

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN

CHIMICA

Curriculum Molecolare

CLASSE 21 (Scienze e Tecnologie Chimiche)

Elaborato del Tirocinio

Studio di composti triazinici mediante spettroscopia NMR

Relatore interno: Dott.ssa D. Catalano

Controrelatore: Prof. F. Bellina

Candidato: Damiano Spadoni

Anno Accademico 2008-2009

Indice

Introduzione	3
Capitolo 1	
Il sistema studiato	5
Primi spettri NMR del protone	6
Spettri ^{13}C NMR	11
Esperimenti bidimensionali	11
Capitolo 2	
Gli interrogativi da sciogliere	17
Informazioni e suggerimenti dalla letteratura	17
Metodi applicati alla risoluzione dei problemi proposti ...	18
Capitolo 3	
Risultati dei calcoli teorici	20
Spettri ^1H e ^{13}C NMR di Biboc in DMSO- d_6	23
Misure a temperatura variabile	24
Misure dei tempi di rilassamento longitudinale T_1 del protone	28
Effetti della concentrazione	32
Sezione sperimentale	34
Conclusioni	35
Bibliografia	36

Introduzione

I dendrimeri costituiscono una classe di composti caratterizzati da ramificazioni multiple. La loro struttura è rappresentata da un corpo centrale composto da pochi atomi (per esempio un amminoacido o un anello aromatico funzionalizzato) da cui si diramano catene uguali tra loro, che possono essere a loro volta ramificate.

I dendrimeri si dividono in specie a basso e ad alto peso molecolare; quest'ultimo gruppo comprende polimeri polifunzionali basati su una catena centrale con più catene polimeriche attaccate ai lati come ramificazioni.

Le proprietà di queste molecole sono guidate dai numerosi gruppi funzionali presenti alle estremità delle catene. Per questo esse trovano impiego in campo biomedico in quanto l'attivazione della loro superficie, ottenuta legando determinate molecole ai gruppi funzionali situati nella regione più esterna della molecola, permette il veicolamento di farmaci verso precisi siti attivi, il trasporto di intermedi bioattivi e il monitoraggio di traccianti radioattivi per indagini mediche *in vivo* all'interno degli organismi, ma è nella battaglia contro i tumori che questi composti hanno riscosso il maggior interesse da parte della comunità scientifica [1,2].

Il sistema 1,3,5-triazinico si presta bene come nucleo di partenza per la sintesi di dendrimeri e, più in generale, di dendrimeri ibridi [3,4] e di derivati polifunzionali. Triazine opportunamente sostituite sono utilizzate come fasi stazionarie chirali nelle comuni tecniche cromatografiche grazie alla capacità di specifici sostituenti di formare legami non covalenti; trovano impiego anche nell'industria delle plastiche, nell'industria automobilistica ed edilizia; possono essere utilizzate come coloranti nell'industria tessile, come sbiancanti ottici fluorescenti, additivi per saponi ed erbicidi ed hanno interessanti applicazioni farmacologiche [5,6].

Questo lavoro si propone di avviare un'accurata analisi conformazionale di dendrimeri a base triazinica, sfruttando varie tecniche di spettroscopia NMR sia mono che bidimensionali e comparando i valori di chemical shift dei protoni e dei nuclei di ^{13}C con i corrispondenti dati teorici.

I composti studiati sono stati sintetizzati dalla professoressa Rita Menicagli e dal suo gruppo di ricerca, mentre i calcoli teorici sono stati svolti dal dr. Alberto Marini.

Nel primo capitolo della tesi il problema affrontato viene delineato attraverso l'analisi di una serie di spettri NMR dei due composti in esame, dai semplici spettri protonici ad alcuni bidimensionali.

Nel secondo capitolo si fa il punto sugli interrogativi posti dall'insieme dei dati raccolti, si riassumono informazioni e suggerimenti forniti dalla letteratura e si elencano schematicamente i metodi con i quali si è tentato di dare qualche risposta.

Infine, nel terzo capitolo, sono presentati e discussi i risultati ottenuti.

