ed ha permesso di individuare tre diverse possibilità di interazione tra la porfirina ed il polielettrolita al variare della concentrazione di quest'ultimo. Nel caso dell'impiego di una bassa concentrazione di PVS ($< 50 \mu\text{M}$, Figura 6 linea rossa), la porfirina interagisce con il polimero formando presumibilmente delle estese strutture aggregate. Questa ipotesi è sostanziata da una marcata ipocromicità della banda B unitamente ad un suo netto allargamento verso il rosso (Figura 6a), da un *quenching* di fluorescenza (Figura 6b) e principalmente, dalla presenza di un intenso picco RLS (Figura 6c). In queste condizioni, molto vicine ad un rapporto stechiometrico unitario in carica, è presumibile che si possano instaurare forti interazioni tra i cromofori mediate da varie catene del template polimerico che però non è in grado di espletare alcun ruolo catalitico non osservando alcuna incipienza di demetallazione nel tempo al valore di pH pari a 1.5. Per contro, a concentrazione più elevata di polimero e più specificatamente nell'ampio intervallo $50 \mu\text{M} - 6 \text{mM}$, le caratteristiche spettroscopiche variano decisamente rispetto alla situazione precedente non avendo alcun riscontro di formazione di estese specie aggregate come evidenziato dall'assenza di segnale RLS (Figura 6c). Piuttosto, il piccolo spostamento ipsocromico ($\Delta\lambda = 3\text{nm}$) della banda B (Figura 6a) potrebbe fare pensare alla presenza di piccoli oligomeri di porfirina, come tra l'altro già riportato in letteratura.¹⁶ L'aspetto più interessante è che in queste condizioni e al valore di pH = 1.5 il polimero riesce ad esercitare un'azione catalitica riguardo al processo di demetallazione acida. In particolare, l'andamento

delle costanti di velocità del processo ottenute per mezzo di una procedura di fitting non lineare per mezzo dell'Eq. 2 mostrano un andamento di tipo non lineare e a saturazione al variare della concentrazione di polielettrolita (Figura 7). Dunque, un aumento progressivo della concentrazione della matrice (50 μ M-6mM) determina una maggiore efficacia del processo di catalisi presumibilmente a causa dell'incremento della concentrazione idrogenionica in prossimità del campo elettrostatico del polimero.²⁶

Come riportato nella Tabella 2, oltre un valore di soglia di concentrazione di PVS (> 6 mM) l'effetto catalitico diminuisce drammaticamente (Figura 7). In quest'ultimo caso le caratteristiche spettroscopiche (Figura 6, linea verde) sono del tutto simili a quelle della porfirina in bulk e suggeriscono una forte diluizione del sistema, con il cromoforo che probabilmente si trova monodisperso su singole catene di polimero. In queste condizioni, la condensazione protonica sulla superficie del polielettrolita ed in prossimità del cromoforo dovrebbe potere essere limitata al punto da determinare un forte rallentamento del processo di demetallazione acida.

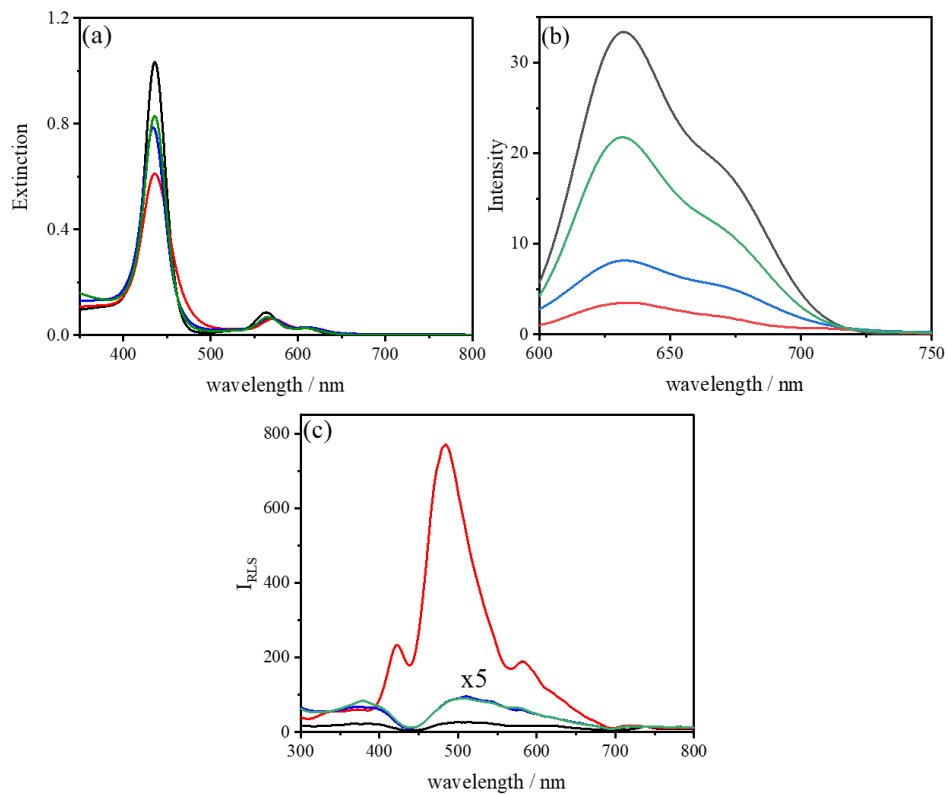


Figura 6. Spettri UV/Vis (a), di emissione di fluorescenza (b) e di RLS (c) della porfirina ZnTMPyP (linea nera) e del sistema ZnTMPyP / PVS a varia concentrazione di polimero: [PVS] = 25 μ M (linea rossa); [PVS] = 6 mM (linea blu); [PVS] = 32mM (linea verde). Condizioni sperimentali: [ZnTMPyP] = 5 μ M, [PVS] = 25 μ M / 6 mM / 32 mM, T = 298 K, λ_{exc} 581 nm.

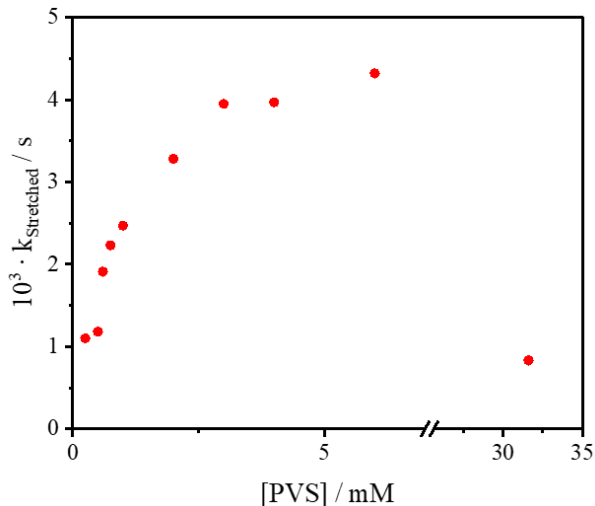


Figura 7. Andamento della costante di velocità $k_{stretched}$ in funzione della concentrazione di polimero. Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $pH = 1.5$, $T = 298 K$.

Tabella 2. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP condotto a varia concentrazione di PVS.

$[PVS] / mM$	$k_{stretched} / s^{-1}$	n
0.25	$(1.10 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.13 ± 0.01
0.5	$(1.18 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.14 ± 0.01
0.6	$(1.91 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.27 ± 0.01
0.75	$(2.23 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.24 ± 0.01
1.00	$(2.47 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.31 ± 0.01
2.00	$(3.28 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	1.20 ± 0.01
3.00	$(3.95 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.28 ± 0.01
4.00	$(3.97 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	1.28 ± 0.01
6.00	$(4.32 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.28 ± 0.01
31.60	$(8.32 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	1.15 ± 0.01

Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $pH = 1.5$, $T = 298 K$.

2.2.2 - Effetto della concentrazione idrogenionica

Verificato che il polimero è in grado di indurre il processo di demetallazione in condizioni sperimentali nelle quali in bulk ($\text{pH} \geq 0.75$) il processo non avviene completamente, è stato effettuato un ulteriore studio cinetico volto a verificare, alla massima concentrazione fruibile di polimero, l'effetto della variazione di pH. Il processo di solvolisi acida è stato condotto alla concentrazione di polimero di 1 mM e 6 mM (Figura 8) e nell'intervallo di pH (0.75 - 3.4). Nelle tabelle 3 e 4 sono riportati i parametri cinetici ottenuti tramite il fitting non lineare dei dati di estinzione ($\lambda = 641 \text{ nm}$) ed elaborati per mezzo dell'Eq. 2. La velocità di demetallazione aumenta in modo non lineare all'aumentare della concentrazione idrogenionica fino al valore di soglia di $\text{pH} = 0.75$ al di sotto della quale, come detto, il processo di demetallazione avviene anche in bulk in assenza di polimero (Figura 8).

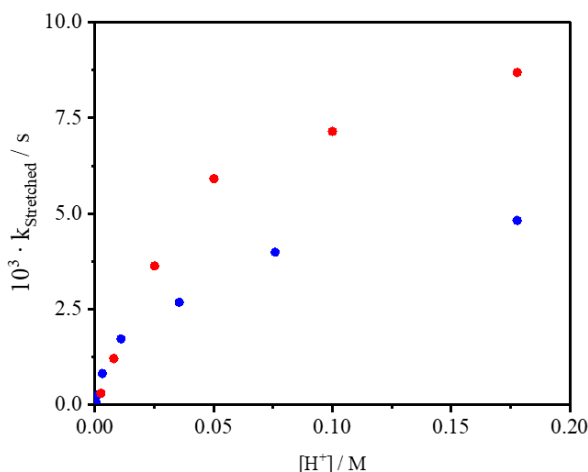


Figura 8. Andamento della costante di velocità $k_{stretched}$ in funzione della concentrazione idrogenionica. Condizioni sperimentali: $[\text{ZnTMpyP}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{PVS}] = 1 \text{ mM}$ (blu), $[\text{PVS}] = 6 \text{ mM}$ (rosso), $T = 298 \text{ K}$.

Tabella 3. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP catalizzato da PVS (1mM) a diverso valore di pH.

<i>pH</i>	$10^3 \cdot k_{stretched} / s$	<i>n</i>
0.75	$(4.51 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.26 ± 0.01
1.12	$(3.78 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.32 ± 0.01
1.45	$(2.59 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.26 ± 0.01
1.96	$(1.66 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.25 ± 0.01
2.50	$(7.73 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	1.19 ± 0.01
3.04	$(2.18 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	1.18 ± 0.01
3.44	$(6.76 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	1.13 ± 0.01

Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PVS] = 1 mM, T = 298 K.

Tabella 4. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP catalizzato da PVS (6mM) a diverso valore di pH.

<i>pH</i>	$10^3 \cdot k_{stretched} / s$	<i>n</i>
0.75	$(8.69 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	1.34 ± 0.01
1.00	$(7.15 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	1.36 ± 0.02
1.30	$(5.91 \pm 0.06) \cdot 10^{-3}$	1.30 ± 0.02
1.60	$(3.63 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	1.35 ± 0.02
2.10	$(1.21 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.24 ± 0.01
2.60	$(2.99 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	1.20 ± 0.01

Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PVS] = 6 mM, T = 298 K.

2.2.3 - Effetto del protocollo di mescolamento

Come è noto, il controllo della sintesi supramolecolare in acqua è fortemente dipendente da effetti gerarchici che possono regolare il percorso termodinamico o cinetico delle specie aggregate.²⁷ Al fine di verificare la sussistenza di effetti gerarchici si è pensato di adottare due diverse metodiche di mescolamento: PF (*porphyrin first*) nella quale i reattivi (PVS e HCl) vengono aggiunti in successione ad una soluzione prediluita di porfirina e PL (*porphyrin last*) nella quale la porfirina viene aggiunta come ultimo reagente ad una soluzione premiscelata di acido e polimero. Entrambi i protocolli sono stati impiegati per avviare, in diverse condizioni sperimentali, diversi *run* cinetici. Tuttavia, il sistema non risulta essere di natura gerarchica, avendo riscontrato sia costanti di velocità sia caratteristiche spettroscopiche del tutto invarianti in funzione del protocollo di mescolamento adottato. A titolo di esempio in Figura 9 vengono riportati i profili cinetici e le relative caratteristiche spettroscopiche per il processo di demetallazione avviato con entrambi i protocolli di mescolamento nelle condizioni di massima velocità (PVS = 6 mM, pH = 1.5).

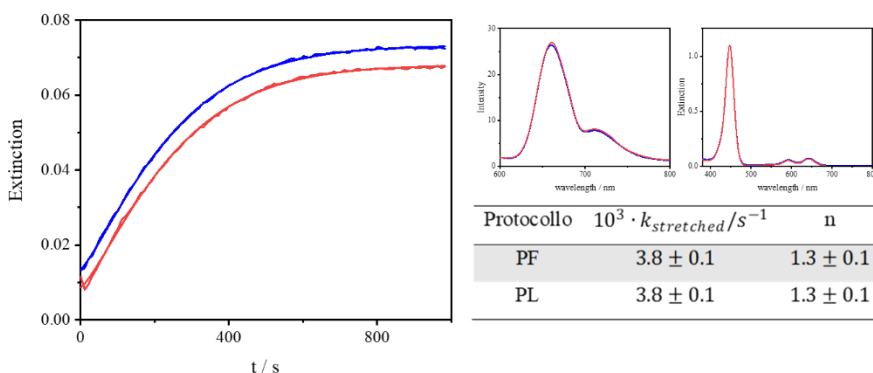


Figura 9. Profili cinetici, spettri UV/Vis e di emissione di fluorescenza per il processo di demetallazione avviato sulla base del protocollo di mescolamento PF (linea blu) e PL (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $[PVS] = 6 mM$, $pH = 1.5$, $T = 298 K$.

2.2.4 - Effetto della temperatura

Nell'ottica di voler ottenere ulteriori informazioni riguardo il processo di demetallazione catalizzato da PVS è stato condotto uno studio al fine di determinare i parametri d'attivazione che caratterizzano lo stato attivato del processo attraverso l'equazione di Eyring la cui forma generale è rappresentata dall'equazione:¹⁷

$$k = (k_b T/h) \cdot K^\ddagger \quad (\text{Eq. 3})$$

dove k_b è la costante di Boltzmann, h è la costante di Planck, T è la temperatura assoluta e K^\ddagger è la costante di pseudo equilibrio tra i reagenti e lo stato attivato. Applicando la relazione tra l'energia libera di Gibbs e la costante di equilibrio si ottiene l'equazione

$$k = (k_b T/h) e^{\left(\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right)} \quad (\text{Eq. 4})$$

che può ulteriormente essere riscritta esplicitando l'entalpia molare di attivazione (ΔH^\ddagger) e l'entropia molare di attivazione (ΔS^\ddagger):

$$k = \left(\frac{k_B T}{h}\right) e^{\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)} e^{\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}\right)} \quad (\text{Eq. 5})$$

L'espressione in forma logaritmica è lineare ed utile ai fini della valutazione dei parametri di attivazione:

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{-\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (\text{Eq. 6})$$

Lo studio della variazione della velocità di demetallazione al variare della temperatura è stato condotto sulla porfirina ZnTMPyP sia in bulk a pH 0.5 che in condizioni catalitiche a pH 1.5 e a diversa concentrazione di PVS (1 e 6 mM). In quest'ultimo caso, la scelta del valore del pH è giustificata sia dalla necessità di escludere qualsiasi incipienza di processo di demetallazione in bulk nonché

dall'esigenza di ottenere delle cinetiche di reazione i cui tempi fossero monitorabili attraverso tecniche convenzionali. Infatti, come si evince dai dati di costanti di velocità riportati in Tabella 5 e 6, nel caso della demetallazione mediata dal supporto polimerico si ha un'accelerazione del processo di quasi due ordini di grandezza al variare della temperatura. In Tabella 7 sono invece riportate le costanti di velocità di pseudo-primo ordine per il processo di demetallazione in bulk ottenute per mezzo di una procedura di fitting non lineare impiegando l'Eq. 7:

$$E = E_{\infty} + (E_0 - E_{\infty})e^{-k_{obs}t} \quad (\text{Eq. 7})$$

Tabella 5. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP catalizzato da PVS (1mM) al variare della temperatura.

T / K	$k_{stretched} / s^{-1}$	n
289	$(6.55 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	1.17 ± 0.03
293	$(1.01 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.14 ± 0.01
298	$(1.61 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.25 ± 0.01
303	$(2.63 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.16 ± 0.01
307	$(3.96 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	1.27 ± 0.01
311	$(5.92 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	1.31 ± 0.01
317	$(8.78 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	1.32 ± 0.01
322	$(1.28 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	1.40 ± 0.02
326	$(1.84 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	1.31 ± 0.02
331	$(2.66 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	1.21 ± 0.02

Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PVS] = 1 mM, pH = 1.5.

Tabella 6. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP catalizzato da PVS (6mM) al variare della temperatura.

T / K	$k_{stretched} / s^{-1}$	n
288	$(9.00 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	1.23 ± 0.01
293	$(1.46 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.23 ± 0.01
298	$(2.30 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	1.20 ± 0.03
303	$(3.58 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	1.32 ± 0.03
311	$(7.59 \pm 0.08) \cdot 10^{-3}$	1.34 ± 0.03
325	$(2.96 \pm 0.08) \cdot 10^{-2}$	1.24 ± 0.06

Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $[PVS] = 6 \text{ mM}$, $pH = 1.5$.

Tabella 7. Costanti di velocità di pseudo-primo ordine ottenute attraverso una analisi di fitting non lineare dei dati (Eq. 7) e relative al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP in bulk al variare della temperatura.

T / K	k / s^{-1}
298	$(3.30 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$
306	$(6.23 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$
310	$(9.80 \pm 0.08) \cdot 10^{-4}$
315	$(1.42 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$
318	$(1.84 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$

Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $pH = 0.5$.

In Figura 10 è riportato l'andamento dei parametri cinetici ottenuti dall'analisi delle velocità del processo in funzione della temperatura sia in bulk che alle due diverse concentrazioni di polimero. I dati sperimentali rispettano pienamente l'equazione di Eyring rendendo possibile la determinazione dei parametri di attivazione (Tabella 8) relativi al processo di demetallazione dalla pendenza (ΔH^\ddagger) e dall'intercetta (ΔS^\ddagger).

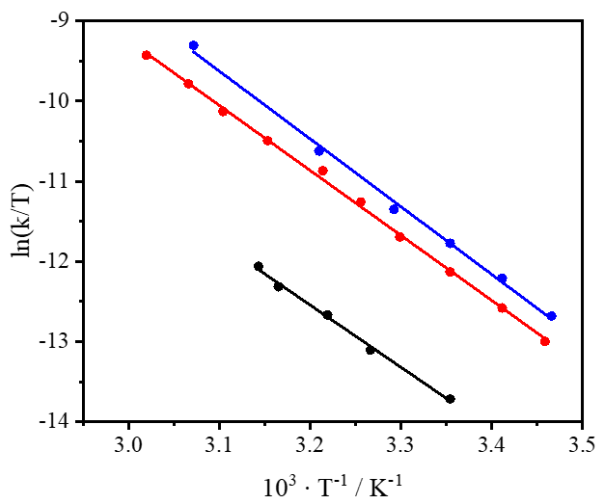


Figura 10. Diagramma di Eyring delle costanti di velocità per il processo di demetallazione della porfirina ZnTMpyP in bulk a pH = 0.5 (linea nera) ed indotta a pH = 1.5 da PVS 1 mM (linea rossa) e 6 mM (linea blu). Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PVS] = 1 mM / 6 mM, pH = 0.5 / 1.5. Fitting lineare: $R^2 = 0.996$ (nera), $R^2 = 0.999$ (rossa), $R^2 = 0.997$ (blu).

Come facilmente prevedibile, i valori di ΔH^\ddagger sono positivi e tra l'altro praticamente costanti nelle varie condizioni sperimentali, risultando di fatto il parametro poco diagnostico. La leggera diminuzione osservata in bulk potrebbe però essere ascrivibile ad un effetto di maggiore solvatazione dello stato di transizione. I valori di entropia di attivazione risultano invece essere tutti negativi, chiara indicazione di come la flessibilità dello stato attivato sia minore rispetto a quella del sistema reagente. L'insieme congiunto dei parametri di attivazione induce dunque a pensare che nel meccanismo di demetallazione assume senz'altro grande importanza il grado di solvatazione dello stato attivato che, nel caso del processo mediato da polimero, è da intendersi certamente di grado minore risultando in valori di ΔS^\ddagger più piccoli al variare del carico di polimero. Altre considerazioni risulterebbero puramente speculative in virtù delle differenti condizioni di pH adottate, ma rese necessarie in virtù dell'intrinseca natura del sistema indagato.

Tabella 8. Parametri di attivazione ricavati in base all'equazione di Eyring per la solvolisi acida della porfirina ZnTMpyP in bulk a pH = 0.5 ed indotta da PVS a pH = 1.5.

	<i>Bulk</i>	<i>[PVS] = 1 mM</i>	<i>[PVS] = 6 mM</i>
$\Delta H^\ddagger / kJ \cdot mol^{-1}$	64.50 ± 0.01	67.43 ± 0.01	70.28 ± 0.01
$\Delta S^\ddagger / J \cdot mol^{-1}$	-95.45 ± 0.01	-72.12 ± 0.01	-59.70 ± 0.01

Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $[PVS] = 1 mM / 6 mM$, pH = 0.5 / 1.5.

2.2.5 - Impiego di altri polimeri

Verificata l'efficienza del PVS nella catalisi di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP, si è voluto procedere a verificare l'ipotesi che anche altri polielettroliti recanti elevata densità di carica, potessero essere in grado di svolgere il medesimo ruolo catalitico. I polimeri utilizzati sono stati il polifosfato di sodio (PPA) e il polistirensolfonato (PSS) (Figura 11).

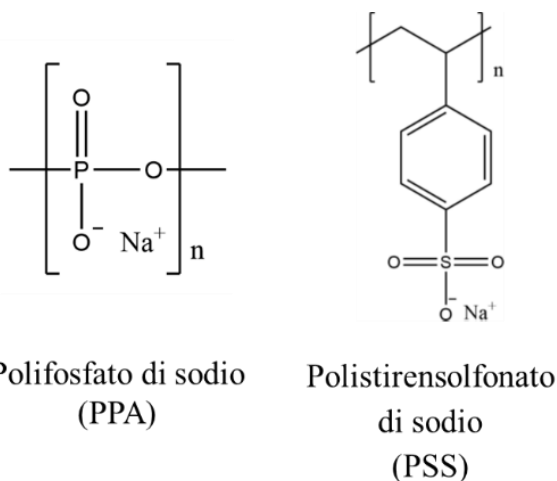


Figura 11. Strutture dei polielettroliti polifosfato di sodio (PPA) e polistirensolfonato di sodio (PSS).

Il comportamento della porfirina ZnTMpyP in presenza di PSS è ben diverso rispetto a quello riscontrato con il PVS. L'interazione con il polimero determina uno spostamento *batocromico* sia della banda di Soret ($\Delta\lambda = 5$ nm) che delle bande Q ($\Delta\lambda = 2$ e 4 nm) nonché una variazione dello spettro di emissione di fluorescenza sia in termini di rapporto relativo di intensità delle bande che delle loro posizioni (Figura 12). Le osservazioni sperimentali inducono a pensare all'esistenza di una forte interazione di *stacking* esistente tra gli anelli benzenici del supporto polimerico ed il sistema porfirinico. In letteratura sono noti numerosi esempi di spostamenti batocromici osservati in seguito ad interazioni di questa natura ed un esempio classico è costituito dall'intercalazione di alcune porfirine

con le nucleobasi di DNA.²⁸ Una conferma sulla natura dell'interazione tra ZnTMpyP e PSS viene dalla completa incapacità da parte del polimero, di svolgere alcuna attività catalitica in seguito ad un abbassamento del pH. Infatti, nelle condizioni descritte in Figura 12, l'aggiunta di acido cloridrico (pH = 2.5) non comporta nel tempo alcuna variazione delle caratteristiche spettroscopiche descritte rimanendo la porfirina nella sua forma metallata. Un'ulteriore spiegazione della mancata demetallazione deriva dalla diversità strutturale del PSS rispetto al PVS. Il PSS impiegato in questo studio è caratterizzato dal possedere una catena molto estesa con un numero di residui carichi di circa un ordine di grandezza superiore al PVS (340 vs 38). L'estensione della catena, unitamente all'ingombro sterico determinato dal residuo benzensolfonato in interazione con la porfirina può senz'altro determinare una rigidità conformazionale in grado di limitare l'attività di condensazione protonica che nel PVS è invece senz'altro favorita dalle ridotte dimensioni delle singole catene. In questo caso, piccoli segmenti carichi possono interagire tra loro mediando le interazioni repulsive grazie alla mediazione di piccoli oligomeri di porfirina come descritto in precedenza.

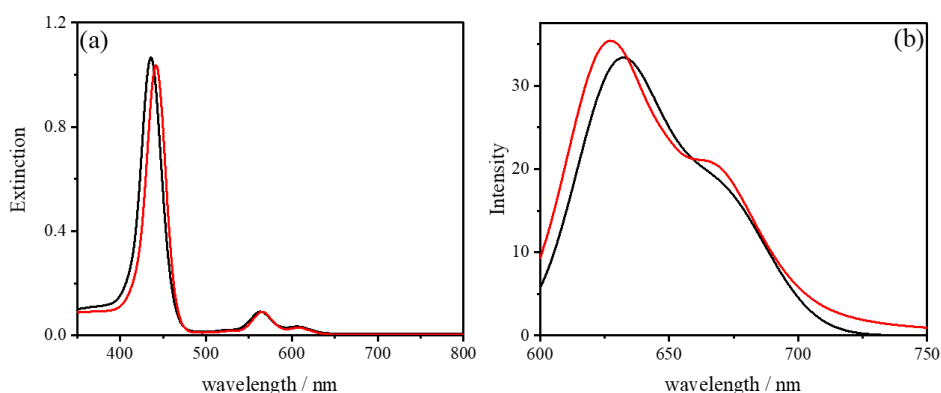


Figura 12. Spettri UV/Vis (a) e di emissione di fluorescenza (b) dei sistemi ZnTMpyP (linea nera) e ZnTMpyP / PSS (linea rossa). Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PSS] = 1 mM, pH = 2.5, T = 298 K, λ_{exc} 581 nm.

Il comportamento della porfirina ZnTMpyP in presenza di PPA è invece del tutto simile a quanto riscontrato con il PVS. L'interazione con il polimero determina uno spostamento ipsocromico della banda di Soret ($\Delta\lambda = 5$ nm) e batocromico delle bande Q ($\Delta\lambda = 4$ e 5 nm) nonché un marcato *quenching* dell'emissione di fluorescenza della porfirina ZnTMpyP (Figura 13). Anche il PPA, per effetto del forte campo elettrostatico indotto dall'alta densità di carica dei residui fosfati, è dunque in grado di esercitare un effetto catalitico nel processo di solvolisi acida della porfirina ZnTMpyP. In Figura 13a è riportata la formazione sul polimero della specie diacida H_2TMpyP^{2+} a pH 2.5, la quale è caratterizzata da un profilo di assorbimento simile a quello riscontrato sul PVS con la banda B posizionata a 449 nm e le bande Q rispettivamente a 593 nm e 644 nm. Il corrispondente profilo di emissione di fluorescenza presenta due picchi, uno di intensità maggiore a 665 nm e l'altro a 707 nm (Figura 13b). Una volta verificato che il PPA è in grado di svolgere un ruolo catalitico nella reazione di demetallazione della porfirina ZnTMpyP, si è quindi pensato di procedere ad una comparazione con il PVS unicamente per quanto riguarda la dipendenza delle costanti di velocità in funzione della temperatura. Le condizioni sperimentali scelte sono però condizionate dal fatto che il residuo carico sul PPA è suscettibile di protonazione a valori acidi ben più alti rispetto a quanto verificato su PVS. Prove preliminari hanno stabilito che a pH = 1.5 la porfirina viene estrusa dal polimero, una condizione che invece non si realizza alzando il pH a 2.5. Vista la similitudine delle caratteristiche spettroscopiche della porfirina ZnTMpyP su PVS e PPA, anche in questo caso è preferibile monitorare la formazione della specie diacida H_2TMpyP^{2+} facendo riferimento alla regione delle bande Q e più specificamente alla lunghezza d'onda di 644 nm alla quale il metallo derivato non presenta alcun assorbimento. L'analisi cinetica dei dati è stata condotta, ancora una volta, per mezzo di una procedura di fitting non lineare dei dati di estinzione in funzione del tempo mediante l'Eq. 2 e i valori dei parametri cinetici calcolati sono riportati nella Tabella 9.

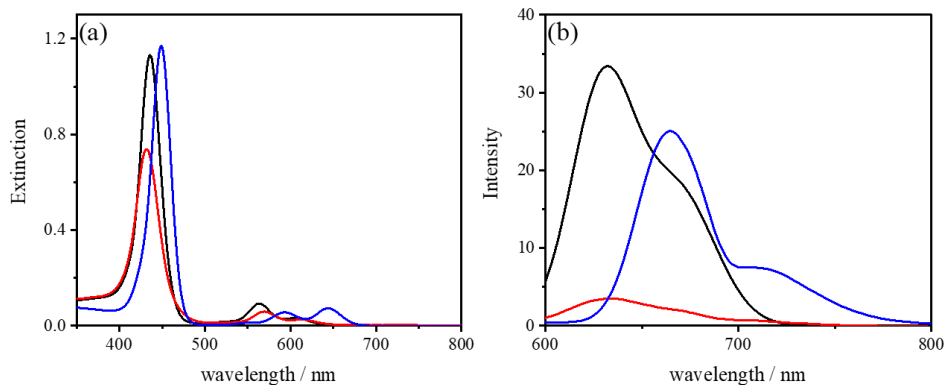


Figura 13. Spettri UV/Vis (a) e di emissione di fluorescenza (b) dei sistemi ZnTMpyP (linea nera), ZnTMpyP / PPA (linea rossa) e H₂TMpyP²⁺ / PPA (linea blu). Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μM, [PPA] = 1 mM, pH = 2.5, T = 298 K, λ_{exc} 581 nm.

Tabella 9. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell’Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP catalizzato da PPA (1 mM) al variare della temperatura.

<i>T / K</i>	<i>k</i> _{stretched} / s ⁻¹	<i>n</i>
298	(2.05 ± 0.01) · 10 ⁻³	(8.56 ± 0.05) · 10 ⁻¹
303	(3.28 ± 0.01) · 10 ⁻³	(7.86 ± 0.03) · 10 ⁻¹
309	(6.42 ± 0.04) · 10 ⁻³	(7.76 ± 0.04) · 10 ⁻¹
314	(9.41 ± 0.09) · 10 ⁻³	(8.25 ± 0.07) · 10 ⁻¹
318	(1.51 ± 0.02) · 10 ⁻²	(8.45 ± 0.08) · 10 ⁻¹

Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μM, [PPA] = 1 mM, pH = 2.5

L’andamento dei dati di velocità in funzione della temperatura è in accordo con l’equazione di Eyring ed i parametri di attivazione del processo di demetallazione sono riportati nella didascalia della Figura 14.

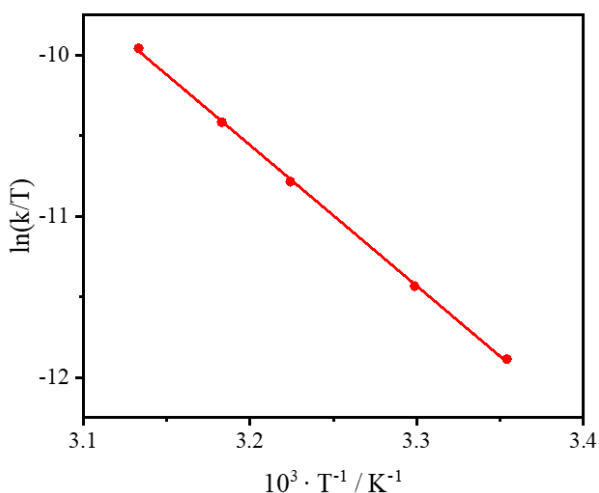


Figura 14. Diagramma di Eyring delle costanti di velocità per il processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP indotta da PPA. Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PPA] = 1mM, pH = 2.5. Dall'analisi dei dati si ottiene $\Delta H^\ddagger = (73 \pm 1) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = (-52 \pm 1) \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$.

Come sopraddetto, al fine di potere effettuare un confronto tra le attività catalitiche del PVS e del PPA nelle medesime condizioni sperimentali, sono stati condotti degli studi per verificare l'effetto della temperatura a pH 2.5 per il PVS. I valori dei parametri cinetici calcolati sono riportati nella Tabella 10 e l'andamento dei dati di velocità in funzione della temperatura ha permesso l'estrapolazione dei parametri di attivazione che sono riportati nella didascalia della Figura 15.

Tabella 10. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP catalizzato da PVS (1mM) al variare della temperatura.

T / K	$k_{stretched} / s^{-1}$	n
303	$(7.73 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	1.19 ± 0.01
309	$(1.28 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.26 ± 0.01
314	$(1.85 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.22 ± 0.01
318	$(2.68 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	1.16 ± 0.01
324	$(4.42 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	1.32 ± 0.01

Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PVS] = 1 mM, pH = 2.5

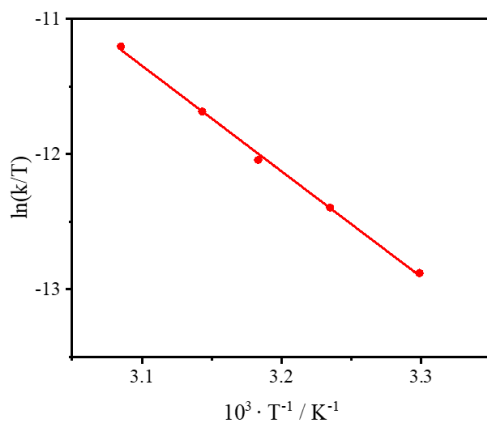


Figura 15. Diagramma di Eyring delle costanti di velocità per il processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP indotta da PVS. Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $[PVS] = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 2.5$. Dall'analisi dei dati si ottiene $\Delta H^\ddagger = (65 \pm 1) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = (-90 \pm 1) \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$.

Da un confronto dei dati di costanti di velocità si può evidenziare come, a parità di condizioni sperimentali, il processo di demetallazione acida sul PPA avviene più velocemente rispetto al PVS e con un valore associato di entropia di attivazione più piccolo $\Delta S^\ddagger = (-52 \pm 1) \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ vs $(-90 \pm 1) \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$. I due polimeri possiedono comunque delle strutture diverse e a parità di condizioni di pH di bulk gli stessi potrebbero determinare una concentrazione idrogenionica locale ben diversa in prossimità della porfirina cationica determinando tra l'altro, variazioni conformazionali a carico di una singola catena o anche promuovere l'associazione di più catene. In ogni caso, trattandosi di una catalisi su polimero è da escludere la possibilità di una reazione di tipo "anione assistita" come descritto da Hambright nelle condizioni di bulk²⁹, ma piuttosto è più opportuno fare riferimento alla formazione di un complesso SAT (*sitting-atop*) mediato dal polimero. All'atto della dissociazione dello stato di transizione, a parte l'effetto del grado di solvatazione delle varie specie, un ruolo fondamentale ed in grado di giustificare la differenza in termini cinetici tra i due polimeri, potrebbe essere assolto dallo ione uscente Zn^{2+} che senz'altro, presenta una maggiore affinità per i residui fosfato.

2.2.6 - Meccanismo di reazione

Le informazioni ottenute dagli studi precedentemente descritti hanno permesso l'elaborazione di un meccanismo di reazione. Il quale prevede innanzitutto l'equilibrio tra il PVS e la sua forma protonata (Eq. 8) con la relativa costante di equilibrio K_1 (Eq. 9). Inoltre, è necessario considerare anche l'equilibrio tra il PVS e la metalloporfirina ZnTMPyP (Eq. 10) che per semplicità nel meccanismo chiameremo ZnP e la relativa costante di equilibrio (Eq. 11).



$$K_1 = \frac{[PVS \cdot H]}{[PVS][H^+]} \quad (\text{Eq. 9})$$



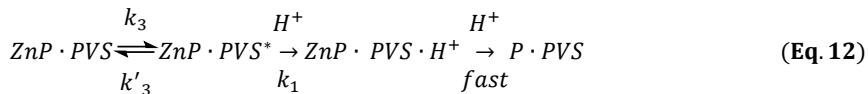
$$K_2 = \frac{[ZnP \cdot PVS]}{[PVS][ZnP]} \quad (\text{Eq. 11})$$

In seguito alla formazione dell'addotto $ZnP \cdot PVS$, l'aggiunta di acido dà luogo al processo cinetico che porta al prodotto di reazione, ovvero alla formazione della specie diacida H_2TMPyP^{2+} legata al supporto polimerico, che per semplicità nella discussione seguente chiameremo $P \cdot PVS$.

L'Eq. 12 descrive l'intero processo cinetico in esame nel quale è contemplata la formazione di un intermedio di reazione $ZnP \cdot PVS^*$ il quale, per maggiore semplicità, verrà indicato in seguito come $[I]$.

Una volta formato, l'intermedio di reazione può riformare la specie $ZnP \cdot PVS$ (secondo una k'_3) od evolvere, tramite l'aggiunta di un protone (secondo una k_1) nella specie $ZnP \cdot PVS \cdot H^+$, la quale è da intendersi il labile complesso

sitting-atop che si converte molto rapidamente nella specie finale $P \cdot PVS$ in seguito all'aggiunta di un ulteriore protone.



Considerando la variazione di concentrazione dell'intermedio di reazione nel tempo si ha:

$$\frac{\partial[I]}{\partial t} = -k_1[H^+][I] - k'_3[I] + k_3[ZnP \cdot PVS] \quad (\text{Eq. 13})$$

$[ZnP \cdot PVS]$ può essere determinato dall'Eq.11 e quindi sostituito nell'Eq. 13 per ottenere l'Eq. 14.

$$\frac{\partial[I]}{\partial t} = -[I](k_1[H^+] + k'_3) + K_2k_3[ZnP][PVS] \quad (\text{Eq. 14})$$

Supponendo di poter applicare l'approssimazione dello stato stazionario ovvero che è $\frac{\partial[I]}{\partial t} = 0$ si avrà:

$$K_2k_3[ZnP][PVS] - [I](k_1[H^+] + k'_3) = 0$$

da cui si ricava

$$[I] = \frac{K_2k_3[ZnP][PVS]}{k_1[H^+] + k'_3} \quad (\text{Eq. 15})$$

L'espressione della velocità con la quale si forma il prodotto sarà data da:

$$v = \frac{\partial[P \cdot PVS]}{\partial t} = k_1[I][H^+] \quad (\text{Eq. 16})$$

Sostituendo l'Eq.15 nella Eq.16 si otterrà:

$$v = \frac{\partial[P \cdot PVS]}{\partial t} = k_1[I][H^+] = \frac{k_1k_3K_2[PVS][H^+][ZnP]}{k_1[H^+] + k'_3} \quad (\text{Eq. 17})$$

Considerando la concentrazione totale di porfirina ($[P]_T$) otteniamo l'Eq. 18.

$$[P]_T = [ZnP] + [ZnP \cdot PVS] + [P \cdot PVS] \quad (\text{Eq. 18})$$

Ricavando $[ZnP \cdot PVS]$ dall'Eq. 11, sostituendo nell'Eq. 18 e rielaborando l'espressione si ottiene l'Eq. 19:

$$[P]_T = [ZnP](1 + K_2[PVS]) + [P \cdot PVS] \quad (\text{Eq. 19})$$

Poiché la variazione della concentrazione totale di porfirina nel tempo non varia, si ha $\frac{\partial [P]_T}{\partial t} = 0$. L'Eq. 19 può essere esplicitata rispetto ZnP per ottenere l'Eq. 20:

$$-\frac{\partial [ZnP]}{\partial t} = \frac{\partial [P \cdot PVS]}{\partial t} \cdot \frac{1}{1 + K_2[PVS]} \quad (\text{Eq. 20})$$

La velocità del processo è determinata dalla diminuzione in concentrazione del metallo derivato ZnP , e sostituendo l'Eq. 17 nell'Eq. 20 si ottiene:

$$v = -\frac{\partial [ZnP]}{\partial t} = \frac{k_1 k_3 K_2 [PVS] [H^+] [ZnP]}{(k_1 [H^+] + k'_3)(1 + K_2 [PVS])} \quad (\text{Eq. 21})$$

L'Eq. 21 mostra come la velocità del processo dipende anche dalla concentrazione del PVS, la quale varia nel tempo dovendo anche considerare gli equilibri descritti nelle Eq. 8 ed Eq. 10. La concentrazione totale del polimero è espressa da:

$$[PVS]_T = [PVS] + [PVS \cdot H^+] + [ZnP \cdot PVS] \quad (\text{Eq. 22})$$

Sostituendo $[PVS \cdot H^+]$ dall'Eq. 9 e $[ZnP \cdot PVS]$ dall'Eq. 11 si ottiene l'Eq. 23 che mostra come la concentrazione totale di PVS dipende anche dalle costanti K_1 e K_2 .

$$[PVS]_T = [PVS](1 + K_1[H^+] + K_2[ZnP]) \quad (\text{Eq. 23})$$

Esplicitando $[PVS]$ dall'Eq. 23, si ottiene l'Eq. 24:

$$[PVS] = \frac{[PVS]_T}{1 + K_1[H^+] + K_2[ZnP]} \quad (\text{Eq. 24})$$

Quest'ultima può essere sostituita sia a numeratore che a denominatore nell'Eq. 21 così da ottenere l'Eq. 25 che permette di valutare tutti i parametri da cui dipende la velocità del processo, annoverando anche le specie che vedono coinvolto il polimero.

$$v = \frac{k_1 k_3 K_2 \frac{[PVS]_T}{1 + K_1[H^+] + K_2[ZnP]} [H^+][ZnP]}{(k_1[H^+] + k'_3) \left(1 + K_2 \frac{[PVS]_T}{1 + K_1[H^+] + K_2[ZnP]} \right)} \quad (\text{Eq. 25})$$

L'Eq. 25 determina un profilo a “campana” in funzione della concentrazione idrogenionica e la cui ampiezza dipende dalla concentrazione iniziale del polimero. Tuttavia, quando la concentrazione idrogenionica è talmente alta da causare anche la protonazione del PVS e la conseguente estrusione del cromoforo dal polimero, il processo di demetallazione avviene esclusivamente in bulk mediante un meccanismo di protonazione anione assistito riportato da Hambricht (Eq. 1).²⁹ Di conseguenza, l'Eq. 25 deve essere implementata da un termine additivo ricavabile dall'Eq. 1 così da ottenere l'Eq. 26. Poiché le condizioni di acidità in soluzione sono determinate dall'aggiunta di HCl, il valore della costante relativa al processo in bulk è nota in letteratura e risulta essere $k_s = 6.8 \cdot 10^{-2}$.²⁹ Questo dato bibliografico è comunque stato ulteriormente verificato dal punto di vista sperimentale nel corso di questa tesi.

$$v = \frac{k_1 k_3 K_2 \frac{[PVS]_T}{1 + K_1[H^+] + K_2[ZnP]} [H^+][ZnP]}{(k_1[H^+] + k'_3) \left(1 + K_2 \frac{[PVS]_T}{1 + K_1[H^+] + K_2[ZnP]} \right)} + k_s [ZnP][H^+]^2 [X^-]^2 \quad (\text{Eq. 26})$$

Poiché la concentrazione della metalloporfirina è dell'ordine della micromolarità, si può considerare l'approssimazione per cui $(K_2[ZnP]) \ll (1 + K_1[H^+])$ e tale da semplificare l'Eq. 26 nell'Eq. 27 che permette di esprimere la costante osservata:

$$k_{obs} = \frac{k_1 k_3 K_2 \frac{[PVS]_T}{1 + K_1 [H^+]} [H^+]}{(k_1 [H^+] + k'_3) \left(1 + K_2 \frac{[PVS]_T}{1 + K_1 [H^+]}\right)} + k_s [H^+]^2 [X^-]^2 \quad (\text{Eq. 27})$$

Al fine di verificare la validità del meccanismo proposto sono state condotte delle misure di demetallazione acida impiegando le due concentrazioni di PVS precedentemente descritte (1 mM e 6 mM) ed utilizzando una concentrazione di acido cloridrico pari a 0.32 e 0.5 M. La Tabella 11 mostra i valori delle costanti ottenute per mezzo di una procedura di fitting non lineare e facendo riferimento all'Eq. 2 di tipo “*stretched*”. Dai dati ottenuti si evince come a valore di pH più acido, nel caso della più alta concentrazione di polimero, il processo di demetallazione rallenta significativamente.

Tabella 11. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 2 e relativi al processo di demetallazione acida della porfirina ZnTMpyP catalizzato da PVS a diversa concentrazione idrogenionica.

$[H^+]/M$	<i>PVS 1 mM</i> $k_{stretched} / s^{-1}$	<i>PVS 6 mM</i> $k_{stretched} / s^{-1}$
0.32	$(4.52 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	$(1.25 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$
0.50	$(1.53 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	$(6.12 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$

Condizioni sperimentali: [ZnTMpyP] = 5 μ M, [PVS] = 1 mM / 6 mM, [HCl] = 0.32 / 0.5 M, T = 303 K.

In Figura 16 è riportato il confronto tra i valori sperimentali delle costanti di velocità in funzione della concentrazione protonica utilizzando le due concentrazioni di PVS precedentemente descritte e il risultato della simulazione ottenuta impiegando l'Eq. 27. Dal grafico è evidente che la simulazione della curva ottenuta alla più bassa concentrazione di polimero (1 mM) è in linea con i dati sperimentali. Più specificatamente, la curva prevede all'aumentare della concentrazione idrogenionica un iniziale profilo a campana che si modifica non appena vengono realizzate le condizioni di acidità per cui il processo di demetallazione in bulk diventa significativo (> 0.3 M). A valori di acidità maggiori la curva simulata, ovviamente, tende a seguire il medesimo andamento

della demetallazione in bulk previsto da Hambright. Per la concentrazione più elevata di polimero (6 mM) i dati sperimentali, come da modello proposto, mostrano un iniziale andamento a campana più ampia rispetto al caso precedente. Sfortunatamente, la simulazione non ha portato a dei risultati ottimali motivo per cui non è stata riportata. Probabilmente la motivazione potrebbe essere ricondotta alla mancanza di punti sperimentali immediatamente oltre la concentrazione pari a 0.5 M in linea con un'ampiezza maggiore del profilo della campana. In ogni caso, tutte le evidenze sperimentali riportate in Figura 17 sono in accordo con la formazione dell'unica specie finale $P \cdot PVS$. Alla luce di quanto esposto, si rende comunque necessaria un'implementazione dei dati sperimentali per una correlazione ottimale della simulazione di un meccanismo così complesso.