Capitolo 1

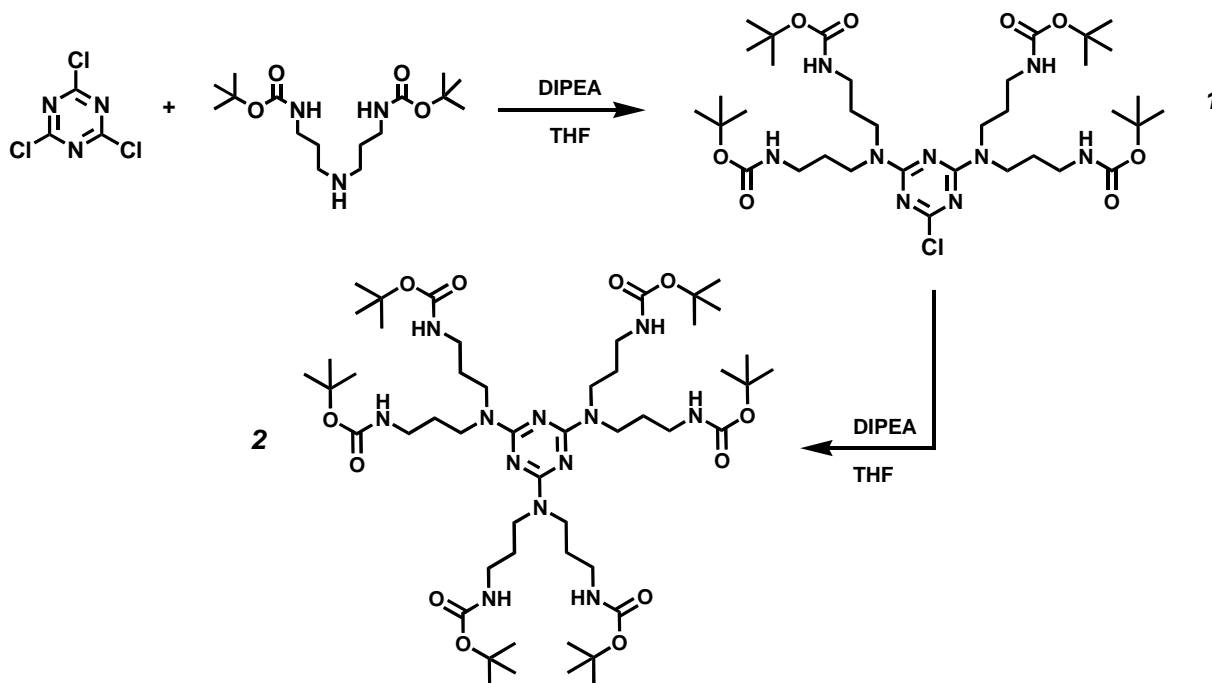
Il sistema studiato

La molecola protagonista di questo lavoro è un derivato della triazina doppiamente sostituito, ovvero una N^2,N^2,N^4,N^4 -tetrakis(3-(*t*-butossicarbonilammino)propil)-6-cloro-1,3,5-triazina-2,4-diammina, che verrà chiamata per semplicità **Biboc** (**1**, schema 1). Questo nome di comodo mette in evidenza la disostituzione (2,4-diammina) e il fatto che ogni gruppo funzionale amminico secondario è stato protetto col gruppo *ter*-butossicarbonile, spesso chiamato Boc.

I dati relativi a questo composto sono stati poi paragonati nel corso del lavoro a quelli di un composto simile, cioè della corrispondente triazina 2,4,6-triammino sostituita (**2**, schema 1) chiamata **Triboc**.

Entrambe queste sostanze sono state sintetizzate nel laboratorio della prof. Menicagli tramite sostituzione nucleofila aromatica del cloruro di cianurile con opportune quantità di ammina secondaria protetta. Per completezza è riportato di seguito un breve schema sintetico.

Schema 1



Primi spettri NMR del protone

Biboc

La struttura del composto **1** è riportata di seguito con la numerazione attribuita agli atomi di carbonio e agli idrogeni ad essi legati. La lettera T indica i carboni dell'anello triazinico, mentre A e B distinguono le catene legate allo stesso azoto amminico, chimicamente uguali ma potenzialmente differenti per intorno chimico, come verrà ampiamente discusso in seguito.

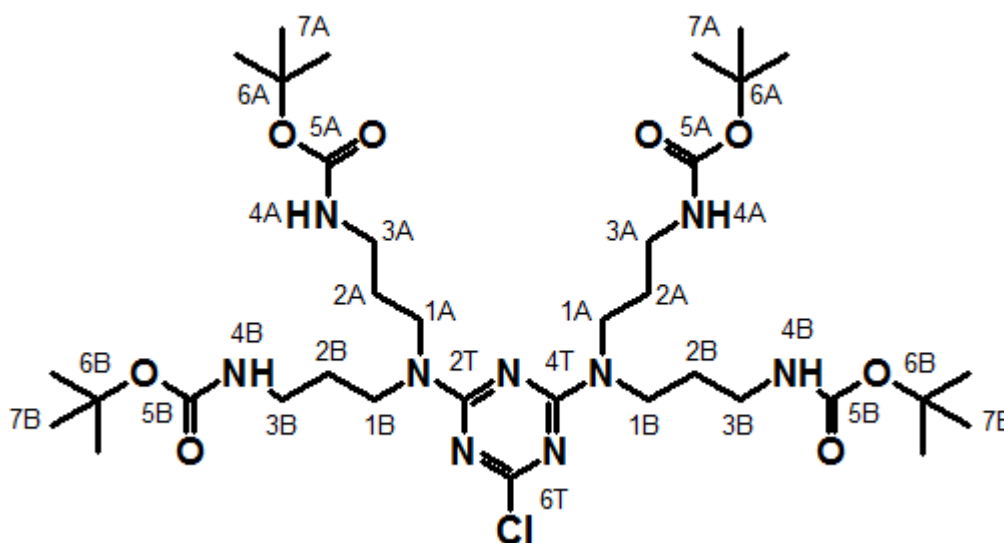


Figura 1- Struttura di Biboc e relativa numerazione. La numerazione usata per Triboc è analoga.

I composti Biboc e Triboc si presentano come solidi vetrosi di colore giallo-arancio, ben solubili nei più comuni solventi organici, cosa che ha permesso una facile preparazione dei campioni per l'analisi NMR.

Il primo esperimento effettuato è stato uno spettro ^1H NMR, riportato in Fig. 2, registrato su un campione di Biboc sciolto in CDCl_3 con una concentrazione iniziale circa 0,1 M.