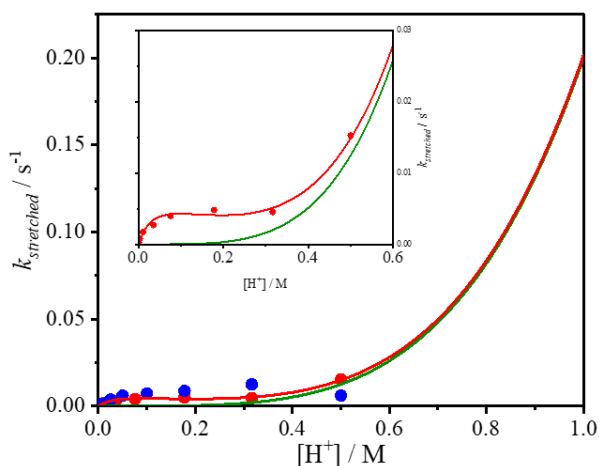


Figura 16. Andamento della costante di velocità sperimentale $k_{stretched}$ in funzione della concentrazione idrogenionica impiegando diverse concentrazioni di PVS: 1 mM (simboli rossi) e 6 mM (simboli blu). Le linee rappresentano le simulazioni effettuate dell'Eq. 1 proposta da Hambright²⁰ (linea verde) e dell'Eq. 27 (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[ZnTMpyP] = 5 \mu M$, $[PVS] = 1 / 6 \text{ mM}$, $T = 303 \text{ K}$.

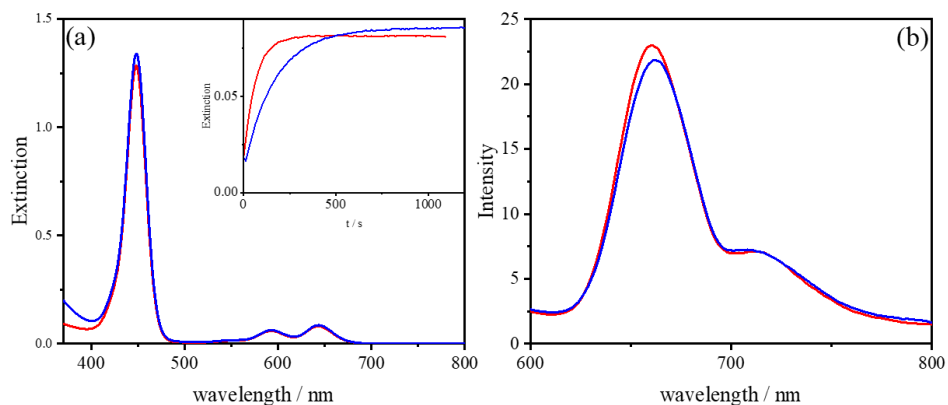


Figura 17. Spettri UV/Vis con inset delle tracce cinetiche a λ_{642} (a) e spettri di emissione di fluorescenza (b) relativi al sistema $\text{H}_2\text{TMpyP}^{2+}/\text{PVS}$ realizzando PVS 1 mM (linea rossa) e 6 mM (linea blu). Condizioni sperimentali: $[\text{ZnTMpyP}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{PVS}] = 1 \text{ mM} / 6 \text{ mM}$, $[\text{HCl}] = 0.5 \text{ M}$, $T = 303 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 581 \text{ nm}$.

2.3 - Conclusioni

In questo capitolo viene riportata un'indagine spettroscopica e cinetica del processo di demetallazione della porfirina Zn(II) meso-tetrakis(N-metilpiridinio-4-il) (ZnTMpyP) in condizioni inusuali di pH per mezzo dell'azione catalitica esercitata da polielettroliti. Una particolare attenzione è stata rivolta al polivinilsolfonato (PVS), un polianione ad alta densità di carica il quale, in funzione della sua concentrazione, è stato dimostrato interagire con la porfirina ZnTMpyP formando tre diverse specie di cui soltanto una ha evidenziato attività catalitica nei confronti del processo di demetallazione ed a valori di pH (1 - 3.4) ben superiori a quello necessario in bulk (pH < 0.75). Una dettagliata indagine cinetica è stata condotta al variare sia della concentrazione di polimero che del pH, determinando, in tal modo, le condizioni più appropriate per il processo catalitico di solvolisi acida. Inoltre, un dettagliato studio cinetico mirato a valutare l'effetto della temperatura ha evidenziato come i dati di velocità rispettano pienamente l'equazione di Eyring potendo così determinare i parametri d'attivazione relativi al processo di demetallazione. Tutte le evidenze sperimentali hanno permesso l'elaborazione di un complesso meccanismo di reazione la cui validità è stata sostanziata da ulteriori sperimentazioni nonché da simulazioni numeriche.

2.4 - Sezione sperimentale

Materiali e preparazione dei campioni

La porfirina *meso*-tetrakis(N-metilpiridinio-4-il) (TMpyP) è stata acquistata dalla Mid-Century Chemicals come cloruro ed è stata impiegata come ricevuta, senza ulteriori purificazioni. Il derivato di zinco(II) (ZnTMpyP) è stato preparato per reazione di metallazione dalla corrispondente base libera impiegando cloruro di zinco(II) ACS reagent grade e seguendo una metodica riportata in letteratura.² Soluzioni stock di porfirina sono state preparate sciogliendo i rispettivi solidi in acqua purificata millipore e sono state conservate al riparo dalla luce ed utilizzate entro una settimana dalla loro preparazione. Le concentrazioni delle soluzioni sono state determinate per conoscenza del coefficiente di assorbività molare alla lunghezza d'onda della banda B (TMpyP³⁰: $\epsilon_{422} = 2.34 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$; ZnTMpyP²³: $\epsilon_{437} = 2.04 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$). Il polivinilsolfonato di sodio (PVS) e il polistirensolfonato di sodio (PSS) sono stato acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich Corporation. Per quanto concerne il PVS, la massa molecolare media è circa 5000 g/mol per cui, tenendo in conto della massa di ogni residuo (130.1 g/mol), è possibile stimare una media di 38 residui per catena, la quale possiede una lunghezza di circa 10 nm. Il PSS possiede una massa molecolare media di circa 70000 g/mol, una massa del monomero di 206,2 g/mol il che implica una media di 340 residui per catena. Il polifosfato di sodio 96% (PPA) è stato acquistato dalla ditta Acros Organics possiede forma lineare con una massa molecolare media di circa 1770 g/mol, una massa del monomero (102 g/mol) ed una media di 17 residui per catena. La concentrazione delle soluzioni dei vari polimeri è espressa come moli di unità di monomero per litro. Tutte le condizioni di pH citate sono state ottenute per mezzo dell'aggiunta di acido cloridrico di appropriata concentrazione. In generale, tutte le soluzioni impiegate in questo

studio sono state preparate impiegando acqua in fiale per preparazioni iniettabili acquistate dalla Galenica Senese. Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich Corporation ed impiegati senza ulteriore purificazione.

Misure spettroscopiche

Gli spettri di assorbimento UV/Vis sono stati eseguiti su uno spettrofotometro Agilent mod. 8453 a matrice di diodi utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico da 1 cm. Un filtro UV (Hoya UV-34, cut-off: 340 nm) è stato impiegato in tutte le misure al fine di tagliare la componente ultravioletta della sorgente luminosa così da prevenire fenomeni di fotodegradazione delle porfirine. Gli esperimenti cinetici sono stati effettuati con l'ausilio del portacampione termostato dello strumento e lasciando equilibrare la temperatura (con accuratezza di ± 0.1 K) per almeno 20 minuti prima di procedere all'avvio di ogni *run* cinetico.

Gli spettri di emissione di fluorescenza e di *resonance light scattering* (RLS) sono stati effettuati per mezzo di uno spettrofluorimetro Jasco FP-750 equipaggiato con un fotomoltiplicatore Hamamatsu R928 e dotato di una lampada Xenon da 150 W. Gli esperimenti RLS sono stati eseguiti adottando un assetto di rilevamento ad angolo retto.³¹ Gli spettri di emissione di fluorescenza e RLS non sono stati corretti per l'assorbimento dei campioni.

Le misure di pH sono state eseguite utilizzando un phmetro Metrohm 744 pH meter utilizzando un elettrodo a vetro combinato con un microelettrodo.

2.5 - Riferimenti bibliografici

- (1) Bellacchio, E.; Lauceri, R.; Magrì, A.; Purrello, R.; Gurrieri, S.; Scolaro, L. M.; Romeo, A. Nanomolar determination of copper (II) and zinc (II) using supramolecular complexes of meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphine on polyglutamate. *Chemical Communications* **1998**, (13), 1333.
- (2) Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Villafranca, J. J. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry* **1983**, 22 (10), 2406.
- (3) Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J.; Villafranca, J. J. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry* **1983**, 22 (23), 5409.
- (4) Foster, N.; Singhal, A. K.; Smith, M. W.; Marcos, N. G.; Schray, K. J. Interactions of porphyrins and transfer RNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1988**, 950 (2), 118.
- (5) Ghazaryan, A. A.; Dalyan, Y. B.; Haroutiunian, S. G.; Tikhomirova, A.; Taulier, N.; Wells, J. W.; Chalikian, T. V. Thermodynamics of Interactions of Water-Soluble Porphyrins with RNA Duplexes. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (6), **1914**.
- (6) Occhiuto, I.; De Luca, G.; Villari, V.; Romeo, A.; Micali, N.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Supramolecular chirality transfer to large random aggregates of porphyrins. *Chemical Communications* **2011**, 47 (21), 6045.
- (7) Ikeda, S.; Nezu, T.; Ebert, G. Induced CD and interaction of some porphyrin derivatives with α -helical polypeptides in aqueous solutions. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **1991**, 31 (11), 1257.
- (8) Nezu, T.; Ikeda, S. Induction of circular dichroism on the Soret bands of a symmetric water-soluble porphyrin by poly (L-lysine) in three conformations. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1993**, 66 (1), 25.
- (9) Pasternack, R. F.; Gibbs, E. J. Porphyrin assembly formation on helical biopolymers. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers* **1993**, 3 (1), 77.
- (10) Pancoska, P.; Urbanova, M.; Bednarova, L.; Vacek, K.; Parschenko, V. Z.; Vasiliev, S. Models of pigment-protein interactions in photosynthetic systems: tetraphenylporphyrin complexes with polycationic sequential polypeptides. Absorption, circular dichroism and fluorescence properties. *Chemical physics* **1990**, 147 (2-3), 401.
- (11) Purrello, R.; Monsu'Scolaro, L.; Bellacchio, E.; Gurrieri, S.; Romeo, A. Chiral H- and J-type aggregates of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphine on α -helical polyglutamic acid induced by cationic porphyrins. *Inorganic chemistry* **1998**, 37 (14), 3647.

- (12) Bellacchio, E.; Lauceri, R.; Gurrieri, S.; Scolaro, L. M.; Romeo, A.; Purrello, R. Template-imprinted chiral porphyrin aggregates. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (47), 12353.
- (13) De Luca, G.; Romeo, A.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F. Conformations of a model protein revealed by an aggregating CuII porphyrin: sensing the difference. *Chemical communications* **2010**, *46* (3), 389.
- (14) Scolaro, L. M.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Micali, N.; Angelini, N.; Lo Passo, C.; Felici, F. Supramolecular binding of cationic porphyrins on a filamentous bacteriophage template: toward a noncovalent antenna system. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (23), 7446.
- (15) Nam, Y. S.; Shin, T.; Park, H.; Magyar, A. P.; Choi, K.; Fantner, G.; Nelson, K. A.; Belcher, A. M. Virus-templated assembly of porphyrins into light-harvesting nanoantennae. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (5), 1462.
- (16) Castriciano, M. A.; Samperi, M.; Camiolo, S.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. Unusual Stepwise Protonation and J-Aggregation of meso-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphine on Binding Poly(sodium vinylsulfonate). *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (36), 12161.
- (17) Sanders, J. K. M.; Bampos, N.; Clyde-Watson, Z.; Darling, S. L.; Hawley, J. C.; Kim, H. J.; Mak, C. C.; Academic Press, San Diego, **2000**.
- (18) Chen, Y.; Li, A.; Huang, Z.-H.; Wang, L.-N.; Kang, F. In *Nanomaterials*, **2016**; Vol. 6.
- (19) Lehn, J.-M. Supramolecular chemistry. *Science* **1993**, *260* (5115), 1762.
- (20) Hambright, P.; Shears, B.; Shad, B. Acid-catalyzed solvolysis reactions of zinc porphyrins having various basicities and zinc N-methylporphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (3), 776.
- (21) Pasternack, R. F.; Sutin, N.; Turner, D. H. Some very rapid reactions of porphyrins in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98* (7), 1908.
- (22) Kalyanasundaram, K. Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyridyl- and tetrakis(N-methylpyridiniumyl)porphyrins. *Inorganic Chemistry* **1984**, *23* (16), 2453.
- (23) Pasternack, R. F.; Francesconi, L.; Raff, D.; Spiro, E. Aggregation of nickel(II), copper(II), and zinc(II) derivatives of water-soluble porphyrins. *Inorganic Chemistry* **1973**, *12* (11), 2606.
- (24) Kalyanasundaram, K.; Neumann-Spallart, M. Photophysical and redox properties of water-soluble porphyrins in aqueous media. *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86* (26), 5163.
- (25) Pasternack, R. F.; Fleming, C.; Herring, S.; Collings, P. J.; dePaula, J.; DeCastro, G.; Gibbs, E. J. Aggregation kinetics of extended porphyrin and cyanine dye assemblies. *Biophys J* **2000**, *79* (1), 550.

- (26) Manning, G. S. Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions II. Self-Diffusion of the Small Ions. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, *51* (3), 934.
- (27) Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Occhiuto, I.; Zagami, R.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Kinetic control of chirality in porphyrin J-aggregates. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (1), 40.
- (28) Pasternacki, R. F.; Gibbs, E. J. Porphyrin and Metalloporphyrin. *Metal Ions in Biological Systems: Volume 33: Probing of Nucleic Acids by Metal Ion Complexes of Small Molecules* **1996**, *33*, 367.
- (29) Shah, B.; Hambright, P. Acid catalyzed solvolysis reactions of zinc porphyrins. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1970**, *32* (10), 3420.
- (30) Hambright, P. Chemistry of Water Soluble 18 Porphyrins. *The Porphyrin Handbook: Inorganic, organometallic and coordination chemistry* **2000**, *3*, 129.
- (31) Pasternack, R. F.; Collings, P. J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. *Science* **1995**, *269* (5226), 935.

Capitolo 3

*Effetto dello ione specifico
sul processo di
aggregazione di porfirine*

3.1 - Introduzione

Il processo di “*self-assembling molecolare*” ha suscitato un crescente impegno ed interesse a livello internazionale per la sua importanza centrale in biologia e per il suo ruolo nella comprensione dell'origine molecolare di un'ampia gamma di malattie.¹⁻³ Il fenomeno, per definizione, è un'organizzazione spontanea di molecole che avviene in condizioni di equilibrio quasi termodinamico e che conduce alla formazione di architetture supramolecolari di diverse dimensioni e forme attraverso l'instaurarsi di legami deboli non covalenti. Più specificatamente, tra quest'ultimi si annoverano le interazioni elettrostatiche, le interazioni idrofobiche e idrofile, i legami idrogeno mediati dall'acqua, le interazioni di π -stacking e di van der Waals. Sebbene ognuna di queste interazioni sia piuttosto debole, le interazioni collettive di queste forze possono però dar luogo ad organizzazioni gerarchiche sia strutturalmente che chimicamente stabili sebbene dinamicamente più flessibili. Dunque, il *self-assembling molecolare* costituisce un fenomeno di estrema importanza che gli scienziati hanno preso in prestito dalla natura per progettare e realizzare una vasta gamma di nuove architetture supramolecolari. Un'opportuna scelta dei componenti molecolari può quindi aprire la strada alla progettazione e alla sintesi di materiali in grado di esibire specifiche proprietà e funzioni.^{4,5} In questo contesto, le porfirine costituiscono degli ottimi elementi costitutivi molecolari, in quanto, a seconda delle loro proprietà elettroniche e steriche, possono auto-assemblarsi spontaneamente formando strutture supramolecolari complesse aventi nuove caratteristiche di particolare interesse per numerosi settori come la nanomedicina,⁶ l'optoelettronica⁷ e la fotocatalisi.⁸ Le porfirine idrosolubili ed in particolare quelle dotate di una carica netta, offrono la possibilità di controllare il processo di *self-assembling* attraverso semplici variazioni del mezzo quali l'aumento di forza ionica e/o del pH le quali contribuiscono a schermare le repulsioni di carica esaltando le interazioni idrofobiche e solvofobiche in genere.

In letteratura sono presenti numerosi studi di aggregazione di porfirine sia cationiche, come la *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$), che anioniche, come la porfirina *meso*-tetrakis(4-solfonatofenil)porfirina (TPPS₄). (Figura 1).

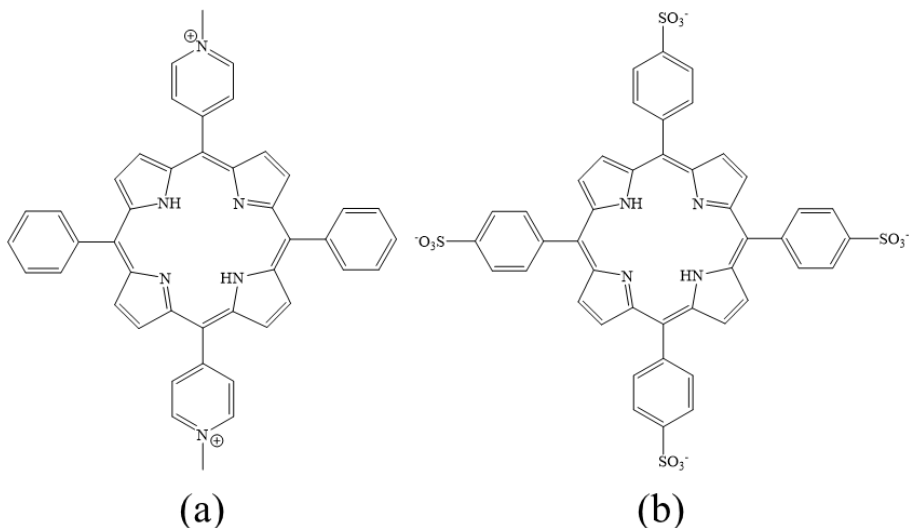
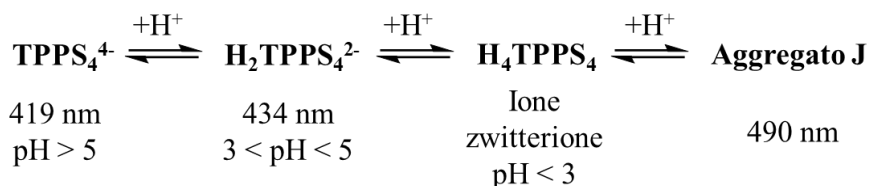


Figura 1. Struttura molecolare della porfirina cationica $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (a) e della porfirina anionica TPPS₄ (b).

La porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ evidenzia una grande tendenza all'auto-aggregazione e nel tempo sono stati riportati diversi esempi di formazione di strutture supramolecolari aggregate sulla superficie del DNA,⁹ di polinucleotidi sintetici¹⁰ e semplici polipeptidi.¹¹ Studi più dettagliati sul processo di auto-aggregazione di questa porfirina hanno evidenziato la formazione di aggregati mesoscopici di natura frattalica la cui struttura è strettamente correlata alle cinetiche di crescita di queste specie.¹²⁻¹⁷ Più specificatamente, al variare della forza ionica così come anche della temperatura e della concentrazione di porfirina, si determina un cambiamento del potenziale DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) che comporta differenti regimi di crescita per gli aggregati. Quest'ultimi presentano delle strutture piuttosto porose e sono caratterizzati dall'aver dimensioni che vanno dalla scala nanometrica (> 100 nm) a quella micrometrica (1 - 2 μM). Queste caratteristiche strutturali fanno

sì che il forte accoppiamento elettronico esistente tra cromofori attigui sia in grado di determinare la formazione di intensi segnali di luce diffusa risonante,¹⁸ una proprietà intrinseca di queste specie che ne permette la loro individuazione in modo semplice ed efficace con tecniche convenzionali.

Negli ultimi anni la porfirina tetranionica TPPS₄ ha attratto l'attenzione di vari ricercatori, in quanto a pH acido (< 1) e/o in condizioni di elevata forza ionica, essa è in grado di dare luogo alla formazione di aggregati di tipo J.^{15,19-22} In soluzione acquosa, la base libera è una specie tetra-anionica per la presenza di quattro gruppi benzensolfonato nelle posizioni *meso* dell'anello porfirinico. In condizioni neutre di pH ed in funzione della concentrazione della forza ionica si instaura un equilibrio tra la forma monomerica e il dimero.^{23,24} In ambiente blandamente acido (pK_a ~ 4.9) gli atomi di azoto pirrolici del macrociclo subiscono protonazione con la conseguente formazione della specie diprotonata H₂TPPS₄²⁻ la quale di fatto, a valore più acidi, esiste anche come zwitterione (H₄TPPS₄) a causa della protonazione di due dei quattro gruppi benzensolfonato (Schema 1).^{25,26}



Schema 2. Ripartizione e relative posizioni dell'assorbimento della banda B per le diverse specie formate dalla porfirina TPPS₄ a diversa condizione di pH.

Entrambe le forme diprotonate sono in grado di auto-assemblarsi in aggregati J a seconda della forza ionica totale e del pH delle soluzioni acquose. La tendenza all'auto-aggregazione è dovuta sia all'aumento della forza ionica che è in grado di schermare le cariche elettrostatiche, sia all'instaurarsi di interazioni idrofobiche tra gli anelli porfirinici. La formazione di questi aggregati è quindi favorita dall'instaurarsi di interazioni di natura elettrostatica tra il residuo anionico dibenzensolfonato di una porfirina ed il *core* cationico di un'altra adiacente. In

letteratura è presente un ampio dibattito riguardo alla natura intrinseca dell'aggregato J, sebbene l'idea più accettata, verte su strutture di tipo *rod-like*. In letteratura è stata anche dimostrata la possibilità di ottenere un *crossover* di tipo strutturale agendo sul potenziale di interazione intermolecolare.²⁷ Nel dettaglio, a bassa concentrazione di cromoforo ed alta forza ionica l'azione di schermo determina la formazione di strutture di tipo frattalico laddove, a bassa forza ionica ed alta concentrazione di cromoforo, l'aggregazione conduce invece alla formazione di strutture *rod-like*. L'apparente discrasia non deve comunque sorprendere, in quanto sia la struttura che la dimensione degli aggregati sono strettamente correlati al variare dei parametri del mezzo (concentrazione, forza ionica pH e temperatura) nonché al protocollo di mescolamento. A tal riguardo, anche la cinetica rappresenta un fattore discriminante nella determinazione delle strutture finali, soprattutto quando quest'ultime sono il risultato di una delicata interazione di fattori come le interazioni elettrostatiche e idrofobiche.²⁷ In soluzione acquosa è però il legame a idrogeno che assume un ruolo determinante nella stabilizzazione delle strutture aggregate finali.²⁸ È noto anche come gli ioni in soluzione esercitano un notevole impatto sul network di legami a idrogeno del solvente, potendosi comportare come ioni caotropici (*water-structure breakers*) o ioni cosmotropici (*water-structure makers*).²⁹ Le loro diverse attitudini sono alla base della serie empirica di Hofmeister che è stata utilizzata per spiegare la precipitazione delle proteine e altre proprietà dei sistemi colloidali.³⁰

Sulla scorta di quanto detto, in questo capitolo ci siamo prefissi di indagare dettagliatamente dal punto di vista cinetico sia la formazione degli aggregati frattalici della porfirina *t*-H₂P_{agg} che degli aggregati di tipo J della TPPS₄ al variare della natura del contro-ione del sale impiegato per indurre l'aggregazione. Dai risultati ottenuti emerge, nel caso di entrambi i processi di aggregazione, l'esistenza di un SIE (*Specific Ion Effect*) che in alcuni casi è anche correlabile alla serie di Hofmeister.

3.2 - Risultati e discussioni

3.2.1 - Caratterizzazione spettroscopica della porfirina dicationica $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$

Dal punto di vista spettroscopico la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$ è caratterizzata da una banda di Soret centrata a 419 nm e quattro bande Q posizionate rispettivamente a 519, 559, 581 e 641 nm (Figura 2a). Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati registrati eccitando a 519 nm e sono caratterizzati da un tipico profilo a doppia banda con i massimi centrati a 667 e 716 nm (Figura 2b). In condizioni di forza ionica zero anche gli spettri di luce diffusa risonante escludono la formazione di aggregati in soluzione, risultando di bassa intensità e di fatto, comparabile al solvente. Il profilo dello spettro RLS (Figura 2c) è caratterizzato da un minimo a 419 nm determinato dalla perdita di luce dovuto al forte assorbimento del campione. In seguito all'aumento della forza ionica ($[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$) della soluzione la porfirina è soggetta ad un processo di auto-aggregazione che nel tempo conduce alla diminuzione dell'intensità dell'assorbimento relativo al monomero (419 nm) e alla contemporanea formazione di una nuova specie attribuita all'aggregato e caratterizzata da un considerevole spostamento batocromico (450 nm). A riprova della formazione di specie aggregate, gli spettri di emissione di fluorescenza sono caratterizzati da un notevole *quenching* (Figura 2b) mentre lo spettro RLS evidenzia un intenso segnale posizionato intorno a 467 nm (Figura 2c). Le evidenze sperimentali sono in perfetto accordo con quanto già riportato in letteratura, ovvero con la formazione di grandi clusters monodispersi caratterizzati da una struttura frattalica e determinata da un regime di crescita di tipo DLA.¹⁵

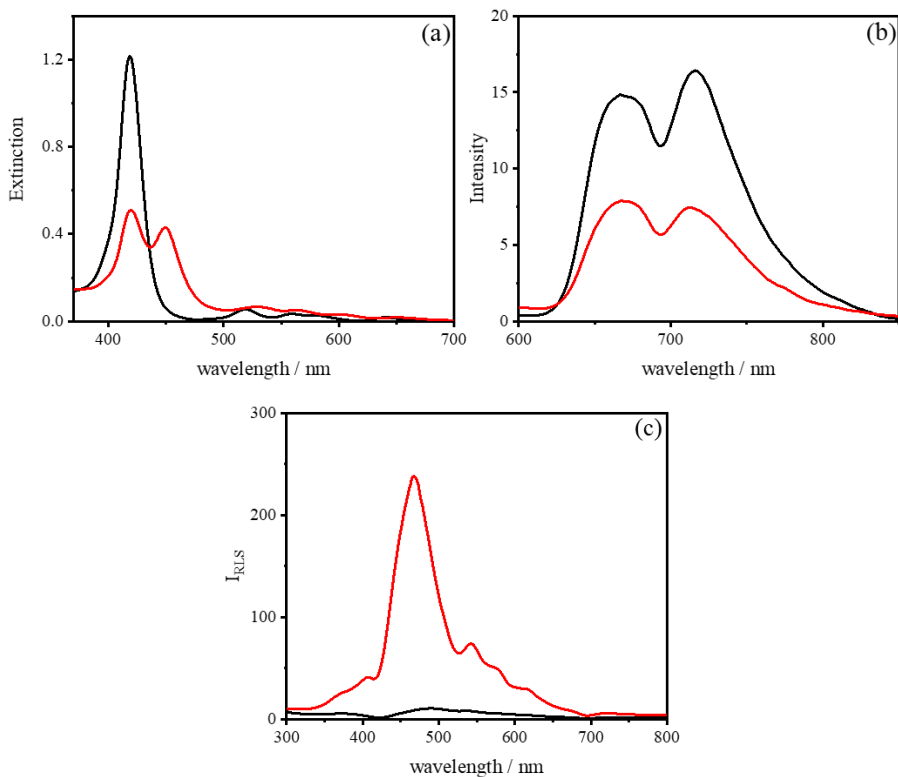


Figura 2. Spettri UV/Vis (a), di emissione di fluorescenza (b) e di RLS (c), della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ in acqua (linea nera) ed alla fine del processo di aggregazione indotto da NaCl (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} 519 \text{ nm}$.

In Figura 3a è riportato l'andamento della variazione spettrale relativo al processo di formazione dei clusters porfirinici da cui si evince la formazione di un punto isobestico centrato a 434 nm. In Figura 3b sono riportate le tracce cinetiche relative sia alla scomparsa del monomero (419 nm) che alla formazione dell'aggregato (450 nm). L'analisi cinetica dei dati può essere condotta indifferentemente utilizzando qualsivoglia delle due lunghezze d'onda e per mezzo di una procedura di fitting non lineare facendo riferimento all'Eq. 1 proposta da Pasternack come modello cinetico per l'aggregazione di porfirine sul DNA.³¹

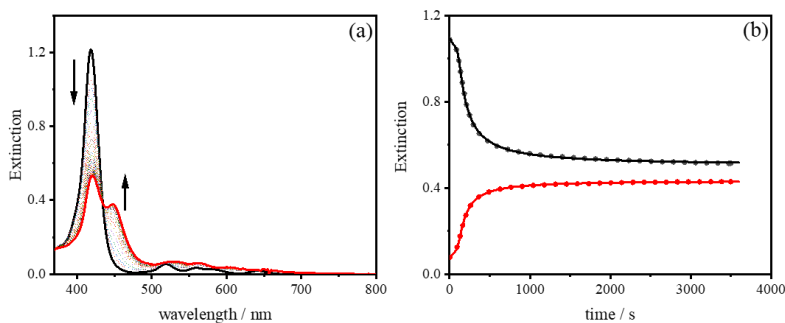


Figura 3. Variazione spettrale UV/Vis registrata nel tempo all’aggiunta di NaCl ad una soluzione di $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (a) e corrispondenti profili cinetici seguiti a $\lambda = 419$ nm (nero) e $\lambda = 450$ nm (rosso) (b). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$.

Il modello è stato derivato ipotizzando che il “*rate determining step*” sia costituito dalla formazione di un piccolo oligomero avente un nucleo critico ed in grado di catalizzare la formazione di strutture più complesse. Questo meccanismo può essere considerato come una sorta di catalisi mediata dalla superficie dell’aggregato in crescita e la cui velocità dipende proprio dall’estensione della superficie. Tuttavia, quest’ultima, altro non rappresenta che la dimensione dell’oligomero che varia nel tempo, per cui ne consegue che anche le costanti di velocità del processo risultano essere dipendenti dal tempo. Nella forma integrata l’equazione vede la presenza di ben sei parametri di cui quattro sono quelli di interesse cinetico e che devono essere computati: E_0 ed E_{inf} rappresentano rispettivamente i valori dell’estinzione all’inizio e al termine del processo di aggregazione; k_0 è la costante specifica di velocità per il processo non-catalizzato; k_c è la costante specifica di velocità per il processo catalizzato; n un parametro che rappresenta la dipendenza della crescita dell’aggregato come funzione di potenza del tempo e che è correlato al numero di clusters che prendono parte alla fase autocatalitica; m rappresenta la dimensione del nucleo critico, la cui formazione rappresenta lo stadio determinante la cinetica del processo aggregativo.

$$E = E_{\infty} + (E_0 - E_{\infty})(1 + (m - 1)(k_0 t + (n + 1)^{-1}(k_c t)^{n+1}))^{-\frac{1}{m-1}} \quad (\text{Eq. 1})$$

3.2.2 - Effetto dei cationi sul processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$

Uno studio cinetico dettagliato è stato condotto sul processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$ al fine di valutare se l'identità del catione del sale aggiunto per indurre l'aggregazione potesse avere un qualche effetto sulla velocità del processo. A tale fine, per aumentare la forza ionica, sono stati impiegati diversi cloruri del primo e del secondo gruppo adottando un rigoroso protocollo di mescolamento dei reagenti che prevede l'aggiunta del sale come ultimo reattivo ad una soluzione acquosa diluita di $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$. I risultati sperimentali evidenziano come al variare del tipo di sale aggiunto non è possibile osservare alcuna variazione in termini di posizione delle bande di assorbimento né del monomero residuo né dell'aggregato risultante, un'osservazione che sostanzia l'ipotesi della formazione in soluzione della stessa tipologia di aggregato (Figura 4a). Differenze sono invece riscontrabili in termini di rapporto relativo dell'intensità di assorbimento tra monomero ed aggregato (Tabella 1), di intensità del segnale RLS delle soluzioni finali (Figura 4b), nonché di velocità globale del processo di aggregazione i cui profili cinetici sono riportati nell'inset della Figura 4a. Inoltre, mediante misure di diffusione dinamica della luce (DLS – *Dynamic Light Scattering*) sono stati misurati i diametri idrodinamici (D_H) dei clusters porfirinici ottenendo, per tutti i cationi in esame, valori superiori a 1 μm .

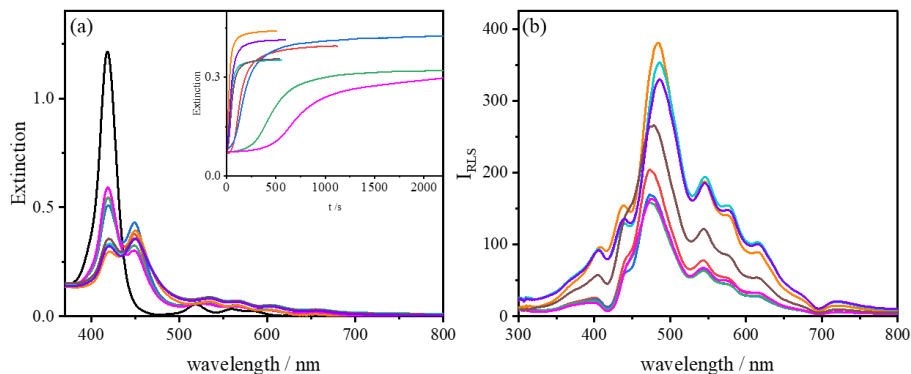


Figura 4. (a) Spettri UV/Vis finali relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera) indotto da differenti sali cloruro. Nell'inset sono riportati i corrispondenti profili cinetici registrati a $\lambda = 450$ nm. (b) Corrispondenti spettri RLS. LiCl (linea rossa), NaCl (linea blu), KCl (linea verde), CsCl (linea viola), MgCl_2 (linea arancione), CaCl_2 (linea azzurra), SrCl_2 (linea marrone), BaCl_2 (linea magenta). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{M}^{n+}] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$.

Tabella 1. Valori di estinzione della banda del monomero (419 nm) e dell'aggregato (450 nm), relativo rapporto di intensità delle bande (419 nm / 450 nm) ed intensità del segnale RLS per il processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto da differenti sali cloruro.

M^{n+}	Ext. 419 nm	Ext. 450 nm	419 nm / 450 nm	$(I_{\text{RLS}})_{\text{corr}}$
Li^+	0.55	0.38	1.45	204.74
Na^+	0.51	0.43	1.19	169.55
K^+	0.54	0.33	1.64	158.96
Cs^+	0.59	0.30	1.97	163.89
Mg^{2+}	0.30	0.39	0.77	381.02
Ca^{2+}	0.33	0.36	0.92	353.56
Sr^{2+}	0.36	0.36	1.00	266.07
Ba^{2+}	0.32	0.35	0.91	330.12

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{M}^{n+}\text{Cl}_n] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$. L'intensità degli spettri RLS è stata corretta per l'assorbimento mediante l'Eq. 2.³²

$$(I_{\text{RLS}})_{\text{corr}} = I_{\text{RLS}} \cdot 10^{-\text{Ext}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Come si evince dalla Figura 4a tutte le cinetiche presentano un andamento di tipo sigmoidale con un periodo di induzione iniziale. L'analisi cinetica dei dati è stata condotta per mezzo di una procedura di fitting non lineare dei dati di estinzione in

funzione del tempo mediante l'Eq.1 e i valori dei parametri cinetici calcolati sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 1 e relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto da differenti sali cloruro.

M^{n+}	k_0 / s^{-1}	k_c / s^{-1}	m	n
Li ⁺	$(1.05 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	$(1.20 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	4.87 ± 0.10	5.17 ± 0.13
Na ⁺	$(1.41 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	$(9.54 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	5.72 ± 0.12	5.27 ± 0.13
K ⁺	$(2.88 \pm 0.08) \cdot 10^{-4}$	$(3.20 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	3.85 ± 0.01	5.42 ± 0.06
Cs ⁺	$(1.62 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	$(2.04 \pm 0.01) \cdot 10^{-3}$	6.04 ± 0.15	8.00 ± 0.22
Mg ²⁺	$(2.41 \pm 0.67) \cdot 10^{-3}$	$(4.74 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	2.66 ± 0.06	1.71 ± 0.07
Ca ²⁺	$(5.36 \pm 0.52) \cdot 10^{-3}$	$(4.03 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	2.57 ± 0.05	1.82 ± 0.07
Sr ²⁺	$(4.14 \pm 0.35) \cdot 10^{-3}$	$(3.94 \pm 0.04) \cdot 10^{-2}$	2.64 ± 0.07	1.79 ± 0.07
Ba ²⁺	$(1.03 \pm 0.27) \cdot 10^{-3}$	$(3.63 \pm 0.07) \cdot 10^{-2}$	2.58 ± 0.03	165 ± 0.04

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[M^{n+}\text{Cl}_n] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$, $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Come accennato in fase di introduzione del capitolo, gli ioni sono in grado di influenzare la struttura dell'acqua influenzando il numero medio di legami idrogeno. In quest'ottica le costanti di velocità del processo catalizzato (k_c) sono state correlate con alcuni parametri termodinamici riportati in letteratura da Marcus quali la variazione di entropia strutturale $\Delta_{str}S$ e la variazione di energia libera di Gibbs per la formazione di legami idrogeno ΔG_{HB} che si ottiene tramite l'Eq. 3 riportata da Marcus³³ (Tabella 3). Il risultato principale di questa correlazione è l'ottenimento di due distinti andamenti lineari per i monocationi e i dicationi. È possibile osservare come i cationi definiti “*structure-making*” (es. Mg²⁺ e Li⁺) sono i più efficienti nel promuovere la formazione degli aggregati, mentre quelli definiti “*structure-breaking*” (es. Ba²⁺ e Cs⁺) rallentano il processo di aggregazione (Figura).

$$\Delta G_{HB} = -(0.14 \pm 0.006) - (8.16 \pm 1.01) \cdot 10^{-3} (\Delta_{str}S/J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}) \quad (\text{Eq. 3})$$

Tabella 3. Parametri caratteristici riportati in letteratura da Marcus per i cationi impiegati.^{29,33}

M^{n+}	$\Delta_{str}S/J \cdot K^{-1}mol^{-1[a]}$	$\Delta_{HB}G_{calc}/kJmol^{-1[a]}$	$B/dm^3mol^{-1[b]}$	$\Delta_{hyd}G/kJmol^{-1[c]}$
Li ⁺	-52	0.28	0.146	-475
Na ⁺	-14	-0.03	0.085	-365
K ⁺	47	-0.52	-0.009	-295
Cs ⁺	68	-0.70	-0.047	-250
Mg ²⁺	-113	0.78	0.385	-1830
Ca ²⁺	-59	0.34	0.284	-1505
Sr ²⁺	-53	0.29	0.261	-1380
Ba ²⁺	-18	0.01	0.216	-1250

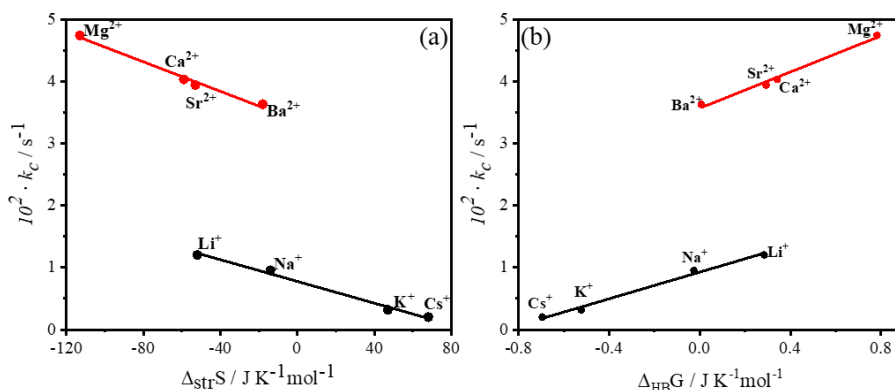
 Ref. [a];³³ Ref. [b];³⁴ Ref. [c]³⁵.


Figura 5. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) ed i parametri $\Delta_{str}S$ (a) e ΔG_{HB} (b) per i cationi del primo gruppo (linea nera) e per i cationi del secondo gruppo (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{agg}] = 5 \mu\text{M}$, $[M^{n+}Cl_n] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.991$ (a - linea nera), $R^2 = 0.988$ (a - linea rossa), $R^2 = 0.991$ (b - linea nera), $R^2 = 0.988$ (b - linea rossa).

Con l'obiettivo di volere trovare un'unica correlazione tra i dati cinetici relativi ai cationi in esame e la serie di Hofmeister, le costanti di velocità del processo di aggregazione sono state correlate al coefficiente di viscosità B di Jones-Dole il quale dipende dall'idratazione degli elettroliti. Tale parametro, come già riportato nel Capitolo 1, offre una misura quantitativa dell'effetto ionico specifico (SIE) ed inoltre, esso è in relazione con il parametro $\Delta_{str}S$ attraverso una funzione che tiene in considerazione anche il parametro della carica degli ioni (Eq. 4).³⁴

$$\frac{B}{dm^3 mol^{-1}} = 0.033(z^2 + |z|) - 0.00165(\Delta S_{str}/J \cdot K^{-1} mol^{-1}) \quad (\text{Eq. 4})$$

La Figura mostra il risultato di questa correlazione evidenziando un unico andamento lineare che include tutti i cationi studiati indipendentemente dalla loro carica. La serie di Hofmeister coinvolge gli effetti specifici degli ioni in soluzione ed è stata originariamente correlata alla solubilità delle proteine classificando gli anioni e i cationi in base al loro crescente potere di stabilizzazione delle soluzioni proteiche. La sequenza dei cationi riportata in Figura 7 descrive tale comportamento: a bassa concentrazione di sale in soluzioni contenenti gli ioni che compaiono a destra, la tendenza è a stabilizzare la struttura nativa ripiegata di una proteina e a diminuirne la solubilità. Per contro, gli ioni a sinistra tendono a facilitare la denaturazione della proteina e ad aumentarne la solubilità e quindi la stabilità anche ad alte concentrazioni di sale.³⁶⁻⁴¹ Da un'attenta analisi della figura 6 si evince come gli ioni a maggiore carattere cosmotropico siano quelli in grado di promuovere più velocemente il processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$.

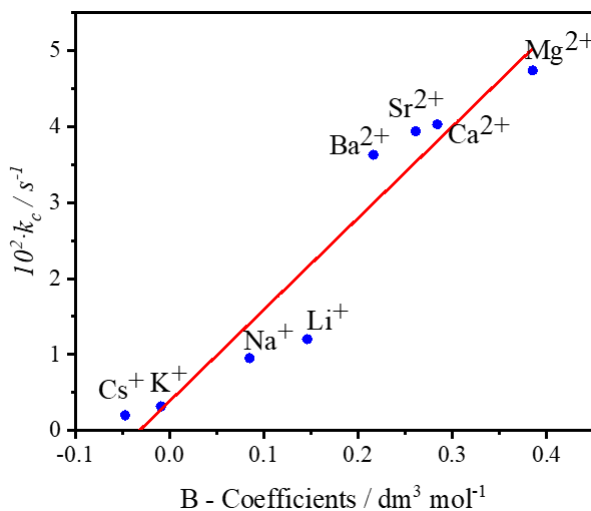


Figura 6. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) ed il coefficiente B di Jones-Dole.³⁴ Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{agg}] = 5 \mu\text{M}$, $[M^{n+}Cl_n] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.921$.

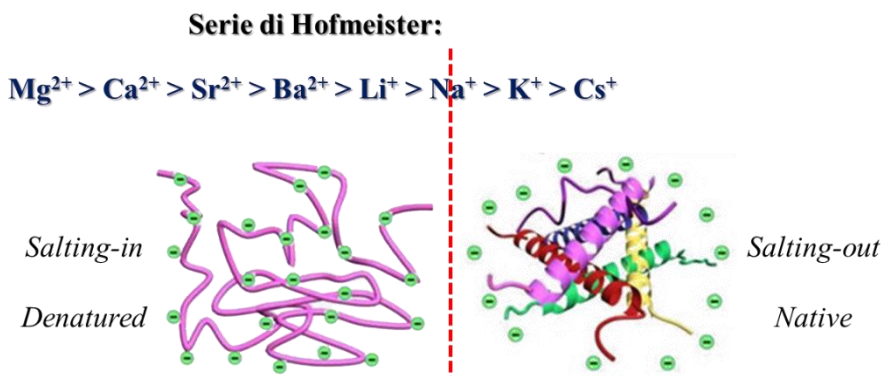


Figura 7. Rappresentazione dell'andamento della serie di Hofmeister dei cationi in acqua.

Da una comparazione dei risultati ottenuti con l'andamento della serie di Hofmeister per i cationi si evince quindi un andamento di tipo indiretto o “inverso” e questo è riconducibile al fatto che il processo di stabilizzazione in soluzione non riguarda una proteina carica negativamente, ma piuttosto dei cromofori cationici dall'elevato carattere idrofobico. Infatti, nella serie di Hofmeister il catione Mg^{2+} ha certamente il maggiore carattere cosmotropico, esso risulta quindi fortemente idratato ed è in grado di ordinare la struttura dell'acqua appartenente al “guscio” che ricopre le regioni idrofobiche dei cromofori facilitandone l'aggregazione e pertanto determinandone la loro precipitazione (fenomeno del *salting-out*). Ioni caotropici come il Cs^+ sono invece in grado di agire in modo opposto stabilizzando l'interazione tra acqua e cromoforo e determinando il fenomeno del *salting-in*.