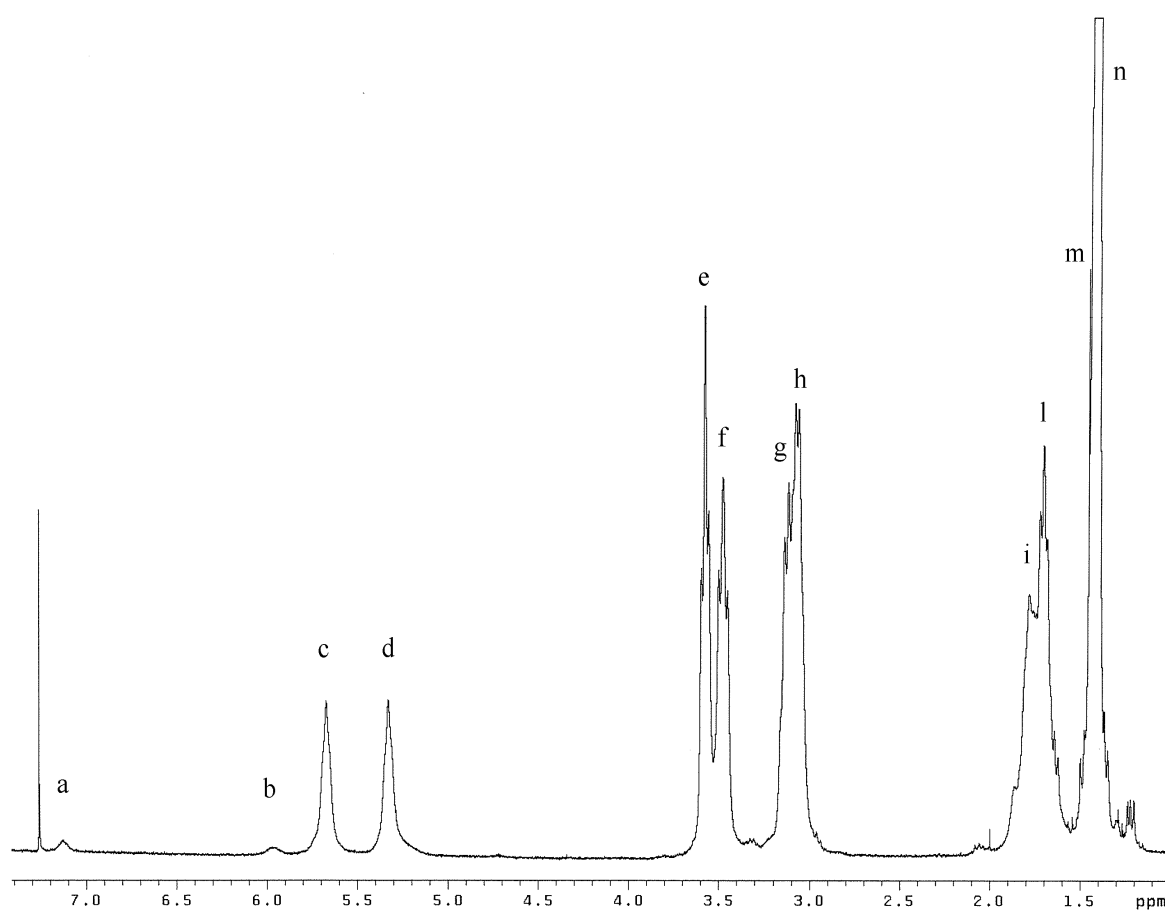
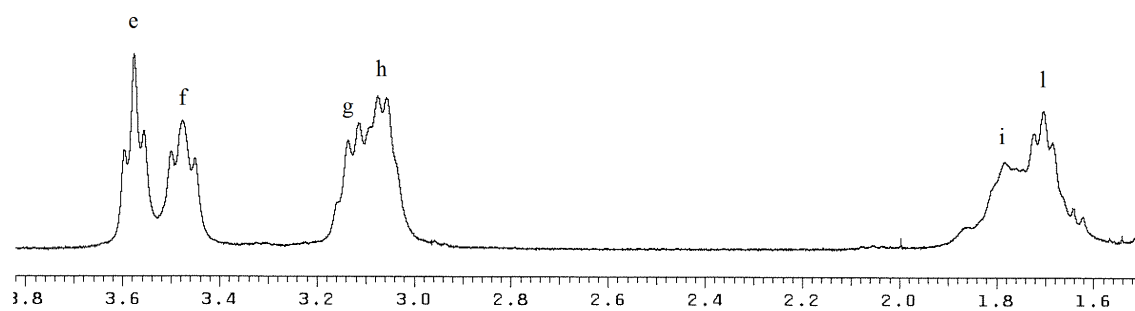


Figura 2. Spettro ^1H NMR di Biboc in basso. In alto un'espansione dello spettro da 1.6 a 3.8 ppm.

Viene di seguito riportata una tabella con le caratteristiche riguardanti i vari segnali dello spettro.

Segnale (vedi fig.1)	Chemical Shift (p.p.m.)	Intensità relativa	Forma del segnale	Assegnazione
<i>a</i>	7.13	0.15	singoletto slargato	4A o B
<i>b</i>	5.97	0.11	singoletto slargato	4A o B
<i>c</i>	5.67	0.85	singoletto slargato (tripletto)	4A
<i>d</i>	5.33	0.93	singoletto slargato (tripletto)	4B
<i>e</i>	3.58	1.94	tripletto	1A
<i>f</i>	3.48	1.98	tripletto	1B
<i>g</i>	3.13	4.14	doppi tripletti (quartetti apparenti)	3B
<i>h</i>	3.07			3A
<i>i</i>	1.78	4.50	multipletto non risolto	2B
<i>l</i>	1.70			2A
<i>m</i>	1.43	8.09	singoletto	7A
<i>n</i>	1.41	9.30	singoletto	7B

Forniamo una descrizione dei picchi relativi a questo spettro protonico.