Un ulteriore spiegazione di tale andamento sperimentale è data dalla “Legge di corrispondenza dell'affinità dell'acqua” (LMWA) proposta da Collins nel 1997.⁴² Egli propose un insieme di regole fenomenologiche in grado di classificare l'entità e quindi l'ordine delle interazioni ione-ione e ione-sito di superficie a livello qualitativo. Collins tenta dunque di spiegare il SIE supponendo che in soluzione, ioni di carica opposta (così come gruppi carichi) che hanno un'affinità simile per l'acqua perdono spontaneamente parte dei loro gusci di idratazione per associarsi e formare una coppia di ioni a stretto contatto. Come fondamento termodinamico della sua

legge empirica, egli si basa sui diagrammi del vulcano di Morris⁴³ concludendo che l'associazione di specie è preferenziale se esse possiedono entalpie assolute di idratazione simili (Figura 8). La porfirina *t*-H₂P_{agg} è una specie dicationica per cui l'effetto del catione del sale aggiunto per indurne l'aggregazione presumibilmente eserciterà un ruolo preminente nei confronti del solvente piuttosto che con il cromoforo. Tenendo in conto della natura caotropica dei residui N-metilpiridinio³³ e prendendo in considerazione la stabilità crescente delle interazioni riportate in Figura 8, è possibile concludere che nel caso di ioni a spiccata attività cosmotropica come Mg²⁺, l'interazione ione-acqua sarà assolutamente preferenziale e tale da “sottrarre” solvente al guscio di solvatazione dei cromofori esaltandone le interazioni idrofobiche.

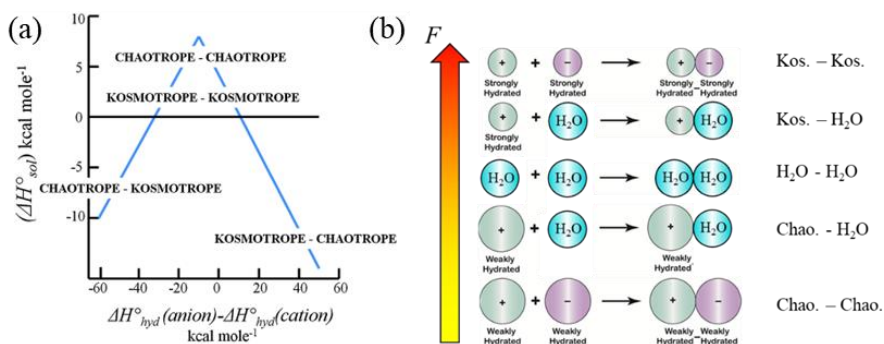


Figura 8. “Legge di corrispondenza dell’affinità dell’acqua” (LMWA): (a) Diagramma a vulcano; (b) Schema dell’intensità delle interazioni tra ioni di carica opposta e tra ioni e molecole di acqua sulla base della classificazione cosmotropica/caotropica. Figura adattata da Salis et al.⁴⁴

Un ulteriore riscontro sulla natura dei fenomeni in considerazione deriva dall’esistenza di una correlazione tra le costanti di velocità k_c ed i valori tabulati dell’energia libera di Gibbs di idratazione ($\Delta_{hyd}G_{calc}$) sia dei mono che dei dicationi.³⁵ Come si evince dalla Figura 9 le specie che posseggono un maggiore grado di idratazione inducono un aumento della velocità del processo di aggregazione.

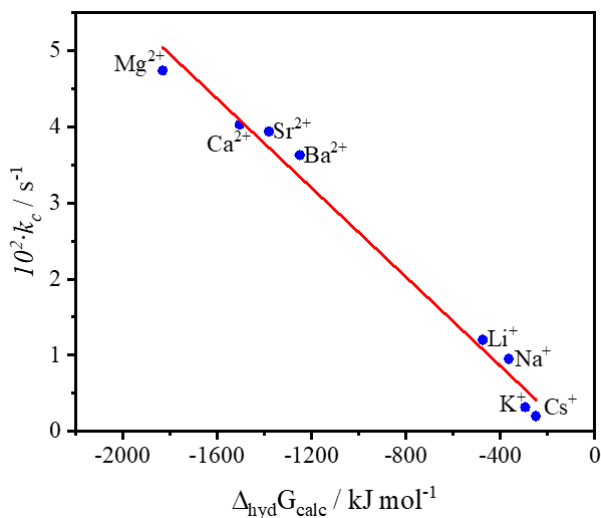


Figura 9. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) e l'energia libera di Gibbs $\Delta_{hyd}G_{calc}$ per l'idratazione dei cationi. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{agg}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{M}^{n+}\text{Cl}_n] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.985$.

I valori di $\Delta_{hyd}G_{calc}$ possono essere calcolati sulla base dell'Eq. 5 la quale fa riferimento ad un modello che prevede la presenza dello ione in una cavità del solvente ed in grado di interagire con l'ambiente circostante che è rappresentato da due regioni distinte: un guscio di idratazione nel quale l'acqua è immobilizzata e l'acqua di bulk, che in ogni caso, risulta sotto l'influenza del campo elettrico dello ione.^{33,35,45}

$$\Delta_{hyd}G_{calc} = \Delta G'_{neut} + (\Delta G_{el1} + \Delta G_{el2}) + \Delta G_{unsym} \quad (\text{Eq. 5})$$

L'equazione vede il contributo di quattro termini: i) un "termine neutro" ($\Delta G'_{neut}$) che rappresenta il contributo delle interazioni con la cosiddetta "carica spenta"; ii) la variazione di energia associata alle interazioni elettrostatiche nel guscio di idratazione (ΔG_{el1}) e iii) al suo esterno (ΔG_{el2}); iv) un fattore correttivo per la carica asimmetrica (ΔG_{unsym}). L'espressione ulteriormente esplicitata ed utile per il calcolo dell'energia libera di Gibbs di idratazione è la seguente:

$$\Delta_{hyd}G_{calc} = (41 - 87r + 1200r^2) + \left(-\frac{64.5z^2 \left[0.44 \left(\frac{\Delta r}{r} \right) + 0.987 \right]}{r + \Delta r} \right) + (120rz^3) \quad (\text{Eq. 6})$$

dove r rappresenta il raggio ionico, Δr lo spessore del guscio di idratazione e z la carica dello ione. Alla luce dei parametri specifici degli ioni che sono inclusi in quest'ultima equazione, si è voluto verificare se alcuni di questi potessero anche individualmente correlare con la velocità del processo di aggregazione. In Figura 10 è riportato l'andamento delle costanti di velocità k_c al variare del valore del raggio ionico dei cationi da cui si evince una doppia correlazione lineare tale da potere distinguere il comportamento dei mono dai dicationi.

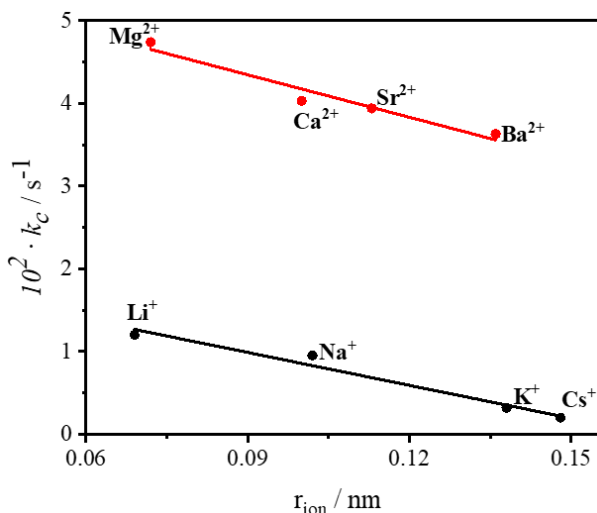


Figura 10. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) e il valore dei raggi ionici dei cationi.³⁵ Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{agg}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{M}^{n+}\text{Cl}_n] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.949$ (linea rossa), $R^2 = 0.946$ (linea nera).

In Figura 11 è riportato l'andamento delle costanti di velocità k_c al variare del numero di molecole di acqua presente nel guscio di idratazione Δr . Anche in questo caso è evidente una distinta correlazione lineare per la serie dei cationi del primo e del secondo gruppo.

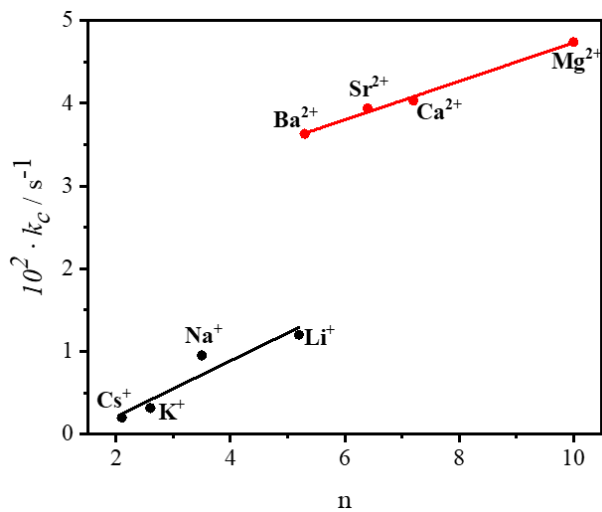


Figura 11. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) e il numero di molecole di acqua presente nel guscio di idratazione (n).³⁵ Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{M}^{n+}\text{Cl}_n] = 0.1 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.993$ (linea rossa), $R^2 = 0.895$ (linea nera).

3.2.3 - Effetto degli anioni sul processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$

Alla luce dei risultati ottenuti nello studio dell'effetto dei cationi sulla velocità del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, si è voluto procedere a verificare se anche gli anioni potessero esercitare un ruolo analogo. A tal fine, si è voluto procedere impiegando diversi sali sodici sia perché il catione Na^+ possiede un carattere di tipo *borderline* nella serie di Hofmeister, sia per la maggiore facilità di potere reperire una vasta gamma di reagenti idonei per tale studio. Per quanto concerne le caratteristiche spettroscopiche del sistema, al variare della tipologia di sale impiegato gli spettri UV/Vis riportati in Figura 12 evidenziano la formazione della medesima specie aggregata la cui posizione in assorbimento è soggetta a piccole variazioni ($\Delta\lambda = \pm 2$ nm).

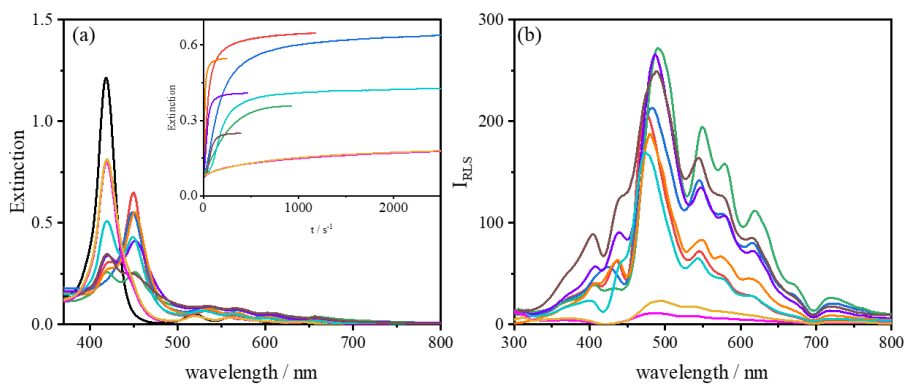


Figura 12. (a) Spettri UV/Vis finali relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera) indotto da differenti sali sodici: $\text{NaSCN}^{[\text{a}]}$ (linea rossa); $\text{NaClO}_4^{[\text{a}]}$ (linea blu); $\text{NaI}^{[\text{a}]}$ (linea verde); $\text{NaBr}^{[\text{b}]}$ (linea viola); $\text{NaNO}_3^{[\text{b}]}$ (linea arancione); $\text{NaCl}^{[\text{c}]}$ (linea azzurra); $\text{Na}_2\text{SO}_4^{[\text{c}]}$ (linea marrone); $\text{Na}_2\text{CO}_3^{[\text{c}]}$ (linea magenta); $\text{Na}_3\text{PO}_4^{[\text{c}]}$ (linea gialla). Nell'inset sono riportati i corrispondenti profili cinetici registrati a $\lambda = 450$ nm. (b) Corrispondenti profili RLS. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{X}^{\text{m-}}] = [\text{a}] = 1.5 \text{ mM}$, $[\text{b}] = 30 \text{ mM}$, $[\text{c}] = 100 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$.

Importanti differenze sono invece riscontrabili in termini di rapporto relativo dell'intensità di assorbimento tra monomero ed aggregato e di intensità del segnale RLS delle soluzioni finali (Tabella 4).

Tabella 4. Valori di estinzione della banda del monomero e dell'aggregato, relativo rapporto di intensità delle bande ed intensità del segnale RLS per il processo di aggregazione della porfirina *t*-H₂P_{agg} indotto da differenti sali sodici.

X^{m-}	Monomero		Aggregato		419 nm / Ext. λ_{agg}	$(I_{RLS})_{corr}$
	Ext. 419 nm	λ_{agg}	Ext.	λ_{agg}		
SCN ⁻ [a]	0.30	450	0.65	0.46	209.0	
ClO ₄ ⁻ [a]	0.22	449	0.55	0.40	213.0	
I ⁻ [a]	0.26	451	0.26	1.01	272.2	
NO ₃ ⁻ [b]	0.34	451	0.41	0.82	367.1	
Br ⁻ [b]	0.27	451	0.55	0.49	187.8	
Cl ⁻ [c]	0.51	449	0.43	1.19	169.6	
SO ₄ ²⁻ [c]	0.35	450	0.25	1.38	249.4	
CO ₃ ²⁻ [c]	0.80	450	0.18	4.39	11.4	
PO ₄ ³⁻ [c]	0.81	450	0.20	3.99	23.2	

Condizioni sperimentali: [*t*-H₂P_{agg}] = 5 μM, [Na_mX^{m-}] = [a] = 1.5 mM, [b] = 30 mM, [c] = 100 mM, T = 298 K. L'intensità degli spettri RLS è stata corretta per l'assorbimento mediante l'Eq. 2.³²

L'aspetto più significativo dal punto di vista sperimentale, come evidenziato dai profili cinetici riportati nell'inset della Figura 12, è senz'altro la notevole differenza in termini di velocità del processo di aggregazione tanto che si è reso necessario impiegare diversi intervalli di concentrazione salina sulla base della differente efficienza degli anioni nel promuovere il processo di aggregazione. In particolare, si è constatato come gli ioni tiocianato e perclorato, anioni aventi forte carattere caotropico, sono molto efficienti nell'indurre l'aggregazione in tempi rapidi e ad una concentrazione di sale di ben due ordini di grandezza inferiore rispetto a quanto riscontrato con altri anioni. L'analisi cinetica dei dati è stata condotta, anche in questo caso, per mezzo di una procedura di fitting non lineare dei dati di estinzione in funzione del tempo mediante l'Eq.1 e i valori dei parametri cinetici calcolati sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 1 e relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto da differenti sali sodici.

X^m	k_0 / s^{-1}	k_c / s^{-1}	m	n
SCN ⁻ [a]	$(1.07 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	$(4.42 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	5.29 ± 0.03	2.57 ± 0.02
ClO ₄ ⁻ [a]	$(3.62 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	$(2.88 \pm 0.03) \cdot 10^{-2}$	1.43 ± 0.16	1.51 ± 0.12
I ⁻ [a]	$(6.54 \pm 0.07) \cdot 10^{-4}$	$(1.61 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	2.91 ± 0.03	5.02 ± 0.02
NO ₃ ⁻ [b]	$(2.91 \pm 0.19) \cdot 10^{-2}$	$(1.35 \pm 0.01) \cdot 10^{-1}$	3.88 ± 0.08	2.69 ± 0.09
Br ⁻ [b]	$(1.07 \pm 0.08) \cdot 10^{-2}$	$(4.11 \pm 0.04) \cdot 10^{-2}$	3.40 ± 0.14	3.09 ± 0.17
Cl ⁻ [c]	$(1.23 \pm 0.10) \cdot 10^{-3}$	$(9.53 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	8.31 ± 0.30	6.91 ± 0.30
SO ₄ ²⁻ [c]	$(2.22 \pm 0.17) \cdot 10^{-3}$	$(8.94 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	2.80 ± 0.04	3.31 ± 0.06
CO ₃ ²⁻ [c]	$(1.99 \pm 0.48) \cdot 10^{-5}$	$(1.80 \pm 0.27) \cdot 10^{-3}$	2.29 ± 0.05	3.48 ± 0.09
PO ₄ ³⁻ [c]	$(1.29 \pm 0.70) \cdot 10^{-5}$	$(2.17 \pm 0.18) \cdot 10^{-4}$	1.99 ± 0.02	2.93 ± 0.07

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{Na}_m\text{X}^m] = 1.5 - 100 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$, $\lambda = 450 \text{ nm}$.

[a] = 1.5 mM; [b] = 30 mM; [c] = 100 mM.

Dai dati cinetici ottenuti si evince che tra gli anioni indagati il tiocianato è quello che determina una maggiore velocità del processo di aggregazione ed alla concentrazione più bassa di sale. Per tale ragione sono stati condotti ulteriori studi cinetici al fine di valutare l'effetto della variazione di concentrazione dello ione tiocianato sui valori di k_c . In Tabella 6 sono riportati i parametri cinetici ottenuti variando la concentrazione dell'anione SCN⁻ in un ristretto intervallo di concentrazione (1-2 mM). I motivi di tale scelta sono prettamente sperimentali e determinati dall'estrema velocità del processo di aggregazione che non permette di monitorare variazioni spettrali mediante tecniche di mescolamento convenzionali.

Tabella 6. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 1 e relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto al variare della concentrazione dello ione SCN⁻.

$[\text{SCN}^-] / \text{mM}$	k_0 / s^{-1}	k_c / s^{-1}	m	n
1.00	$(5.11 \pm 0.19) \cdot 10^{-4}$	$(1.73 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	1.92 ± 0.05	1.32 ± 0.05
1.25	$(2.36 \pm 0.28) \cdot 10^{-3}$	$(1.11 \pm 0.07) \cdot 10^{-2}$	2.34 ± 0.05	0.83 ± 0.05
1.50	$(1.07 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	$(4.44 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	5.29 ± 0.03	2.57 ± 0.02
1.75	$(2.58 \pm 0.13) \cdot 10^{-2}$	$(6.71 \pm 0.06) \cdot 10^{-2}$	5.41 ± 0.13	2.75 ± 0.10
2.00	$(4.50 \pm 0.19) \cdot 10^{-2}$	$(1.34 \pm 0.01) \cdot 10^{-1}$	6.07 ± 0.07	3.01 ± 0.05

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{SCN}^-] = 1\text{-}2 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$, $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Come evidenziato dai valori di k_c all'aumentare della concentrazione di sale aumenta la velocità del processo di aggregazione, ma come evidenziato in Figura 13

negli spettri UV/vis finali varia contestualmente anche la distribuzione tra le bande relative al monomero residuo (419 nm) e all'aggregato (450 nm). Nel grafico sono stati inclusi anche gli spettri finali relativi all'aggregazione indotta a concentrazioni maggiori di sale (> 2 mM) e per le quali la velocità del processo, come sopraddetto, è tale da non potere seguire alcun andamento cinetico. Per meglio chiarire quest'ultimo aspetto si è proceduto ad effettuare calcoli di deconvoluzione degli spettri di estinzione utilizzando una funzione in grado di combinare il profilo gaussiano a quello lorenziano (Funzione 1 in sezione sperimentale). L'intervallo di lunghezza d'onda selezionato (380-500 nm) è piuttosto ristretto, ma è tale da prendere in considerazione sia la banda B del monomero che quella dell'aggregato.

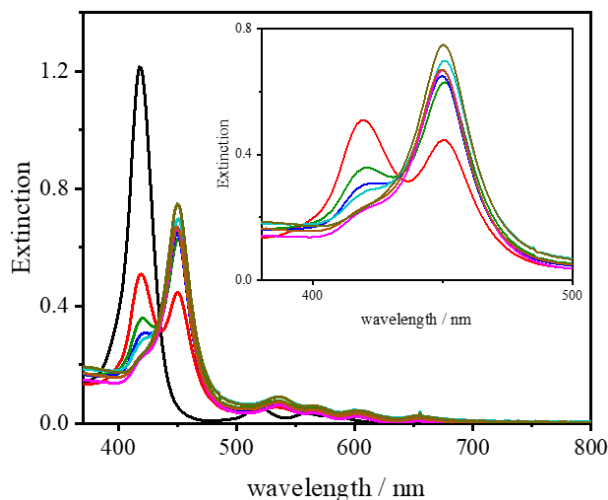


Figura 13. Spettri UV/Vis finali relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ in funzione della variazione di concentrazione di ione SCN^- : no sale (linea nera); 1.00 mM (linea rossa); 1.25 mM (linea verde); 1.50 mM (linea blu); 1.75 mM (linea azzurra); 2.00 mM (linea magenta); 2.50 mM (linea arancione); 3.00 mM (linea verde scuro). Nell'inset è riportato l'ingrandimento di alcuni spettri nella regione 380 - 500 nm. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{SCN}^-] = 1 - 3$ mM, $T = 298$ K.

La Figura 14 mostra, a titolo di esempio, un tipico calcolo di deconvoluzione applicato allo spettro finale relativo all'aggregato formato alla concentrazione di ione tiocianato pari a 1.5 mM al fine di potere valutare la percentuale relativa di aggregato

e di monomero. Tutti i dati relativi al processo di deconvoluzione per gli spettri finali degli aggregati ottenuti al variare della concentrazione di ione SCN^- sono riportati in Tabella 7.

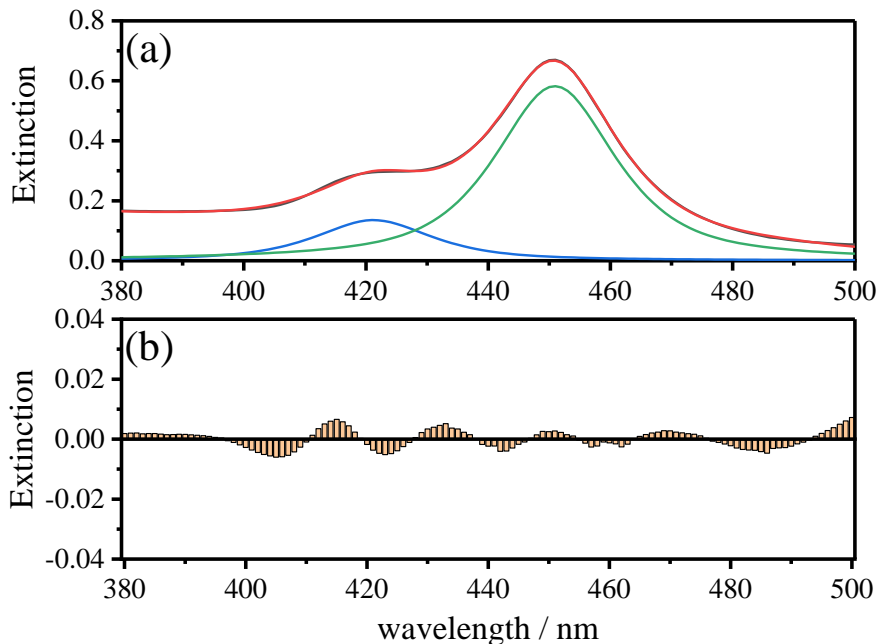


Figura 14. (a) Deconvoluzione dello spettro UV/Vis relativo all'aggregato della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ formato in seguito all'aggiunta di ione SCN^- e (b) relativi residui. Spettro osservato (linea nera); spettro calcolato (linea rossa); banda calcolata relativa al monomero λ_{419} (linea blu); banda calcolata relativa all'aggregato λ_{450} (linea verde). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{SCN}^-] = 1.5 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$, $R^2 = 0.9997$.

Tabella 7. Distribuzione percentuale dell'area integrata della banda a 419 e 450 nm per gli spettri UV/Vis registrati alla fine del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto a diversa concentrazione di ione SCN^- :

$[\text{SCN}^-] / \text{mM}$	IntArea (419nm) / %	IntArea (450nm) / %
1.00	30.9	69.1
1.25	27.3	72.7
1.50	18.2	81.8
1.75	13.1	86.9
2.00	8.4	91.6
2.50	7.9	92.1
3.00	6.8	93.2

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{SCN}^-] = 1 - 3 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$.

In Figura 15 è riportato l'andamento della distribuzione percentuale dell'aggregato calcolato in funzione della concentrazione di sale impiegata. Dal grafico si evince come la quantità di aggregato che si viene a formare aumenta apprezzabilmente fino ad una concentrazione di 2 mM di ione tiocianato, soglia oltre la quale le variazioni sono minime.

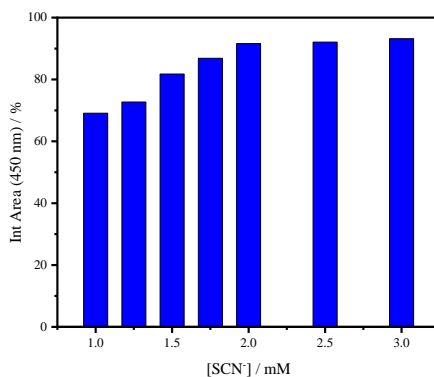


Figura 15. Andamento dei valori degli integrali dell'area dell'aggregato (λ_{450}) al variare della concentrazione di ione SCN^- . Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{SCN}^-] = 1\text{-}3 \text{ mM}$; $T = 298 \text{ K}$.

La Figura 16 complessivamente mostra come la velocità del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, nonché la percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato, siano correlabili alla concentrazione di ione tiocianato.

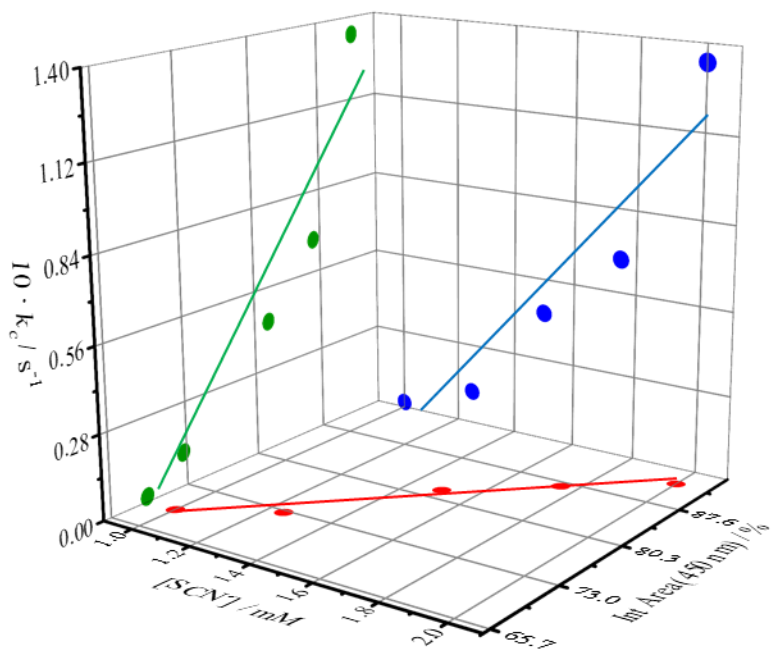


Figura 16. Andamento della costante di velocità k_c per il processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$ al variare dell'area integrata della banda dell'aggregato (λ_{450}) (verde) e al variare della concentrazione di ione SCN^- (blu). Variazione dell'area integrata della banda dell'aggregato (λ_{450}) al variare della concentrazione di ione SCN^- (rosso). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{agg}] = 5\ \mu\text{M}$, $[\text{SCN}^-] = 1\text{-}2\ \text{mM}$, $T = 298\ \text{K}$. Fitting lineare: (rosso) $R^2 = 0.983$, (blu) $R^2 = 0.917$, (verde) $R^2 = 0.893$.

In analogia a quanto fatto con l'anione tiocianato, studi cinetici sul processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$ sono stati condotti anche al variare della concentrazione dell'anione nitrato. In Tabella 8 sono riportati i relativi parametri cinetici ottenuti nell'intervallo di concentrazione 10 - 30 mM. A concentrazione superiore di sale la velocità del processo di aggregazione è tale da dovere ricorrere a tecniche di mescolamento non convenzionali. Come mostrato in Figura 17, così come nel caso dello ione tiocianato, anche nel caso dello ione nitrato l'aumento della concentrazione di sale impiegata determina un aumento della velocità di aggregazione sussistendo una discreta relazione di tipo lineare.

Tabella 8. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 1 e relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto al variare della concentrazione dello ione NO_3^- .

$[\text{NO}_3^-] / \text{mM}$	k_0 / s^{-1}	k_c / s^{-1}	m	n
10.0	$(1.40 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	$(4.22 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	2.71 ± 0.05	2.19 ± 0.06
15.0	$(1.07 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	$(3.16 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	3.30 ± 0.03	1.47 ± 0.02
17.0	$(1.09 \pm 0.04) \cdot 10^{-2}$	$(4.02 \pm 0.03) \cdot 10^{-2}$	3.15 ± 0.05	1.40 ± 0.04
20.0	$(2.96 \pm 0.07) \cdot 10^{-2}$	$(7.97 \pm 0.04) \cdot 10^{-2}$	5.41 ± 0.13	2.75 ± 0.10
22.0	$(3.71 \pm 0.03) \cdot 10^{-2}$	$(1.12 \pm 0.02) \cdot 10^{-1}$	2.38 ± 0.29	0.64 ± 0.10
30.0	$(2.91 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	$(1.35 \pm 0.01) \cdot 10^{-1}$	3.88 ± 0.08	2.69 ± 0.09

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_3^-] = 10\text{-}30 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$, $\lambda = 450 \text{ nm}$.

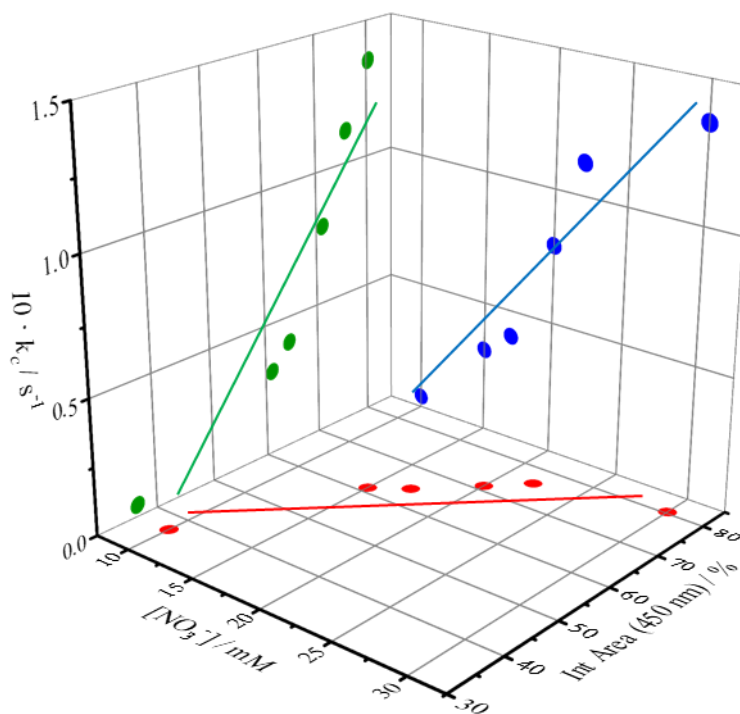


Figura 17. Andamento della costante di velocità k_c relativo al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ al variare della concentrazione di ione NO_3^- . Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_3^-] = 10 - 30 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: (rosso) $R^2 = 0.818$, (blu) $R^2 = 0.930$, (verde) $R^2 = 0.813$.

In Figura 18 sono riportati gli spettri UV/Vis finali corrispondenti alle cinetiche effettuate nell'intervallo di concentrazione 10 - 30 mM da cui, ancora una volta, si evince una diversa distribuzione tra le bande relative al monomero residuo

(419 nm) e all'aggregato (450 nm). Anche in questo caso si è proceduto ad effettuare la deconvoluzione degli spettri elettronici ottenendo le diverse percentuali dell'area integrata delle bande (Tabella 9). La Figura 19 evidenzia ancora una volta come la velocità del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, nonché la percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato, siano correlabili alla concentrazione dello ione nitrato.

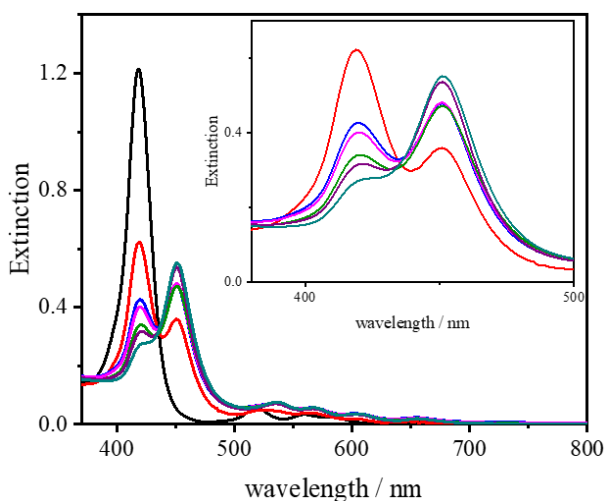


Figura 18. Spettri UV/Vis finali relativi al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ in funzione della variazione di concentrazione di ione NO_3^- : no sale (linea nera); 10 mM (linea rossa); 15 mM (linea blu); 17 mM (linea magenta); 20 mM (linea verde); 22 mM (linea viola); 30 mM (linea azzurra). Nell'inset è riportato l'ingrandimento di alcuni spettri nella regione 380 - 500 nm. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_3^-] = 10\text{-}30 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$.

Tabella 9. Distribuzione percentuale dell'area integrata delle bande a 419 e 450 nm per gli spettri UV/Vis registrati alla fine del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto a diversa concentrazione di ione NO_3^- .

$[\text{NO}_3^-] / \text{mM}$	IntArea (419nm) / %	IntArea (450nm) / %
10.00	63.2	36.8
15.00	38.8	61.2
17.00	36.5	64.5
20.00	28.8	71.2
22.00	24.1	75.9
30.00	19.6	80.4

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_3^-] = 10 - 30 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$.

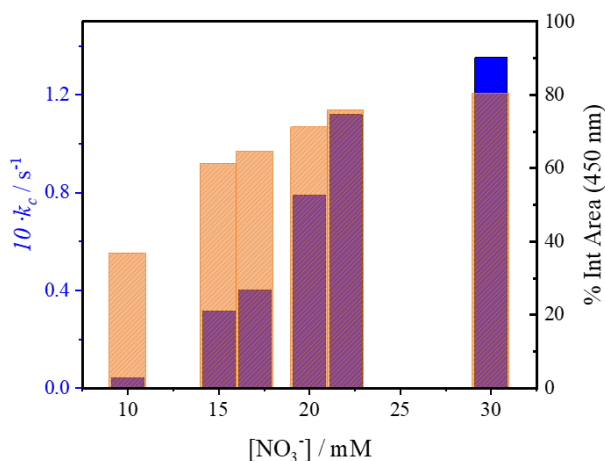


Figura 19. Andamento della costante di velocità k_c per il processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (blu) e della relativa percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato (λ_{450}) (arancione) al variare della concentrazione di ione NO_3^- . Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_3^-] = 10 - 30 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$.

La Figura 20 mostra un confronto dell'andamento delle costanti di velocità k_c relative al processo di aggregazione indotto a diversa concentrazione di ione tiocianato (linea rossa) e nitrato (linea blu) in funzione della percentuale dell'area integrata per valori superiori a 50% della banda dell'aggregato (λ_{450}).

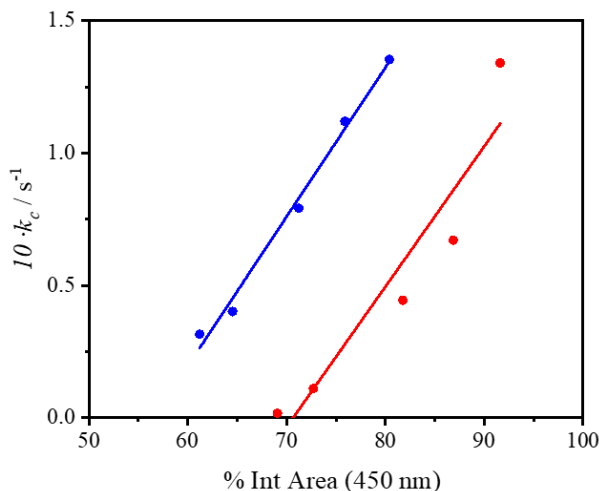


Figura 20. Andamento della costante di velocità k_c relativo al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto al variare della concentrazione di ione SCN^- (linea rossa) e NO_3^- (linea blu). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NO}_3^-] = 15 - 30 \text{ mM}$, $[\text{SCN}^-] = 1 - 2 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.894$ (linea rossa), $R^2 = 0.991$ (linea blu).

Verificata la sussistenza, per entrambi gli anioni, di una dipendenza lineare tra la loro concentrazione e la k_c per il processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, si è proceduto ad una normalizzazione di tutti i valori delle costanti di velocità ottenute per tutti gli anioni riportati in Tabella 5. A tale fine è stata utilizzata l'Eq. 7 dove c è l'effettiva concentrazione di sale impiegata.

$$k_N = k_c \frac{100 \text{ mM}}{(c \cdot \text{mM})} \quad (\text{Eq. 7})$$

In Tabella 10 sono riportate le costanti di velocità normalizzate calcolate per i vari anioni unitamente alle dimensioni degli aggregati risultanti ottenuti mediante misure di diffusione dinamica della luce (DLS). Da quest'ultimi dati si evince, tra l'altro, che per la maggior parte degli anioni in esame le strutture che si formano hanno valori dei diametri idrodinamici superiori a $1 \mu\text{m}$ ad eccezione dello ione tiocianato e perclorato, ovvero le specie che determinano le maggiori velocità del processo di aggregazione.

Tabella 10. Intervallo di concentrazione, coefficiente B di Jones-Dole, costanti di velocità normalizzate k_N e diametro idrodinamico D_H relativo agli anioni studiati.

X^-	c / mM	$B^{[a]}$	k_N / s^{-1}	D_H / nm
SCN ⁻	[1 – 2]	-0.103	^[b] 2.91	226 ± 6
ClO ₄ ⁻	[1.5]	-0.061	1.92 ± 1.85 · 10 ⁻²	673 ± 38
I ⁻	[1.5]	-0.068	1.07 ± 3.05 · 10 ⁻⁵	>1000
NO ₃ ⁻	[10 – 30]	-0.046	^[b] 3.07 · 10 ⁻¹	>1000
Br ⁻	[30]	-0.032	(1.40 ± 0.01) · 10 ⁻¹	>1000
Cl ⁻	[100]	-0.007	(9.53 ± 0.04) · 10 ⁻³	>1000
SO ₄ ²⁻	[100]	0.208	(8.94 ± 0.03) · 10 ⁻³	>1000
CO ₃ ²⁻	[100]	0.278	(1.80 ± 0.27) · 10 ⁻³	>1000
PO ₄ ³⁻	[100]	0.590	(2.17 ± 0.18) · 10 ⁻⁴	>1000

^[b] $\overline{k_N}$ = media delle costanti normalizzate. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{agg}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{Na}_m\text{X}^{m-}] = c / \text{mM}$, $T = 298 \text{ K}$. [a] = Ref.⁴²

Al fine di potere valutare se l'ampio intervallo di velocità riscontrato con i diversi anioni fosse in relazione con la serie di Hofmeister, le costanti di velocità normalizzate sono state riportate in funzione del coefficiente B di Jones-Dole (Figura 21). Per quanto concerne la serie di Hofmeister, gli anioni posizionati più a sinistra sono più fortemente idratati di quelli a destra. È noto come gli anioni debolmente idratati diminuiscono la stabilità delle proteine aumentandone la solubilità.³⁶ Inoltre, essi diminuiscono la tensione superficiale dell'interfaccia proteina/acqua⁴⁶ aumentando il grado di denaturazione delle proteine. Al contrario, gli anioni a più forte idratazione hanno generalmente l'effetto opposto e determinano la precipitazione della proteina dalla soluzione.⁴⁷ Come si evince dalla Figura 21, la velocità del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$ segue, anche nel caso degli anioni, un andamento di tipo indiretto o "inverso" della serie di Hofmeister che è riconducibile, anche in questo caso, alla legge di corrispondenza dell'affinità dell'acqua⁴² e quindi alla specificità delle interazioni ione-ione. In particolare, si osservano due distinti andamenti lineari a seconda del carattere esibito dagli ioni con quelli a carattere caotropico che determinano una maggiore velocità del processo di aggregazione. Tenendo in conto ancora una volta della natura caotropica dei residui

N-metilpiridinio³³ e prendendo in considerazione la stabilità crescente delle interazioni riportate in Figura 8, l'interazione più forte sarà tra ioni che esibiscono un "carattere" simile. Situato all'estremità della serie di Hofmeister, il tiocianato è un anione "soft" scarsamente idratato⁴⁸ il cui comportamento è noto legandosi preferenzialmente al gruppo ammidico del *backbone* di proteine^{44,49-51} determinandone un aumento della solubilità e la denaturazione ad elevata concentrazione di sale. Non è quindi sorprendente l'osservazione per cui, nel sistema in indagine, lo ione tiocianato risulta la specie che, anche a bassa concentrazione, esercita per interazione con i residui carichi della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, un'eccellente azione di schermo in grado di promuovere le interazioni solvofobiche tra i cromofori e dunque l'aggregazione. L'osservazione sperimentale di andamenti invertiti per la serie di Hofmeister non rappresenta una novità essendo presenti in letteratura diversi esempi^{49,51-54} nei quali, tra l'altro, si sottolinea una maggiore specificità degli anioni rispetto ai cationi.

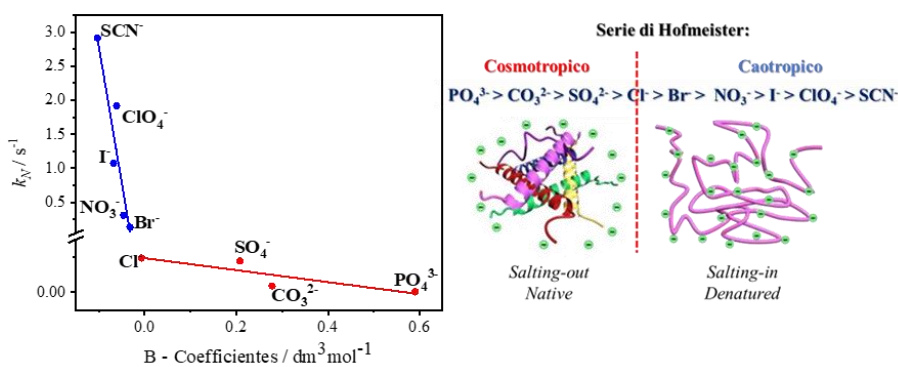


Figura 21. Andamento della costante di velocità normalizzata k_N relativo al processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto dai vari ioni in funzione del coefficiente B di Jones-Dole e serie di Hofmeister per gli anioni. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{Na}_m\text{X}^{m-}] = c \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.856$. (linea blu), $R^2 = 0.746$ (linea rossa).

3.2.4 - Effetto dei cationi sulla formazione degli aggregati J della porfirina TPPS₄

Come già riportato in fase di introduzione di questo capitolo, la porfirina *meso*-tetrakis(4-solfonatofenil) porfirina (TPPS₄) (Figura 1) è solubile in ambiente acquoso ed in condizioni di pH neutro esiste in forma tetraanionica o di base libera. In ambiente blandamente acido (pKa ~ 4.9) si osserva la formazione della specie diacida ed eventualmente, a valori di pH più bassi, si ottiene anche lo zwitterione (schema 1). Entrambe queste specie sono in grado di dare origine a fenomeni di *self-assembly* determinando la formazione sia di aggregati di tipo H (interazione *face-to-face*) che di tipo J (interazione *head-to-tail*). Diversi studi hanno evidenziato il rilevante ruolo svolto dal legame idrogeno,⁵⁵⁻⁵⁷ dai contro-anioni⁵⁶ e da determinate specie cationiche⁵⁸⁻⁷⁰ nel guidare la cinetica di crescita di questi sistemi aggregati e conseguentemente definirne le caratteristiche morfologiche, ottiche e chirottiche generali. È stato dimostrato come alcuni cationi (Na⁺ e/o il K⁺) svolgono il semplice ruolo di aumentare la forza ionica, diminuendo così la repulsione elettrostatica tra porfirine adiacenti e favorendo la formazione di un dimero.^{22,71} Ni²⁺ o Zn²⁺ sono invece efficaci nello stabilizzare queste specie^{72,73}, anche se per quest'ultimo ione è stato recentemente evidenziato un ruolo specifico nella stabilizzazione dei nanoaggregati e nel modo in cui essi si organizzano nel formare una struttura mesoscopica in grado di esibire peculiare attività chirottica.⁷⁴ Alcuni complessi metallici chirali sono invece in grado di interagire specificamente nella fase di crescita degli aggregati J conferendo chiralità alle strutture finali.^{66,67} È stato anche dimostrato come la spermina e poliammine simili sono in grado di templare il processo di *self-assembly* con formazione di strutture di tipo frattalico o del tipo “*sea-urchin*” e per le quali viene proposto un meccanismo di accoppiamento dipolare per spiegare l’inusuale larghezza delle bande J.^{58,75} A questo riguardo, in questa sezione, descriviamo i risultati di uno studio cinetico sul processo di *self-assembly* supramolecolare che porta alla formazione di aggregati J della porfirina TPPS₄ e volto

alla valutazione dell'eventuale esistenza di un SIE del catione del sale impiegato per indurre l'aggregazione. In Figura 22 viene mostrata una comparazione degli spettri di estinzione e di emissione di fluorescenza corrispondenti alle varie specie in soluzione acquosa. La porfirina in forma tetraanionica (TPPS₄⁴⁻) è caratterizzata dall'aver la banda B posizionata a 414 nm e un set di quattro bande Q collocate nella zona tra 500 e 700 nm. Il corrispondente spettro di emissione di fluorescenza presenta un tipico profilo a doppia banda con i massimi posizionati a 644 e 708 nm. La forma diacida (H₂TPPS₄²⁻) presenta uno spostamento batocromico sia della banda B (434 nm, $\Delta\lambda = 20$ nm) che delle bande Q posizionate tra 600 e 700 nm e ridotte in numero a causa della variazione di simmetria molecolare determinata dalla protonazione del *core* porfirinico. Il corrispondente spettro di emissione di fluorescenza presenta un profilo a doppia banda con un massimo posizionato a 670 nm ed una piccola spalla intorno a 705 nm. Gli aggregati J sono invece contraddistinti dalla presenza di una banda B (492 nm) molto intensa e marcatamente spostata nel rosso rispetto alla specie monomerica ($\Delta\lambda = 58$ nm). Un aspetto piuttosto peculiare della banda J, nonché diagnostico della sua presenza, è costituito dalla sua ampiezza a metà altezza (FWHM) nettamente minore rispetto a quella della banda della specie monomerica diacida. A questo proposito, in letteratura è riportato come la FWHM del picco di assorbimento dell'aggregato J varia con la lunghezza di coerenza secondo $N^{-1/2}$ dove N è il numero di aggregazione spettroscopico che rappresenta il numero di molecole che condividono lo stato eccitato delocalizzato, ovvero quel numero di molecole su cui la funzione d'onda è coerentemente dispersa.⁷⁶⁻⁷⁸ Per quanto concerne lo spettro di emissione di fluorescenza, il processo di aggregazione generalmente determina un notevole *quenching* dell'emissione di fluorescenza potendo unicamente rilevare l'emissione del monomero residuo.

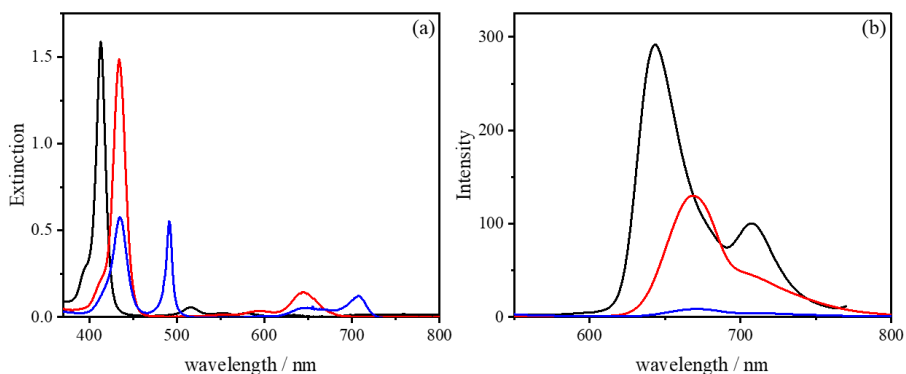


Figura 22. (a) Spettri UV/Vis e di (b) emissione di fluorescenza per le diverse specie della porfirina TPPS₄ in soluzione acquosa e a diverso valore di pH: base libera TPPS₄⁴⁻ (linea nera), diacida H₂TPPS₄²⁻ (linea rossa) e aggregato J (linea blu). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM, λ_{exc} 422 nm (linea nera); [TPPS₄] = 3 μM + [HCl] = 0.3 M, t = 0 s, λ_{exc} 452 nm (linea rossa); [TPPS₄] = 3 μM + [HCl] = 0.3 M, t = 12000 s λ_{exc} 460 nm (linea blu); T = 298 K.

La presenza dell'aggregato J può essere rilevata facilmente per mezzo della tecnica di diffusione di luce risonante in quanto il corrispondente spettro RLS è contraddistinto da un intenso e stretto segnale con un massimo collocato intorno ai 500 nm e dunque leggermente spostato nel rosso rispetto alla posizione del picco di estinzione del campione (Figura 23). Queste caratteristiche sono in linea con la formazione di estesi aggregati in soluzione caratterizzati da un notevole grado di organizzazione tra i cromofori e comunque, da un forte accoppiamento eccitonico.

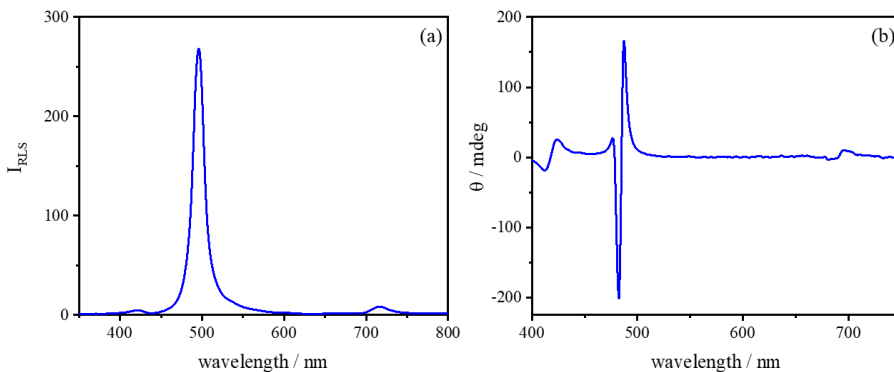


Figura 23. Spettro di RLS (a) e di dicroismo circolare (b) corrispondente alla formazione di aggregati J della porfirina TPPS₄ registrato alla fine del processo di aggregazione. Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM, [HCl] = 0.3 M, t = 12000 s, T = 298 K.

La spettroscopia di dicroismo circolare sostanzia ulteriormente quanto descritto evidenziando la presenza di intense bande eccitoniche indotte in corrispondenza della regione dell'assorbimento degli aggregati J con un effetto Cotton di tipo positivo. Un effetto simile e meno intenso è riscontrabile per l'aggregato di tipo H con bande posizionate ad energia maggiore, nella regione vicino ai 420 nm. Studi precedenti hanno evidenziato come le cinetiche di formazione degli aggregati J della porfirina TPPS₄ sono fortemente influenzate dalla natura dell'anione dell'acido inorganico utilizzato per indurre l'aggregazione, mostrando un andamento delle costanti di velocità che segue l'ordine H₂SO₄ > HCl > HBr > HNO₃ > HClO₄.⁵⁶ In particolare, sia le costanti di velocità che l'entità della chiralità indotta nel sistema correlano con la diversa capacità dei vari anioni di influenzare il network di legame ad idrogeno esibendo un andamento che è in accordo con la serie di Hofmeister. Gli autori sottolineano come probabilmente gli anioni svolgono un ruolo fondamentale nella formazione iniziale del dimero o del nucleo critico *m* ed in questo elaborato di tesi, come predetto, ci si è proposti di appurare se, parimenti agli anioni, anche i cationi possono assumere un ruolo cruciale in grado di influenzare la cinetica di crescita di questi aggregati. Dunque, con l'obiettivo di valutare al meglio un effetto SIE dei cationi nella formazione degli aggregati J, si è pensato di mantenere tutti i parametri costanti e di variare unicamente la natura del sale utilizzato al fine di potere accedere

ad una vasta gamma di cationi. In tal senso, per realizzare le condizioni opportune di pH è stato impiegato acido cloridrico e come sale i cloruri dei metalli alcalini ed alcalino-terrosi. Questa metodologia consente di assicurare in soluzione la presenza unicamente dell'anione cloruro, il quale tra l'altro, ha il pregio di collocarsi in una posizione *borderline* nella serie di Hofmeister. La ben nota natura gerarchica del processo di formazione degli aggregati J della porfirina TPPS₄ rappresenta però una problematica di non poco conto nel momento in cui si deve affrontare uno studio sistematico dal punto di vista cinetico.⁷⁹ In primo luogo, al fine di ottenere una buona riproducibilità dei dati cinetici l'attenzione è stata rivolta alla ricerca di un idoneo protocollo di mescolamento dei reagenti tale da assicurare al tempo zero la presenza della medesima specie di partenza (monomeri). Infatti, la coesistenza di specie diverse quali dimeri o piccoli oligomeri può influenzare marcatamente la cinetica di aggregazione e quindi anche la dimensione degli aggregati risultanti. Poiché uno studio cinetico ottimale non può esulare da un'oculata scelta della sua velocità complessiva, una volta individuato un adeguato protocollo di mescolamento sono state valutate le più opportune condizioni sperimentali tali da avere cinetiche non troppo veloci e comunque caratterizzate da profili cinetici aventi un periodo di induzione. Quest'ultimo aspetto è basilare in quanto, come già detto, gli anioni assolvono un ruolo fondamentale presumibilmente già a livello della formazione di dimeri.⁵⁶ Il protocollo di mescolamento adottato è del tipo “*porphyrin first*” (PF), ovvero esso prevede l'aggiunta di una soluzione premiscolata di acido cloridrico (0.3 M) e sale (0.2 M) ad una soluzione acquosa diluita di TPPS₄ (3 μM), una metodica che permette senz'altro di ottenere delle cinetiche caratterizzate da profili di tipo sigmoidale.⁷⁹ La concentrazione di acido impiegata è stata idoneamente valutata sulla scorta di studi precedenti,⁷⁹ in quanto in bulk (ed in assenza di sale) essa già determina profili sigmoidali con tempi di nucleazione estremamente lunghi (~ 2000 sec). Tali condizioni, permettono di adoperare la metodica di mescolamento sopradescritta con la ragionevole sicurezza che, nei primi secondi dal mescolamento, non dovrebbe avere luogo alcun processo di aggregazione promosso unicamente dalla variazione di condizione di acidità. Il processo cinetico che porta alla formazione degli aggregati J

può essere facilmente monitorato attraverso spettroscopia UV/Vis ed al fine di una corretta determinazione dei parametri cinetici è possibile seguire la variazione di estinzione nel tempo sia a 434 nm (scomparsa della specie diacida) che a 492 nm (formazione dell'aggregato J). In Figura 24, a titolo di esempio, è riportata la comparazione dei profili cinetici ottenuti per il processo di aggregazione ottenuto in bulk ed indotto da LiCl. In generale, tutte le tracce cinetiche ottenute in questo studio, ovvero impiegando i cloruri dei metalli alcalini ed alcalino-terrosi, mostrano un profilo di tipo sigmoidale la cui analisi è possibile secondo il modello autocatalitico di Pasternack (Eq.1).

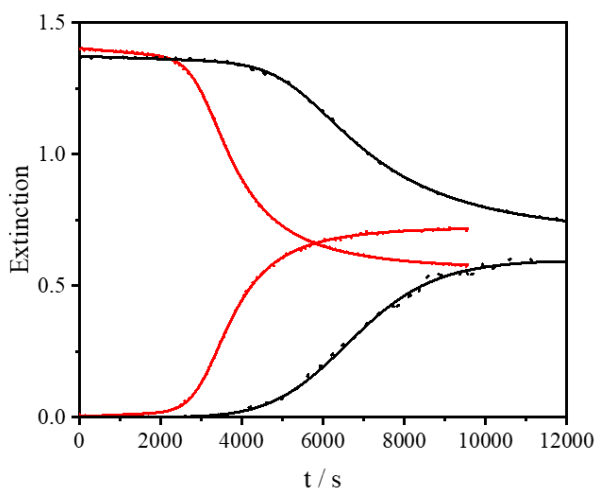


Figura 24. Confronto dei profili cinetici relativi alla scomparsa della specie diacida $H_2TPPS_4^{2-}$ (λ_{434}) e di formazione dell'aggregato J (λ_{492}) ottenuti in bulk (linea nera) ed indotto da sale (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[TPPS_4] = 3 \mu M$, $[HCl] = 0.3 M$; $[TPPS_4] = 3 \mu M$ + soluzione premiscelata ($[HCl] = 0,3M$ + $[LiCl] = 0,2M$). Le linee rappresentano i fitting ottenuti per mezzo dell'Eq. 1. bulk: $k_0 = (5.44 \pm 0.75) \cdot 10^{-7} \cdot s^{-1}$; $k_c = (1.95 \pm 0.01) \cdot 10^{-4} \cdot s^{-1}$; $m = 3.73 \pm 0.04$; $n = 7.36 \pm 0.08$; $R^2 = 0.999$; HCl + LiCl: $k_0 = (9.95 \pm 0.95) \cdot 10^{-6} \cdot s^{-1}$; $k_c = (3.60 \pm 0.01) \cdot 10^{-4} \cdot s^{-1}$; $m = 3.31 \pm 0.05$; $n = 8.55 \pm 0.13$; $R^2 = 0.999$.

Come si evince dalla Figura 25 al variare della carica del catione del sale impiegato per indurre il processo di aggregazione si ottengono spettri di estinzione finali per l'aggregato marcatamente diversi. In particolare, i cationi del primo gruppo determinano la formazione di un picco intenso e stretto posizionato a 492 nm, mentre

i cationi del secondo gruppo conducono a spettri insolitamente meno intensi e notevolmente più larghi rispetto a quelli ottenuti con i monocationi e con innalzamento della linea di base.

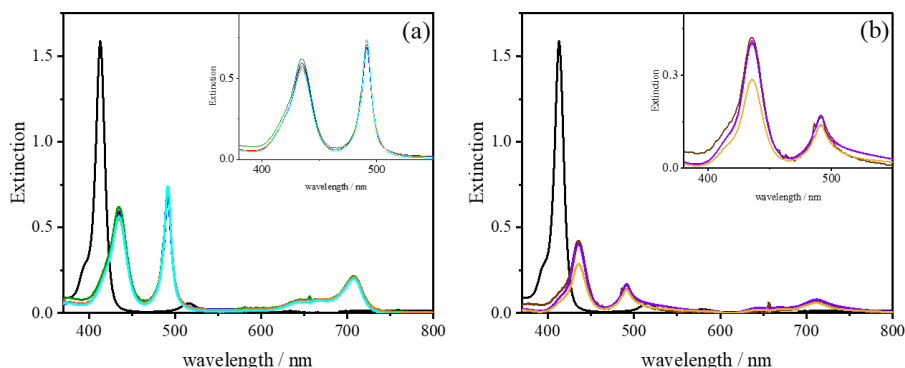


Figura 25. Spettri UV/Vis finali relativi al processo di formazione di aggregati di tipo J della porfirina TPPS₄ indotto da diversi sali cloruro del I Gruppo (a) e del II Gruppo (b). Negli inset sono riportati gli ingrandimenti di alcuni spettri nella regione 380 - 550 nm. LiCl (linea rossa); NaCl (linea blu); KCl (linea verde); CsCl (linea arancione); NH₄Cl (linea azzurra); MgCl₂ (linea magenta); CaCl₂ (linea marrone); SrCl₂ (linea viola); BaCl₂ (linea gialla). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM, [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K.

In Figura 26 sono riportati i corrispondenti spettri RLS registrati alla fine di ogni cinetica. I monocationi mostrano un profilo molto intenso posizionato a circa 498 nm chiara indicazione della formazione di estese strutture aggregate caratterizzate da un forte accoppiamento eccitonico tra i cromofori, mentre i cationi divalenti mostrano un profilo con un picco più spostato nel rosso e caratterizzato dall'essere decisamente meno intenso e di gran lunga più largo rispetto ai monocationi. Queste caratteristiche sono in linea con quelle riscontrate negli spettri di estinzione e congiuntamente suggeriscono una diversa organizzazione strutturale dell'aggregato finale. Infatti, nel caso dei dicationi il segnale è meno risonante e caratterizzato da una maggiore componente di diffusione di tipo Rayleigh, segno di un minore accoppiamento eccitonico tra i cromofori e della crescita in soluzione di oggetti di dimensioni più grandi caratterizzati da una minore organizzazione a livello locale. Questa ipotesi è supportata anche da misure di diffusione dinamica della luce

per le quali l'aggregato J indotto in presenza dei dicationsi presenta dimensioni medie superiori ($D_H > 1000$ nm) a quelle evidenziate dai monocationi ($D_H \sim 600$ nm).

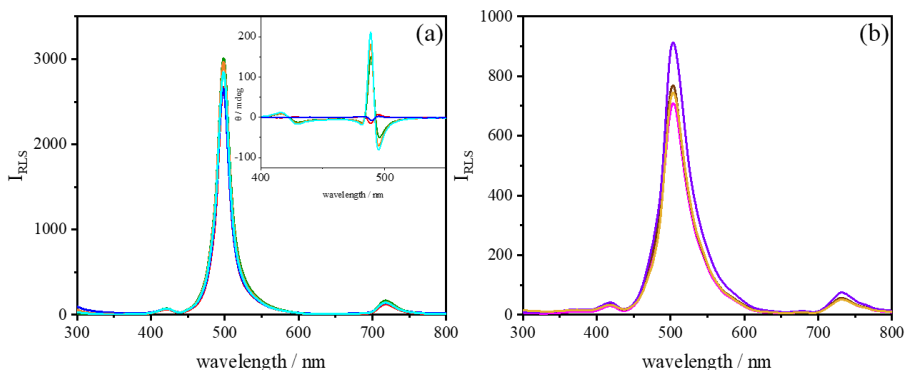


Figura 3: spettri RLS degli aggregati di tipo J di porfirina TPPS₄ formati in seguito all'aggiunta di metalli del I gruppo (a) e del secondo gruppo (b). Nell'inset sono riportati gli spettri CD corrispondenti agli aggregati formati mediante i cationi del I gruppo. LiCl (linea rossa); NaCl (linea blu); KCl (linea verde); CsCl (linea arancione); NH₄Cl (linea azzurra); MgCl₂ (linea magenta); CaCl₂ (linea marrone); SrCl₂ (linea viola); BaCl₂ (linea gialla). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM, [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K.

Un'ulteriore conferma indiretta a sostegno della formazione di strutture di tipo diverso a seconda della carica del catione impiegato è fornita dagli spettri di dicroismo circolare. Nel caso della serie dei monocationi gli spettri CD sono caratterizzati dalla presenza di intensi segnali nelle regioni di assorbimento della banda J e H con i relativi segni dell'effetto Cotton che però non trovano un'opportuna razionalizzazione. Per contro, nel caso dei dicationsi non è possibile osservare l'insorgenza di alcun tipo di segnale dicroico. In letteratura esistono esempi di aggregati J ottenuti in diverse condizioni sperimentali ed aventi caratteristiche spettroscopiche reminiscenti di quelle osservate con i dicationsi. Da una parte, esiste uno studio condotto al variare della concentrazione di porfirina e della forza ionica che ha dimostrato la possibilità di ottenere aggregati di forma e dimensione controllata evidenziando la possibilità di accedere a strutture di tipo *rod-like* o frattaliche.²⁷ Dall'altra, vi sono alcuni esempi di aggregati J formati in presenza di specie cationiche.^{58,63,74,75,79,80} In questi casi, le evidenze sperimentali vengono

spiegate con un meccanismo di accoppiamento dipolare dei cromofori piuttosto che con il modello classico degli eccitoni di Frenkel.

In Figura 27 sono riportati i profili cinetici relativi al processo di aggregazione al variare dei sali cloruro. Tutte le curve esibiscono un profilo sigmoidale con un periodo di induzione iniziale leggermente variabile in funzione del tipo di sale impiegato per promuovere l'aggregazione. L'analisi cinetica dei dati è stata condotta utilizzando l'Eq. 1 e i valori dei parametri cinetici calcolati sono riportati nella Tabella 11.

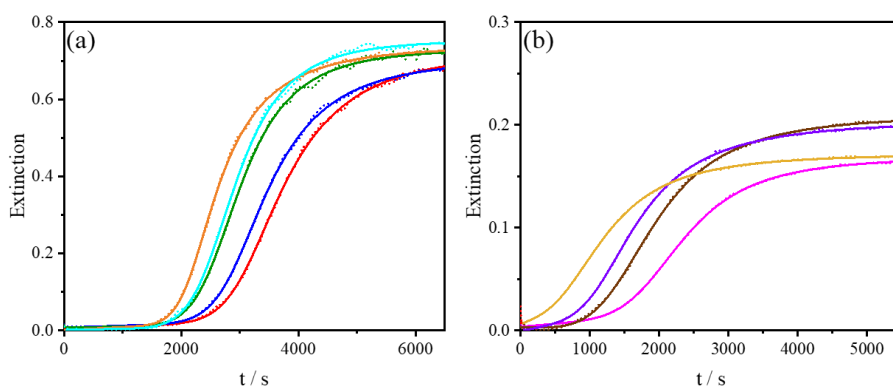


Figura 27. Confronto dei profili cinetici relativi alla formazione di aggregati di tipo J della porfirina TPPS₄ (λ_{492}) ottenuti mediante l'impiego di cationi monovalenti (a) e cationi divalenti (b). LiCl (linea rossa); NaCl (linea blu); KCl (linea verde); CsCl (linea arancione); NH₄Cl (linea azzurra); MgCl₂ (linea magenta); CaCl₂ (linea marrone); SrCl₂ (linea viola); BaCl₂ (linea gialla). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μ M, [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K.

Tabella 11. Parametri cinetici ottenuti per mezzo dell'Eq. 1 e relativi al processo di aggregazione della porfirina TPPS₄ indotto dall'impiego di cationi mono e divalenti.

M^{n+}	k_0 / s^{-1}	k_c / s^{-1}	m	n
Li ⁺	$(9.95 \pm 0.95) \cdot 10^{-6}$	$(3.60 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	3.31 ± 0.05	8.55 ± 0.13
Na ⁺	$(7.73 \pm 0.82) \cdot 10^{-6}$	$(3.86 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	3.15 ± 0.04	8.30 ± 0.11
K ⁺	$(4.25 \pm 1.52) \cdot 10^{-6}$	$(4.44 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	2.73 ± 0.05	7.46 ± 0.14
Cs ⁺	$(1.15 \pm 0.19) \cdot 10^{-5}$	$(5.12 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	3.76 ± 0.08	9.34 ± 0.22
NH ₄ ⁺	$(2.92 \pm 1.29) \cdot 10^{-6}$	$(4.56 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	2.54 ± 0.04	7.00 ± 0.10
Mg ²⁺	$(3.92 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	$(5.99 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	2.55 ± 0.02	4.71 ± 0.04
Ca ²⁺	$(1.07 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	$(7.50 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	3.17 ± 0.05	4.76 ± 0.08
Sr ²⁺	$(7.17 \pm 0.32) \cdot 10^{-5}$	$(8.84 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	2.81 ± 0.04	3.57 ± 0.05
Ba ²⁺	$(1.63 \pm 0.08) \cdot 10^{-4}$	$(1.15 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$	2.17 ± 0.03	2.09 ± 0.05

Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM, [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K, λ = 492 nm.

In Figura 28 sono riportati i dati relativi alla variazione della costante di velocità k_c per i vari cationi da cui è evidente un aumento della velocità di formazione degli aggregati scendendo lungo un gruppo, molto più marcato nel caso dei dicationi. Tale risultato, da un punto di vista qualitativo è anche in perfetto accordo con la serie di Hofmeister per i cationi riportata in Figura 7.

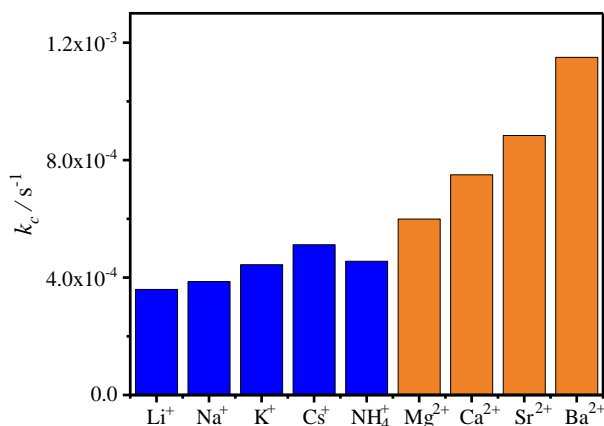


Figura 28. Andamento della costante di velocità k_c per il processo di aggregazione della porfirina TPPS₄ in funzione del catione impiegato: cationi monovalenti (blu), cationi bivalenti (arancione). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM, [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K.

Al fine di determinare quantitativamente la sussistenza di una correlazione tra la velocità del processo di aggregazione e la serie di Hofmeister, le costanti di velocità k_c sono state correlate ad una serie di parametri pubblicati da Marcus e riportati nella Tabella 12.³⁵

Tabella 12. Parametri di Marcus relativi ai diversi cationi: r_{ion} raggio ionico; Δr_{shell} raggio del guscio di idratazione; $\Delta G_{el\ 1+2} / kJmol^{-1}$ energia libera di Gibbs delle interazioni elettrostatiche nel guscio di idratazione ed al suo esterno; $\Delta_{hyd}G_{calc} / kJmol^{-1}$ energia libera di Gibbs di idratazione degli ioni calcolata per mezzo dell'Eq. 5.³⁵

M^{n+}	r_{ion} / nm	$\Delta r_{shell} / nm$	$\Delta G_{el\ 1+2} / kJmol^{-1}$	$\Delta_{hyd}G_{calc} / kJmol^{-1}$
Li ⁺	0.069	0.172	-558	-510
Na ⁺	0.102	0.116	-440	-385
K ⁺	0.138	0.074	-372	-305
Cs ⁺	0.170	0.049	-328	-245
NH ₄ ⁺	0.148	0.065	-358	-285
Mg ²⁺	0.072	0.227	-2049	-1940
Ca ²⁺	0.100	0.171	-1656	-1515
Sr ²⁺	0.113	0.150	-1541	-1385
Ba ²⁺	0.136	0.118	-1390	-1210

In Figura 29 è riportato l'andamento delle costanti di velocità k_c in funzione della dimensione del raggio dei cationi impiegati per indurre il processo di aggregazione della porfirina TPPS₄. Come si può vedere dal grafico, i cationi in funzione della loro carica, presentano due andamenti ben distinti, determinando un aumento della velocità del processo in funzione della dimensione del raggio ionico.

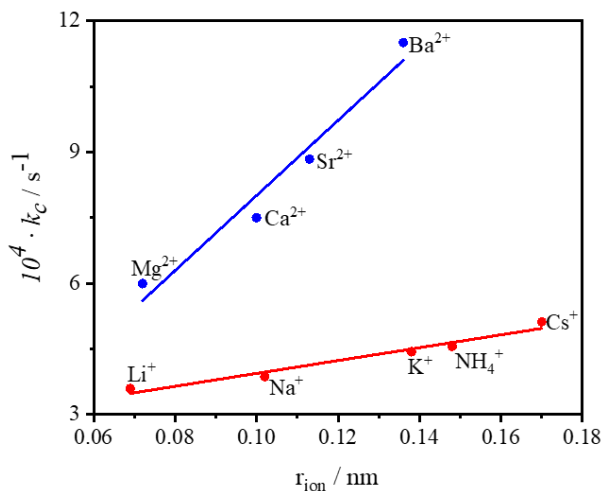


Figura 29. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) della porfirina TPPS₄ e il valore dei raggi ionici dei cationi. Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM , [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K. Fitting lineare: $R^2 = 0.961$ (linea rossa - cationi monovalenti), $R^2 = 0.960$ (linea blu - cationi divalenti).

In modo del tutto analogo, riportando le costanti di velocità k_c in funzione del raggio di idratazione del guscio (Figura 3) si ottengono due distinti andamenti lineari per i monocationi e i dicationi. Nel caso specifico, maggiore è la dimensione del guscio di idratazione dello ione, minore sarà la velocità del processo.

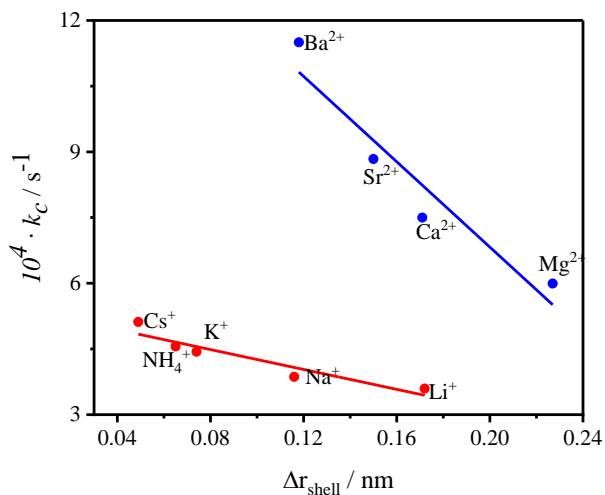


Figura 30. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) della porfirina TPPS₄ e il valore del raggio del guscio di idratazione dei cationi. Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM , [HCl] = 0.3 M, [M^nCl_n] = 0.2 M, T = 298 K. Fitting lineare: $R^2 = 0.881$ (linea rossa - cationi monovalenti), $R^2 = 0.913$ (linea blu - cationi divalenti).

Come descritto in precedenza, nel modello di Marcus i parametri raggio ionico e raggio del guscio di idratazione dei cationi contribuiscono alla determinazione dell'energia libera di Gibbs delle interazioni elettrostatiche ($\Delta G_{el\ 1+2}$) la quale prende in considerazione le interazioni all'interno ed all'esterno del guscio di idratazione.³⁵ Riportando in grafico le costanti di velocità k_c in funzione dei valori di $\Delta G_{el\ 1+2}$ riportati in Tabella 12 si ottengono, anche in questo caso, due andamenti ben distinti in funzione della carica del catione (Figura 31).

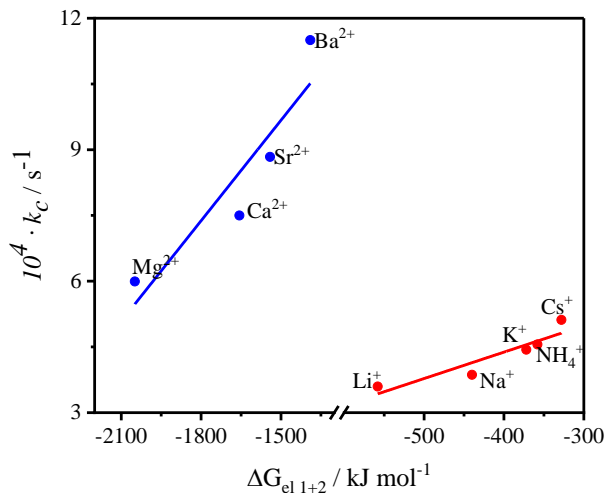


Figura 31. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) della porfirina TPPS₄ e il valore dell'energia libera di Gibbs delle interazioni elettrostatiche all'interno ed all'esterno del guscio di idratazione ($\Delta G_{el\ 1+2}$). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μ M, [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K. Fitting lineare: $R^2 = 0.851$ (linea rossa - cationi monovalenti), $R^2 = 0.850$ (linea blu - cationi divalenti).

Un andamento del tutto simile si ottiene riportando le costanti di velocità k_c in funzione dell'energia libera di Gibbs di idratazione degli ioni ($\Delta_{hyd}G_{calc}$) calcolate attraverso l'Eq. 5 e riportate in Tabella 12. Dalla Figura 32 si evince, come all'interno dello stesso andamento, più lo ione presenta un carattere idrofilo più lento sarà il processo di aggregazione della porfirina TPPS₄.

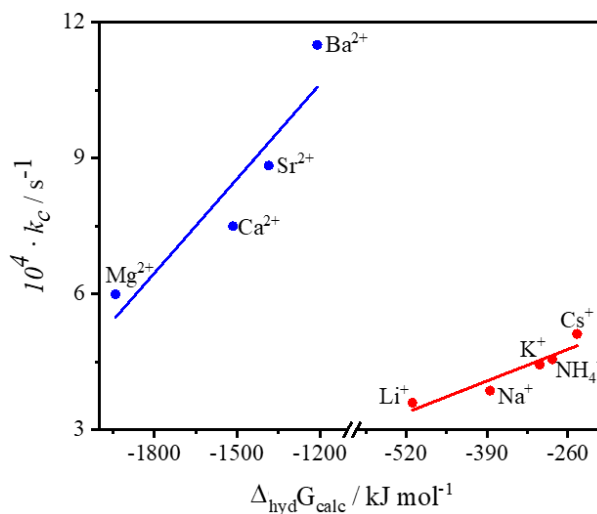


Figura 32. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) della porfirina TPPS₄ e l'energia libera di Gibbs per l'idratazione dei cationi ($\Delta_{\text{hyd}}G_{\text{calc}}$). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM , [HCl] = 0.3 M, [$\text{M}^{\text{n+}}\text{Cl}_n$] = 0.2 M, T = 298 K. Fitting lineare: $R^2 = 0.882$ (linea rossa - cationi monovalenti), $R^2 = 0.861$ (linea blu - cationi divalenti).

Al fine di ottenere un'ulteriore valutazione quantitativa dell'effetto esercitato dai cationi, si è cercato di mettere in relazione i valori di k_c sia con la variazione di entropia associata alle variazioni strutturali $\Delta_{\text{str}}S$ che con l'energia libera di Gibbs per il legame ad idrogeno ΔG_{HB} , parametri i cui valori sono riportati in tabella 3. In Figura 33 sono riportati gli andamenti ottenuti dai quali è evidente come, sia per i cationi monovalenti che per i divalenti, la velocità del processo di aggregazione aumenta al crescere del carattere caotropico dello ione. Il significato del ΔG_{HB} è già stato discusso in precedenza e sostanzialmente riflette il numero medio di legami idrogeno che si possono formare intorno allo ione.

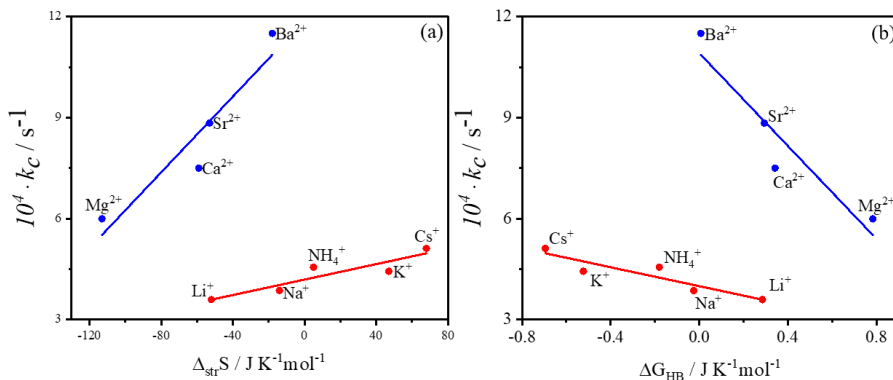


Figura 33. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) della porfirina TPPS₄ e l'energia libera di Gibbs per il legame ad idrogeno ΔG_{HB} (a) e l'entropia strutturale $\Delta_{str}S$ (b). Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μ M, [HCl] = 0.3 M, [Mⁿ⁺Cl_n] = 0.2 M, T = 298 K. Fitting lineare: $R^2 = 0.841$ (linea rossa - cationi monovalenti), $R^2 = 0.893$ (linea blu - cationi divalenti).

All'atto della formazione dell'aggregato J della TPPS₄, quale che sia la sua forma coinvolta nell'aggregazione (diacida o zwitterione), essa è senz'altro una specie dotata di due residui benzensolfonato che risentiranno elettrostaticamente della specificità del catione del sale aggiunto per indurre l'aggregazione. Tenendo in conto della natura caotropa dei residui solfonati⁸¹ la tendenza sarà, all'interno di ogni serie dei cationi indagati, ad interagire con quelli a carattere caotropico, tipicamente quelli aventi minore carattere idrofilo e maggiori dimensioni. Il modello dell'aggregato J si basa su un'interazione elettrostatica tra il nucleo protonato di una porfirina e i gruppi solfonati delle unità porfiriniche adiacenti^{20,82,83} e se da una parte la presenza di uno ione caotropico influenza le proprietà del solvente promuovendo interazioni idrofobiche e di π - π stacking tra i cromofori, dall'altra tende a destabilizzare la formazione del network di legame idrogeno. Un idoneo bilanciamento di questi effetti potrebbe essere alla base della formazione degli aggregati ed in linea con tutte le osservazioni sperimentali. In particolare, se si guarda all'effetto della carica, si osserva che i dicationi determinano effetti più marcati sul processo di aggregazione e che potrebbero determinare la formazione di specie la cui stabilizzazione direzionale per mezzo del legame idrogeno è sempre minore a livello mesoscopico. In letteratura sono presenti alcuni report riguardo al problema della

possibile influenza dei legami idrogeno mediati dall'acqua sulla struttura e sulle proprietà ottiche degli aggregati $J^{55,84}$ tra cui, uno che per mezzo della sostituzione isotopica, dimostra proprio l'influenza sull'accoppiamento degli eccitoni tra i monomeri dell'aggregato.²⁸ Un ulteriore riscontro sperimentale a sostegno della plausibile differenza strutturale degli aggregati in base alla diversa specificità dei cationi deriva dal mancato unico andamento della variazione della costante di velocità del processo di aggregazione con il coefficiente B di Jones-Dole. Come si evince dalla Figura 34 si ottengono ancora una volta due correlazioni differenti, in linea con il fatto che si formano due varietà di strutture diverse, un andamento ben diverso da quello riscontrato con la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ dove la normalizzazione per la carica dei cationi insito nel parametro B ha permesso di correlare tutti i dati di velocità per la formazione, tuttavia, della medesima specie aggregata.

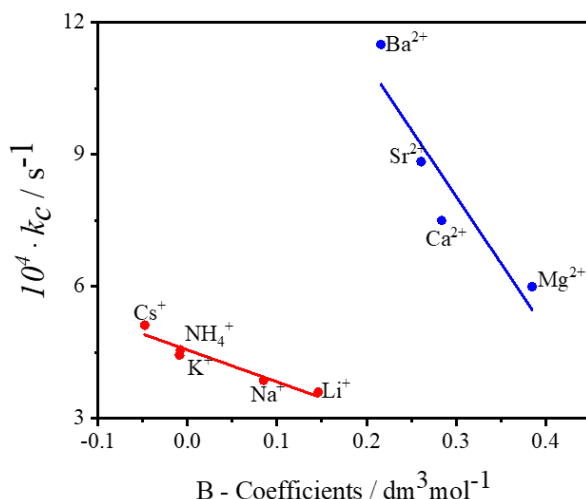


Figura 34. Correlazione tra le costanti di velocità del processo di aggregazione (k_c) della porfirina TPPS₄ e il coefficiente B di Jones-Dole. Condizioni sperimentali: [TPPS₄] = 3 μM , [HCl] = 0.3 M, [M^nCl_n] = 0.2 M, T = 298 K. Fitting lineare: $R^2 = 0.932$ (linea rossa - cationi monovalenti), $R^2 = 0.859$ (linea blu - cationi divalenti).

3.3 - Conclusioni

Nell'ambito dello studio del processo di *self-assembly* di porfirine idrosolubili caratterizzate da una carica netta, l'attenzione è stata rivolta alle porfirine *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$) e *meso*-tetrakis(4-solfonatofenil)porfirina (TPPS₄). La porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ è una specie dicationica che mostra una grande tendenza all'aggregazione in soluzione acquosa e per la quale studi dettagliati hanno evidenziato, al variare della forza ionica, la formazione di aggregati di natura frattalica. La porfirina TPPS₄ è una specie tetraanionica estensivamente studiata in letteratura in quanto a pH acido (< 1) e/o in condizioni di elevata forza ionica, essa è in grado di dare luogo alla formazione di aggregati di tipo J. In questo contesto, è stata effettuata una dettagliata indagine spettroscopica e cinetica della formazione sia degli aggregati frattalici della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ che degli aggregati di tipo J della TPPS₄ al variare della natura del contro-ione del sale impiegato per indurre l'aggregazione. Nel caso della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ sono stati impiegati diversi cloruri del primo e del secondo gruppo adottando un rigoroso protocollo di mescolamento dei reagenti che prevede l'aggiunta del sale come ultimo reattivo. L'analisi cinetica dei dati ha permesso di trovare, in funzione della carica del catione, delle correlazioni tra le costanti di velocità del processo di formazione dei clusters porfirinici ed alcuni parametri termodinamici riportati in letteratura da Marcus quali la variazione di entropia strutturale $\Delta_{str}S$ e la variazione di energia libera di Gibbs per la formazione di legami idrogeno ΔG_{HB} . Un'unica correlazione è stata invece ottenuta attraverso il coefficiente di viscosità B di Jones-Dole il quale tiene in considerazione, tra i vari parametri, anche l'effetto della carica degli ioni. Un'attenta analisi dei dati rivela che gli ioni a maggiore carattere cosmotropico sono quelli in grado di promuovere più velocemente il processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, un andamento di tipo "inverso" rispetto a quello riportato nella serie di Hofmeister. Quest'andamento sperimentale può giustificarsi considerando la natura caotropica dei residui N-metilpiridinio e la stabilità crescente delle interazioni

secondo la legge di corrispondenza dell'affinità dell'acqua proposta da Collins. Un ulteriore riscontro sulla natura dei fenomeni che regolano tale processo deriva dall'esistenza di una correlazione tra le costanti di velocità ed i valori tabulati dell'energia libera di Gibbs di idratazione ($\Delta_{hyd}G$) sia dei mono che dei dicationi a conferma che le specie che posseggono un maggiore grado di idratazione inducono un aumento della velocità del processo di aggregazione.

Alla luce dei risultati ottenuti nello studio dell'effetto dei cationi sulla velocità del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{agg}$, si è proceduto ad effettuare un altro dettagliato studio cinetico finalizzato a verificare se anche gli anioni potessero esercitare un ruolo analogo. A tal fine, si sono utilizzati diversi sali sodici ed un aspetto significativo è costituito dalla notevole differenza in termini di velocità del processo di aggregazione tanto che si è reso necessario impiegare diversi intervalli di concentrazione salina sulla base della differente efficienza degli anioni nel promuovere il processo di aggregazione. In particolare, si è constatato come gli ioni tiocianato e perclorato, anioni aventi forte carattere caotropico, siano molto efficienti nell'indurre l'aggregazione in tempi rapidi e ad una concentrazione di sale di ben due ordini di grandezza inferiore rispetto a quanto riscontrato con altri anioni. Uno studio comparativo più dettagliato è stato condotto sull'effetto determinato dagli ioni tiocianato e nitrato verificando la sussistenza di una correlazione tra la costante di velocità, la concentrazione dello ione e la percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato ricavata tramite calcoli di deconvoluzione degli spettri UV/Vis. Le costanti di velocità calcolate per i vari anioni e normalizzate per la loro concentrazione, sono state correlate con il coefficiente B di Jones-Dole, trovando due distinte correlazioni per gli ioni cosmotropici e caotropici con andamenti invertiti della serie di Hofmeister riconducibili, anche in questo caso, alla legge di corrispondenza dell'affinità dell'acqua e quindi alla specificità delle interazioni ione-ione.

Per quanto concerne lo studio dell'aggregazione della porfirina TPPS₄ in letteratura era già stato riscontrato l'effetto della natura dell'anione dell'acido

inorganico utilizzato per indurre l'aggregazione, accertando l'esistenza di una correlazione lineare tra le costanti di velocità e la capacità dei vari anioni di influenzare il network di legame idrogeno in accordo con la serie di Hofmeister. In questo progetto di ricerca, con il proposito di ottenere una maggiore riproducibilità dei dati cinetici e al fine di valutare al meglio un eventuale effetto dei cationi nella formazione degli aggregati J, si è proceduto ad elaborare un idoneo protocollo di mescolamento che ha previsto l'aggiunta di una soluzione premiscelata di acido cloridrico e sale (cloruri dei metalli alcalini ed alcalino-terrosi) ad una soluzione acquosa diluita di TPPS₄. Le evidenze spettroscopiche suggeriscono la formazione di aggregati J strutturalmente diversi dipendentemente dalla carica del catione impiegato. La costante di velocità del processo di aggregazione correla linearmente con la serie dei mono e dei dicationi mostrando due andamenti ben distinti in accordo con la serie di Hofmeister. Ulteriori correlazioni lineari sono state trovate tra i dati cinetici ed alcuni parametri strutturali caratteristici degli ioni in esame nonché alcuni parametri termodinamici, tra cui le energie di Gibbs di idratazione ($\Delta_{hyd}G$) e per la formazione di legami idrogeno ΔG_{HB} , la variazione di entropia strutturale $\Delta_{str}S$ ed il coefficiente di viscosità B di Jones-Dole. L'aver ottenuto delle correlazioni distinte a seconda del tipo di catione impiegato è in linea con il fatto che si formano due strutture differenti, un andamento ben diverso da quello riscontrato con la porfirina *t*-H₂P_{agg} dove la normalizzazione per la carica dei cationi, insito nel parametro B, ha permesso di correlare tutti i dati di velocità, in quanto si ha la formazione della medesima specie aggregata.

3.4 - Sezione sperimentale

Materiali e preparazione dei campioni

La porfirina *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$) come cloruro e la porfirina *meso*-tetrakis(4-solfonatofenil)porfirina (TPPS₄) come sale sodico sono state acquistate rispettivamente dalla Mid-Century Chemicals e Aldrich & Co. e sono state impiegate come ricevute, senza ulteriori purificazioni. Soluzioni stock di porfirina sono state preparate sciogliendo i rispettivi solidi in acqua purificata millipore e sono state conservate al riparo dalla luce ed utilizzate entro una settimana dalla loro preparazione. Le concentrazioni delle soluzioni sono state determinate per conoscenza del coefficiente di assorbività molare alla lunghezza d'onda della banda B ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ ¹³: $\epsilon_{419} = 2.40 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; TPPS₄⁸⁵: $\epsilon_{414} = 5.33 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). I sali ed i polimeri impiegati sono stati acquistati dalla ditta Aldrich & Co. ed utilizzati come ricevuti. In generale, tutte le soluzioni impiegate in questo studio sono state preparate impiegando acqua in fiale per preparazioni iniettabili acquistate dalla Galenica Senese.

Misure spettroscopiche

Gli spettri di assorbimento UV/Vis sono stati registrati con uno spettrofotometro Agilent mod. 8453 matrice di diodi utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico da 1 cm. Un filtro UV (Hoya UV-34, cut-off: 340 nm) è stato impiegato in tutte le misure cinetiche al fine di tagliare la componente ultravioletta della sorgente luminosa così da prevenire fenomeni di fotodegradazione delle porfirine. Gli esperimenti cinetici sono stati effettuati con l'ausilio del portacampione termostato dello strumento e lasciando equilibrare la temperatura (con accuratezza di $\pm 0.1 \text{ K}$) per almeno 20 minuti prima di procedere all'avvio di ogni *run* cinetico.

I calcoli di deconvoluzione degli spettri di estinzione sono stati condotti mediante software PeakFit® utilizzando la funzione 1 denominata “Gaussian-Lorentzian Sum (Amplitude)” i cui parametri sono qui riportati.

$$y = a_0 \left(\frac{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} \exp\left(-4 \ln 2 \left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right) + \frac{1 - a_3}{\pi a_2 \left(1 + 4 \left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right)}}{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} + \frac{1 - a_3}{\pi a_2}} \right) \quad (\text{Funz. 1})$$

a_0 = ampiezza

a_1 = centro banda

a_2 = larghezza (> 0)

a_3 = forma ($\geq 0, \leq 1$)

Gli spettri di emissione di fluorescenza e di resonance light scattering (RLS) sono stati effettuati per mezzo di uno spettrofluorimetro Jasco FP-750 equipaggiato con un fotomoltiplicatore Hamamatsu R928 e dotato di una lampada Xenon da 150 W. Gli esperimenti RLS sono stati eseguiti adottando un assetto di rilevamento ad angolo retto.²¹ Gli spettri di emissione di fluorescenza e di RLS sono stati corretti per l'assorbimento dei campioni.³²

Gli spettri di dicroismo circolare (CD) sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-720, equipaggiato con una lampada xenon a 450 W. L'elitticità è stata ottenuta attraverso calibrazione dello strumento con una soluzione acquosa al 0.06% di acido R-canforsolfonico. Gli spettri CD sono stati corretti dal contributo della cella e del solvente. Al fine di quantificare il segno e l'entità della chiralità supramolecolare è stato calcolato il fattore di asimmetria $g = \Delta\epsilon/\epsilon = \Delta A/A$ ⁸⁶ dove $\Delta A = \Theta/32980$, dove ΔA = unità di assorbanza e Θ = elitticità in mdeg.