-I due segnali *c* e *d* che si trovano rispettivamente a 5.67 e 5.33 ppm appartengono agli idrogeni legati agli atomi di azoto, infatti integrano entrambi quasi per un protone e si trovano nel campo degli idrogeni ammidici; inoltre la forma slargata dei segnali lascia intravedere un tripletto, dovuto all' accoppiamento coi metileni adiacenti. I segnali *a* e *b* a 7.13 e 5.97 ppm sono probabilmente dovuti a una piccola percentuale di molecole formanti diversi legami a idrogeno. Le due condizioni di molecola legata e non legata sono in scambio *lento* tra di loro, cioè *lo scambio avviene con frequenza molto inferiore alla differenza delle frequenze di risonanza del protone nelle due condizioni estreme.*

-I segnali *e-f*, *g-h* e *i-l* sono stati tutti attribuiti ai metileni alifatici. Il gruppo *i-l* è sicuramente riconducibile ai metileni centrali 2A e 2B; in ciascuno dei due casi, trattandosi di un metilene adiacente ad altri due metileni, il segnale dovrebbe presentarsi come un quintetto sdoppiato. Questa struttura è compatibile con la forma del segnale *i* e riconoscibile nel segnale *l*. Meno ovvia è l'attribuzione dei gruppi *e-f* e *g-h* adiacenti agli atomi di azoto secondari e terziari sulla sola base dei chemical shifts e delle tabelle riportate in letteratura [7]; l'attribuzione è stata invece possibile grazie alla struttura peculiare di questi segnali. I gruppi *e-f* sono entrambi triplette a causa di un unico accoppiamento col metilene centrale 2, *e-f* sono quindi dovuti ai metileni 1A e 1B. I segnali *g-h* sono apparentemente quartetti, interpretabili come triplette sdoppiate e parzialmente sovrapposte; tale struttura è attribuibile all'accoppiamento con i protoni metilenici adiacenti e all'ulteriore accoppiamento col protone ammidico, purché le due costanti di accoppiamento siano molto simili. I gruppi *g-h* sono perciò attribuibili ai metileni 3A e 3B.

-il segnale *m-n* che ben visibilmente si risolve in due singoletti a 1.43 e 1.41 ppm, ciascuno dei quali integra per 9 protoni, è inequivocabilmente dovuto ai metili dei gruppi Boc.

Dal momento che tutti i segnali si presentano sdoppiati, è necessario considerare che le catene laterali risentano di due intorni chimici diversi. Abbiamo chiamato catene A le porzioni alifatiche rivolte verso la parte di anello che non presenta l'atomo di cloro, e catene B quelle che si trovano più vicine a questo atomo. Non è ancora possibile stabilire in ciascuna coppia di segnali (*c-d*, *e-f* ecc.) quale sia dovuto all'una o all'altra catena, ma è possibile fare subito un'ipotesi di correlazione fra segnali presumibilmente attribuibili alla stessa catena. Si nota infatti che:

-*e*, *h*, *l* e *m* presentano larghezza di riga vistosamente minore di *f*, *g*, *i* e *n*;

-*e*, *h*, *l* presentano costanti di accoppiamento *J* minori di *f*, *g*, *i*.

Tutto ciò induce a ritenere che i protoni che emettono i segnali *e*, *h*, *l* e *m* appartengano alla stessa catena e che i protoni *f*, *g*, *i* e *n* appartengano all'altra. Questa ipotesi verrà poi confermata e completata da uno spettro COSY.

Va però messo in evidenza che l'assegnazione dell'etichetta A al primo gruppo di segnali e B al secondo gruppo, come appare nella tabella, è convenzionale e non è affatto definitiva, ma anzi, tutta da stabilire.

Questa iniziale assegnazione ci ha permesso di muovere i primi passi verso la risoluzione strutturale della molecola e, ci ha reso possibile la formulazione delle prime ipotesi, alcune confermate, altre smentite dagli esperimenti successivi.

Triboc

Nel composto **2** gli atomi di carbonio e gli idrogeni ad essi legati sono stati numerati in analogia con quanto visto per il Biboc. Non è stata necessaria in questo caso una distinzione tra la catena A e la catena B.

Lo spettro ¹H NMR del Triboc in CDCl₃ circa 0,1 M è riportato in Fig. 3. Oltre ai segnali più intensi si notano varie impurezze delle quali non ci occuperemo. Le caratteristiche riguardanti i vari segnali dello spettro sono riassunte nella tabella che segue.

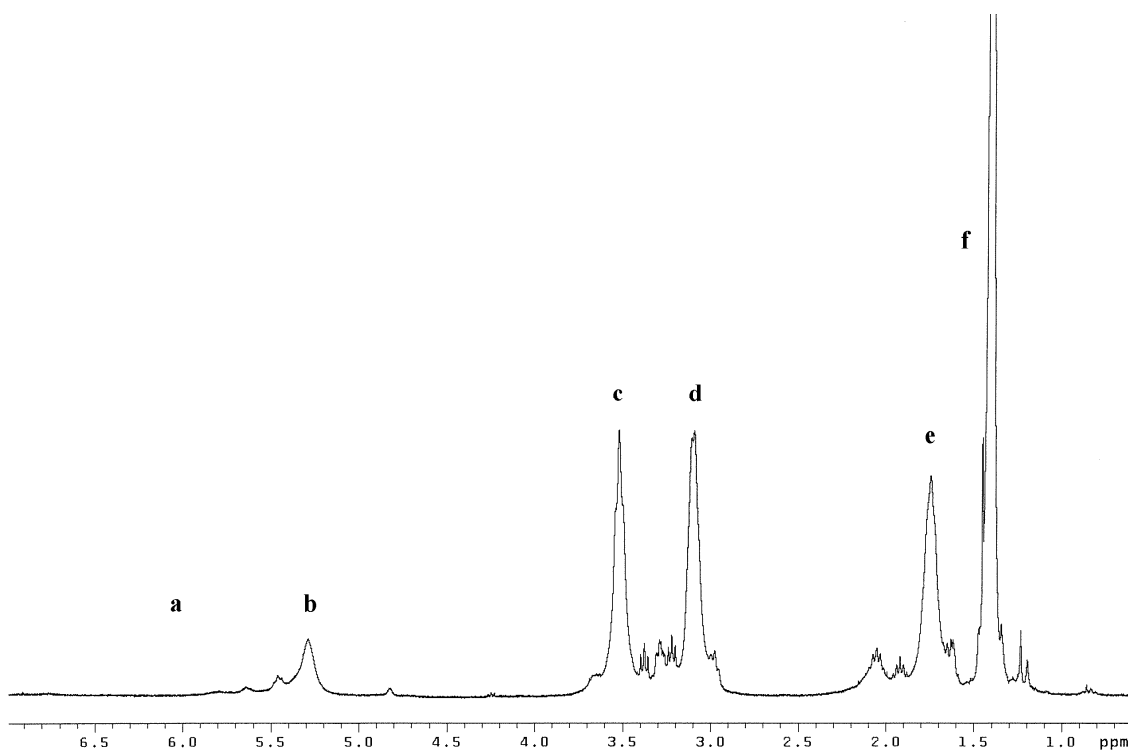


Figura 3- Spettro ^1H NMR di Triboc.