Le misure del diametro idrodinamico medio (D_H) e della larghezza della distribuzione (PdI) sono state effettuate da uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, Regno Unito) a 298K in acqua ultrapura. I risultati sono riportati come media di tre misurazioni separate \pm le deviazioni standard.

3.5 - Riferimenti bibliografici

- (1) Benzinger, T. L. S.; Gregory, D. M.; Burkoth, T. S.; Miller-Auer, H.; Lynn, D. G.; Botto, R. E.; Meredith, S. C. Two-Dimensional Structure of β -Amyloid(10–35) Fibrils. *Biochemistry* **2000**, *39* (12), 3491.
- (2) Burkoth, T. S.; Benzinger, T. L. S.; Jones, D. N. M.; Hallenga, K.; Meredith, S. C.; Lynn, D. G. C-Terminal PEG Blocks the Irreversible Step in β -Amyloid(10-35) Fibrillogenesis. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (30), 7655.
- (3) Lashuel, H. A.; LaBrenz, S. R.; Woo, L.; Serpell, L. C.; Kelly, J. W. Protofilaments, Filaments, Ribbons, and Fibrils from Peptidomimetic Self-Assembly: Implications for Amyloid Fibril Formation and Materials Science. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (22), 5262.
- (4) Chen, S. H.; Huang, J. S.; Tartaglia, P. *Structure and dynamics of strongly interacting colloids and supramolecular aggregates in solution*; Springer Science & Business Media, **2012**.
- (5) Lehn, J. M. *Supramolecular chemistry*; Vch, **1995**.
- (6) Xue, X.; Lindstrom, A.; Li, Y. Porphyrin-Based Nanomedicines for Cancer Treatment. *Bioconjugate Chemistry* **2019**, *30* (6), 1585.
- (7) Ambrose, A.; Wagner, R. W.; Rao, P. D.; Riggs, J. A.; Hascoat, P.; Diers, J. R.; Seth, J.; Lammi, R. K.; Bocian, D. F.; Holten, D. et al. Design and Synthesis of Porphyrin-Based Optoelectronic Gates. *Chemistry of Materials* **2001**, *13* (3), 1023.
- (8) Chen, Y.; Li, A.; Huang, Z.-H.; Wang, L.-N.; Kang, F. In *Nanomaterials*, **2016**; Vol. 6.
- (9) Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (13), 5393.
- (10) Gibbs, E. J.; Tinoco, I., Jr.; Maestre, M. F.; Ellinas, P. A.; Pasternack, R. F. Self-assembly of porphyrins on nucleic acid templates. *Biochemical and biophysical research communications* **1988**, *157* (1), 350.
- (11) Pasternack, R. F.; Giannetto, A.; Pagano, P.; Gibbs, E. J. Self-assembly of porphyrins on nucleic acids and polypeptides. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (20), 7799.
- (12) Mallamace, F.; Micali, N.; Trusso, S.; Monsu'Scolaro, L.; Romeo, A.; Terracina, A.; Pasternack, R. F. Experimental evidence for self-similar structures in the aggregation of porphyrins in aqueous solutions. *Physical review letters* **1996**, *76* (25), 4741.
- (13) Mallamace, F.; Micali, N.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F.; Romeo, A.; Terracina, A.; Trusso, S. Porphyrin aggregation in aqueous solutions: small angle and quasielastic light scattering results. *Journal of Molecular Structure* **1996**, *383* (1), 255.
- (14) Micali, N.; Monsu' Scolaro, L.; Romeo, A.; Mallamace, F. Light absorption study of aggregating porphyrin in aqueous solutions. *Physical Review E* **1998**, *57* (5), 5766.
- (15) Micali, N.; Monsu' Scolaro, L.; Romeo, A.; Mallamace, F. Fractal aggregation in aqueous solutions of porphyrins. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **1998**, *249* (1), 501.

- (16) Mallamace, F.; Monsù Scolaro, L.; Romeo, A.; Micali, N. Crossover in the Kinetic Growth Process of Porphyrin Aggregation. *Physical Review Letters* **1999**, *82* (17), 3480.
- (17) Monsù Scolaro, L.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Mazzaglia, A.; Mallamace, F.; Micali, N. Nucleation effects in the aggregation of water-soluble porphyrin aqueous solutions. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **2002**, *304* (1), 158.
- (18) Pasternack, R. F.; Collings, P. J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. *Science* **1995**, *269* (5226), 935.
- (19) Ribó, J. M.; Crusats, J.; Farrera, J.-A.; Valero, M. L. Aggregation in water solutions of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, DOI:10.1039/C39940000681 10.1039/C39940000681(6), 681.
- (20) Akins, D. L.; Zhu, H. R.; Guo, C. Absorption and Raman scattering by aggregated meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl) porphine. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98* (14), 3612.
- (21) Pasternack, R. F.; Schaefer, K. F.; Hambright, P. Resonance light-scattering studies of porphyrin diacid aggregates. *Inorganic Chemistry* **1994**, *33* (9), 2062.
- (22) Micali, N.; Mallamace, F.; Romeo, A.; Purrello, R.; Monsù Scolaro, L. Mesoscopic Structure of meso-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphine J-Aggregates. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (25), 5897.
- (23) Krishnamurthy, M.; Sutter, J. R.; Hambright, P. Monomer–dimer equilibration of water-soluble porphyrins as a function of the co-ordinated metal ion. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1975**, DOI:10.1039/C39750000013 10.1039/C39750000013(1), 13.
- (24) Pasternack, R. F.; Huber, P. R.; Boyd, P.; Engasser, G.; Francesconi, L.; Gibbs, E.; Fasella, P.; Cerio Venturo, G.; Hinds, L. d. Aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (13), 4511.
- (25) Kalyanasundaram, K. *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*; Academic Press, **1992**.
- (26) Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. The nature of π - π interactions. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (14), 5525.
- (27) Micali, N.; Villari, V.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. From Fractal to Nanorod Porphyrin J-Aggregates. Concentration-Induced Tuning of the Aggregate Size. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (16), 8289.
- (28) Rich, C. C.; McHale, J. L. Influence of hydrogen bonding on excitonic coupling and hierarchal structure of a light-harvesting porphyrin aggregate. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (7), 2362.
- (29) Marcus, Y. Effect of Ions on the Structure of Water: Structure Making and Breaking. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (3), 1346.
- (30) Zhang, Y.; Cremer, P. S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Current opinion in chemical biology* **2006**, *10* (6), 658.
- (31) R. F. Pasternack; E. J. Gibbs; P. J. Collings; Paula, J. C. d. Non-conventional approach to supramolecular formation dynamics: the kinetics of assembly of DNA-bound porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (24).
- (32) Micali, N.; Mallamace, F.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. Separation of Scattering and Absorption Contributions in UV/Visible Spectra of Resonant Systems. *Analytical Chemistry* **2001**, *73* (20), 4958.

-
- (33) Marcus, Y. *Ions in Solution and their Solvation*, **2015**.
- (34) Jenkins, H. D. B.; Marcus, Y. Viscosity B-Coefficients of Ions in Solution. *Chemical Reviews* **1995**, *95* (8), 2695.
- (35) Marcus, Y. Thermodynamics of solvation of ions. Part 5.—Gibbs free energy of hydration at 298.15 K. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1991**, *87* (18), 2995.
- (36) Flores, S. C.; Kherb, J.; Konelick, N.; Chen, X.; Cremer, P. S. The Effects of Hofmeister Cations at Negatively Charged Hydrophilic Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (9), 5730.
- (37) Oncsik, T.; Trefalt, G.; Borkovec, M.; Szilagy, I. Specific Ion Effects on Particle Aggregation Induced by Monovalent Salts within the Hofmeister Series. *Langmuir* **2015**, *31* (13), 3799.
- (38) Asakereh, I.; Lee, K.; Francisco, O. A.; Khajepour, M. Hofmeister Effects of Group II Cations as Seen in the Unfolding of Ribonuclease A. *ChemPhysChem* **2022**, *23* (12), e202100884.
- (39) Kang, B.; Tang, H.; Zhao, Z.; Song, S. Hofmeister Series: Insights of Ion Specificity from Amphiphilic Assembly and Interface Property. *ACS Omega* **2020**, *5* (12), 6229.
- (40) Gregory, K. P.; Elliott, G. R.; Robertson, H.; Kumar, A.; Wanless, E. J.; Webber, G. B.; Craig, V. S. J.; Andersson, G. G.; Page, A. J. Understanding specific ion effects and the Hofmeister series. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2022**, *24* (21), 12682.
- (41) Assaf, K. I.; Nau, W. M. The Chaotropic Effect as an Assembly Motif in Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (43), 13968.
- (42) Collins, K. D. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical Journal* **1997**, *72* (1), 65.
- (43) Morris, D. F. C. In *Structure and Bonding*; C. K. Jørgensen; J. B. Neilands; Ronald S. Nyholm; D. Reinen; Williams, R. J. P., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, **1969**; Vol. 6.
- (44) Salis, A.; Ninham, B. W. Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (21), 7358.
- (45) Marcus, Y. Thermodynamics of ion hydration and its interpretation in terms of a common model. *Pure and Applied Chemistry* **1987**, *59* (9), 1093.
- (46) Collins, K. D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* **2004**, *34* (3), 300.
- (47) Kunz, W. Specific ion effects in colloidal and biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15* (1), 34.
- (48) Mason, P. E.; Neilson, G. W.; Dempsey, C. E.; Barnes, A. C.; Cruickshank, J. M. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (8), 4557.
- (49) Okur, H. I.; Hladílková, J.; Rembert, K. B.; Cho, Y.; Heyda, J.; Dzubiella, J.; Cremer, P. S.; Jungwirth, P. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (9), 1997.
- (50) Flores, S. C.; Kherb, J.; Cremer, P. S. Direct and Reverse Hofmeister Effects on Interfacial Water Structure. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (27), 14408.
- (51) Heyda, J.; Lund, M.; Ončák, M.; Slavíček, P.; Jungwirth, P. Reversal of Hofmeister Ordering for Pairing of NH₄⁺ vs Alkylated Ammonium Cations with Halide Anions in Water. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (33), 10843.
-

- (52) Ries-Kautt, M. M.; Ducruix, A. F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *The Journal of biological chemistry* **1989**, *264* (2), 745.
- (53) Zhang, Y.; Cremer, P. S. The inverse and direct Hofmeister series for lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (36), 15249.
- (54) Schwierz, N.; Horinek, D.; Netz, R. R. Reversed anionic Hofmeister series: the interplay of surface charge and surface polarity. *Langmuir* **2010**, *26* (10), 7370.
- (55) Zagami, R.; Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Monsù Scolaro, L. Inverse Kinetic and Equilibrium Isotope Effects on Self-Assembly and Supramolecular Chirality of Porphyrin J-Aggregates. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (1), 70.
- (56) Occhiuto, I. G.; Zagami, R.; Trapani, M.; Bolzonello, L.; Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Collini, E.; Monsù Scolaro, L. The role of counter-anions in the kinetics and chirality of porphyrin J-aggregates. *Chemical Communications* **2016**, *52* (77), 11520.
- (57) Friesen, B. A.; Nishida, K. R. A.; McHale, J. L.; Mazur, U. New Nanoscale Insights into the Internal Structure of Tetrakis(4-sulfonatophenyl) Porphyrin Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (5), 1709.
- (58) Scolaro, L. M.; Romeo, A.; Castriciano, M. A.; Micali, N. Unusual optical properties of porphyrin fractal J-aggregates. *Chemical communications* **2005**, (24), 3018.
- (59) Purrello, R.; Monsu'Scolaro, L.; Bellacchio, E.; Gurrieri, S.; Romeo, A. Chiral H-and J-type aggregates of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphine on α -helical polyglutamic acid induced by cationic porphyrins. *Inorganic chemistry* **1998**, *37* (14), 3647.
- (60) Trapani, M.; Mazzaglia, A.; Piperno, A.; Cordaro, A.; Zagami, R.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. Novel nanohybrids based on supramolecular assemblies of meso-tetrakis-(4-sulfonatophenyl) porphyrin J-aggregates and amine-functionalized carbon nanotubes. *Nanomaterials* **2020**, *10* (4), 669.
- (61) Occhiuto, I. G.; Castriciano, M. A.; Trapani, M.; Zagami, R.; Romeo, A.; Pasternack, R. F.; Monsù Scolaro, L. Controlling J-Aggregates formation and chirality induction through demetallation of a zinc (II) water soluble porphyrin. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (11), 4001.
- (62) Castriciano, M. A.; Trapani, M.; Romeo, A.; Depalo, N.; Rizzi, F.; Fanizza, E.; Patanè, S.; Monsù Scolaro, L. Influence of magnetic micelles on Assembly and deposition of porphyrin J-aggregates. *Nanomaterials* **2020**, *10* (2), 187.
- (63) Zagami, R.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Trapani, M.; Pedicini, R.; Scolaro, L. M. Tuning supramolecular chirality in nano and mesoscopic porphyrin J-aggregates. *Dyes and Pigments* **2017**, *142*, 255.
- (64) Castriciano, M. A.; Leone, N.; Cardiano, P.; Manickam, S.; Scolaro, L. M.; Schiavo, S. L. A new supramolecular polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS)–porphyrin nanohybrid: Synthesis and spectroscopic characterization. *Journal of Materials Chemistry C* **2013**, *1* (31), 4746.
- (65) Lauceri, R.; Gurrieri, S.; Bellacchio, E.; Contino, A.; Monsu'scolaro, L.; Romeo, A.; Toscano, A.; Purrello, R. J-type aggregates of the anionic meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphine induced by ,hindered' cationic porphyrins. *Supramolecular Chemistry* **2000**, *12* (2), 193.
- (66) Randazzo, R.; Mamma, A.; D'Urso, A.; Lauceri, R.; Purrello, R. Reversible “chiral memory” in ruthenium tris (phenanthroline)–anionic porphyrin complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (51), 9879.

- (67) Wang, J.; Liu, C.; Ding, D.; Zeng, L.; Cao, Q.; Zhang, H.; Zhao, H.; Li, X.; Xiang, K.; He, Y. Aggregation of an anionic porphyrin with chiral metal complexes and the competitive binding influences of a surfactant and a polyelectrolyte. *New Journal of Chemistry* **2011**, *35* (7), 1424.
- (68) Wang, J.; Ding, D.; Zeng, L.; Cao, Q.; He, Y.; Zhang, H. Transformation, memorization and amplification of chirality in cationic Co (III) complex–porphyrin aggregates. *New Journal of Chemistry* **2010**, *34* (7), 1394.
- (69) Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Scolaro, L. M. Aggregation of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin on polyethyleneimine in aqueous solutions and on a glass surface. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2002**, *6* (06), 431.
- (70) Mollaeva, M. R.; Yabbarov, N.; Sokol, M.; Chirkina, M.; Mollaev, M. D.; Zabolotskii, A.; Seregina, I.; Bolshov, M.; Kaplun, A.; Nikolskaya, E. In *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**; Vol. 22.
- (71) Maiti, N. C.; Ravikanth, M.; Mazumdar, S.; Periasamy, N. Fluorescence dynamics of noncovalently linked porphyrin dimers, and aggregates. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99* (47), 17192.
- (72) Trapani, M.; Occhiuto, I. G.; Zagami, R.; De Luca, G.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F. Mechanism for Copper(II)-Mediated Disaggregation of a Porphyrin J-Aggregate. *ACS Omega* **2018**, *3* (12), 18843.
- (73) Occhiuto, I.; De Luca, G.; Trapani, M.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F. Peripheral Stepwise Degradation of a Porphyrin J-Aggregate. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (19), 10074.
- (74) Occhiuto, I. G.; Castriciano, M. A.; Trapani, M.; Zagami, R.; Romeo, A.; Pasternack, R. F.; Monsù Scolaro, L. In *International Journal of Molecular Sciences*, **2020**; Vol. 21.
- (75) Romeo, A.; Angela Castriciano, M.; Scolaro, L. M. Spectroscopic and kinetic investigations on porphyrin J-aggregates induced by polyamines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2010**, *14* (08), 713.
- (76) Knapp, E. W. Lineshapes of molecular aggregates, exchange narrowing and intersite correlation. *Chemical Physics* **1984**, *85* (1), 73.
- (77) Knapp, E. W.; Scherer, P. O. J.; Fischer, S. F. On the lineshapes of vibronically resolved molecular aggregate spectra. application to pseudoisocyanin (PIC). *Chemical Physics Letters* **1984**, *111* (4), 481.
- (78) Koti, A. S. R.; Taneja, J.; Periasamy, N. Control of coherence length and aggregate size in the J-aggregate of porphyrin. *Chemical Physics Letters* **2003**, *375* (1), 171.
- (79) Castriciano, M. A.; Cardillo, S.; Zagami, R.; Trapani, M.; Romeo, A.; Scolaro, L. M. Effects of the mixing protocol on the self-assembling process of water soluble porphyrins. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (2), 797.
- (80) Villari, V.; Mazzaglia, A.; Trapani, M.; Castriciano, M. A.; de Luca, G.; Romeo, A.; Scolaro, L. M.; Micali, N. Optical Enhancement and Structural Properties of a Hybrid Organic–Inorganic Ternary Nanocomposite. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (13), 5435.
- (81) Vlachy, N.; Jagoda-Cwiklik, B.; Vácha, R.; Touraud, D.; Jungwirth, P.; Kunz, W. Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions. *Advances in colloid and interface science* **2009**, *146* (1-2), 42.
- (82) Maiti, N. C.; Mazumdar, S.; Periasamy, N. J- and H-aggregates of porphyrin–surfactant complexes: time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (9), 1528.

- (83) El-Hachemi, Z.; Balaban, T. S.; Campos, J. L.; Cespedes, S.; Crusats, J.; Escudero, C.; Kamma-Lorger, C. S.; Llorens, J.; Malfois, M.; Mitchell, G. R. Effect of Hydrodynamic Forces on meso-(4-Sulfonatophenyl)-Substituted Porphyrin J-Aggregate Nanoparticles: Elasticity, Plasticity and Breaking. *Chemistry–A European Journal* **2016**, 22 (28), 9740.
- (84) Villari, V.; Mineo, P.; Scamporrino, E.; Micali, N. Role of the hydrogen-bond in porphyrin J-aggregates. *RSC Advances* **2012**, 2 (33), 12989.
- (85) Ribó, J. M.; Crusats, J.; Farrera, J.-A.; Valero, M. L. Aggregation in water solutions of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1994**, 6, 681.
- (86) Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular dichroism: principles and applications*; John Wiley & Sons, **2000**.

Capitolo 4

*Chirogenesi supramolecolare
di aggregati porfirinici*

4.1 - Introduzione

Uno degli aspetti più intriganti dell'evoluzione della vita è che tutti gli organismi viventi si formano attraverso processi di *self-assembly*, una sorta di straordinario processo di “*design*” che avviene in ambito biologico ed attraverso il quale una struttura organizzata si costruisce apparentemente da sola a partire da un insieme disordinato di parti più piccole. In questo senso, basta pensare ai filamenti di DNA che si uniscono per formare la doppia elica che codifica il nostro genoma, oppure al *self-assembly* di cellule in tessuti embrionali che ulteriormente si trasformano in esseri umani ed animali completamente formati. Una corretta razionalizzazione dei processi naturali di *self-assembly* rappresenta quindi un valido strumento per l'ingegnerizzazione di un'ampia varietà di sistemi complessi, dotati di funzionalità e proprietà specifiche. In questo contesto la chiralità è un'intrigante proprietà che assume vitale importanza in natura, ma di grande impatto anche in molti altri campi, tra cui la chimica, la biologia, la fisica e la scienza dei materiali.¹⁻⁶ La chiralità si presenta, oltre che a livello molecolare, solitamente in forme più esoteriche, come le strutture secondarie delle proteine, il DNA a doppio filamento⁷⁻¹³ e le eliche su scala nanometrica nei biosistemi.^{14,15} Dunque, l'espressione della chiralità dal livello molecolare a quello supramolecolare, rappresenta un argomento di grande interesse e volto all'interpretazione dell'omochiralità della vita e dei fenomeni di *symmetry breaking*. La comprensione dei meccanismi con i quali avviene il trasferimento, l'amplificazione e la memoria dell'informazione chirale diventa quindi la chiave essenziale per comprendere al meglio i delicati processi biologici dove il riconoscimento molecolare e la selettività giocano un ruolo cruciale. La progettazione e la sintesi di sistemi supramolecolari in grado di riportare selettivamente l'informazione chirale indotta dalla singola molecola e/o da biomolecole è conseguentemente diventata una tematica di grande attualità per le sue implicazioni sia nella ricerca di base che in campo applicativo.¹⁶⁻²⁶ In particolare, molte ricerche sono state rivolte allo studio di sistemi supramolecolari che possano

agire come sensori ottici in grado di rilevare celermente l'informazione chirale trasmessa da campioni, anche molto diluiti. In quest'ottica le porfirine rappresentano una classe di composti ampiamente impiegata grazie alle loro peculiari caratteristiche spettroscopiche e alla relativa facilità con cui è possibile modularne le proprietà chimico-fisiche agendo sulle proprietà del mezzo, fattori in grado di influenzare drasticamente la propensione al *self-assembly* dei monomeri.²⁷⁻³⁰ A questo riguardo, in letteratura è stato riportato come sistemi etero-aggregati di porfirine sono in grado di rilevare ed amplificare la presenza di tracce di clusters di amminoacidi³¹⁻³⁴ o di matrici templanti quali polipeptidi.³⁵⁻³⁸ Mentre per gli aggregati J della porfirina TPPS₄ si è ipotizzato che i peculiari segnali di dicroismo circolare potrebbero attribuirsi alla presenza di contaminanti chirali (ad es. membrane batteriche) presenti in tracce nell'acqua ultrapura,³⁹ o dall'aggiunta di templanti chirali.⁴⁰⁻⁴⁴ Alcuni studi hanno poi evidenziato l'impiego di porfirine come promettenti biosensori per studi conformazionali del DNA.^{45,46} In particolare è stato dimostrato come il derivato di zinco(II) della *meso*-tetrakis(4-N-metilpiridinio)porfirina (ZnT₄) costituisca una promettente sonda chirottica per rilevare la conformazione a zig-zag del DNA levogiro (Z-DNA),^{47,48} mentre il derivato di Ni(II) della *meso*-tetrakis(4-solfonatofenil)porfirina (NiTPPS₄) è in grado di discriminare spettroscopicamente tra il B-DNA destrogiro e Z-DNA levogiro.^{45,49}

In passato è stato anche dimostrato come la porfirina *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina (*t*-H₂P_{agg}) e il suo derivato di rame(II) (*t*-CuP_{agg}) sono in grado di formare estesi aggregati supramolecolari chirali sugli acidi nucleici.^{50,51} Più recentemente, alcuni studi hanno evidenziato come la porfirina *t*-CuP_{agg} sia nella sua forma di semplice dimero⁵² che in forma di estesi aggregati di natura frattalica^{53,54} agisce da sensore chirottico in grado di rilevare la conformazione e la chiralità di un biopolimero quale il poligluttammato (PGA).

Negli studi intrapresi nel capitolo 3 è stato sottolineato come, impiegando una vasta gamma di sali sodici, la porfirina *t*-H₂P_{agg} forma estesi aggregati in soluzione esibendo cinetiche di aggregazione la cui velocità è strettamente correlata alla natura

dell'anione. Tra quest'ultimi, lo ione tiocianato è risultato il più efficiente e quello in grado di formare gli aggregati più piccoli ed alla più bassa concentrazione di sale. Tale specificità ci ha indotto a verificare se, parimenti alla porfirina $t\text{-CuP}_{\text{agg}}$, anche questa tipologia di aggregati fossero in grado di agire da sonde molecolari chirottiche impiegando poligluttammato (Figura 1) e testando anche altri biopolimeri carichi negativamente. L'aggregato chirale risultante è stato ulteriormente impiegato come template per la formazione di eteroaggregati evidenziando la possibilità di indurre la formazione di aggregati J chirali della porfirina TPPS₄ in condizioni sperimentali inusuali.

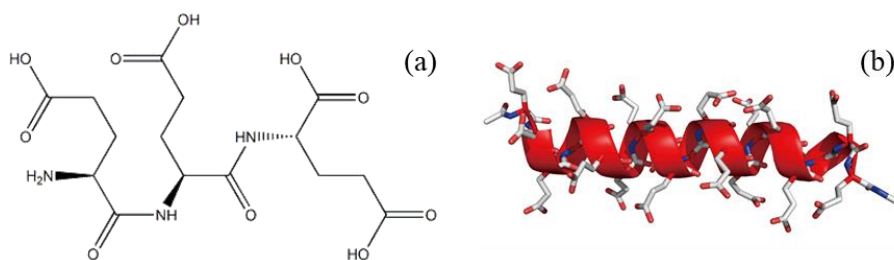


Figura 1. Struttura molecolare dell'acido poligluttammico (PGA) (a) e struttura realizzata mediante REMD²³ dell'acido poligluttammico in conformazione α -elica (b).

4.2 - Risultati e discussioni

4.2.1 - Induzione di chiralità con PGA

I clusters porfirinici sui quali sono stati condotti gli studi di induzione di chiralità sono quelli formati mediante l'impiego dei sali NaSCN e NaNO₃. La scelta è giustificata dal volere effettuare uno studio comparativo tra le due specie sulla base delle risultanze sperimentali ottenute nel capitolo 3 e più precisamente: (i) entrambi gli anioni in esame evidenziano carattere caotropico e determinano cinetiche di formazione sufficientemente veloci inducendo l'aggregazione anche a bassa concentrazione di sale; (ii) misure di DLS hanno però evidenziato nel caso dell'anione tiocianato la formazione di clusters di dimensioni ridotte ($D_H \approx 200$ nm) rispetto a ciò che si verifica con lo ione nitrato ($D_H > 1$ μ m).

In Figura 2 sono riportate le caratteristiche spettroscopiche relative agli aggregati della porfirina *t*-H₂P_{agg} indotti da tiocianato e nitrato sodico e il corrispondente effetto all'aggiunta di L-PGA in conformazione di α -elica. Come già discusso nel capitolo precedente, i due sistemi aggregati non mostrano variazioni nelle posizioni delle bande di assorbimento evidenziando soltanto una differenza nella distribuzione tra le bande relative al monomero residuo (419 nm) e all'aggregato (450 nm). Questa differenza è riconducibile sia alla diversa concentrazione di sale impiegata, nonché al diverso carattere caotropico dell'anione in grado di influenzare la velocità del processo di aggregazione. Gli spettri RLS mostrano, nella regione compresa tra 350 e 650 nm, un forte innalzamento del segnale caratterizzato da intensi picchi in accordo con la presenza di estesi aggregati in soluzione, risultando un segnale decisamente più intenso nel caso dello ione tiocianato. Le soluzioni aggregate risultano essere stabili nel tempo necessario ad eseguire gli esperimenti, un aspetto molto importante e determinato dall'impiego di una bassa concentrazione di sale che conduce ad una maggiore stabilità del sistema colloidale. In realtà,

l'aggregato formato con ione tiocianato, in virtù delle sue ridotte dimensioni (Tabella 1) risulta ancora più stabile nel tempo, il che lo rende idoneo come sistema template per sistemi aggregati superiori come verrà descritto in seguito. L'aggregato della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto da qualsivoglia sale sodico risulta essere otticamente inattivo non mostrando alcun segnale CD (Figura 3). In realtà studi condotti da Avnir hanno sottolineato che, anche in assenza di inducenti chirali, i clusters frattalici sono da intendersi intrinsecamente chirali in quanto la loro immagine speculare virtuale non è sovrapponibile al cluster stesso.^{55,56} In ogni caso, la natura caotica del processo di aggregazione dovrebbe condurre ad una miscela statistica di tipo racemico avente un'ampia distribuzione di ipotetiche forme enantiomeriche.^{55,56} In analogia a ciò che è stato riportato per la porfirina $t\text{-CuP}_{\text{agg}}$ ^{52,53} le specie aggregate formate con la $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ sono anch'esse dotate di una residua carica positiva e caratterizzate da una certa porosità, un insieme di caratteristiche che rendono possibile l'immediata interazione di biopolimeri carichi negativamente e strutturalmente adeguati in termini di dimensione. Come da premessa, il biopolimero impiegato è il L-PGA, il quale indipendentemente dalla sua forma enantiomerica, in condizioni di sufficiente acidità ($\text{pH} < 5$), adotta una conformazione di α -elica la cui elicità dipende dalla configurazione assoluta dell'aminoacido (Figura 4).⁵⁷ In base a queste premesse, aggiungendo L-PGA nella sua conformazione otticamente attiva alla soluzione degli aggregati porfirinici, l'interazione è tale da indurre chiralità al sistema frattalico con parziale risoluzione del sistema racemo. Tutto ciò è sostanziato dalla presenza, nella regione di assorbimento dell'aggregato, di intensi segnali bisegnati di dicroismo circolare indotto molto più intensi ed asimmetrici nel caso specifico dell'aggregato indotto da NaSCN. Questo aspetto è ancora più evidente se si confrontano i valori relativi al fattore di asimmetria (o anisotropia) $g = |\Delta\epsilon/\epsilon|$ ($g = |\Delta A/A|$),^{58,59} per il processo di aggregazione indotto dai due diversi sali (Tabella 1). Questo parametro, che altro non è che la misura della qualità dell'oscillatore, risulta essere una quantità adimensionale estremamente importante nel momento in cui è necessario comparare segni ed intensità di segnali CD tra campioni diversi. Per quanto concerne gli spettri UV/Vis, l'aggiunta di L-PGA determina una diminuzione in intensità della banda

relativa al monomero residuo ed al contempo, gli spettri di RLS mostrano un considerevole aumento dell'intensità di segnale (Figura 2).

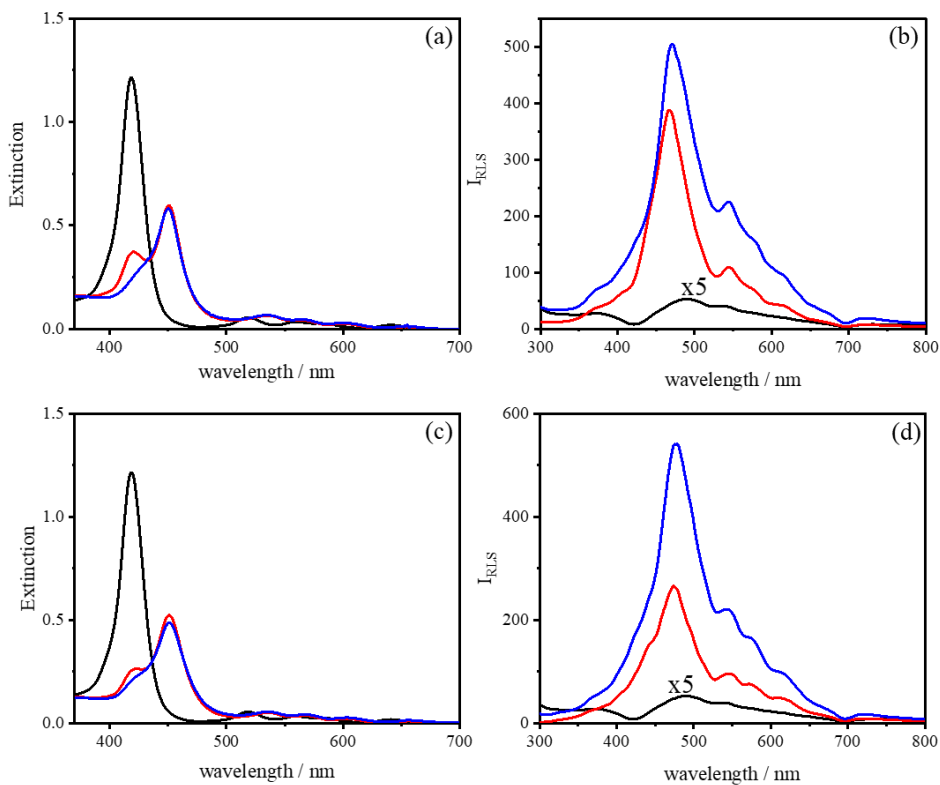


Figura 2. Spettri UV/Vis e spettri RLS della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera), del relativo aggregato finale (linea rossa) formato con NaSCN (a-b) e NaNO_3 (c-d) e dell'aggregato in presenza di L-PGA (linea blu). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_3] = 25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$.

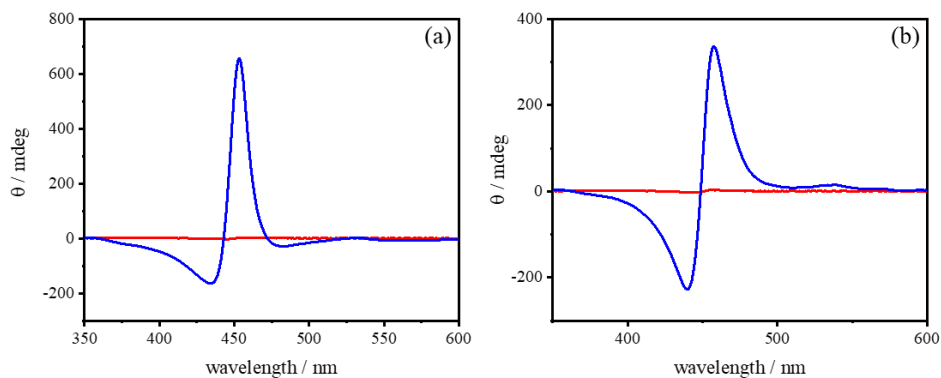


Figura 2. Spettri CD dell'aggregato finale della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea rossa) formato con NaSCN (a) e NaNO_3 (b) e in presenza di L-PGA (linea blu). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_3] = 25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$.

Tabella 1. Diametri idrodinamici (D_H) e fattore di asimmetria (g) per gli aggregati della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ ottenuti impiegando gli anioni tiocianato e nitrato.

Anione	c / mM	D_H / nm	g
SCN^-	1	225.80 ± 5.69	$4.3 \cdot 10^{-2}$
NO_3^-	25	> 1000	$3.5 \cdot 10^{-2}$

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_3] = 25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$.

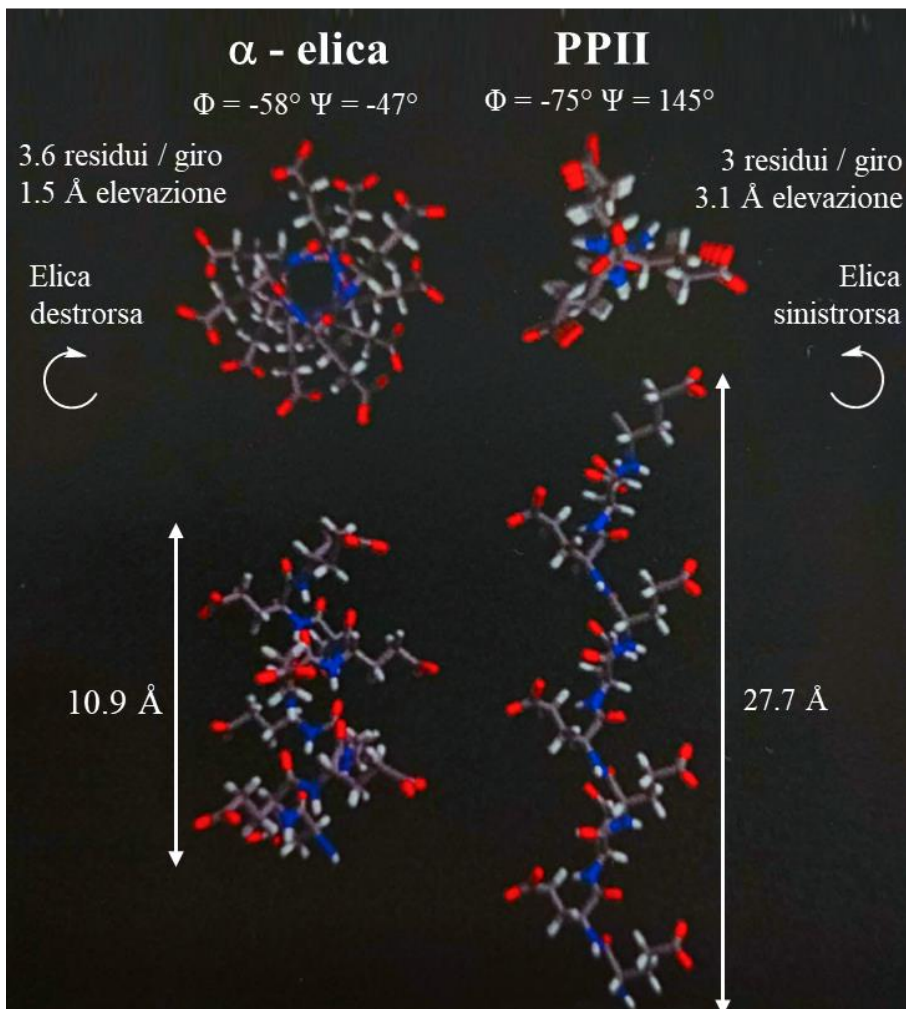


Figura 4. Modello molecolare dell'acido deca-glutammico che mostra le differenze strutturali caratteristiche delle conformazioni ad α -elica e della poliprolina II (PPII).

In Figura 5 sono riportati gli spettri CD relativi ai due sistemi aggregati al variare della concentrazione del sale impiegato per indurre il processo. Da un'attenta analisi si deduce un andamento contrario in base al tipo di sale impiegato; nel caso dello ione tiocianato si osserva una diminuzione di intensità dei segnali CD all'aumentare della forza ionica, mentre per lo ione nitrato una tendenza opposta. Questa osservazione è avvalorata dall'esistenza di una correlazione lineare tra il fattore di asimmetria (g) e la concentrazione di sale impiegato che però vede pendenze opposte in base

all'anione coinvolto (Figura 6). Al fine di potere meglio valutare una correlazione tra l'informazione chirale indotta, espressa dal fattore di asimmetria e la quantità relativa di monomero e/o di aggregato, sono stati effettuati dei calcoli di deconvoluzione (già descritti nel capitolo 3) degli spettri elettronici registrati alla fine del processo cinetico di aggregazione.

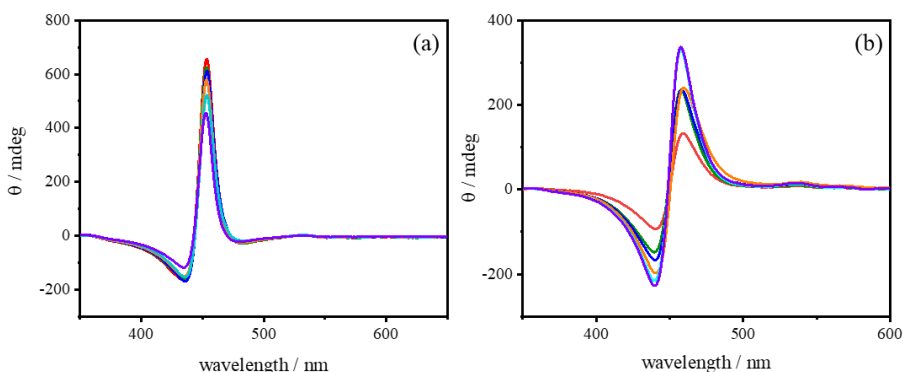


Figura 5. Spettri CD registrati dopo l'aggiunta di L-PGA ai clusters porfirinici formato a varie concentrazioni di NaSCN (a) e di NaNO₃ (b). a: 1 mM (linea rossa); 1.25 mM (linea verde); 1.5 mM (linea blu); 1.75 mM (linea arancione); 2.00 mM (linea azzurra); 3.00 mM (linea viola). b: 10 mM (linea rossa); 15 mM (linea verde); 17 mM (linea blu); 20 mM (linea arancione); 22 mM (linea azzurra); 25 mM (linea viola). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1\text{-}3 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_3] = 10\text{-}25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampono acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$.

In Tabella 2 e Tabella 3 sono riportati i valori della distribuzione percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato, unitamente ai fattori di asimmetria relativi ai clusters porfirinici chirali formati in seguito all'aggiunta di varie concentrazioni di ioni tiocianato e nitrato.

Tabella 2. Distribuzione percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato e fattore di asimmetria (g) in funzione della concentrazione di anione SCN^- .

$[\text{SCN}^-] / \text{mM}$	% Int Area (450 nm)	$10^2 \cdot g$
1.00	69.08	4.30
1.25	72.71	3.84
1.50	81.76	3.70
1.75	86.86	3.41
2.00	83.46	3.26
3.00	93.18	2.57

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1\text{-}3 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8, T = 298 K.

Tabella 3. Distribuzione percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato e fattore di asimmetria (g) in funzione della concentrazione di anione NO_3^- .

$[\text{NO}_3^-] / \text{mM}$	% Int Area (450 nm)	$10^2 \cdot g$
10	36.78	1.79
15	61.21	2.56
17	64.53	2.67
20	71.24	3.08
22	75.90	3.32
25	80.40	3.52

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaNO}_3] = 10\text{-}25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8, T = 298 K.

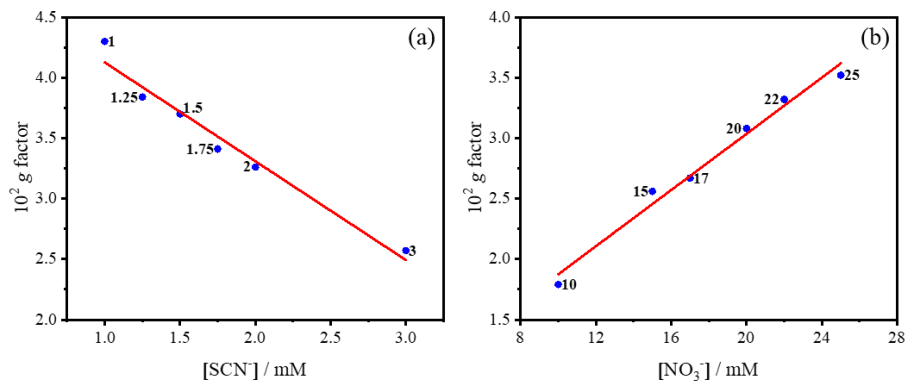


Figura 6. Andamento del fattore di asimmetria (g) al variare della concentrazione di ione tiocianato (a) e di ione nitrato (b). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1\text{-}3 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_3] = 10\text{-}25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.967$ (a), $R^2 = 0.984$ (b).

La

Figura 7 mostra l'esistenza di una relazione lineare tra la variazione del fattore di asimmetria e la distribuzione percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato a 450 nm.

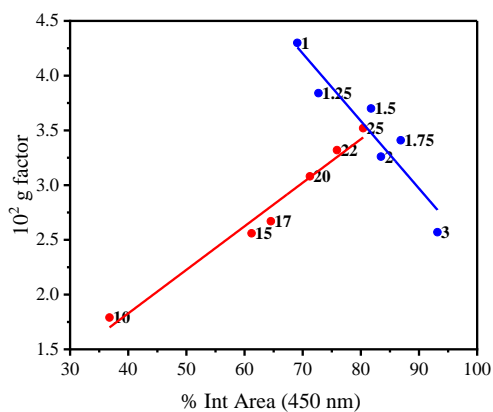


Figura 7. Correlazione tra il fattore di asimmetria (g) e la percentuale dell'area integrata della banda dell'aggregato (λ_{450}) al variare della concentrazione di NaSCN (linea blu) e NaNO_3 (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1\text{-}3 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_3] = 10\text{-}25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.881$ (linea blu), $R^2 = 0.975$ (linea rossa).

Nel caso dello ione nitrato, l'andamento conferma una maggiore efficienza del trasferimento di chiralità all'aumentare della quantità di aggregato, mentre per lo ione tiocianato sussiste l'andamento opposto rendendo plausibile il possibile coinvolgimento del rapporto relativo monomero residuo/aggregato nel processo di induzione dell'informazione chirale. In realtà, questo andamento potrebbe essere ricondotto al diverso grado di porosità del sistema porfirinico aggregato. È stato, infatti, dimostrato come la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ sia soggetta, all'aumentare della forza ionica (NaCl), a diversi regimi di aggregazione caratterizzati da un diverso valore di dimensione frattalica e quindi di porosità, un comportamento simile a quello delle sospensioni di latex.⁶⁰ Più specificamente, all'aumentare della velocità del processo di aggregazione la struttura che si forma è caratterizzata da una maggiore porosità. Dal punto di vista della spettroscopia UV/Vis è stato evidenziato come un meccanismo di crescita di questo tipo (DLCCA, *Diffusion-Limited-Cluster-Cluster Aggregation*) determina una minima frazione di monomero in equilibrio con l'aggregato, una situazione del tutto simile a quella riscontrata nel caso delle concentrazioni più elevate di ione tiocianato impiegate in questo studio. Dunque, nell'ipotesi che la struttura porfirinica sia maggiormente porosa è plausibile che si possa riscontrare un minore grado di interazione del polimero in conformazione di α -elica all'interno delle cavità idrofobiche del sistema, una condizione necessaria affinché avvenga il trasferimento dell'informazione chirale.⁵³ Tra le altre cose, le evidenze sperimentali dimostrano che, al variare della concentrazione di tiocianato, le dimensioni dei clusters porfirinici sono abbastanza piccole ($D_H \approx 200 \pm 50$ nm). Il polimero impiegato in questo studio possiede 95 residui amminoacidici e la lunghezza media della singola catena può stimarsi intorno ai 12/14 nm. In base ad una comparazione delle dimensioni si può anche presumere che l'interazione delle eliche del polipeptide, in strutture ad alta porosità, possa risultare minore (Figura 8). Ovviamente le considerazioni fatte sono puramente speculative, una maggiore certezza su questo tipo di interazione la si potrebbe avere soltanto effettuando mirati esperimenti, in particolare di diffusione quasi elastica della luce (QELS).