Segnale (vedi fig.3)	Chemical Shift (p.p.m.)	Intensità relativa	Forma del segnale	Assegnazione
<i>a</i>	6.77, 5.78, 5.64, 5.46	0.30	singoletti slargati	4
<i>b</i>	5.29	0.52	singoleto slargato	4
<i>c</i>	3.52	2.00	tripletto slargato	1
<i>d</i>	3.10	2.03	apparente quartetto slargato	3
<i>e</i>	1.74	2.04	multipletto non risolto (quintetto)	2
<i>f</i>	1.41	8.92	singoleto	7

L'assegnazione dei segnali non richiede ulteriori spiegazioni rispetto al caso del Biboc. E' evidente la mancanza di differenziazione fra le catene, e ciò avvalorata l'ipotesi che lo sdoppiamento osservato nel Biboc sia dovuto alla presenza dell'atomo di cloro. Inoltre è stato osservato che i valori di chemical shift osservati nel Triboc coincidono con le medie aritmetiche dei valori corrispondenti delle catene A e B di Biboc.

Spettri ^{13}C NMR

Sono stati registrati gli spettri del ^{13}C , disaccoppiati dal protone, sugli stessi campioni. Anche in questi spettri si osserva sdoppiamento dei segnali per il Biboc ma non per il Triboc, come mostra la tabella seguente.

Biboc		Triboc	
Chemical Shift	Assegnazione	Chemical Shift	Assegnazione
168.84	6T	--	--
164.02	2T, 4T	165.38	2T, 4T, 6T
156.16	5A, 5B	156.28	5
79.22 e 78.81	6A, 6B	79.23	6
44.62	1B	43.96	1
43.56	1A	--	--
38.27	3B	38.43	3
36.72	3A	--	--
28.46 e 28.41	7B e 7A	28.70	7
28.32	2B	28.61	2
28.00	2A	--	--

L'assegnazione è stata effettuata sulla base dei chemical shift riportati in letteratura [7, 8] e, per quanto riguarda la differenziazione delle catene A e B di Biboc, sulla base dello spettro HETCOR.

Esperimenti bidimensionali

Verranno ora illustrati gli esperimenti cosiddetti bidimensionali perchè, al contrario dei precedenti, producono spettri in funzione non di una ma di due coordinate di frequenza [9]. Spettri di questo tipo vengono chiamati mappe di correlazione.

COSY (COrrelation SpectroscopY, correlazione di shift omonucleare)

La mappa COSY presenta due coordinate di frequenza uguali, che coprono l'intervallo di chemical shift in cui appaiono i segnali di interesse dello spettro monodimensionale; lungo la diagonale si trovano i segnali del normale spettro protonico e, fuori diagonale, con coordinate

di frequenza δ_1 - δ_2 , *cross-peaks* che indicano la presenza di accoppiamento scalare J fra i segnali con chemical shift δ_1 e δ_2 . Da questo tipo di spettro si traggono le stesse informazioni che si potrebbero ottenere da una serie di disaccoppiamenti selettivi sullo spettro monodimensionale. Lo spettro COSY di Biboc in CDCl_3 è riportato in Fig. 4.