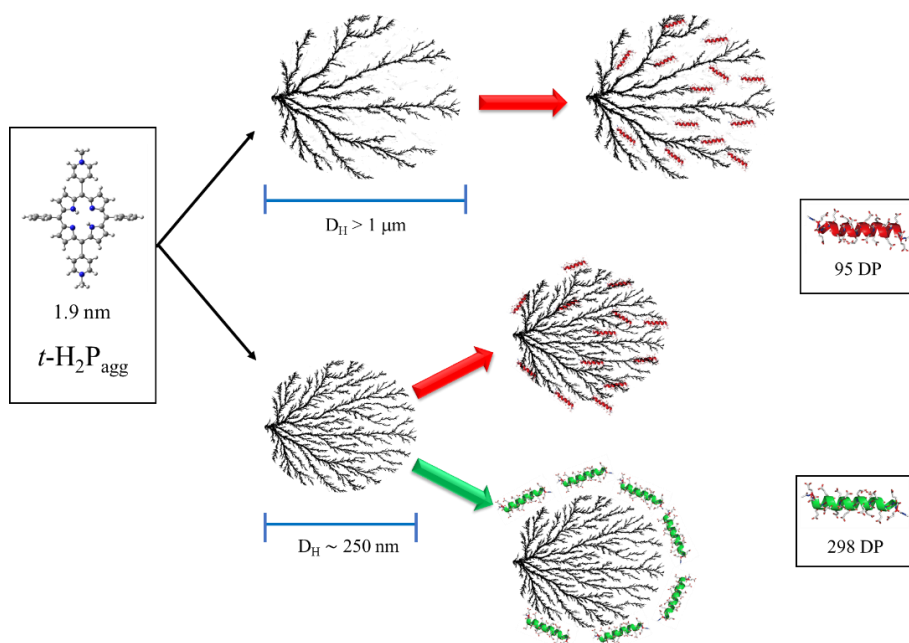


Figura 8. Rappresentazione schematica della possibile interazione tra clusters porfirinici di differente struttura e PGA a diversa massa molecolare.

In Figura 9 è comunque riportata la correlazione tra il fattore di asimmetria (g) ed il corrispondente valore di RLS al variare della concentrazione di NaSCN. L'interpretazione dei dati implica, a riscontro di quanto detto, che l'entità di chiralità trasferita dal biopolimero ai clusters porfirinici è correlata alla natura degli stessi ed al grado di accoppiamento elettronico dei suoi costituenti molecolari.

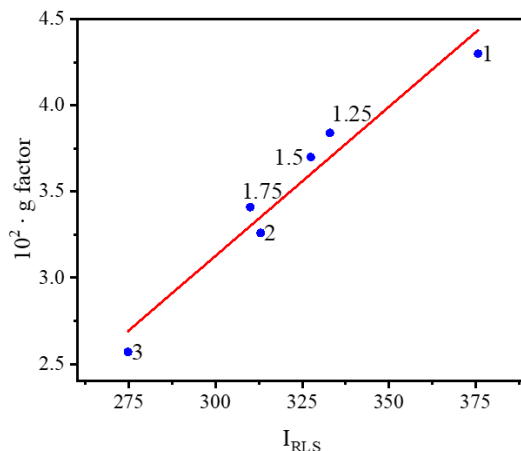


Figura 9. Correlazione tra il fattore di asimmetria (g) e l'intensità del segnale RLS dopo l'aggiunta di L-PGA ai clusters porfirinici formato a varie concentrazioni di NaSCN. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{agg}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1\text{-}3 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampono acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$. Fitting lineare: $R^2 = 0.952$ (linea rossa). I valori dei segnali RLS sono stati corretti attraverso l'Eq. 2⁶¹ $(I_{RLS})_{corr} = I_{RLS} \cdot 10^{-Ext}$.

In linea con quanto detto, in Figura 10 è riportata una comparazione degli spettri CD ottenuti con L-PGA a diversa lunghezza di catena e massa molecolare per il sistema aggregato indotto alla concentrazione più bassa di NaSCN. La notevole differenza di intensità dei segnali induce ragionevolmente a considerare che frammenti peptidici più grandi possano interagire più facilmente sulla superficie esterna dei clusters porfirinici piuttosto che al loro interno, riducendo l'efficienza dell'induzione chirale (Figura 8).

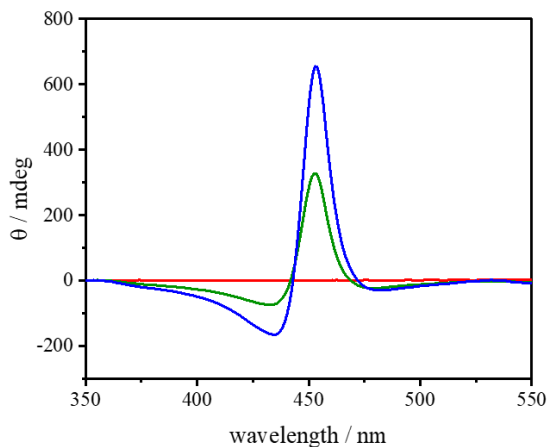


Figura 10. Spettri CD ottenuti alla fine del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea rossa) indotto in seguito all'aggiunta di L-PGA di diverso grado di polimerizzazione: DP = 95, MW = 14kD (linea blu), DP = 294, MW = 44 kD (linea verde). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, pH = 3.8, T = 298 K.

A pH 3.8, quando il polipeptide adotta una conformazione ad α -elica con elicità dipendente dalla forma enantiomerica dell'unità di glutammato, i clusters porfirinici rispondono prontamente al tipo di conformazione adottata dal polimero rivelando due segnali CD speculari corrispondenti all'elica destrorsa e sinistrorsa di L- e D-PGA (Figura 11). Comprensibilmente, il diverso effetto Cotton osservato per le due conformazioni rappresenta un utile strumento per il riconoscimento della chiralità delle proteine.

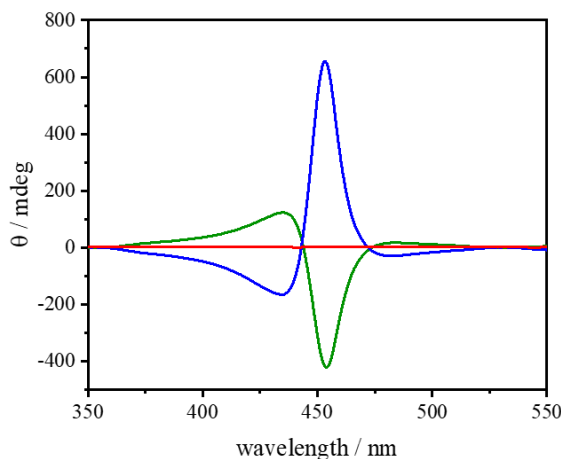


Figura 11. Spettri CD ottenuti alla fine del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea rossa) indotto in seguito all'aggiunta di L-PGA (blu) e D-PGA (verde). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$.

L'acido poligluttammico è un sistema modello ideale per studiare la transizione α -elica \leftrightarrow *random coil* poiché la sua struttura secondaria è altamente sensibile non solo alla temperatura, ma anche al pH.⁶² Molto interessante è la risposta osservata quando i clusters porfirinici interagiscono con la matrice polimerica a pH neutro. In queste condizioni sperimentali, il polipeptide adotta una conformazione *random coil*, meglio conosciuta come struttura poliprolina(II) che rappresenta una conformazione dominante nello stato denaturato dei peptidi, anche quando non sono presenti proline nella sequenza. La transizione conformazionale determina un'inversione dell'elicità cosicché l' α -elica destrogira del L-PGA è convertita in una struttura secondaria con elicità levogira (Figura 4). Quando i clusters porfirinici interagiscono con L-PGA in conformazione *random coil*, gli spettri CD mostrano dei segnali indotti caratterizzati da effetti Cotton opposti. In Figura 12 sono riportati gli spettri CD relativi all'induzione di chiralità sia nel caso dei clusters formati all'aggiunta di tiocianato che nel caso del nitrato. Come si può vedere, mentre la conformazione ad α -elica induce un intenso segnale con effetto Cotton negativo – positivo – negativo, la

conformazione *random coil* porta alla formazione di un segnale molto debole (oltre 20 volte) con effetto Cotton inverso.

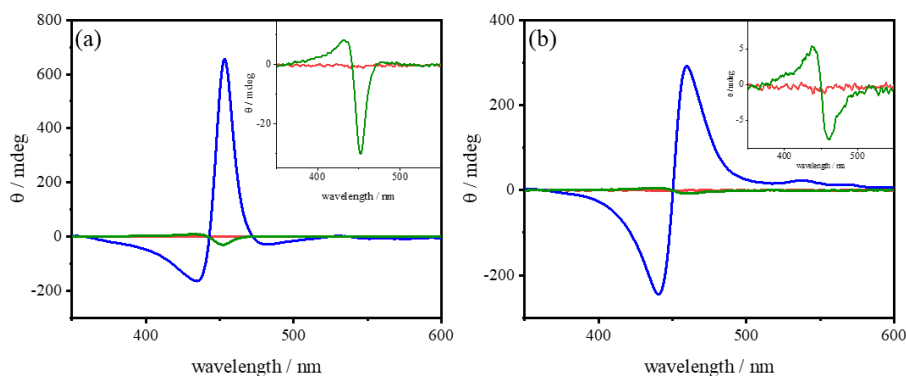


Figura 3: Spettri CD registrati dopo l'aggiunta di L-PGA, in conformazione di α -elica (linea blu) o *random coil* (linea verde), ai clusters porfirinici della $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea rossa) formati in seguito all'aggiunta di SCN^- (a) e NO_3^- (b). Inset: ingrandimento di alcuni spettri nella regione 350-550 nm. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_3] = 25 \text{ mM}$, $[\text{PGA}] = 100 \mu\text{M}$ (α -elica: [tampono acetato] = 2 mM, pH = 3.8; *random coil*: pH 7), T = 298 K.

Quest'ultimo aspetto non è sorprendente ed è riconducibile al fatto che il grado di informazione chirale del PGA in una conformazione *random coil* è molto inferiore a quello delle α -eliche, e per i sistemi finora studiati, i cromofori che interagiscono con questa proteina a pH 7 hanno mostrato segnali ICD marcatamente ridotti come conseguenza della transizione da elica a coil.^{36,52,63} Con l'obiettivo di chiarire meglio l'induzione di chiralità tra il PGA e i cluster porfirinici, sono stati condotti degli esperimenti di *pH-jump* finalizzati a commutare la conformazione del polimero più volte nello stesso esperimento. Come mostrato in Figura 4 nel caso dell'aggregato formato in presenza di NaSCN, il polimero passando dalla conformazione α -elica a quella *random coil* (pH 3.8 \rightarrow 7) promuove un'inversione del segnale CD. Il ripristino per acidificazione della conformazione ad α -elica (pH 7 \rightarrow 3.8) determina un'ulteriore inversione del segnale CD, caratterizzato da un effetto Cotton analogo al segnale originale, ma con un'intensità notevolmente differente. È comunque possibile effettuare altri cicli acido/base ottenendo segnali però gradualmente più

bassi in intensità. In seguito ad ulteriore acidificazione (pH 3.8 \rightarrow 0.5) il biopolimero risulterà completamente protonato e non potrà avvenire alcuna induzione di chiralità anche perché la porfirina, come risultato della distruzione dei clusters preformati, è presente nella sua forma diacida come sostanziato dalla presenza di una intensa banda B centrata a 444 nm e 2 bande Q posizionate rispettivamente a 602 e 665 nm.

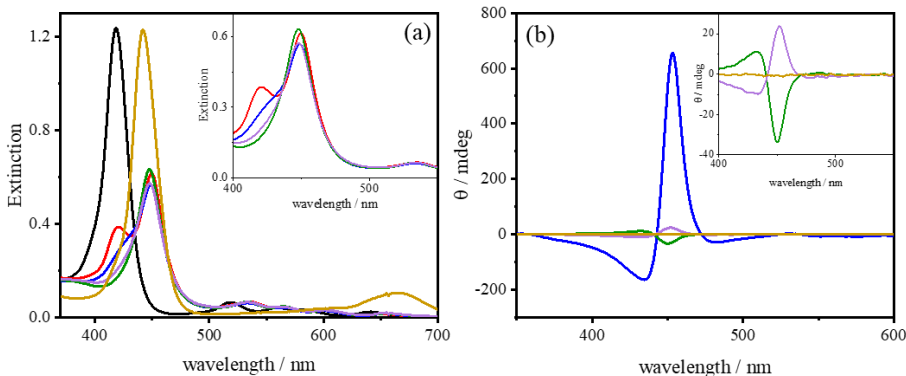


Figura 4. Spettri di estinzione (a) e spettri CD (b) registrati dopo avere aggiunto L-PGA ai clusters porfirinici ed indotto le variazioni conformazionali al variare del pH (aggiunte HCl/NaOH). Inset: ingrandimento di alcuni spettri nella regione 400-550 nm. $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera), clusters porfirinici (linea rossa), L-PGA a pH 3.8 (linea blu), (i) pH 3.8 \rightarrow 7 (linea verde), (ii) pH 7 \rightarrow 3.5 (linea magenta), (iii) pH 3.8 \rightarrow 0.5 (linea gialla). Condizioni sperimentali: $[\text{t-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampono acetato}] = 2 \text{ mM}$, pH = 3.8, T = 298 K.

In modo analogo è stato condotto uno studio di *pH-jump* sull'aggregato formato in presenza di NaNO_3 . Nella Figura 14 viene evidenziato come, passando dalla conformazione α -elica a quella *random coil* (pH 3.8 \rightarrow 7) si ottiene, anche in questo caso, una notevole diminuzione in intensità del segnale CD il quale è però caratterizzato da un effetto Cotton analogo a quello riscontrato in presenza dell' α -elica. Il ripristino di quest'ultima, mediante acidificazione (pH 7 \rightarrow 3.8), determina naturalmente un aumento dell'intensità del segnale. Anche in questo caso, è possibile eseguire dei cicli acido/base ottenendo l'andamento descritto degli effetti Cotton con una progressiva diminuzione di intensità del segnale. Come nell'esperimento precedentemente descritto, condizioni acide estreme (pH 3.8 \rightarrow 0.5) determinano la

distruzione dell'aggregato porfirinico, la completa protonazione del polipeptide e la relativa assenza di segnale CD.

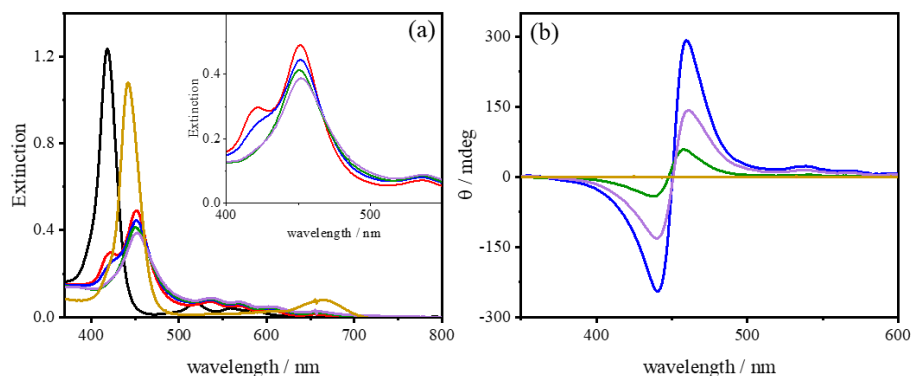


Figura 14. Spettri di estinzione (a) e spettri CD (b) registrati dopo avere aggiunto L-PGA al cluster porfirinico ed indotto le variazioni conformazionali al variare del pH (aggiunte HCl/NaOH). $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera), clusters porfirinici (linea rossa), L-PGA a pH 3.8 (linea blu), (i) pH 3.8 \rightarrow 7 (linea verde), (ii) pH 7 \rightarrow 3.8 (linea magenta), (iii) pH 3.8 \rightarrow 0.5 (linea gialla). Inset: ingrandimento di alcuni spettri nella regione 400-550 nm. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaNO}_3] = 25 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8, T = 298 K.

Gli esperimenti di *pH-jump* mettono in evidenza un aspetto importante quale la ritenzione dell'informazione chirale nel caso dell'interazione dei clusters porfirinici preformati con lo ione nitrato e L-PGA in conformazione di α -elica. Con le informazioni in nostro possesso, non è però possibile formulare ipotesi a sostegno della specificità di tale comportamento rispetto all'analogo sistema con lo ione tiocianato, potendo sussistere anche in questo caso, delle motivazioni strutturali meritevoli di ulteriori indagini.

Come già discusso, il controllo della sintesi supramolecolare in acqua è fortemente dipendente da effetti gerarchici che possono regolare il percorso termodinamico o cinetico delle specie aggregate.⁶⁴ La metodica di mescolamento descritta finora è formalmente denominabile come PL (*protein last*) ed al fine di verificare la sussistenza di un effetto del protocollo di mescolamento si è pensato di

effettuare esperimenti procedendo ad aggiungere il biopolimero alla soluzione diluita di porfirina piuttosto che agli aggregati preformati (PF - *protein first*).

In Figura 15 sono mostrati gli spettri UV/Vis, CD e RLS ottenuti per il processo di aggregazione impiegando la metodica di mescolamento PF dai quali si evince, all'aggiunta di L-PGA, la formazione istantanea di una specie aggregata caratterizzata da una marcata ipocromicità della banda B e dalla presenza di una ulteriore componente spostata nel rosso e posizionata a $\lambda = 419$ nm. La presenza di specie aggregate è sostanziata dalla presenza di una moderata componente di segnale RLS e dalla presenza nello spettro di dicroismo circolare di un intenso segnale leggermente asimmetrico. All'aggiunta di NaSCN le caratteristiche spettroscopiche cambiano pervenendo nel tempo alla formazione di una specie aggregata caratterizzata da un picco ben definito a $\lambda = 450$ nm e da una componente residua di monomero ($\lambda = 419$ nm). Il profilo cinetico che caratterizza il processo di aggregazione è di tipo *stretched* ed è riportato nell'inset della Figura 15a. Lo spettro RLS corrispondente alla struttura supramolecolare finale è decisamente più intenso, così come anche lo spettro CD, una chiara indicazione della formazione di estese specie aggregate nelle quali sussiste un forte accoppiamento elettronico tra le unità di porfirina. Le evidenze spettroscopiche unitamente ai valori misurati di DLS riportati in Tabella 4 suggeriscono la formazione di strutture diverse a seconda del tipo di protocollo di mescolamento adoperato. In particolare, l'aggiunta di PGA come primo reattivo potrebbe indurre l'aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ con formazione di piccoli clusters chirali che, all'aggiunta di NaSCN, successivamente assolvono il ruolo di "*semi*" per la crescita di estesi aggregati che potrebbero formarsi sia estendendosi lungo il *backbone* del polimero ("*wrapping type*") o anche trasversalmente al sistema templante e quindi verso l'esterno ("*pending type*").⁶⁵⁻⁶⁷

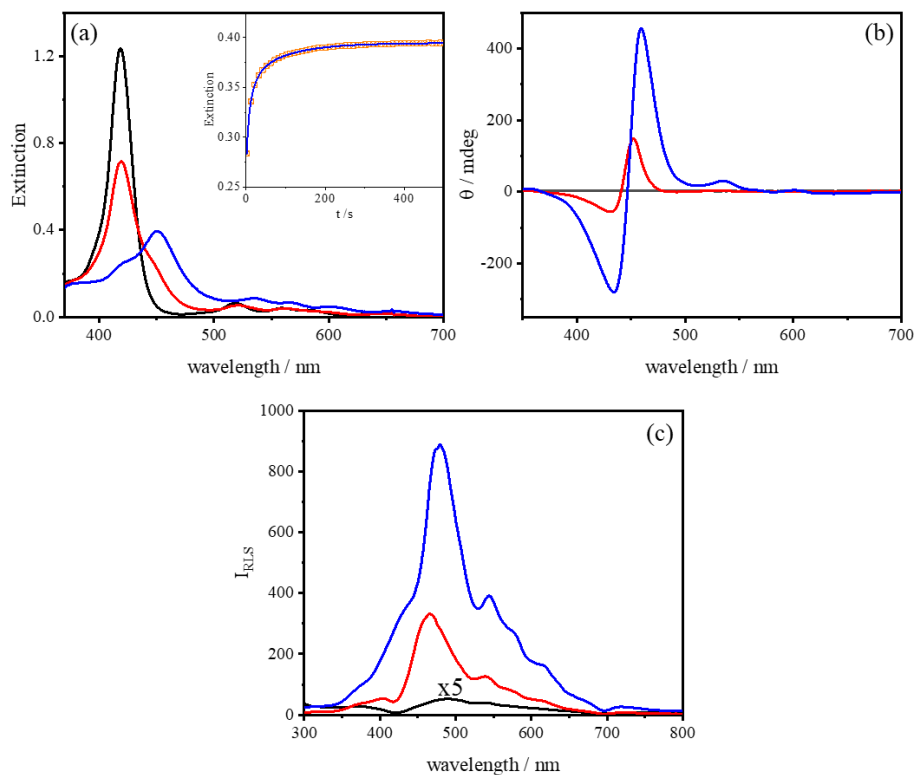


Figura 15. Spettri UV/vis (a), spettri CD (b) ed RLS (c) relativi alla porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera), ai clusters porfirinici formati in seguito ad aggiunta di L-PGA (linea rossa) ed all'aggregato finale indotto dall'aggiunta di NaSCN (blu). Inset (a): profilo cinetico registrato a λ_{450} di formazione dell'aggregato finale indotto dall'aggiunta di NaSCN. La linea rappresenta il fitting ottenuto per mezzo dell'Eq. 1⁶⁸ ($k_{\text{stretched}} = (9.8 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$; $n = 0.4 \pm 0.1$; $R^2 = 0.999$). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{PGA}] = 100 \mu\text{M}$, [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8, T = 298 K.

Tabella 4: Valori di diametro idrodinamico ottenuti mediante misure DLS e valori del fattore di asimmetria (g) in funzione del protocollo di mescolamento.

Protocollo	D_H / nm	fattore g
SCN^-	226 ± 6	//
$\text{SCN}^- \rightarrow \text{L-PGA}$	214 ± 16	$4.30 \cdot 10^{-2}$
L-PGA	615 ± 59	$2.76 \cdot 10^{-2}$
$\text{PGA} \rightarrow \text{SCN}^-$	849 ± 56	$5.67 \cdot 10^{-2}$

Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{PGA}] = 100 \mu\text{M}$, [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8, T = 298 K.

In Figura 16 è mostrata un'ulteriore peculiarità del sistema aggregato realizzato con protocollo di mescolamento PL e che mette in evidenza l'insorgenza di possibili effetti di cooperatività nel momento in cui il polimero viene introdotto mediante aggiunte graduali piuttosto che "one pot". Il dato di maggiore impatto è senz'altro l'entità del trasferimento di chiralità dal polimero all'aggregato preformato che risulta meno efficiente nel caso di aggiunte graduali di inducente chirale. Questa risultanza potrebbe essere correlata ad una differenza strutturale tra le specie cui si perviene in linea con i dati DLS che evidenziano una dimensione degli aggregati piuttosto marcata.

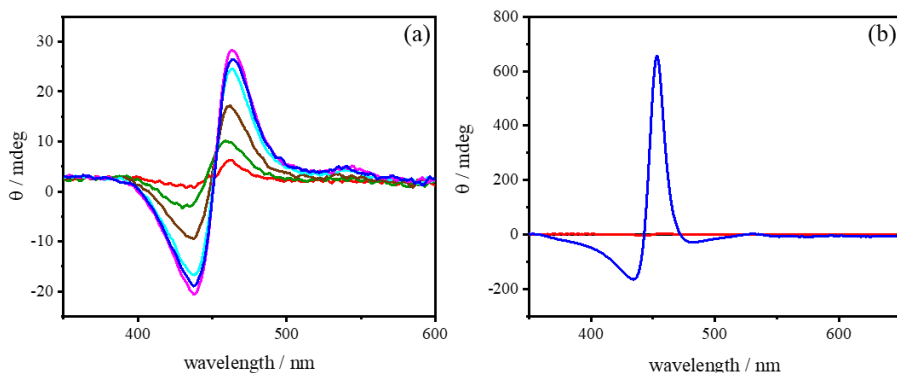


Figura 16. Spettri CD ottenuti alla fine del processo di aggregazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotto tramite aggiunte graduali (a) e per aggiunta diretta (b) di L-PGA. $[\text{PGA}] = 1 \mu\text{M}$ (linea rossa), $5 \mu\text{M}$ (linea verde), $10 \mu\text{M}$ (linea marrone), $20 \mu\text{M}$ (linea azzurro), $50 \mu\text{M}$ (linea magenta), $100 \mu\text{M}$ (linea blu). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampono acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$. (a) $D_{\text{H}} = 925 \pm 32$, $g = 5.3 \cdot 10^{-3}$ (linea blu); (b) $D_{\text{H}} = 226 \pm 16$, $g = 4.3 \cdot 10^{-2}$ (linea blu).

4.2.2 – Impiego di altri polimeri

Dopo aver indagato il ruolo espletato dal PGA nel processo di induzione della chiralità agli aggregati preformati di $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ indotti da sale, è stato condotto un veloce screening di altri polimeri chirali dotati di carica negativa al fine di potere valutare la pianificazione di ulteriori studi che però, esulano da questo elaborato di tesi. Oltre al PGA, si è evidenziata un'interazione dei clusters preformati di porfirina anche con i polimeri rappresentati in Figura 17.

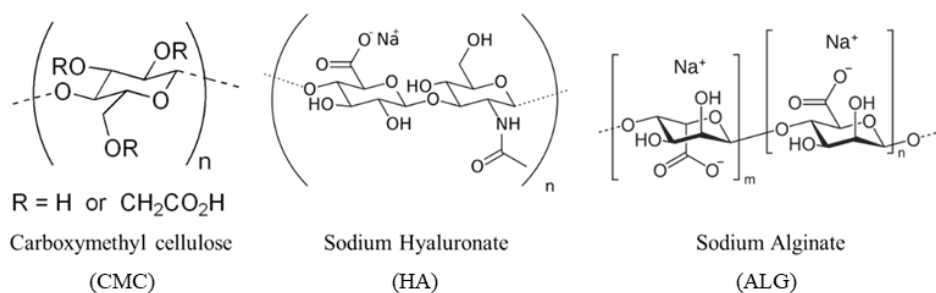


Figura 17. Struttura molecolare dei polimeri chirali impiegati nell'interazione con i clusters porfirinici.

Come mostrato in Figura 18 lo ialuronato e l'alginato sodico interagiscono con i clusters porfirinici preformati portando ad alcune modifiche dei profili degli spettri UV/Vis, ma l'aspetto più significativo è che essi sono in grado di trasferire la loro informazione chirale determinando la comparsa di bande CD moderatamente intense caratterizzate da un effetto Cotton di tipo negativo – positivo – negativo con un profilo asimmetrico analogo a quanto si verifica con L-PGA.

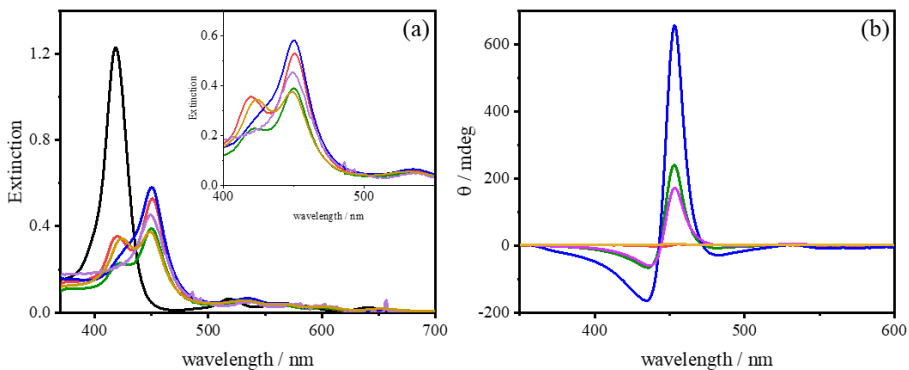
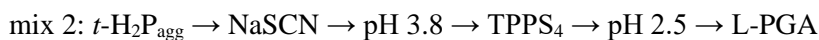


Figura 18. Spettri UV/Vis (a) e spettri CD (b) della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera) e dei clusters porfirinici formato utilizzando NaSCN (linea rossa) e dopo l’aggiunta dei seguenti polimeri: L-PGA (linea blu), CMC (linea gialla), HA (linea verde), ALG (linea viola). Inset (a): ingrandimento di alcuni spettri nella regione 400-550 nm. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$, [polimero]: (i) $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$; [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8; (ii) $[\text{CMC}] = 1 \mu\text{M}$, pH = 10; (iii) $[\text{HA}] = 1 \mu\text{M}$, pH = 7; (iv) $[\text{ALG}] = 1 \text{ mM}$.

4.2.3 - Formazione di eteroaggregati chirali

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi rivolti alla comprensione dei processi di memoria chirale di aggregati di porfirine e alcuni di questi fanno riferimento alla formazione di eteroaggregati ternari chirali formati da porfirine di natura diversa aggregate su matrici polimeriche otticamente attive.^{35-38,67,69-72} Sulla base di quanto già presente in letteratura, dopo aver studiato il processo di trasferimento di chiralità tra L-PGA ed i clusters porfirinici, si è pensato di effettuare degli studi al fine di impiegare tale struttura come template cationico chirale per indurre la formazione di aggregati J chirali della porfirina tetraanionica TPPS₄ in condizioni inusuali. La formazione del sistema ternario, così come descritto, può in linea di principio essere realizzata per mezzo di due diversi protocolli di mescolamento che sono qui di seguito indicati:



Nel primo, si ha la formazione del cluster porfirinico chirale secondo le modalità descritte in questo capitolo e si procede all'aggiunta della porfirina TPPS₄ e successivamente si abbassa il pH (per mezzo di HCl) fino a raggiungere le condizioni di acidità appropriate per indurre la formazione dell'aggregato J su matrice template. La seconda metodica di mescolamento prevede l'aggiunta dell'inducente chirale soltanto alla fine.

In Figura 19 sono mostrati i risultati ottenuti impiegando il primo protocollo di mescolamento (mix 1). Una volta che si sono formati i clusters porfirinici chirali (linea blu), la loro superficie presenta un eccesso di cariche positive residue che permettono l'interazione con la porfirina tetraanionica TPPS₄. Quest'ultima, risentendo delle condizioni di acidità adottate per la stabilizzazione dell' α -elica del L-PGA (pH 3.8) immediatamente si converte nella corrispondente specie diacida

$H_2TPPS_4^{2-}$ (linea verde) la cui banda B è posizionata a 434 nm. L'interazione appena descritta ha il pregio di non essere ostacolata dalla forza ionica che risulta essere piuttosto bassa. Abbassando ulteriormente il pH fino al valore di 2.5, si determina l'istantanea formazione di una banda UV/Vis centrata a 490 nm attribuibile alla formazione dell'aggregato J della $TPPS_4$ e la cui intensità cresce nel tempo secondo il profilo cinetico riportato nella Figura 20. Le condizioni di acidità adottate non determinano la disaggregazione dei clusters porfirinici e sono tali che, la formazione di aggregato J in bulk, generalmente non viene osservata. Questo tipo di eteroaggregato è abbastanza stabile nel tempo ed è stato dimostrato che specie similari esibiscono una notevole inerzia (cinetica e termodinamica) dovuta alla forza e al numero delle interazioni coulombiane tra le porfirine.^{35-38,69,72} Per quanto riguarda la porfirina $t-H_2P_{agg}$, (pKa 2.8), una volta che essa è parte integrante di un sistema cresciuto sotto controllo gerarchico è dunque in grado di esibire una stabilità alla variazione di pH ben diversa da quella in bulk. La presenza di aggregati J è ulteriormente confermata dagli spettri RLS riportati in Figura 19b, i quali evidenziano un picco intenso e ben definito, centrato a 500 nm.

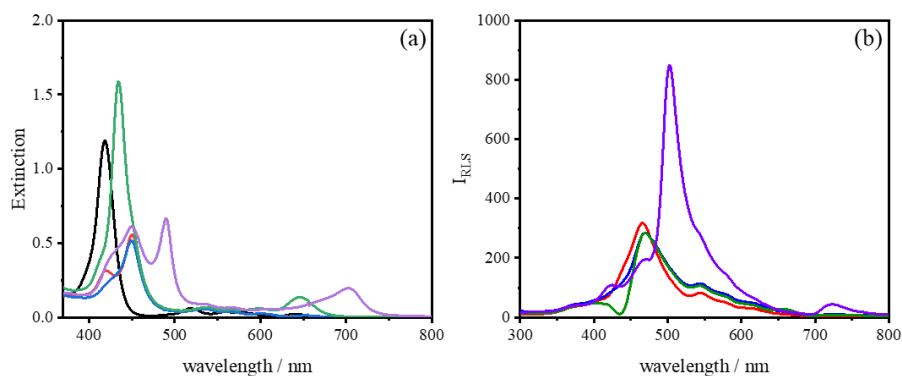


Figura 19. Spettri UV/Vis (a) e spettri RLS (b) per il processo di formazione dell'eteroaggregato secondo il mix1: $t-H_2P_{agg}$ (linea nera), clusters porfirinici ottenuti con NaSCN (linea rossa), in presenza di L-PGA (linea blu), aggiunta di $TPPS_4$ a pH 3.8 (linea verde), aggregato J di $TPPS_4$ su clusters porfirinici a pH 2.5 (linea viola). Condizioni sperimentali: $[t-H_2P_{agg}] = 5 \mu M$, $[NaSCN] = 1 mM$, $[L-PGA] = 100 \mu M$, [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8, $[TPPS_4] = 3 \mu M$, pH 2.5, $T = 298 K$.

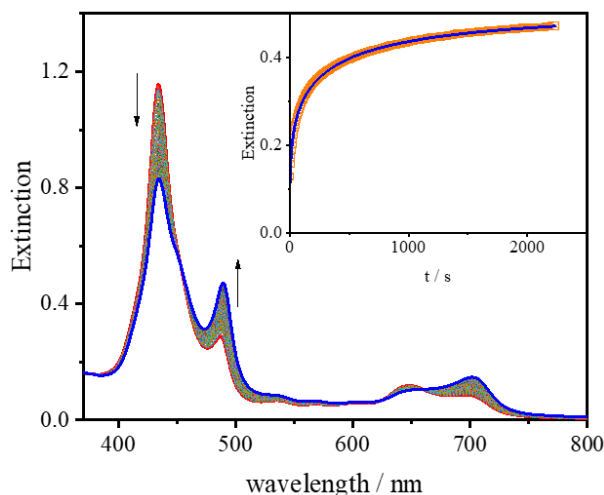


Figura 20. Variazione spettrale UV/Vis e corrispondente profilo cinetico per la formazione dell'aggregato J della porfirina TPPS₄ sui clusters della porfirina *t*-H₂P_{agg} al variare delle condizioni di acidità (pH 3.8 → 2.5). Condizioni sperimentali: [*t*-H₂P_{agg}] = 5 μM, [NaSCN] = 1 mM, [L-PGA] = 100 μM, [tampono acetato] = 2 mM, pH = 3.8, [TPPS₄] = 3 μM, T = 298 K. Nell'inset la linea rappresenta il fitting ottenuto per mezzo dell'Eq.1⁶⁸ sul profilo cinetico registrato a λ₄₉₀ ($k_{stretched} = (5.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \cdot s^{-1}$; $n = 0.4 \pm 0.1$; $R^2 = 0.999$).

In Figura 21 sono mostrati gli spettri CD corrispondenti alla formazione di alcune delle specie che sono state descritte: i clusters porfirinici preformati non presentano alcuna attività ottica, ma all'aggiunta di L-PGA si ha il trasferimento dell'informazione chirale con formazione di un intenso segnale dicroico con un profilo negativo – positivo - negativo che all'aggiunta di TPPS₄, rimane pressoché inalterato nelle condizioni di pH pari a 3.8. In condizioni più acide, come detto, si ha la formazione dell'aggregato J come sostanziato dallo spettro CD che presenta un profilo ben più complesso determinato dalla contemporanea presenza di due specie otticamente attive ed in comunicazione elettronica tra loro quali i clusters della porfirina *t*-H₂P_{agg} e la struttura, presumibilmente di tipo rod-like, della TPPS₄. Per escludere un eventuale modulazione del profilo dello spettro dalla presenza di artefatti sperimentali imputabili a scattering differenziale, le misure CD sono state rigorosamente condotte anche a varie distanze dal fototubo.

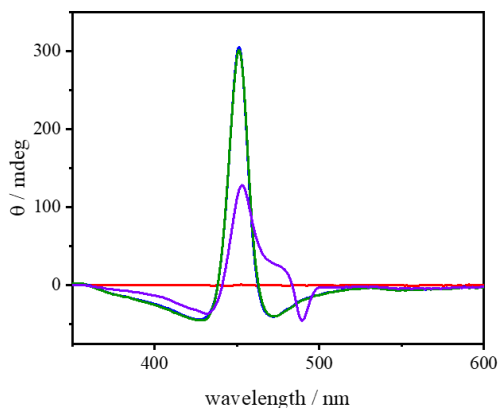


Figura 21. Spettri CD relativi ad alcune specie ottenute nel processo di formazione dell'eteroaggregato secondo il mix 1: clusters porfirinici ottenuti con NaSCN (linea rossa), in presenza di L-PGA (linea blu), aggiunta di TPPS₄ (linea verde), aggregato J di TPPS₄ sui clusters porfirinici (linea viola). Condizioni sperimentali: [*t*-H₂P_{agg}] = 5 μM, [NaSCN] = 1 mM, [L-PGA] = 100 μM, [tampone acetato] = 2 mM, pH = 3.8, [TPPS₄] = 3 μM, pH 2.5, T = 298 K.

In Figura 22a sono mostrati i risultati ottenuti impiegando il secondo protocollo di mescolamento (mix 2). In questo caso il supporto templante è costituito dai clusters porfirinici preformati (linea rossa) che non sono chirali a causa dell'assenza di L-PGA che in questo protocollo costituisce l'ultimo reattivo da aggiungere. L'abbassamento del pH al valore di 3.8 non determina alcuna variazione dal punto di vista spettroscopico. In queste condizioni la porfirina TPPS₄ può interagire con i clusters achirali della *t*-H₂P_{agg} che, tra l'altro, saranno dotati di una carica positiva netta maggiore rispetto al mix 1 causa l'assenza di L-PGA. In tal senso, un pronto riscontro si ha dalla constatazione, all'aggiunta della porfirina tetraanionica, dell'immediata formazione dell'aggregato J (linea verde). Il profilo spettrale evidenzia la presenza rispettivamente di: (i) una larga componente di specie diacida H₂TPPS₄²⁻ (λ₄₃₄), (ii) clusters della porfirina *t*-H₂P_{agg} (λ₄₅₀) e (iii) aggregato J della TPPS₄ (λ₄₉₀). Il profilo spettrale evolve nel tempo (≈ 20') verso l'ulteriore formazione di aggregato J con diminuzione della specie monomerica diacida (linea viola). Queste evidenze sperimentali trovano riscontro nei corrispondenti spettri RLS riportati in Figura 22b dai quali si evince la formazione dell'aggregato J dalla presenza di un intenso picco posizionato a circa 500 nm. L'aspetto però più significativo è che la

successiva aggiunta dell'inducente chirale non determina alcuna variazione delle caratteristiche spettroscopiche menzionate, né porta alla comparsa di segnali di dicroismo circolare. È quindi presumibile che, in queste condizioni sperimentali, per effetto di schermo determinato dalla precedente aggiunta della porfirina tetraanionica, i clusters preformati della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ siano di fatto inaccessibili al PGA il quale tra l'altro non trasferisce chiralità neanche all'aggregato J in quanto già formato in soluzione. Viste le risultanze sperimentali, si è ritenuto non necessario procedere ad un ulteriore abbassamento del pH come nel caso del mix 1.

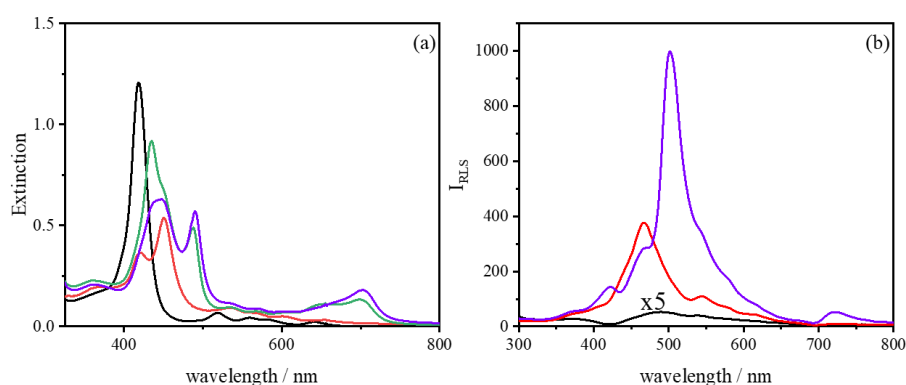


Figura 22. Spettri UV/Vis (a) e spettri RLS (b) per il processo di formazione dell'eteroaggregato secondo il mix 2: $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera), clusters porfirinici ottenuto con NaSCN (linea rossa), aggiunta di TPPS₄ $t = 0$ (linea verde) e $t = 20'$ (linea viola). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $[\text{TPPS}_4] = 3 \mu\text{M}$, $\text{pH} 2.5$, $T = 298 \text{ K}$.

Al fine di dimostrare come la realizzazione di strutture eteroaggregato così complesse è dovuta all'instaurarsi di delicati equilibri ascrivibili ad interazioni di natura debole, si è pensato di procedere alla disaggregazione del sistema. Per supportare questa ipotesi, si è voluta verificare la stabilità del sistema ottenuto mediante il mix 2 attraverso l'aggiunta di uno "scavenger" di specie cationiche come il polivinilsolfonato (PVS). Come già discusso nel capitolo 2, il PVS è un polielettrolita ad alta densità di carica in grado di condensare efficacemente cationi di carica opposta in soluzione⁷³ ed è già stato impiegato con successo per disassemblare aggregati J supramolecolari della porfirina TPPS₄ templati da specie

cationiche quale spermina⁷⁴ o il complesso esamminocobalto(III) $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$.⁷⁵ In Figura 23a viene mostrato come, in seguito all'aggiunta di basse concentrazioni di polielettrolita (100 μM) ed a pH 2.8, la struttura supramolecolare è soggetta ad un processo di disaggregazione. Il corrispondente profilo cinetico è riportato in Figura 23b e conduce alla formazione di una specie la cui banda B è posizionata a 437 nm. Tale banda di assorbimento, in base ai risultati di deconvoluzione effettuati e riportati in Figura 24, è imputabile alla formazione della specie diacida della TPPS₄ (434 nm) e della *t*-H₂P_{agg} (444 nm).

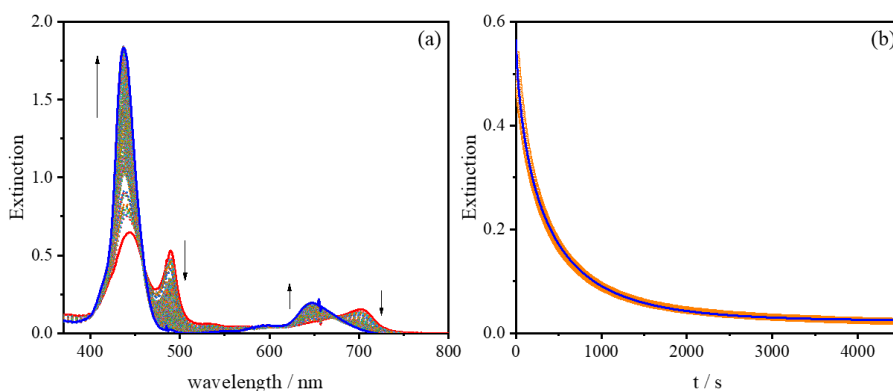


Figura 23. Variazione degli spettri UV/Vis (a) e relativa traccia cinetica registrata a 490 nm (b) per il processo di disaggregazione promosso dall'aggiunta di PVS. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{TPPS}_4] = 3 \mu\text{M}$, $[\text{PVS}] = 0.1 \text{ mM}$, pH = 2.8, T = 298 K. La linea rappresenta il fitting ottenuto per mezzo dell'Eq.1⁶⁸ ($k_{\text{stretched}} = (3.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $n = (6.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$; $R^2 = 0.999$).

È interessante notare come il PVS riesce a procedere alla disaggregazione soltanto ad un pH inferiore a quello a cui si è formato l'eteroaggregato. Da un'attenta analisi sia dei profili degli spettri UV/Vis che di quelli RLS degli aggregati J formati con entrambi i protocolli di mescolamento, sembrerebbe che le strutture che si formano siano di tipo *rod-like*, ragione per la quale l'accoppiamento elettronico dei cromofori può essere descritto secondo il modello degli eccitoni di Frenkel.⁷⁶⁻⁷⁹

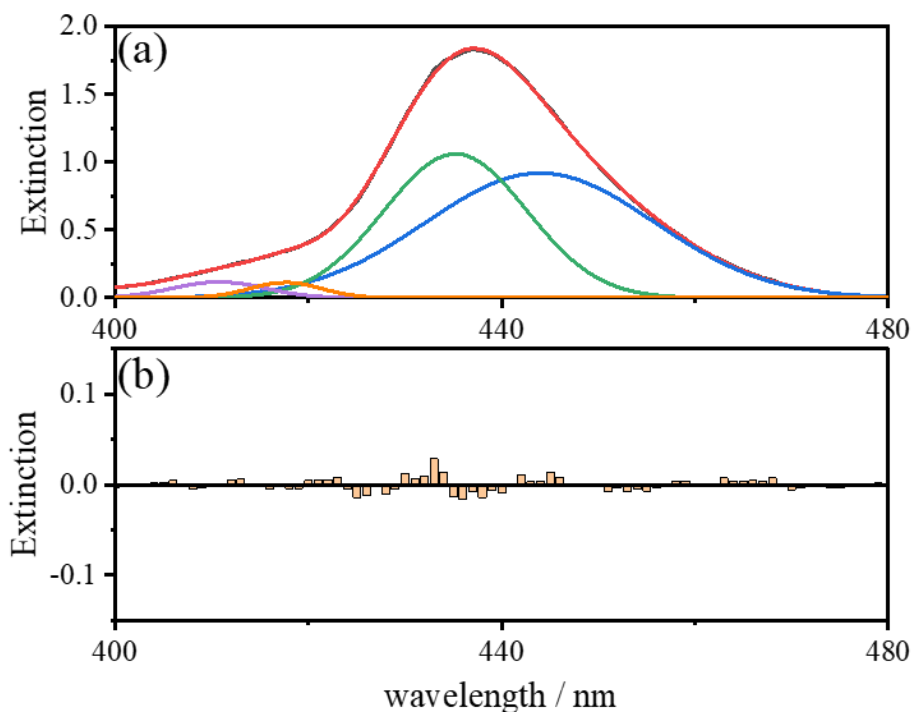


Figura 24. (a) Deconvoluzione dello spettro UV/Vis registrato dopo la cinetica di disaggregazione con PVS (linea nera) e (b) relativi residui. Spettro osservato (linea nera); spettro calcolato (linea rossa); banda calcolata relativa alla specie $\text{H}_2\text{TPPS}_4^{2-}$ (λ_{434} - linea blu); banda calcolata relativa alla specie diacida della $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (λ_{444} - linea verde) e componenti vibroniche delle due porfirine (λ_{411} - linea viola; λ_{418} - linea arancione). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{TPPS}_4] = 3 \mu\text{M}$, $[\text{tampone acetato}] = 2 \text{ mM}$, $[\text{PVS}] = 0.1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $T = 298 \text{ K}$.

Tuttavia, tutti gli studi di disaggregazione promossi da PVS presenti in letteratura sono stati dimostrati su aggregati J il cui modello è riconducibile ad un meccanismo di accoppiamento dipolare,^{74,75} non riuscendo il polimero ad agire su aggregati nanotubulari. Queste informazioni sono importanti perché ci inducono a pensare che gli aggregati J sul sistema eteroaggregato potrebbero essere del tipo “*pending type*” o “*rapping type*” e comunque formati grazie all’ausilio dei clusters della porfirina cationica la cui superficie dovrebbe agire da collante elettrostatico per quanto concerne lo sviluppo dei semi iniziali dei nanoaggregati. Tenendo in considerazione che il valore di pH (3.8) a cui si forma l’aggregato J è assolutamente

inusuale, condizioni di maggiore acidità non dovrebbero in alcun modo essere di ausilio per promuoverne la disaggregazione. Piuttosto, la presenza del polimero unitamente ad una maggiore concentrazione idrogenionica, potrebbero determinare le condizioni per la protonazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ e la susseguente disaggregazione dei clusters che “ancorano” l’aggregato J il quale viene anch’esso ad essere contestualmente demolito.

I clusters della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ formati in seguito ad aggiunta di NaSCN e gli eteroaggregati ottenuti mediante l’impiego del protocollo di mescolamento mix 1, sono stati depositati su dei vetrini al fine di potere visualizzare i campioni per mezzo della microscopia ottica. In Figura 25 è riportata un’immagine dei clusters della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ ottenuta mediante un ingrandimento 40x e da cui si evince la formazione di strutture di tipo dendritico. In Figura 26 è riportata l’immagine ottica per il sistema eteroaggregato unitamente allo spettro UV/Vis ottenuto con l’ausilio di fibre ottiche. L’immagine sembrerebbe rendere più plausibile la formazione di aggregati J nanotubulari “*pending type*” che si propagano a partire da una struttura aggregata più complessa. Da un’attenta analisi dello spettro si evince la copresenza della banda a 450 nm relativa ai clusters della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ e la banda a 490 nm ascrivibile all’aggregato J della porfirina TPPS₄.

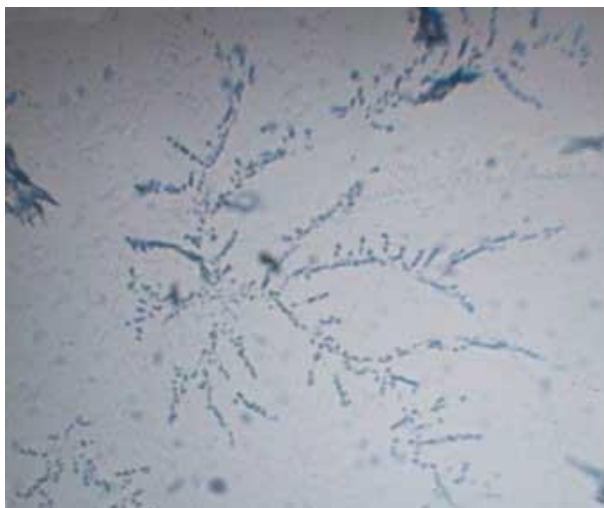


Figura 25. Immagine ottica (40x) dei clusters porfirinici. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampono acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $[\text{TPPS}_4] = 3 \mu\text{M}$, $\text{pH} 2.5$, $T = 298 \text{ K}$.

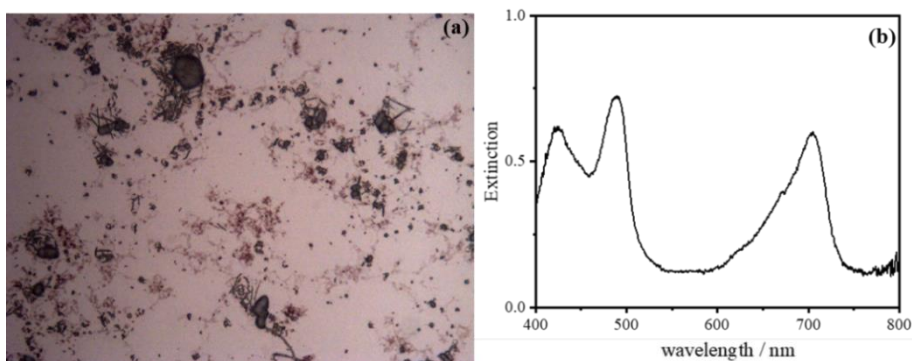


Figura 26. (a) Immagine ottica dell'eteroaggregato (40x) e (b) spettro UV/Vis registrato utilizzando una fibra ottica. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{L-PGA}] = 100 \mu\text{M}$, $[\text{tampono acetato}] = 2 \text{ mM}$, $\text{pH} = 3.8$, $[\text{TPPS}_4] = 3 \mu\text{M}$, $\text{pH} 2.5$, $T = 298 \text{ K}$.

4.3 - Conclusioni

La porfirina dicationica trans-bis(N-metilpiridinio-4-*il*)difenilporfirina ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$) a bassa concentrazione di sale (NaSCN , NaNO_3) è in grado di dare luogo a fenomeni di *self-assembly* che determinano la formazione di estesi aggregati in soluzione la cui dimensione varia in funzione dell'anione. I clusters porfirinici preformati sono otticamente inattivi ed in virtù della loro carica netta, sono in grado di interagire mediante interazioni elettrostatiche con alcuni polimeri chirali carichi negativamente, i quali sono in grado di trasferire l'informazione chirale alla struttura preconstituita. Gli studi condotti hanno evidenziato come il poligluttammato (PGA), sia in conformazione di α -elica che *random coil*, è in grado di interagire in modo ottimale con il templante cationico. L'induzione di chiralità è evidenziata dalla comparsa di un segnale CD bisegnato nella regione di assorbimento della banda B del cromoforo ed è caratterizzato da un effetto Cotton il cui segno dipende dalla conformazione adottata dal polimero. Dunque, i risultati sperimentali dimostrano che i clusters porfirinici della $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ si comportano da sonda chirottica la cui sensibilità, inoltre, varia in funzione della loro struttura e dimensione, parametri determinati dalla natura del sale impiegato nel promuovere il processo cinetico di aggregazione. Gli esperimenti di *pH-jump* hanno evidenziato un altro aspetto importante quale la ritenzione dell'informazione chirale nel caso dell'interazione dei clusters porfirinici preformati con lo ione nitrato e L-PGA in conformazione di α -elica. Il controllo della sintesi supramolecolare in acqua è un processo fortemente dipendente da effetti gerarchici e, per il sistema studiato, ciò è stato evidenziato utilizzando due diversi protocolli di mescolamento, formalmente denominati PF (*protein first*) e PL (*protein last*) a seconda se L-PGA viene introdotto come primo o ultimo componente nella successione delle aggiunte dei reattivi per la preparazione dei campioni. I clusters preformati della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ sono stati successivamente impiegati come templante cationico per indurre la formazione di aggregati J della porfirina tetraanionica TPPS₄ in condizioni inusuali. Gli eteroaggregati che si determinano in

soluzione sono stabili nel tempo ed esibiscono chiralità sulla base della gerarchicità del loro processo di formazione. Più specificatamente, sono stati individuati due diversi protocolli di mescolamento che prevedono rispettivamente (i) l'aggiunta dell'inducente chirale ai clusters preformati della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ e (ii) l'aggiunta dell'inducente chirale soltanto come ultimo reattivo. Nel primo caso, la porfirina tetraanionica TPPS₄ interagisce con una struttura otticamente attiva in grado di trasferire l'informazione chirale anche ai costituenti aggregati J; nel secondo caso, l'inducente chirale viene aggiunto all'eteroaggregato precostituito otticamente inattivo e le risultanze sperimentali evidenziano la mancata interazione del biopolimero con il sistema supramolecolare, non riscontrando attività ottica né a livello dei clusters della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ né degli aggregati J della porfirina TPPS₄. L'immagine ottica dell'eteroaggregato chirale mostra la presenza di una struttura dendritica con delle strutture filiforme potenzialmente riconducibili agli aggregati J così come sostanziato dall'analisi UV/Vis effettuata con l'ausilio di fibre ottiche. La stabilità e la natura non covalente delle interazioni nel sistema eteroaggregato sono state testate tramite esperimenti di disaggregazione condotti con un polielettrolita ad alta densità di carica riconducendo il sistema alla miscela delle forme diacide delle due porfirine.

4.4 - Sezione sperimentale

Materiali e preparazione dei campioni

La porfirina *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$) come cloruro e la porfirina meso-tetrakis(4-solfonatofenil)porfirina (TPPS₄) come sale sodico sono state acquistate rispettivamente dalla Mid-Century Chemicals e Aldrich & Co. e sono state impiegate come ricevute, senza ulteriori purificazioni. I sali ed i polimeri impiegati sono stati acquistati dalla ditta Aldrich & Co. ed utilizzati come ricevuti. Il poligluttammato sodico (PGA) impiegato è di diverso grado di polimerizzazione: DP = 95 (D e L) e DP = 294 (L). Il PGA più corto ha una massa molecolare $M_w \sim 14400$ g/mol per un totale di 95 residui amminoacidici e una lunghezza media della singola catena, ricavata tramite misure di scattering di luce, compresa tra 100 e 135 Å. Il PGA più lungo ha una massa molecolare $M_w \sim 44400$ g/mol per un totale di 294 residui amminoacidici. La concentrazione di una soluzione stock di polimero, espressa come moli di residui amminoacidici per litro, è stata determinata tramite spettrofotometria UV/Vis misurando l'assorbanza a 205 nm ed impiegando il valore di ϵ relativo alla conformazione di α -elica del polipeptide in tampone acetato ($\epsilon_{205} = 2.15 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ pH} = 4.5$).⁵⁷ L'acido alginico come sale sodico (ALG) a bassa viscosità ha un rapporto M/G = 0.66 e il 63% di acido glucuronico. La carbossimetilcellulosa sodica (CMC), ha massa molecolare $M_w \sim 90,000$ g/mol con 0.7 gruppi carbossimetilici per unità di anidroglicosio. Lo ialuronato di sodio (HA), ha massa molecolare compresa tra i 600 - 700 kDa. Per quanto concerne il polivinilsolfonato di sodio (PVS), il peso molecolare del residuo monomero è di 130.1 g/mol ed il peso molecolare medio di ogni catena è circa 4943.7 g/mol il che implica una media di 38 residui per catena. Le concentrazioni delle soluzioni dei vari polimeri sono espresse come moli di unità di monomero per litro. Le concentrazioni delle soluzioni acquose madre di porfirina sono state determinate

misurando il valore dell'assorbanza in corrispondenza del picco della banda B (t - $H_2P_{agg}^{80}$: $\varepsilon_{419} = 2.4 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$; $TPPS_4^{81}$: $\varepsilon_{414} = 5.3 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$). Soluzioni stock di porfirina sono state preparate sciogliendo i rispettivi solidi in acqua purificata millipore e sono state conservate al riparo dalla luce ed utilizzate entro una settimana dalla loro preparazione. In generale, tutte le soluzioni impiegate in questo studio sono state preparate impiegando acqua in fiale per preparazioni iniettabili acquistate dalla Galenica Senese. Tutte le condizioni di pH citate sono state ottenute per mezzo di tampone acetato e, dove necessario, per mezzo dell'aggiunta di acido cloridrico o idrossido di sodio di appropriata concentrazione.

Misure spettroscopiche

Gli spettri di assorbimento UV/Vis sono stati eseguiti su uno spettrofotometro Agilent mod. 8453 a matrice di diodi utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico da 1 cm. Un filtro UV (Hoya UV-34, cut-off: 340 nm) è stato impiegato in tutte le misure al fine di tagliare la componente ultravioletta della sorgente luminosa così da prevenire fenomeni di fotodegradazione delle porfirine. L'analisi dei profili cinetici è stata effettuata per mezzo di una regressione non lineare dei dati di assorbimento impiegando l'equazione:⁶⁸

$$E = E_0 + (E_{inf} - E_0)(1 - e^{-(kt)^n}) \quad (\text{Eq. 2})$$

I calcoli di deconvoluzione degli spettri di estinzione sono stati condotti mediante software PeakFit® utilizzando la funzione 1 denominata "Gaussian Amplitude" i cui parametri sono qui riportati.

$$y = a_0 \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right) \quad (\text{Funz. 1})$$

$a_0 = \text{ampiezza}$

$a_1 = \text{centro banda}$

$a_2 = \text{larghezza } (> 0)$

Gli spettri di resonance light scattering (RLS) sono stati effettuati per mezzo di uno spettrofluorimetro Jasco FP-750 equipaggiato con un fotomoltiplicatore Hamamatsu R928 e dotato di una lampada Xenon da 150 W. Gli esperimenti sono stati eseguiti adottando un assetto di rilevamento ad angolo retto⁸² e gli spettri sono stati corretti per l'assorbimento dei campioni mediante l'equazione:⁶¹

$$(I_{RLS})_{corr} = I_{RLS} \cdot 10^{-Ext} \quad (\text{Eq. 2})$$

Gli spettri di dicroismo circolare (CD) sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-720, equipaggiato con una lampada xenon a 450 W. L'ellitticità è stata ottenuta attraverso calibrazione dello strumento con una soluzione acquosa al 0.06% di acido R-canforsolfonico. Gli spettri CD sono stati corretti dal contributo della cella e del solvente. Al fine di quantificare il segno e l'entità della chiralità supramolecolare è stato calcolato il fattore di asimmetria $g = \Delta\epsilon/\epsilon = \Delta A/A$ ⁵⁸ dove $\Delta A = \Theta/32980$, dove ΔA = unità di assorbanza e Θ = ellitticità in mdeg.

Le misure del diametro idrodinamico medio (D_H) e della larghezza della distribuzione (PDI) sono state effettuate da uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, Regno Unito) a 298K in acqua ultrapura. I risultati sono riportati come media di tre misurazioni separate \pm le deviazioni standard.

Le misure di pH sono state condotte mediante un phmetro Metrohm 744 pH meter utilizzando un elettrodo a vetro combinato con un microelettrodo. Gli esperimenti cinetici sono stati effettuati con l'ausilio del portacampione termostato dello strumento e lasciando equilibrare la temperatura (con accuratezza di ± 0.1 K) per almeno 20 minuti prima di procedere all'avvio di ogni *run* cinetico.

4.5 - Riferimenti bibliografici

- (1) Glavin, D. P.; Burton, A. S.; Elsilá, J. E.; Aponte, J. C.; Dworkin, J. P. The search for chiral asymmetry as a potential biosignature in our solar system. *Chemical reviews* **2019**, *120* (11), 4660.
- (2) Ma, W.; Xu, L.; de Moura, A. F.; Wu, X.; Kuang, H.; Xu, C.; Kotov, N. A. Chiral inorganic nanostructures. *Chemical Reviews* **2017**, *117* (12), 8041.
- (3) Avnir, D.; Huylebrouck, D. On Left and Right: Chirality in Architecture. *Nexus Network Journal* **2013**, *15* (1), 171.
- (4) Wagnière, G. H. *On chirality and the universal asymmetry: reflections on image and mirror image*; John Wiley & Sons, **2007**.
- (5) Liu, M.; Zhang, L.; Wang, T. Supramolecular Chirality in Self-Assembled Systems. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (15), 7304.
- (6) Purrello, R.; D'Urso, A. *Fundamentals Of Supramolecular Chirality*; World Scientific Publishing Company, **2021**.
- (7) Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer New York, NY, **1984**.
- (8) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; John Wiley & Sons, **2010**.
- (9) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular chemistry*; John Wiley & Sons, **2022**.
- (10) Kyte, J. *Structure in protein chemistry*; Garland Science, **2006**.
- (11) Rodger, A.; Nordén, B. *Circular dichroism and linear dichroism*; Oxford University Press, USA, **1997**.
- (12) Woody, R. W.; Hsu, M.-C. Origin of the heme Cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (14), 3515.
- (13) Blauer, G.; Sreerama, N.; Woody, R. W. Optical activity of hemoproteins in the Soret region. Circular dichroism of the heme undecapeptide of cytochrome c in aqueous solution. *Biochemistry* **1993**, *32* (26), 6674.
- (14) Sun, M.; Wang, X.; Guo, X.; Xu, L.; Kuang, H.; Xu, C. Chirality at nanoscale for bioscience. *Chemical Science* **2022**, *13* (11), 3069.
- (15) Sang, Y.; Liu, M. Hierarchical self-assembly into chiral nanostructures. *Chemical Science* **2022**, *13* (3), 633.
- (16) Hembury, G. A.; Borovkov, V. V.; Inoue, Y. Chirality-sensing supramolecular systems. *Chemical reviews* **2008**, *108* (1), 1.
- (17) Seo, J. S.; Whang, D.; Lee, H.; Jun, S. I.; Oh, J.; Jeon, Y. J.; Kim, K. A homochiral metal–organic porous material for enantioselective separation and catalysis. *Nature* **2000**, *404* (6781), 982.
- (18) Nimri, S.; Keinan, E. Antibody–Metalloporphyrin Catalytic Assembly Mimics Natural Oxidation Enzymes. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (39), 8978.
- (19) Verbiest, T.; Elshocht, S. V.; Kauranen, M.; Hellemans, L.; Snauwaert, J.; Nuckolls, C.; Katz, T. J.; Persoons, A. Strong enhancement of nonlinear optical properties through supramolecular chirality. *Science* **1998**, *282* (5390), 913.

- (20) Lin, W.; Wang, Z.; Ma, L. A Novel Octupolar Metal–Organic NLO Material Based on a Chiral 2D Coordination Network. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (48), 11249.
- (21) Akagi, K.; Piao, G.; Kaneko, S.; Sakamaki, K.; Shirakawa, H.; Kyotani, M. Helical polyacetylene synthesized with a chiral nematic reaction field. *Science* **1998**, *282* (5394), 1683.
- (22) Yashima, E.; Maeda, K.; Okamoto, Y. Memory of macromolecular helicity assisted by interaction with achiral small molecules. *Nature* **1999**, *399* (6735), 449.
- (23) Furusho, Y.; Kimura, T.; Mizuno, Y.; Aida, T. Chirality-Memory Molecule: A D₂-Symmetric Fully Substituted Porphyrin as a Conceptually New Chirality Sensor. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (22), 5267.
- (24) Feringa, B. L.; van Delden, R. A.; Koumura, N.; Geertsema, E. M. Chiroptical Molecular Switches. *Chem Rev* **2000**, *100* (5), 1789.
- (25) Zahn, S.; Canary, J. W. Electron-induced inversion of helical chirality in copper complexes of N, N-dialkylmethionines. *Science* **2000**, *288* (5470), 1404.
- (26) Travagliante, G.; Gaeta, M.; Purrello, R.; D'Urso, A. Supramolecular Chirality in Porphyrin Self-Assembly Systems in Aqueous Solution. *Current Organic Chemistry* **2022**, *26* (6), 563.
- (27) Mallamace, F.; Micali, N.; Trusso, S.; Monsu'Scolaro, L.; Romeo, A.; Terracina, A.; Pasternack, R. F. Experimental evidence for self-similar structures in the aggregation of porphyrins in aqueous solutions. *Physical review letters* **1996**, *76* (25), 4741.
- (28) Mallamace, F.; Monsu' Scolaro, L.; Romeo, A.; Micali, N. Crossover in the Kinetic Growth Process of Porphyrin Aggregation. *Physical Review Letters* **1999**, *82* (17), 3480.
- (29) Micali, N.; Monsu' Scolaro, L.; Romeo, A.; Mallamace, F. Light absorption study of aggregating porphyrin in aqueous solutions. *Physical Review E* **1998**, *57* (5), 5766.
- (30) Monsù Scolaro, L.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Mazzaglia, A.; Mallamace, F.; Micali, N. Nucleation effects in the aggregation of water-soluble porphyrin aqueous solutions. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **2002**, *304* (1), 158.
- (31) Lauceri, R.; Raudino, A.; Scolaro, L. M.; Micali, N.; Purrello, R. From achiral porphyrins to template-imprinted chiral aggregates and further. Self-replication of chiral memory from scratch. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (6), 894.
- (32) Randazzo, R.; Gaeta, M.; Gangemi, C. M.; Fragalà, M. E.; Purrello, R.; D'Urso, A. In *Molecules*, **2019**; Vol. 24.
- (33) D'Urso, A.; Petrovic, A. G.; Fragalà, M. E.; Tamargo, M. A.; Ellestad, G. A.; Purrello, R.; Berova, N. In *DNA in Supramolecular Chemistry and Nanotechnology*, **2014**.
- (34) Paolesse, R.; Stefanelli, M.; Pomarico, G.; Nardis, S.; Capuano, R.; Catini, A.; Di Natale, C.; D'Urso, A.; Fragalà, M. E.; Purrello, R. Porphyrin Supramolecular Aggregates and Chemical Sensors: A Marriage for Smart Devices. *ECS Meeting Abstracts* **2014**, *MA2014-01* (35), 1319.
- (35) Bellacchio, E.; Lauceri, R.; Gurrieri, S.; Scolaro, L. M.; Romeo, A.; Purrello, R. Template-imprinted chiral porphyrin aggregates. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (47), 12353.
- (36) Purrello, R.; Raudino, A.; Monsù Scolaro, L.; Loisi, A.; Bellacchio, E.; Lauceri, R. Ternary porphyrin aggregates and their chiral memory. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (46), 10900.

- (37) Purrello, R.; Monsu'Scolaro, L.; Bellacchio, E.; Gurrieri, S.; Romeo, A. Chiral H-and J-type aggregates of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphine on α -helical polyglutamic acid induced by cationic porphyrins. *Inorganic chemistry* **1998**, *37* (14), 3647.
- (38) Rosaria, L.; D'Urso, A.; Mammana, A.; Purrello, R. Chiral memory: Induction, amplification, and switching in porphyrin assemblies. *Chirality* **2008**, *20* (3-4), 411.
- (39) El-Hachemi, Z.; Escudero, C.; Arteaga, O.; Canillas, A.; Crusats, J.; Mancini, G.; Purrello, R.; Sorrenti, A.; D'Urso, A.; Ribo, J. M. Chiral sign selection on the J-aggregates of diprotonated tetrakis-(4-sulfonatophenyl) porphyrin by traces of unidentified chiral contaminants present in the ultra-pure water used as solvent. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry* **2009**, *21* (4), 408.
- (40) Castriciano, M. A.; Romeo, A.; De Luca, G.; Villari, V.; Scolaro, L. M.; Micali, N. Scaling the chirality in porphyrin J-nanoaggregates. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (4), 765.
- (41) Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Zagami, R.; Micali, N.; Scolaro, L. M. Kinetic effects of tartaric acid on the growth of chiral J-aggregates of tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin. *Chemical Communications* **2012**, *48* (40), 4872.
- (42) Sorrenti, A.; El-Hachemi, Z.; Arteaga, O.; Canillas, A.; Crusats, J.; Ribo, J. M. Kinetic Control of the Supramolecular Chirality of Porphyrin J-Aggregates. *Chemistry—A European Journal* **2012**, *18* (28), 8820.
- (43) Koti, A. S. R.; Periasamy, N. Self-assembly of template-directed J-aggregates of porphyrin. *Chemistry of materials* **2003**, *15* (2), 369.
- (44) Micali, N.; Villari, V.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. From fractal to nanorod porphyrin J-aggregates. Concentration-induced tuning of the aggregate size. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (16), 8289.
- (45) Choi, J. K.; D'Urso, A.; Balaz, M. Chiroptical properties of anionic and cationic porphyrins and metalloporphyrins in complex with left-handed Z-DNA and right-handed B-DNA. *Journal of inorganic biochemistry* **2013**, *127*, 1.
- (46) D'Urso, A.; Fragalà, M. E.; Purrello, R. In *Applications of Porphyrinoids*; Paolesse, R., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2014**, DOI:10.1007/7081_2013_113 10.1007/7081_2013_113.
- (47) Balaz, M.; De Napoli, M.; Holmes, A. E.; Mammana, A.; Nakanishi, K.; Berova, N.; Purrello, R. A cationic zinc porphyrin as a chiroptical probe for Z-DNA. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (26), 4006.
- (48) D'Urso, A.; Holmes, A. E.; Berova, N.; Balaz, M.; Purrello, R. Z-DNA Recognition in B-Z-B Sequences by a Cationic Zinc Porphyrin. *Chemistry – An Asian Journal* **2011**, *6* (11), 3104.
- (49) D'Urso, A.; Mammana, A.; Balaz, M.; Holmes, A. E.; Berova, N.; Lauceri, R.; Purrello, R. Interactions of a tetraanionic porphyrin with DNA: from a Z-DNA sensor to a versatile supramolecular device. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (6), 2046.
- (50) Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (13), 5393.
- (51) Pasternack, R. F.; Giannetto, A.; Pagano, P.; Gibbs, E. J. Self-assembly of porphyrins on nucleic acids and polypeptides. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (20), 7799.

- (52) De Luca, G.; Romeo, A.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F. Conformations of a model protein revealed by an aggregating CuII porphyrin: sensing the difference. *Chemical communications* **2010**, *46* (3), 389.
- (53) Occhiuto, I.; De Luca, G.; Villari, V.; Romeo, A.; Micali, N.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Supramolecular chirality transfer to large random aggregates of porphyrins. *Chemical Communications* **2011**, *47* (21), 6045.
- (54) Occhiuto, I. G.; Samperi, M.; Trapani, M.; De Luca, G.; Romeo, A.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Aggregates of a cationic porphyrin as supramolecular probes for biopolymers. *Journal of inorganic biochemistry* **2015**, *153*, 361.
- (55) Katzenelson, O.; Hel-Or, H. Z.; Avnir, D. Chirality of large random supramolecular structures. *Chemistry—A European Journal* **1996**, *2* (2), 174.
- (56) Katzenelson, O.; Avnir, D. Quantitative chirality/enantioselectivity relations in large random supramolecular structures. *Chemistry—A European Journal* **2000**, *6* (8), 1346.
- (57) Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry: Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*; W. H. Freeman, **1980**.
- (58) Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular dichroism: principles and applications*; John Wiley & Sons, **2000**.
- (59) Barron, L. D. *Molecular light scattering and optical activity*; Cambridge University Press, **2009**.
- (60) Majolino, D.; Mallamace, F.; Migliardo, P.; Micali, N.; Vasi, C. Elastic and quasielastic light-scattering studies of the aggregation phenomena in water solutions of polystyrene particles. *Physical Review A* **1989**, *40* (8), 4665.
- (61) Micali, N.; Mallamace, F.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Monsú Scolaro, L. Separation of Scattering and Absorption Contributions in UV/Visible Spectra of Resonant Systems. *Analytical Chemistry* **2001**, *73* (20), 4958.
- (62) Gooding, E. A.; Sharma, S.; Petty, S. A.; Fouts, E. A.; Palmer, C. J.; Nolan, B. E.; Volk, M. pH-dependent helix folding dynamics of poly-glutamic acid. *Chemical Physics* **2013**, *422*, 115.
- (63) Stryer, L.; Blout, E. R. Optical rotatory dispersion of dyes bound to macromolecules. cationic dyes: Polyglutamic acid complexes^{2, 3}. *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83* (6), 1411.
- (64) Castriciano, M. A.; Cardillo, S.; Zagami, R.; Trapani, M.; Romeo, A.; Scolaro, L. M. Effects of the mixing protocol on the self-assembling process of water soluble porphyrins. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (2), 797.
- (65) Zhao, L.; Liu, M.; Li, S.; Li, A.; An, H.; Ye, H.; Zhang, Y. Aggregation and supramolecular chirality of 5, 10, 15, 20-tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin on an achiral poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)-grafted ethylene-vinyl alcohol membrane. *Journal of Materials Chemistry C* **2015**, *3* (15), 3650.
- (66) Zhang, L.; Liu, M. Supramolecular chirality and chiral inversion of tetraphenylsulfonato porphyrin assemblies on optically active polylysine. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113* (42), 14015.
- (67) Thorpe, S. L.; Snyder, G. N.; Mammanna, A. Spectroscopic study of porphyrin self-assembly: Role of pH, time, and chiral template. *Chirality* **2020**, *32* (1), 5.

- (68) Pasternack, R. F.; Fleming, C.; Herring, S.; Collings, P. J.; dePaula, J.; DeCastro, G.; Gibbs, E. J. Aggregation kinetics of extended porphyrin and cyanine dye assemblies. *Biophys J* **2000**, *79* (1), 550.
- (69) Mammanna, A.; De Napoli, M.; Lauceri, R.; Purrello, R. Induction and memory of chirality in porphyrin hetero-aggregates: the role of the central metal ion. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2005**, *13* (17), 5159.
- (70) Julínek, O.; Goncharova, I.; Urbanová, M. Chiral memory and self-replication study of porphyrin and bilirubin aggregates formed on polypeptide matrices. *Supramolecular Chemistry* **2008**, *20* (7), 643.
- (71) Lauceri, R.; Purrello, R. Transfer, memory and amplification of chirality in porphyrin aggregates. *Supramolecular Chemistry* **2005**, *17* (1-2), 61.
- (72) Lauceri, R.; D'Urso, A.; Mammanna, A.; Purrello, R. In *Electronic and Magnetic Properties of Chiral Molecules and Supramolecular Architectures*; Naaman, R.; Beratan, D. N.; Waldeck, D., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**, DOI:10.1007/128_2010_87 10.1007/128_2010_87.
- (73) Castriciano, M. A.; Samperi, M.; Camiolo, S.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. Unusual Stepwise Protonation and J-Aggregation of meso-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphine on Binding Poly(sodium vinylsulfonate). *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (36), 12161.
- (74) Zagami, R.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Trapani, M.; Pedicini, R.; Scolaro, L. M. Tuning supramolecular chirality in nano and mesoscopic porphyrin J-aggregates. *Dyes and Pigments* **2017**, *142*, 255.
- (75) Manganaro, N.; Zagami, R.; Trapani, M.; Castriciano, M. A.; Romeo, A.; Scolaro, L. M. Role of Cobalt (III) Cationic Complexes in the Self-Assembling Process of a Water Soluble Porphyrin. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *22* (1), 39.
- (76) Frenkel, J. On the Transformation of light into Heat in Solids. I. *Physical Review* **1931**, *37* (1), 17.
- (77) Spano, F. C. The Spectral Signatures of Frenkel Polarons in H- and J-Aggregates. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (3), 429.
- (78) Schröter, M.; Ivanov, S. D.; Schulze, J.; Polyutov, S. P.; Yan, Y.; Pullerits, T.; Kühn, O. Exciton–vibrational coupling in the dynamics and spectroscopy of Frenkel excitons in molecular aggregates. *Physics Reports* **2015**, *567*, 1.
- (79) Ribó, J. M.; Bofill, J. M.; Crusats, J.; Rubires, R. Point-Dipole Approximation of the Exciton Coupling Model Versus Type of Bonding and of Excitons in Porphyrin Supramolecular Structures. *Chemistry – A European Journal* **2001**, *7* (13), 2733.
- (80) Mallamace, F.; Micali, N.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F.; Romeo, A.; Terracina, A.; Trusso, S. Porphyrin aggregation in aqueous solutions: small angle and quasielastic light scattering results. *Journal of Molecular Structure* **1996**, *383* (1), 255.
- (81) Ribó, J. M.; Crusats, J.; Farrera, J.-A.; Valero, M. L. Aggregation in water solutions of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, DOI:10.1039/C39940000681 10.1039/C39940000681(6), 681.
- (82) Pasternack, R. F.; Collings, P. J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. *Science* **1995**, *269* (5226), 935.

Capitolo 5

Interazione della porfirina

t -H₂P_{agg} con DPDS

5.1 - Introduzione

L'importanza degli *assemblies* multiporfirinici trova origine, in primo luogo, dagli esempi in natura e dai numerosi sistemi basati su assetti costituiti da più porfirine disposte in modo da avere una geometria ben controllata e da esibire proprietà elettroniche e/o catalitiche esattamente definite. La progettazione di architetture porfiriniche multicomponente tramite interazioni non covalenti quali interazioni idrofobiche, legami idrogeno e legami di coordinazione (interazione metallo-ligando) ha il vantaggio di potere utilizzare un “approccio modulare”. I frammenti relativamente piccoli e facili da preparare possono essere realizzati separatamente ed in un secondo momento, questi “moduli” possono essere riuniti e disposti nello spazio a piacimento, per ottenere un sistema complesso. Ovviamente per il chimico costituisce una sfida affascinante costruire matrici di componenti ad alto ordine secondo questa metodologia, e comunque la progettazione risulta difficile perché la coesione e la geometria dell'architettura finale dipendono esclusivamente da interazioni deboli. Sono state dimostrate diverse modalità di *assembling* supramolecolare sfruttando la funzionalità e la direzionalità dei gruppi di riconoscimento, la geometria planare-quadrata del macrociclo porfirinico e l'uso di ioni metallici e ligandi organici esterni per indurre la coordinazione.¹ Il processo richiede “*building blocks*” (o “*tectons*”) opportunamente predisposti che, in virtù della loro struttura e funzionalità, sono in grado di assemblarsi spontaneamente e generare anche vaste reti molecolari che possono espandersi nelle tre dimensioni.^{2,3} Tra i vari “*tectons*” di natura organica dunque le porfirine *meso*-sostituite rivestono un ruolo molto interessante⁴⁻⁶ non soltanto perché offrono proprietà fotofisiche ed elettrochimiche facilmente modulabili, ma anche perché il numero delle possibili interazioni è ridotto ed è tale da limitare combinazioni che porterebbero a strutture non desiderate. Questo tipo di molecole, è stato ampiamente utilizzato con approccio covalente e non, per la formazione di architetture discrete⁷⁻¹⁴ o anche di networks a coordinazione illimitata.^{4,15-18} In questo contesto, la porfirina *trans*-bis(N-

metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$), caratterizzata dalla presenza di due cariche positive sui residui N-metilpiridinio nelle posizioni 5-15 dell'anello porfirinico offre la possibilità di potere progettare, tramite interazione con opportune specie di carica opposta, la formazione di aggregati aventi geometrie ben definite. Una specie idonea in tal senso si è rivelata essere il sale disodico dell'acido 4,4'-bifenildisolfonico (DPDS) (Figura 1) che permette la formazione di estese strutture aggregate nelle quali l'accoppiamento elettronico tra le porfirine è molto forte in accordo con la formazione di strutture di tipo J.

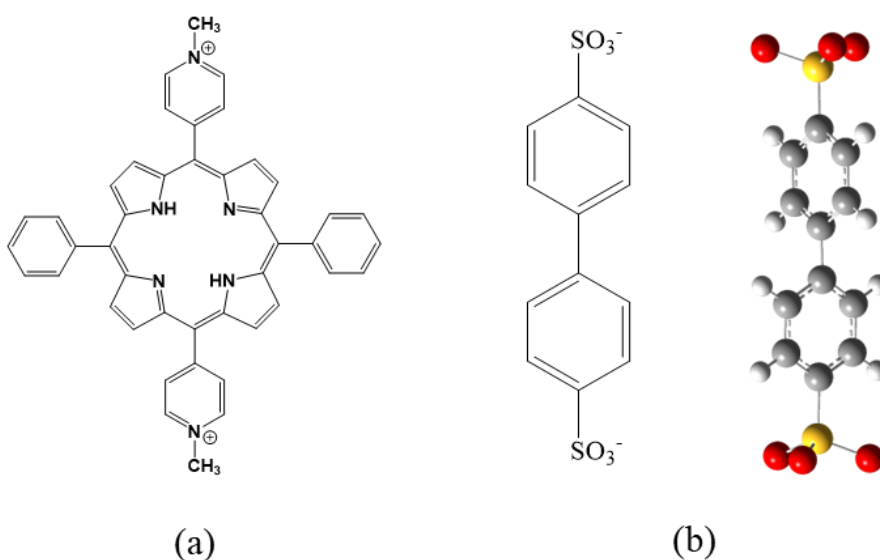


Figura 1. (a) Struttura molecolare della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ e (b) del DPDS con relativa struttura tridimensionale.

5.2 - Risultati e discussione

5.2.1 - Caratterizzazione spettroscopica del sistema

t-H₂P_{agg} – DPDS

La porfirina *t*-H₂P_{agg} è caratterizzata da una banda di Soret centrata a 419 nm e quattro bande Q posizionate rispettivamente a 519, 559, 581 e 641 nm (Figura 2a). Lo spettro di emissione di fluorescenza mostra un tipico profilo a doppia banda con i massimi centrati a 667 e 716 nm (Figura 2b). L'aggiunta di DPDS ad una soluzione acquosa contenente *t*-H₂P_{agg} porta all'immediata formazione di una specie contraddistinta da una netta variazione di tutte le caratteristiche spettroscopiche. Più specificatamente, lo spettro UV/Vis evidenzia la presenza di un marcato *splitting* eccitonico potendo osservare rispettivamente: (i) un notevole spostamento batocromico sia della banda B ($\Delta\lambda = 35$ nm) che delle bande Q (526, 562, 597 e 651 nm) con la banda principale che ha peculiarità di essere molto intensa e stretta; (ii) la formazione di una nuova banda a più alta energia e posizionata a 402 nm ($\Delta\lambda = 17$). Il corrispondente spettro di emissione di fluorescenza presenta sempre un profilo a doppia banda ma il rapporto relativo delle stesse risulta ampiamente modificato e con la banda a minore energia più spostata nel rosso ($\Delta\lambda = 11$ nm). Queste evidenze sperimentali sono in accordo con la formazione di una componente J (a minore energia) e di una componente H (a più alta energia) come risultato dello *splitting* eccitonico. Esperimenti di *resonance light scattering* (RLS) sostanziano questa ipotesi potendo riscontrare la formazione di un intenso segnale con il profilo dello spettro caratterizzato da un massimo leggermente spostato nel rosso ($\lambda = 463$ nm) rispetto alla regione di assorbimento della banda principale, in stretta analogia con ciò che si verifica con gli aggregati J della porfirina TPPS₄. Contrariamente a questi ultimi, il dato più interessante di questa specie è il mantenimento dell'emissione di

fluorescenza come, tra l'altro, anche evidenziato dai risultati ottenuti su dei campioni depositati su vetrini ed osservati al microscopio.

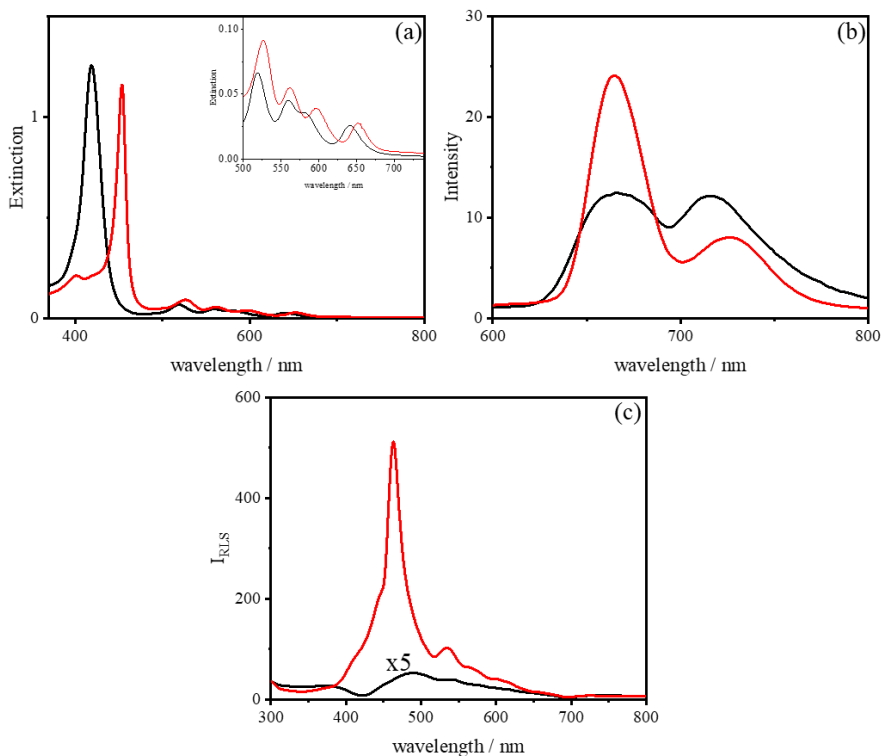


Figura 2. Spettri UV/Vis (a), di emissione di fluorescenza (b) e di RLS (c) della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera) e spettri registrati dopo l'aggiunta di DPDS (linea rossa). Nell'inset sono riportati gli ingrandimenti dei medesimi spettri nella regione 500-750 nm. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$, $T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 519 \text{ nm}$.

In Figura 3 è mostrata una comparazione delle immagini ottiche acquisite in trasmissione ed in fluorescenza mentre in Figura 4 sono riportati gli spettri corrispondenti ai campioni depositati e registrati utilizzando una fibra ottica.

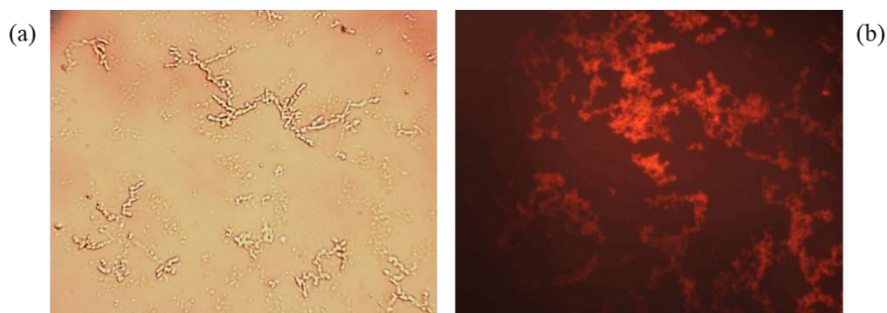


Figura 3. Immagini ottiche (40X) dell'aggregato formato dalla porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ e dal DPDS, ottenute mediante microscopia a trasmissione (a) e di fluorescenza (b). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$, $T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 519 \text{ nm}$.

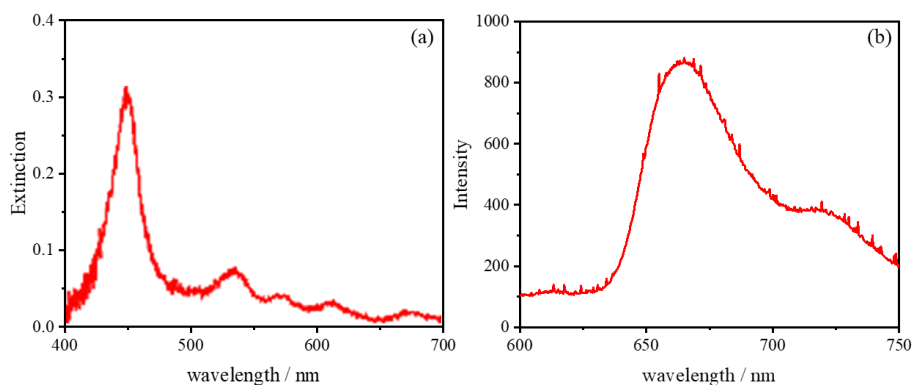


Figura 4. Spettro UV/Vis (a) e spettro di emissione di fluorescenza (b) registrati utilizzando una fibra ottica. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$, $T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 519 \text{ nm}$.

Al fine di valutare i rapporti di concentrazione per i quali tutte le unità monomeriche della porfirina sono convertite nell'aggregato è stata condotta una titolazione con DPDS. Ad ogni aggiunta la reazione è istantanea e la conversione completa del monomero in aggregato risulta a concentrazione di un ordine superiore al rapporto stechiometrico in carica trovando un rapporto minimo porfirina/DPDS 5/50 μM . In queste condizioni la specie che si forma è stabile per giorni, mentre a concentrazione più elevata di DPDS il sistema risulta instabile e macroscopicamente si avverte incipienza di precipitazione come sostanziato dalla marcata ipocromicità degli spettri UV/Vis caratterizzati da un leggero scodamento sul rosso della banda e da un innalzamento della linea di base in tutto l'intervallo spettrale. Gli spettri di

emissione di fluorescenza risultano parzialmente estinti in intensità così come i segnali degli spettri RLS.