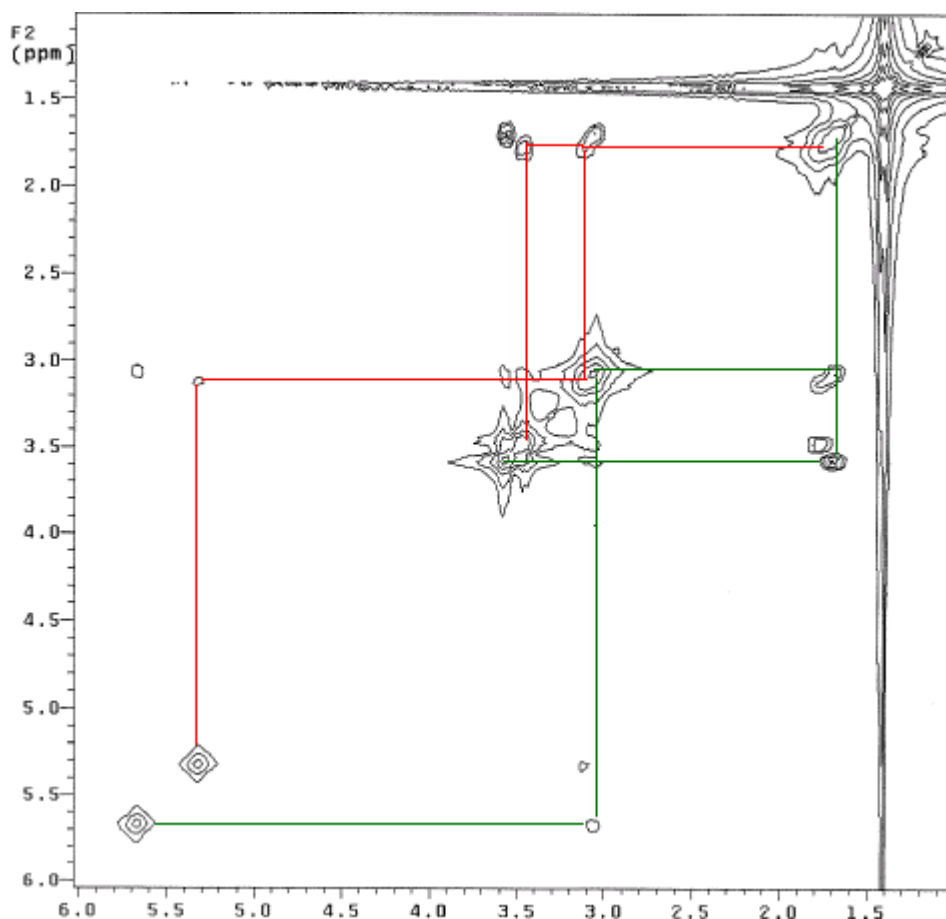


Figura 4- Mappa di correlazione COSY. Le linee verdi correlano i segnali della catena A, quelle rosse i segnali della catena B.

I picchi fuori diagonale osservati confermano definitivamente l'attribuzione dei segnali metilenici alle catene A e B già proposta sulla base dello spettro monodimensionale e inoltre correlano i segnali ammidici *c* e *d* rispettivamente con i metileni 3A e 3B.

HETCOR (HETeronuclear CORrelation Spectroscopy)

La mappa HETCOR presenta due coordinate di frequenza diverse che coprono intervalli di chemical shift in cui appaiono i segnali di nuclei diversi, tipicamente protone e ^{13}C . In questa mappa ogni segnale individua due frequenze corrispondenti rispettivamente ad un segnale dello spettro protonico e ad uno dello spettro del ^{13}C . I due nuclei risultano così essere correlati da

accoppiamento J. Con la sequenza di impulsi comunemente usata si ottengono picchi di correlazione solo fra protoni e carboni direttamente legati, per i quali la costante di accoppiamento ha un valore particolarmente elevato. Fra i parametri da impostare per ottenere spettri in cui il ^{13}C è disaccoppiato dal protone è importante inserire una buona stima del valore della costante di accoppiamento $^1J_{\text{CH}}$. Lo spettro HETCOR di Biboc in CDCl_3 è riportato in Fig. 5.

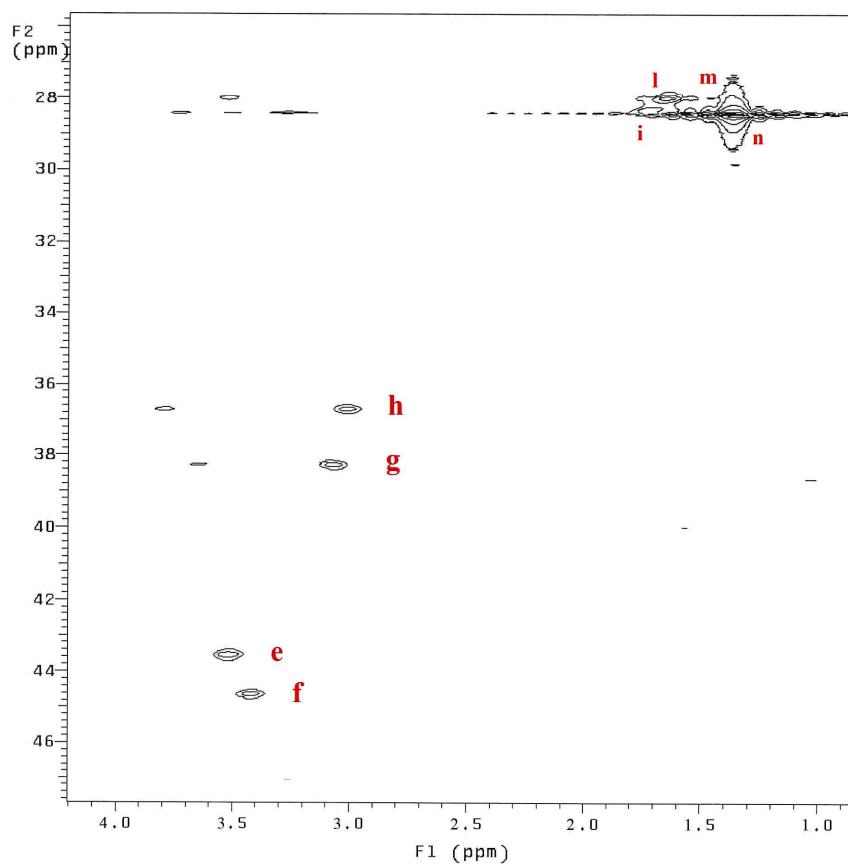


Figura 5. Mappa HETCOR. Le lettere riportate indicano i picchi dello spettro protonico monodimensionale di Fig. 2.

I picchi osservati hanno permesso di correlare i segnali dello spettro protonico, già assegnati, con quelli dello spettro ^{13}C e quindi di etichettare questi ultimi come appartenenti alla catena A o alla catena B.

NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

La mappa NOESY presenta come la COSY due coordinate di frequenza uguali tra di loro che coprono l'intervallo dei chemical shift del protone. Lungo la diagonale si trovano i segnali dello spettro protonico e, fuori diagonale, con coordinate di frequenza δ_1 - δ_2 , si trovano *cross-peaks* dovuti all'effetto NOE, la cui comparsa indica la vicinanza spaziale dei nuclei con chemical shift δ_1 e δ_2 . Fuori diagonale si possono trovare anche *cross-peaks* che indicano lo scambio chimico *lento* fra i nuclei con chemical shift δ_1 e δ_2 . (Spettri bidimensionali finalizzati allo studio dello scambio chimico vengono propriamente chiamati EXSY.)