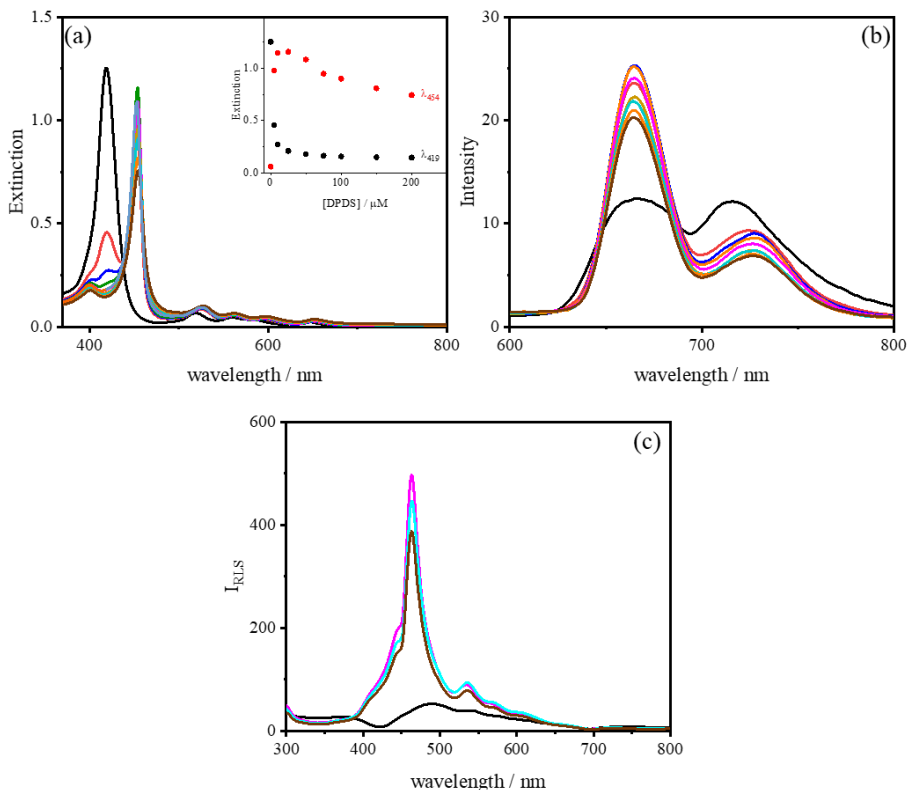


Figura 5. Spettri UV/Vis (a), di emissione di fluorescenza (b) e spettri RLS (c) relativi ad una titolazione della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera) condotta al variare della concentrazione di legante anionico: $[\text{DPDS}] = 5 \mu\text{M}$ (linea rossa), $[\text{DPDS}] = 10 \mu\text{M}$ (linea blu), $[\text{DPDS}] = 25 \mu\text{M}$ (linea verde), $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$ (linea magenta); $[\text{DPDS}] = 75 \mu\text{M}$ (linea gialla), $[\text{DPDS}] = 100 \mu\text{M}$ (linea azzurra), $[\text{DPDS}] = 150 \mu\text{M}$ (linea arancione), $[\text{DPDS}] = 200 \mu\text{M}$ (linea marrone). Nell’inset sono riportate le intensità delle bande a 454 nm (rosso) e a 419 nm (nero). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 5 - 200 \mu\text{M}$, $T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 519 \text{ nm}$.

Dopo aver valutato i rapporti di concentrazione in cui la porfirina è completamente convertita nella struttura aggregata, sono state condotte delle misure per valutare la stabilità del sistema alle variazioni di pH e della forza ionica.

Come mostrato in Figura 6 l'aggiunta di HCl per raggiungere le condizioni di acidità ($\text{pH} = 2$) al di sotto del valore di pK_a (2.8) della porfirina, determina immediatamente una lieve ipocromicità della banda principale unitamente alla comparsa di una spalla posizionata a 444 nm unitamente ad un *quenching* di fluorescenza ed una diminuzione del segnale di RLS. Queste evidenze sperimentali, invariabili nel tempo (anche dopo 24h) sono in accordo con la parziale formazione della specie diacida della $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ come sostanziato anche dai risultati di deconvoluzione effettuati e riportati in Figura 7.

È utile osservare come le condizioni di pH sono quelle per cui in bulk la porfirina dovrebbe esistere soltanto nella sua forma diprotonata, da cui se ne deduce che si ha certamente una parziale disaggregazione del sistema, ma contestualmente una stabilizzazione della base libera. Un ulteriore marcato abbassamento del pH, tuttavia, determina la scomparsa di tutte le caratteristiche spettroscopiche riconducibili alla specie aggregata puntando verso la presenza della sola specie diacida. Infatti, lo spettro UV/Vis evidenzia la presenza di una banda centrata a 444 nm accompagnata da due bande Q posizionate rispettivamente a 600 e 664 nm. Il corrispondente spettro di emissione di fluorescenza ha il profilo tipico delle forme diacide delle porfirine con un massimo centrato a 714 nm accompagnato da una spalla ad energia più alta centrata a 684 nm. A riprova del completo disfacimento del sistema aggregato, lo spettro RLS in queste condizioni di acidità evidenzia un'intensità paragonabile al monomero della base libera con un profilo che è modulato unicamente dal forte assorbimento della banda B centrata a 444 nm.

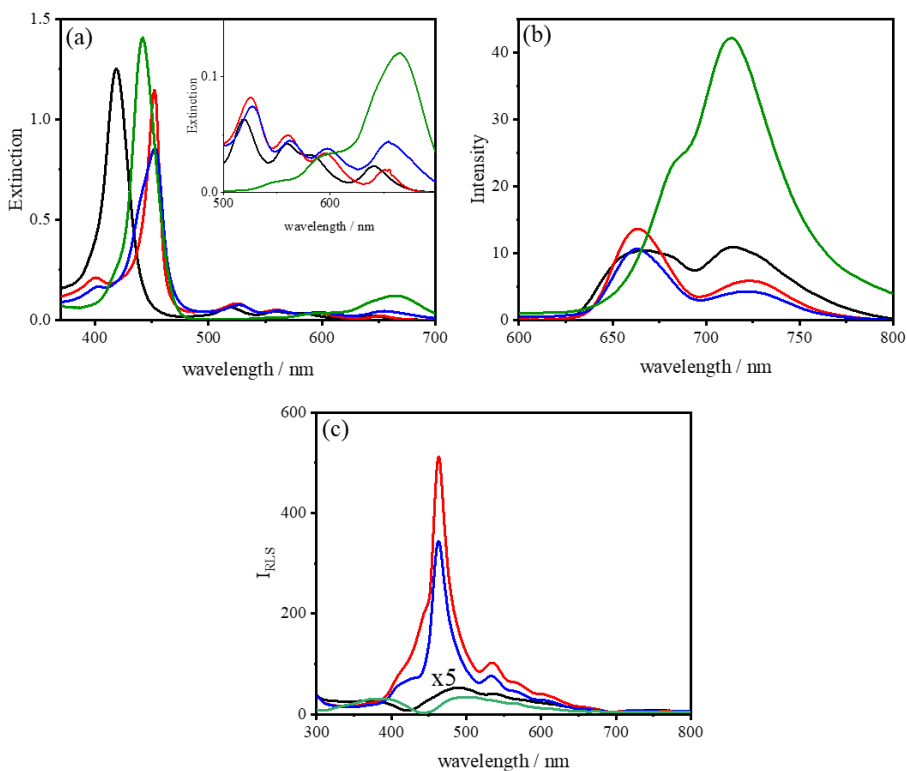


Figura 6. (a) Spettri UV/Vis, (b) di emissione di fluorescenza e (c) di RLS per la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera) e dopo le aggiunte di DPDS (linea rossa), HCl a pH = 2 (linea blu) e pH = 1 (linea verde). Nell'inset è riportato un ingrandimento degli spettri nella regione 500-740 nm. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$, pH = 1-2, $T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 519 \text{ nm}$.

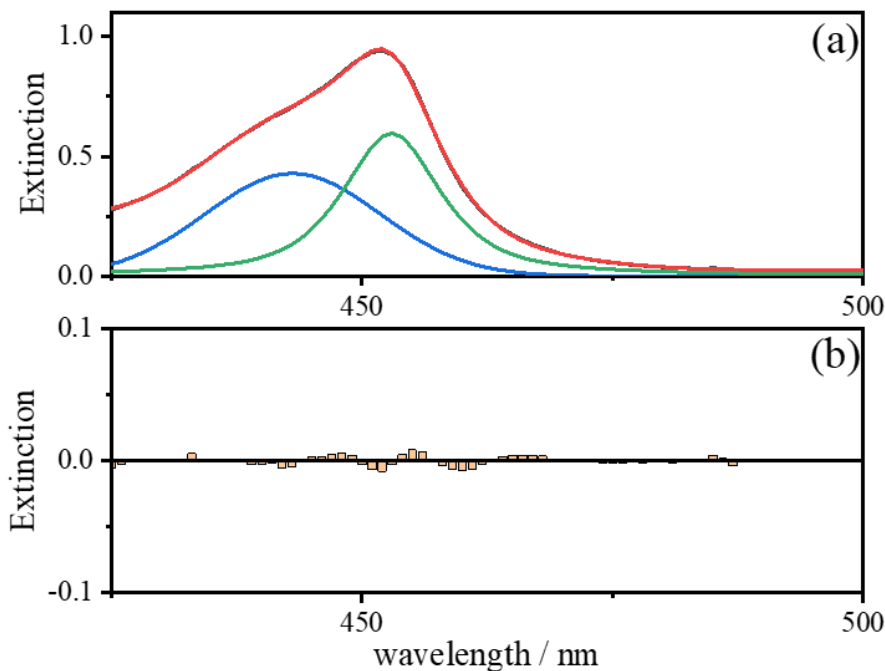


Figura 7. (a) Deconvoluzione dello spettro UV/Vis registrato dopo acidificazione a pH 2 dei clusters porfirinici formati mediante DPDS e (b) relativi residui. Spettro osservato (linea nera); spettro calcolato (linea rossa); banda calcolata mediante Funz. 1 relativa alla specie diacida $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (λ_{444} - linea blu); banda calcolata mediante Funz. 2 relativa ai clusters porfirinici formati mediante DPDS (λ_{454} - linea verde). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$, $T = 293 \text{ K}$.

Per quanto concerne la stabilità dell'aggregato al variare della forza ionica, sono stati condotti degli esperimenti nei quali, ai clusters preformati tramite DPDS, è stato aggiunto del sale a diversa concentrazione. Come si evince dagli spettri riportati in Figura 8, l'impiego rispettivamente di NaCl 0.1 M (linea blu) e 0.3 M (linea verde), determinano un'immediata minima declusterizzazione dovuta all'effetto di deschermaggio, con le soluzioni che si mantengono comunque stabili nel tempo. Nel dettaglio, gli spettri UV/Vis mostrano un effetto ipocromico ed in particolare, con l'impiego della concentrazione maggiore di sale, si inizia ad apprezzare la formazione della banda relativa al monomero posizionata a 419 nm. Per quanto concerne gli spettri di emissione di fluorescenza (Figura 8b), l'impiego di sale causa un parziale spegnimento dell'emissione, più accentuato nel caso della

concentrazione più elevata di sale. Gli spettri RLS evidenziano ancora intensi segnali, a riprova della persistente presenza di una specie di tipo J nella quale l'accoppiamento dei cromofori risulta forte ed esteso.

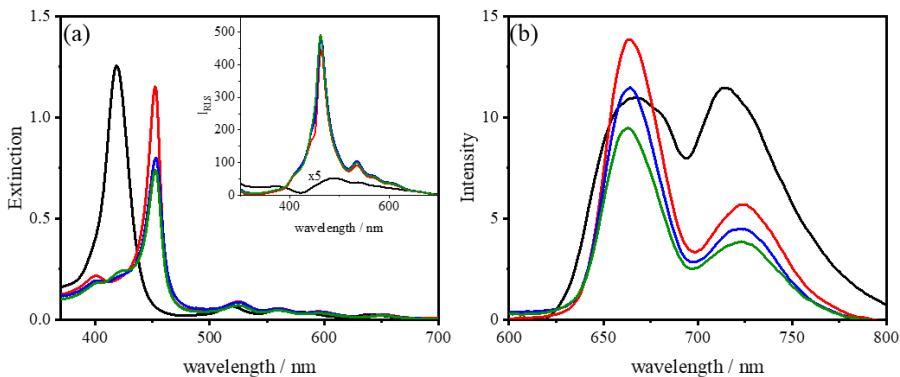


Figura 8. (a) Spettri UV/Vis e (b) di emissione di fluorescenza per la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera) e dopo le aggiunte di DPDS (linea rossa), NaCl 0.1 M (linea blu) e NaCl 0.3 M (linea verde). Nell'inset sono riportati gli spettri RLS corrispondenti. Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 0.1 / 0.3 \text{ M}$, $T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 519 \text{ nm}$.

3.2.3 – Competizione tra DPDS e forza ionica

Come visto in precedenza nel Capitolo 3, la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ all'aumentare della forza ionica è soggetta ad un processo cinetico di aggregazione la cui velocità varia dipendentemente dalla natura del sale impiegato. Le strutture aggregate risultanti hanno natura frattalica e sono caratterizzate da una banda di estinzione posizionata a 450 nm, uno spegnimento dell'emissione di fluorescenza e da un segnale RLS mediamente intenso centrato a 467 nm. Al fine di valutare quale fosse il processo di aggregazione favorito, ovvero sia formazione di clusters frattalici o aggregato J, si è proceduto ad effettuare degli esperimenti nei quali, ad una soluzione di porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ è stata aggiunta una soluzione premiscolata di DPDS 50 μM e sale sodico. Inoltre, con l'ulteriore obiettivo di verificare se la natura intrinseca dell'anione e quindi anche la diversa forza ionica, potesse avere una qualche influenza sul processo, sono stati impiegati NaCl 0.1 M e NaSCN 1 mM, concentrazioni saline i cui risultati sono stati esaustivamente descritti nel capitolo 3.

In entrambi i casi si ha l'istantanea formazione dell'aggregato formato con DPDS e le cui caratteristiche spettroscopiche sono assolutamente analoghe a quelle riportate in Figura 1. Tale risultato, indica la tendenza della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ alla formazione dell'aggregato cineticamente più veloce. Inoltre, il quadro delle evidenze sperimentali evidenzia come tale aggregato, una volta formato, risulta essere piuttosto stabile tantoché in seguito all'aumento di forza ionica, esso non converte neppure parzialmente nella struttura frattalica, persino dopo un lungo tempo di attesa. Tale risultato indica che la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ in interazione con DPDS, determina la formazione di una specie che oltre ad essere cineticamente favorita, è anche stabile termodinamicamente.

Alla luce dei risultati ottenuti, si è inteso anche verificare se la forte affinità della porfirina per il DPDS potesse essere in grado di portare ad una declusterizzazione dei sistemi frattalici preformati con NaCl (0.1 M e 0.3 M) e NaSCN (1 mM e 5 mM). Le evidenze spettroscopiche riportate in Figura 9, mostrano

che l'aggiunta di DPDS ad una soluzione in cui è presente un residuo del monomero (rispettivamente NaSCN 1 mM e NaCl 0.1 M) conduce alla formazione dell'aggregato formato con DPDS. Più specificatamente gli spettri UV/Vis mostrano: (i) una scomparsa della banda relativa al monomero ($\lambda = 419$ nm); (ii) un aumento in intensità della banda principale che muove da 450 nm (tipica del frattale) a 454 nm (tipica dell'aggregato J) e caratterizzata anche da un notevole restringimento ben percepibile a lunghezza d'onda maggiori; (iii) la comparsa della banda relativa alla componente H dell'aggregato ($\lambda = 402$ nm). Gli spettri di emissione di fluorescenza (inset Figura 9b) sono in accordo con questa visione risultando, all'aggiunta di DPDS, un incremento dell'emissione di fluorescenza per formazione dell'aggregato di tipo J il quale ha un profilo dello spettro completamente diverso da quello del residuo del monomero che caratterizza il sistema frattalico. Gli spettri RLS sostanziano ulteriormente quanto descritto mostrando, all'aggiunta di DPDS, un netto aumento del segnale con lo spettro che evidenzia anche marcate differenze dal punto di vista del profilo, risultando molto più stretto rispetto a quello esibito dal frattale preformato e del tutto simile a quello dell'aggregato J.

L'aggiunta di DPDS ai clusters frattalici formati attraverso l'impiego di alte concentrazioni di sale (NaSCN 5 mM e NaCl 0.3 M) determina un quadro delle evidenze sperimentali ben diverso dal caso precedente. Gli spettri UV/Vis mostrano la scomparsa della modesta frazione di monomero residuo ed il contestuale esiguo aumento di intensità della banda principale posizionata a 450 nm mentre, in nessun caso, è tangibile la presenza di specie a più alta energia. Gli spettri di emissione di fluorescenza (inset Figura 9d) mostrano unicamente uno spegnimento progressivo della fluorescenza senza evidenziare in alcuno modo la presenza di specie aggregate mediate da DPDS. Gli spettri di RLS rivelano, invece, un aumento di intensità con un profilo degli spettri che rimane però del tutto inalterato rispetto a quello dei frattali preformati. Tutte le evidenze sperimentali sembrerebbero essere in accordo con (i) una declusterizzazione dei frattali formati a forza ionica minore con formazione di aggregato J e H per interazione con DPDS e (ii) lo spostamento, mediato da DPDS,

dell'equilibrio monomero/aggregato frattalico nel caso delle specie a concentrazione più alta di sale. In definitiva, la mancata disaggregazione del frattale sembrerebbe essere imputabile alle diverse condizioni di forza ionica; questa ipotesi però potrebbe essere valida soltanto nel caso del frattale precostituito con NaCl, certamente non è realistico pensare, anche alla luce di tutti i risultati ottenuti, che nel caso del frattale preformato a 5 mM di NaSCN la mancata disaggregazione sia imputabile ad una mancata interazione del DPDS per mero effetto di schermo. Piuttosto, ancora una volta la differenza di reattività potrebbe essere imputata alla diversa struttura dei frattali formati come argomentato nel capitolo 4. I dati di letteratura^{19,20} riportano nel caso della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ rispettivamente la formazione di un frattale di tipo DLA (0.1M NaCl) più denso e DLCCA (0.3M NaCl) meno denso. Dalle considerazioni fatte nel capitolo 4 è possibile pensare che un *crossover* strutturale avvenga anche nel caso del frattale con tiocianato, essendo quello a 5 mM probabilmente meno denso di quello a 1 mM. La diversa porosità potrebbe dunque essere correlata alla diversa reattività con il DPDS, ma ovviamente, trattasi di considerazioni unicamente speculative, una maggiore certezza su questo tipo di interazione la si potrebbe avere effettuando mirati esperimenti di diffusione quasi elastica della luce (QELS).

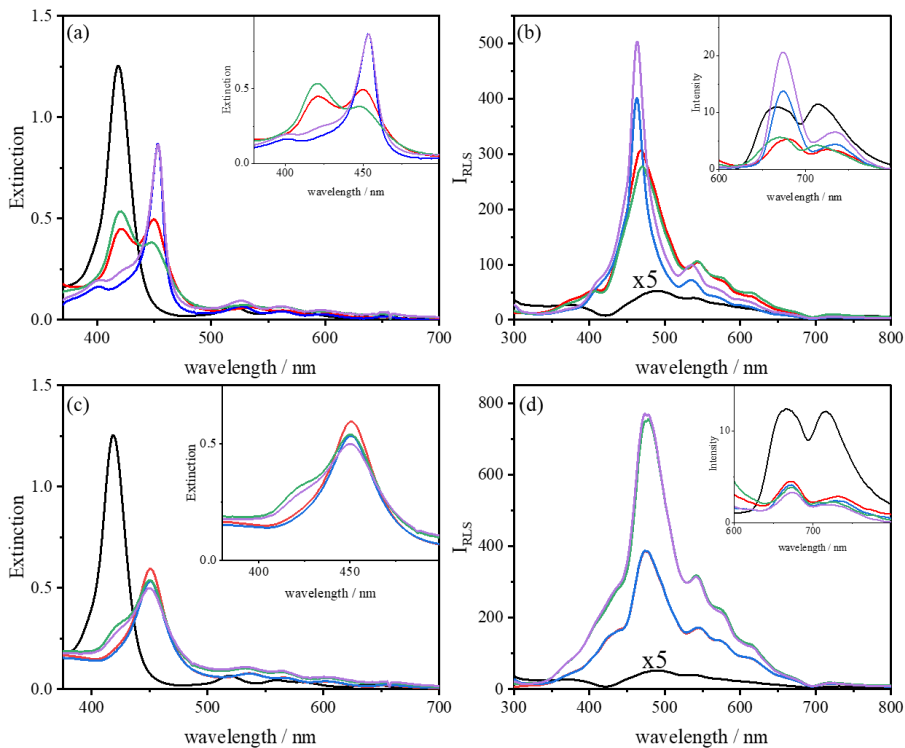


Figura 9. Spettri UV/Vis, di RLS e di emissione di fluorescenza registrati in seguito all'aggiunta di DPDS sui clusters preformati di porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, ottenuti in seguito all'aggiunta di una (a-b) bassa concentrazione di sale ($\text{NaSCN} = 1 \text{ mM}$ e $\text{NaCl} = 0.1 \text{ M}$) e di (c-d) un'alta concentrazione di sale ($\text{NaSCN} = 5 \text{ mM}$ e $\text{NaCl} = 0.3 \text{ M}$). $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ (linea nera); NaSCN (linea rossa); NaSCN / DPDS (linea blu); NaCl (linea verde); NaCl / DPDS (linea viola). Condizioni sperimentali: $[t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}] = 5 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{NaSCN}] = 1 / 5 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 0.1 / 0.3 \text{ M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \text{ }\mu\text{M}$, $T = 293 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 519 \text{ nm}$.

3.2.5 - Modello strutturale

Al fine di potere proporre un plausibile modello strutturale dell'aggregato sono state condotte delle misure di *Depolarized Resonance Light Scattering* che costituisce una potente sonda per la valutazione delle strutture geometriche ed elettroniche di estesi aggregati di cromofori che risultano in stretto accoppiamento tra loro.²¹ Tale tecnica suggerisce che il valore del rapporto di depolarizzazione del segnale $\rho_V(90)$ dipende esclusivamente dal rapporto dei valori principali del tensore di polarizzabilità alla frequenza di risonanza e pertanto, il rapporto di depolarizzazione si riferisce alla geometria dello stato eccitato dell'aggregato, indipendentemente dalle sue dimensioni. Le misure sperimentali sono state effettuate sul sistema $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}/\text{DPDS}$ (5/50) μM ed hanno portato ad un valore del rapporto di depolarizzazione del segnale $\rho_V(90)$ di 0.12 che ha permesso di calcolare due possibili angoli di scorrimento (*slip angle* - φ) associati ai momenti di dipolo di transizione accoppiati e quindi relativi a piani porfirinici adiacenti, ottenendo i valori di $\varphi = 27^\circ$ oppure 83° . L'angolo più piccolo è compatibile con la formazione di strutture di tipo J come riportato nella rappresentazione schematica riportata in Figura 10.

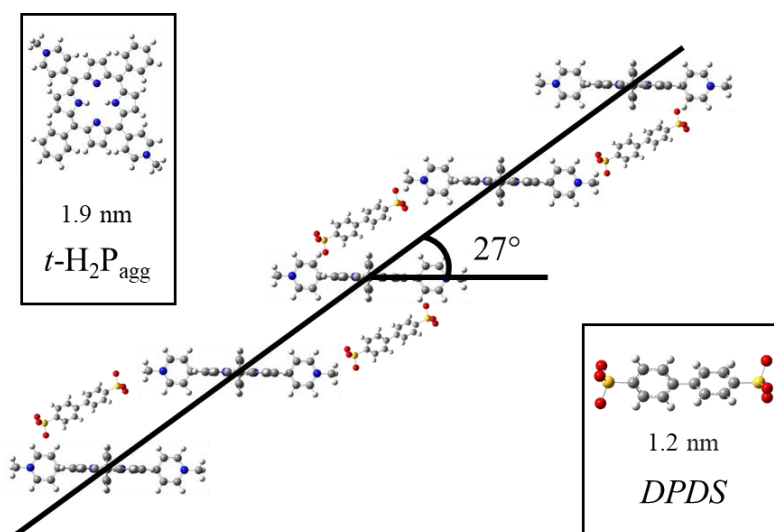


Figura 10. Rappresentazione grafica del modello strutturale dell'aggregato della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ con DPDS.

Al fine di ottenere ulteriori informazioni utili per la validazione del modello si è proceduto ad ulteriori sperimentazioni atte ad appurare l'eventuale coinvolgimento del *core* mediante l'impiego di metallo derivati della porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$. Il derivato di Cu(II) *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-CuP}_{\text{agg}}$) è una specie che mostra una marcata propensione all'autoaggregazione anche in condizioni di forza ionica piuttosto bassa, una proprietà più pronunciata rispetto alla porfirina progenitrice $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, probabilmente a causa di una rigidità strutturale dovuta alla presenza dello ione rame(II) che impone una coordinazione planare quadrata.³ Dal punto di vista spettroscopico la porfirina $t\text{-CuP}_{\text{agg}}$ è caratterizzata da una banda B posizionata a 418 nm e due bande Q centrate rispettivamente a 545 e 590 nm. Lo spettro di RLS mostra la presenza di un moderato segnale in linea con l'elevata tendenza all'autoaggregazione ed imputabile alla formazione di piccoli oligomeri.²² In seguito all'aggiunta di DPDS, in analogia a quanto accade con la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, si determina un netto *splitting* eccitonico (Figura 11a) con formazione della banda attribuibile all'aggregato J spostata nel rosso e centrata a 444 nm ($\Delta\lambda = 24$ nm) e della banda ascrivibile alla componente H a più alta energia e posizionata a 397 nm ($\Delta\lambda = 21$ nm). Lo spettro RLS risulta essere intenso con un profilo caratterizzato da una banda centrata a 465 nm (Figura 11b).

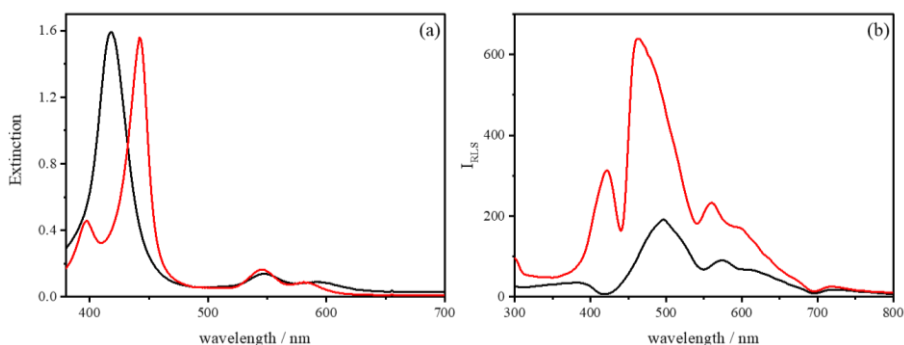


Figura 11. Spettri UV/Vis (a) e spettri RLS (b) della porfirina $t\text{-CuP}_{\text{agg}}$ (linea nera) e dell'aggregato formato in seguito all'aggiunta di DPDS (linea rossa). Condizioni sperimentali: $[t\text{-CuP}_{\text{agg}}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{DPDS}] = 50 \mu\text{M}$, $T = 293 \text{ K}$.

Il derivato di Au(III) *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina (*t*-AuP_{agg}) è una specie che notoriamente mostra una scarsa tendenza all'aggregazione^{23,24} a causa della sua elevata densità di carica a livello del *core*. La porfirina *t*-AuP_{agg} è caratterizzata da una banda B posizionata a 406 nm e due bande Q centrate rispettivamente a 523 e 558 nm e lo spettro RLS, a conferma della propensione alla non aggregazione, risulta essere comparabile in intensità al solvente ed il suo profilo è caratterizzato da un minimo in corrispondenza dell'assorbimento della banda B (Figura 12). All'aggiunta di una concentrazione crescente di DPDS si ottiene uno spostamento batocromico della banda principale che risulta centrata a 415 nm unitamente ad un moderato effetto ipocromico ed uno spostamento nel rosso delle due bande Q (529 e 563 nm). Nessun cambiamento tangibile è osservabile nello spettro RLS in linea con la mancata formazione di aggregati strutturati tra i cromofori.

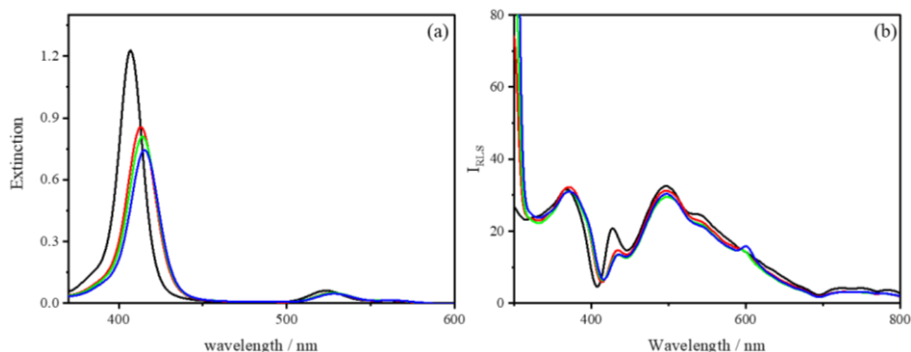


Figura 12. Spettri UV/Vis (a) e spettri RLS (b) della porfirina *t*-AuP_{agg} (linea nera) e dell'aggregato formato in seguito all'aggiunta di varie concentrazioni DPDS. [DPDS] = 100 μM (linea rossa), [DPDS] = 200 μM (linea verde), [DPDS] = 350 μM (linea blu). Condizioni sperimentali: [*t*-AuP_{agg}] = 5 μM, [DPDS] = 100 - 350 μM, T = 293 K, λ_{exc} = 519 nm.

Un'ulteriore prova di interazione con il DPDS è stata effettuata con la porfirina tetracationica *meso*-tetrakis(N-metilpiridinio-4-il)porfirina (TMpyP). Questa specie, in analogia alla porfirina *t*-AuP_{agg} ha scarsa propensione all'aggregazione²⁵⁻²⁸ a causa della repulsione tra le cariche positive delocalizzate sui sostituenti nelle posizioni *meso* che impediscono la formazione di dimeri e aggregati superiori. Essa è caratterizzata da uno spettro UV/Vis che evidenzia la banda principale centrata a 422

nm accompagnata da quattro bande Q (518, 551, 585 e 641 nm). Lo spettro di emissione di fluorescenza è caratterizzato dal tipico profilo a doppia banda con i massimi posizionati a 658 e 713 nm, mentre lo spettro RLS ha un'intensità comparabile a quella del solvente (Figura 13). Anche in questo caso, all'aggiunta graduale di DPDS si osserva un effetto ipocromico della banda B unitamente ad un suo spostamento batocromico fino al raggiungimento di una specie caratterizzata dalla banda di Soret centrata a 435 nm e quattro bande Q anch'esse spostate ad energia minore (523, 563, 587 e 643 nm). Per quanto concerne gli spettri di emissione di fluorescenza si osserva una variazione dei rapporti di intensità delle bande con spostamenti dei massimi ad energia minore (666 e 718 nm) mentre lo spettro di RLS di fatto risulta inalterato. Tutte le evidenze sperimentali dimostrano che il modello proposto in Figura 11 è compatibile con metallo derivati in quanto non vede un coinvolgimento diretto del *core* porfirinico, tantoché il derivato di Cu(II) si comporta in modo analogo evidenziando un forte splitting eccitonico. Il derivato di Au(III) si comporta in modo diverso presumibilmente a causa dell'elevata densità di carica centrata sul *core* che impedisce interazioni di π -stacking tra porfirine adiacenti mentre la porfirina tetracationica TmpyP sembrerebbe potere formare delle strutture nelle quali, però, non risulta un buon accoppiamento dei cromofori.

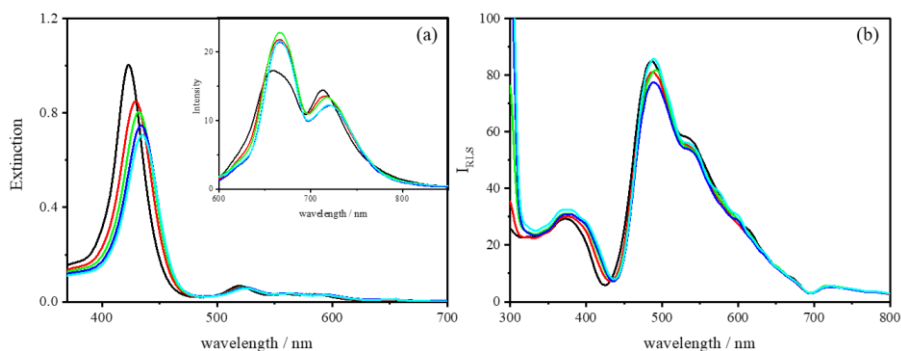


Figura 13. Spettri UV/Vis (a) e spettri RLS (b) della porfirina TmpyP (linea nera) e dell'aggregato formato in seguito all'aggiunta di varie concentrazioni DPDS. [DPDS] = 20 μ M (linea rossa), [DPDS] = 100 μ M (linea verde), [DPDS] = 350 μ M (linea blu), [DPDS] = 560 μ M (linea azzurra). Nell'inset sono riportati gli spettri di emissione di fluorescenza. Condizioni sperimentali: [TmpyP] = 5 μ M, [DPDS] = 20 - 560 μ M, T = 293 K, λ_{exc} = 519 nm.

5.3 – Conclusioni

La porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ possiede le due cariche positive sui residui N-metilpiridinio nelle posizioni 5-15 dell'anello porfirinico. Tale disposizione permette in linea teorica di potere progettare, tramite interazione con opportune specie di carica opposta, la formazione di aggregati aventi geometrie ben definite. Una specie idonea in tal senso si è rivelata essere il sale disodico dell'acido 4,4'-bifenildisolfonico (DPDS). L'interazione tra la porfirina $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ e il DPDS è istantanea, e dipendentemente dal rapporto di concentrazione impiegato, conduce a strutture per le quali le evidenze spettroscopiche sottolineano l'esistenza di un notevole *splitting* eccitonico con formazione di estese strutture aggregate nelle quali l'accoppiamento elettronico tra le porfirine è molto forte. Il quadro sperimentale è in accordo con la formazione di strutture di tipo J, le quali tra l'altro, risultano essere fluorescenti come riscontrato da una comparazione delle immagini ottiche acquisite in trasmissione ed in fluorescenza. Le informazioni strutturali ottenute dal *resonance light scattering depolarizzato*, insieme agli studi condotti su alcuni derivati metallici della $t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$, hanno permesso di proporre un modello strutturale per l'aggregato supramolecolare. Tale modello prevede la formazione di un aggregato di tipo J con accoppiamento dei cromofori secondo un angolo di scorrimento pari a 27° mediato dall'interazione con DPDS.

5.4 – Materiali e metodi

Materiali e preparazione dei campioni

Le porfirine *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$) e *meso*-tetrakis(N-metilpiridinio-4-il)porfirina (TMpyP), sono state acquistate come sale cloruro dalla ditta Mid-Century Chemicals e sono state impiegate come ricevuta senza ulteriore purificazione. Le porfirine Cu(II) *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-CuP}_{\text{agg}}$) e Au(III) *trans*-bis(N-metilpiridinio-4-il)difenilporfirina ($t\text{-AuP}_{\text{agg}}$), sono state preparate in accordo a procedimenti presenti in letteratura.^{29,30}

Le soluzioni stock di porfirina sono state preparate sciogliendo i rispettivi solidi in acqua purificata millipore e sono state conservate al riparo dalla luce ed utilizzate entro una settimana dalla loro preparazione. Le concentrazioni delle soluzioni acquose madre di porfirina sono state determinate misurando il valore dell'assorbanza in corrispondenza del picco della banda di Soret ($t\text{-H}_2\text{P}_{\text{agg}}$ ²⁰: $\epsilon_{419} = 2.40 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $t\text{-CuP}_{\text{agg}}$ ²⁴: $\epsilon_{417} = 2.34 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $t\text{-AuP}_{\text{agg}}$ ²⁴: $\epsilon_{407} = 2.23 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, TMpyP³¹: $\epsilon_{422} = 2.34 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Il sale disodico dell'acido 4,4'-bifenildisolfonico (DPDS) e i vari sali impiegati sono stati acquistati dalla ditta Aldrich & Co. ed utilizzati come ricevuti. In generale, tutte le soluzioni impiegate in questo studio sono state preparate impiegando acqua in fiale per preparazioni iniettabili acquistate dalla Galenica Senese. Tutte le condizioni di pH citate sono state ottenute per mezzo dell'aggiunta di acido cloridrico di appropriata concentrazione.

Misure spettroscopiche

Gli spettri di assorbimento UV/Vis sono stati registrati con uno spettrofotometro Agilent mod. 8453 a diode array utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico da 1 cm. Un filtro UV (Hoya UV-34, cut-off: 340nm) è stato

impiegato in tutte le misure cinetiche al fine di tagliare la componente ultravioletta della sorgente luminosa così da prevenire fenomeni di fotodegradazione delle porfirine. Gli esperimenti cinetici sono stati effettuati con l'ausilio del portacampione termostato dello strumento e lasciando equilibrare la temperatura (con accuratezza di ± 0.1 K) per almeno 20 minuti prima di procedere all'avvio di ogni *run* cinetico.

I calcoli di deconvoluzione degli spettri di estinzione sono stati condotti mediante software PeakFit® utilizzando la funzione 1 denominata “Gaussian Amplitude” e la funzione 2 denominata “Gaussian-Lorentzian Sum (Amplitude)” i cui parametri sono qui riportati.

$$y = a_0 \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right) \quad \text{(Funz. 1)}$$

$a_0 = \text{ampiezza}$

$a_1 = \text{centro banda}$

$a_2 = \text{larghezza } (> 0)$

$$y = a_0 \left(\frac{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} \exp\left(-4\left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right) + \frac{1 - a_3}{\pi a_2 \left(1 + 4\left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right)}}{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} + \frac{1 - a_3}{\pi a_2}} \right) \quad \text{(Funz. 2)}$$

$a_0 = \text{ampiezza}$

$a_1 = \text{centro banda}$

$a_2 = \text{larghezza } (> 0)$

$a_3 = \text{forma } (\geq 0; \leq 1)$

Gli spettri di emissione di fluorescenza e di resonance light scattering (RLS) sono stati effettuati per mezzo di uno spettrofluorimetro Jasco FP-750 equipaggiato con un fotomoltiplicatore Hamamatsu R928 e dotato di una lampada Xenon da 150 W. Gli esperimenti RLS sono stati eseguiti adottando un assetto di rilevamento ad angolo retto³² e gli spettri sono stati corretti per l'assorbimento dei campioni mediante l'equazione:³³

$$(I_{RLS})_{corr} = I_{RLS} \cdot 10^{-Ext} \quad \text{(Eq. 1)}$$

Le misure di *depolarized resonance light scattering* sono state condotte sullo stesso spettrofluorimetro impiegando dei polarizzatori lineari (Sterling Optics 105UV). Il rapporto di depolarizzazione definito come $\rho v(90) = I_{VH}/I_{VV}$, dove I_{VH} e I_{VV} sono rispettivamente l'intensità di luce diffusa con polarizzazione orizzontale e verticale. La diversa efficienza di trasmissione della luce polarizzata, da parte di entrambi i monocromatori di eccitazione ed emissione, è stata tenuta in considerazione correggendo il valore I_{VH} attraverso l'equazione $\rho v(90) = G \cdot I_{VH}/I_{VV}$ dove $G = I_{HV}/I_{HH}$ è un fattore di correzione strettamente dipendente dalla lunghezza d'onda del monocromatore.²¹

Le misure del diametro idrodinamico medio (D_H) e della larghezza della distribuzione (PdI) sono state effettuate da uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, Regno Unito) a 298K in acqua ultrapura. I risultati sono riportati come media di tre misurazioni separate \pm le deviazioni standard.

Le misure di pH sono state condotte mediante un phmetro Metrohm 744 pH meter utilizzando un elettrodo a vetro combinato con un microelettrodo. Gli esperimenti cinetici sono stati effettuati con l'ausilio del portacampione termostato dello strumento e lasciando equilibrare la temperatura (con accuratezza di ± 0.1 K) per almeno 20 minuti prima di procedere all'avvio di ogni *run* cinetico.

5.5 - Riferimenti bibliografici

- (1) J.-C. Chambron; V. Heitz; J.-P. Sauvage In *The Porphyrin Handbook*; K. M. Kadish, K. M. S.; R. Guilard, A. P., Orlando, FL., Eds., **2000**; Vol. 6.
- (2) Simard, M.; Su, D.; Wuest, J. D. Use of hydrogen bonds to control molecular aggregation. Self-assembly of three-dimensional networks with large chambers. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (12), 4696.
- (3) Hosseini, M. W. Molecular Tectonics: From Simple Tectons to Complex Molecular Networks. *Accounts of Chemical Research* **2005**, *38* (4), 313.
- (4) Suslick, K. S.; Bhyrappa, P.; Chou, J. H.; Kosal, M. E.; Nakagaki, S.; Smithenry, D. W.; Wilson, S. R. Microporous Porphyrin Solids. *Accounts of Chemical Research* **2005**, *38* (4), 283.
- (5) Beletskaya, I.; Tyurin, V. S.; Tsvadze, A. Y.; Guilard, R.; Stern, C. Supramolecular Chemistry of Metalloporphyrins. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (5), 1659.
- (6) Bulach, V.; Hosseini, M. W. In *Handbook of Porphyrin Science (Volume 13) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*; World Scientific, **2011**.
- (7) Drain, C. M.; Lehn, J.-M. Self-assembly of square multiporphyrin arrays by metal ion coordination. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, DOI:10.1039/C39940002313 10.1039/C39940002313(19), 2313.
- (8) Scandola, F.; Chiorboli, C.; Prodi, A.; Iengo, E.; Alessio, E. Photophysical properties of metal-mediated assemblies of porphyrins. *Coordination Chemistry Reviews* **2006**, *250* (11), 1471.
- (9) Iengo, E.; Zangrando, E.; Alessio, E. Discrete Supramolecular Assemblies of Porphyrins Mediated by Coordination Compounds. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2003**, *2003* (13), 2371.
- (10) Iengo, E.; Zangrando, E.; Minatel, R.; Alessio, E. Metallacycles of Porphyrins as Building Blocks in the Construction of Higher Order Assemblies through Axial Coordination of Bridging Ligands: Solution- and Solid-State Characterization of Molecular Sandwiches and Molecular Wires. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (6), 1003.
- (11) Iengo, E.; Zangrando, E.; Bellini, M.; Alessio, E.; Prodi, A.; Chiorboli, C.; Scandola, F. Pyridylporphyrin Metallacycles with a Slipped Cofacial Geometry: Spectroscopic, X-ray, and Photophysical Characterization. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44* (26), 9752.
- (12) Lee, S. J.; Hupp, J. T. Porphyrin-containing molecular squares: Design and applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2006**, *250* (13), 1710.
- (13) Fan, J.; Whiteford, J. A.; Olenyuk, B.; Levin, M. D.; Stang, P. J.; Fleischer, E. B. Self-Assembly of Porphyrin Arrays via Coordination to Transition Metal Bisphosphine Complexes and the Unique Spectral Properties of the Product Metallacyclic Ensembles. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (12), 2741.
- (14) Fujita, N.; Biradha, K.; Fujita, M.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K. A Porphyrin Prism: Structural Switching Triggered by Guest Inclusion. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (9), 1718.

- (15) Abrahams, B. F.; Hoskins, B. F.; Robson, R. A new type of infinite 3D polymeric network containing 4-connected, peripherally-linked metalloporphyrin building blocks. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (9), 3606.
- (16) Abrahams, B. F.; Hoskins, B. F.; Michail, D. M.; Robson, R. Assembly of porphyrin building blocks into network structures with large channels. *Nature* **1994**, *369* (6483), 727.
- (17) Michelsen, U.; Hunter, C. A. Self-Assembled Porphyrin Polymers. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39* (4), 764.
- (18) Carlucci, L.; Ciani, G.; Proserpio, D. M.; Porta, F. Four new 2D porous polymeric frames from the self-assembly of silver triflate and silver tosylate with free-base and Zn-metallated 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin. *CrystEngComm* **2005**, *7* (11), 78.
- (19) Micali, N.; Monsu' Scolaro, L.; Romeo, A.; Mallamace, F. Fractal aggregation in aqueous solutions of porphyrins. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **1998**, *249* (1), 501.
- (20) Mallamace, F.; Micali, N.; Scolaro, L. M.; Pasternack, R. F.; Romeo, A.; Terracina, A.; Trusso, S. Porphyrin aggregation in aqueous solutions: small angle and quasielastic light scattering results. *Journal of Molecular Structure* **1996**, *383* (1), 255.
- (21) Parkash, J.; Robblee, J. H.; Agnew, J.; Gibbs, E.; Collings, P.; Pasternack, R. F.; De Paula, J. C. Depolarized resonance light scattering by porphyrin and chlorophyll a aggregates. *Biophysical journal* **1998**, *74* (4), 2089.
- (22) Occhiuto, I. G.; Samperi, M.; Trapani, M.; De Luca, G.; Romeo, A.; Pasternack, R. F.; Scolaro, L. M. Aggregates of a cationic porphyrin as supramolecular probes for biopolymers. *Journal of inorganic biochemistry* **2015**, *153*, 361.
- (23) Pasternack, R. F.; Giannetto, A.; Pagano, P.; Gibbs, E. J. Self-assembly of porphyrins on nucleic acids and polypeptides. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (20), 7799.
- (24) Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibbs, E. J. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (13), 5393.
- (25) Kano, K.; Fukuda, K.; Wakami, H.; Nishiyabu, R.; Pasternack, R. F. Factors Influencing Self-Aggregation Tendencies of Cationic Porphyrins in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (31), 7494.
- (26) Vergeldt, F. J.; Koehorst, R. B. M.; van Hoek, A.; Schaafsma, T. J. Intramolecular interactions in the ground and excited states of tetrakis (N-methylpyridyl) porphyrins. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99* (13), 4397.
- (27) Akins, D. L.; Zhu, H.-R.; Guo, C. Aggregation of tetraaryl-substituted porphyrins in homogeneous solution. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100* (13), 5420.
- (28) Kano, K.; Minamizono, H.; Kitae, T.; Negi, S. Self-aggregation of cationic porphyrins in water. Can $\pi-\pi$ stacking interaction overcome electrostatic repulsive force? *The Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101* (34), 6118.
- (29) Pasternack, R. F.; Francesconi, L.; Raff, D. O. N.; Spiro, E. Aggregation of nickel (II), copper (II), and zinc (II) derivatives of water-soluble porphyrins. *Inorganic Chemistry* **1973**, *12* (11), 2606.
- (30) Herrmann, O.; Mehdi, S. H.; Corsini, A. Heterogeneous metal-insertion: a novel reaction with porphyrins. *Canadian Journal of Chemistry* **1978**, *56* (8), 1084.

- (31) Hambright, P. Chemistry of Water Soluble 18 Porphyrins. *The Porphyrin Handbook: Inorganic, organometallic and coordination chemistry* **2000**, 3, 129.
- (32) Pasternack, R. F.; Schaefer, K. F.; Hambright, P. Resonance light-scattering studies of porphyrin diacid aggregates. *Inorganic Chemistry* **1994**, 33 (9), 2062.
- (33) Micali, N.; Mallamace, F.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Monsú Scolaro, L. Separation of Scattering and Absorption Contributions in UV/Visible Spectra of Resonant Systems. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (20), 4958.