Quando la molecola si trova nel regime dei moti di riorientazione veloci, che verrà meglio definito al momento di discutere le misure di tempi di rilassamento longitudinali, i picchi fuori diagonale dovuti all'effetto NOE sono in fase opposta rispetto ai picchi posti sulla diagonale. I picchi dovuti a scambio chimico invece presentano la stessa fase dei picchi sulla diagonale e risultano quindi ben distinguibili dai precedenti.

I paragrafi seguenti, in corsivo, interrompono la presentazione degli spettri bidimensionali di Biboc con una breve spiegazione della sequenza di impulsi che genera uno spettro NOESY o EXSY.

*La sequenza di impulsi che permette la realizzazione di uno spettro NOESY o EXSY [10] è costituita da due impulsi di 90° , separati da un intervallo di tempo variabile (d_2), durante il quale le magnetizzazioni relative a due nuclei con diverso chemical shift precedono nel piano xy con frequenze δ_1 e δ_2 diverse. Il secondo impulso coglie le due magnetizzazioni con orientazione differente a seconda della durata di d_2 e crea quindi, lungo $-z$, due componenti longitudinali modulate con frequenze δ_1 e δ_2 . A questo punto si permette al sistema, e in particolare alle due componenti longitudinali, di evolvere liberamente per un tempo prefissato, detto *mixing time*; infine, un ulteriore impulso di 90° riporta le componenti longitudinali sul piano xy , permettendoci di 'misurarle' mediante l'acquisizione di un normale segnale di FID. Durante il *mixing time* avvengono i normali processi di rilassamento, che tendono a riportare la magnetizzazione all'equilibrio, ma possono anche accadere altri fenomeni:*

- uno scambio chimico lento per cui nuclei che, durante d_2 , precedevano con frequenza δ_1 si trovano a precedere con frequenza δ_2 durante l'acquisizione finale;
- se la distanza tra i due nuclei in questione è piccola, tipicamente meno di 4 Å, può instaurarsi un effetto NOE fra le rispettive componenti della magnetizzazione lungo $-z$; al variare di d_2 , l'entità del NOE sul primo nucleo è modulata dalla frequenza del secondo.

*Dopo una doppia trasformata di Fourier, rispetto al tempo di acquisizione e rispetto a d_2 , i due fenomeni descritti producono *cross-peaks*, rispettivamente EXSY o NOESY.*

*La scelta di un *mixing time* opportuno è cruciale per una buona riuscita dello spettro NOESY. Esso dovrà essere abbastanza lungo da permettere l'instaurarsi dei fenomeni che si desidera osservare, ma non tanto da permettere alle magnetizzazioni di rilassare completamente. Si consiglia in genere di fare alcune prove, con *mixing times* comparabili con i tempi di rilassamento longitudinale dei nuclei in esame.*

Nel caso dello spettro NOESY di Biboc sono stati provati diversi valori del parametro *mixing time* da 0.25 s a 1s, producendo mappe equivalenti in tutti i caratteri essenziali, ma con un livello di rumore crescente. La mappa ottenuta con *mixing time* 0.25 s è riportata in Fig. 6.

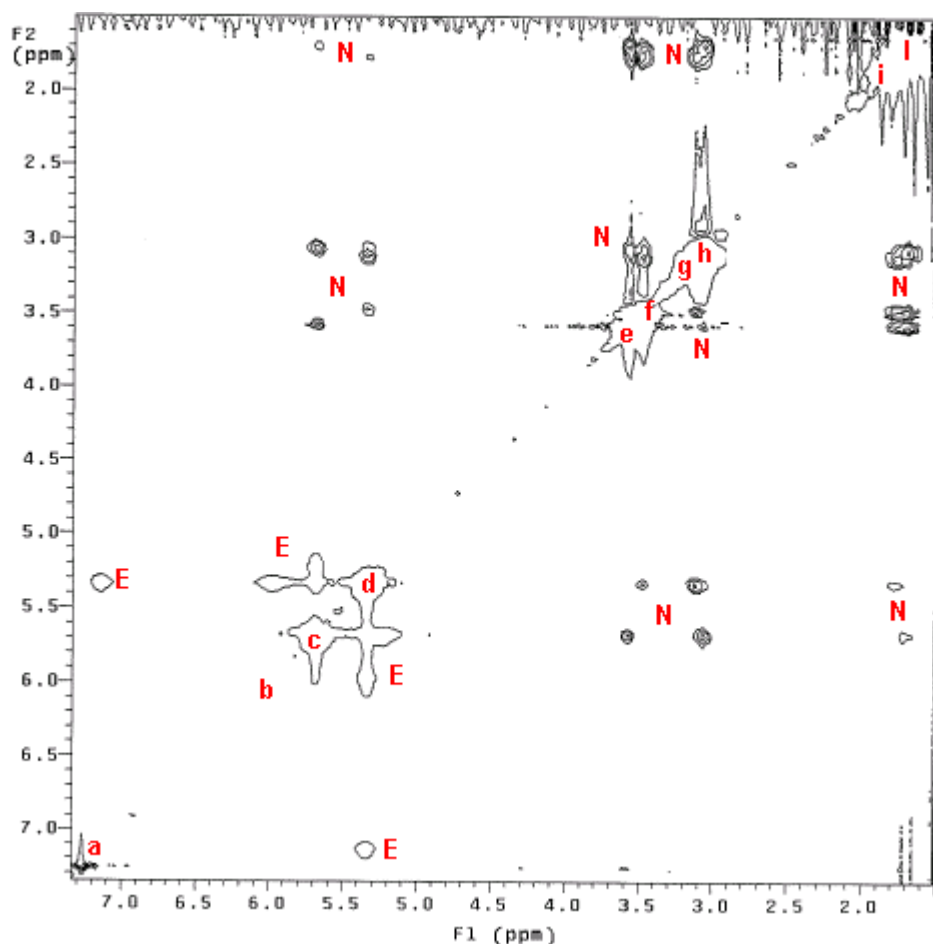


Figura 6. Mappa NOESY. Le lettere minuscole lungo la diagonale corrispondono ai picchi dello spettro riportato in Fig. 2. E indica *cross-peaks* di scambio, N *cross-peaks* dovuti a effetto NOE.

Vi si notano *cross-peaks* NOESY e EXSY, immediatamente riconoscibili perché rispettivamente in antifase e in fase rispetto ai picchi diagonal.

- I *cross-peaks* NOESY, oltre a tutte le correlazioni ovvie tra protoni di gruppi adiacenti, segnalano la relativa vicinanza fra i protoni 1A-3A e 1B-3B, come è normale per catene in conformazione *trans*. Si osservano inoltre *cross-peaks* NOESY tra i segnali relativi ai protoni ammidici e metilenici lontani (4A-2A, 4A-1A e 4B-2B, 4B-1B). La valutazione quantitativa delle distanze internucleari dall'intensità dei *cross-peaks* è ardua ed insidiosa [10]; possiamo però osservare che vari segnali relativi alla catena A appaiono un po' più intensi dei

corrispondenti relativi alla catena B, peraltro molto simili. Ciò può essere semplicemente ricondotto alla maggior larghezza di riga dei segnali B, già rilevata nello spettro monodimensionale. Al contrario, il *cross-peak* 1B-3B è decisamente più intenso del corrispondente 1A-3A, cosa che potrebbe segnalare una situazione conformazionale leggermente diversa all'interno delle due catene.

- Sono assenti *cross-peaks* NOESY fra segnali delle catene A e B, che quindi tendono a distanziarsi. Si deve però tener presente che *cross-peaks* fra gruppi corrispondenti come 1A e 1B (i protoni di questi due metileni sono relativamente vicini, all'incirca 3-4 Å) sarebbero molto difficilmente rilevabili perchè addossati agli intensi segnali, quasi sovrapposti, della diagonale.

- Sembrano assenti *cross-peaks* EXSY fra segnali alifatici delle catene A e B, per i quali però vale la precisazione del punto precedente.

- Sono presenti vistosi *cross-peaks* EXSY fra segnali *c* e *d* dei protoni ammidici 4A e 4B, che quindi sono soggetti a scambio *lento*.

La valutazione quantitativa della frequenza o costante di scambio *k*, non banale [11], può essere tentata, per uno scambio a due siti ugualmente popolati, tramite la formula [12]

$$\frac{I_c}{I_d} = \frac{e^{2kt_m} - 1}{e^{2kt_m} + k}$$

in cui I_d e I_c sono gli integrali rispettivamente del picco diagonale e del *cross-peak* e t_m è il mixing time usato nell'esperimento.

In questo modo k_{A-B} è stata stimata intorno a 0.2-0.3 s⁻¹.

- Sono presenti *cross-peaks* EXSY fra segnali *a-d* e *b-d* dei protoni ammidici. Poiché il segnale *d* è dovuto a protoni della catena B, sembra che siano essenzialmente gli idrogeni ammidici della catena B, non della A, a formare legami a idrogeno nelle condizioni sperimentali in esame (solvente CDCl₃, concentrazione ~0.1M, temperatura 19°C).

Capitolo 2

Gli interrogativi da sciogliere

Le domande sollevate dai dati fin qui raccolti sono le seguenti:

- 1) Quali sono nel Biboc le condizioni conformazionali che differenziano, principalmente per i chemical shift, ma anche per la larghezza di riga e per le costanti di accoppiamento J, due tipi di catene, A e B? Ricordiamo inoltre che, per ora, l'assegnazione delle etichette A e B alle due catene nella struttura di Figura 1 è solo ipotetica.
- 2) Quali sono le condizioni conformazionali delle catene nel Triboc?
- 3) Qual è la barriera energetica per l'interconversione della catena A nella B e viceversa?
- 4) La diversa larghezza di riga nelle catene A e B in Biboc può essere dovuta alla loro diversa mobilità?
- 5) Lo scambio protonico tra gruppi ammidici in Biboc è principalmente intermolecolare o intramolecolare?
- 6) In quale misura le osservazioni fatte dipendono dalla scelta del solvente?

Informazioni e suggerimenti dalla letteratura

In letteratura sono presenti vari studi conformazionali di triazine sostituite [5, 6, 8, 13, 14], fra i quali è stato di particolare utilità un lavoro di Katritzky *et al.* [13]. Si tratta di uno studio, esteso a varie triazine molto simili a Biboc e a Triboc, 4,6-bis e 2,4,6-tris sostituite simmetricamente con gruppi dialchilamminici. La struttura ai raggi X di tutti questi composti ha messo in evidenza che, per tutti gli azoti amminici, i legami C-N sono coplanari, con minime deviazioni dalla coplanarità rispetto all'anello triazinico. Inoltre i legami $C_{\text{triazina}}-N_{\text{amminico}}$ hanno carattere di parziale doppio legame, con una lunghezza media di 1.355 Å, da confrontarsi con 1.474 Å

della metilammina. (Risultati analoghi sono riportati nei rif. 5 e 14.) Per i composti bisostituiti, con gruppi a catena lineare legati agli azoti amminici, uno sdoppiamento dei segnali è stato osservato negli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR. Tale effetto non si presenta negli spettri dei composti trisostituiti.

Come possibili strutture di minima energia, compatibili con le osservazioni fatte sugli spettri, sono state ipotizzate quelle mostrate nella Figura 7. In queste strutture i sostituenti alchilici legati a ciascun azoto si estendono in un piano perpendicolare a quello dell'anello triazinico, da parti opposte.

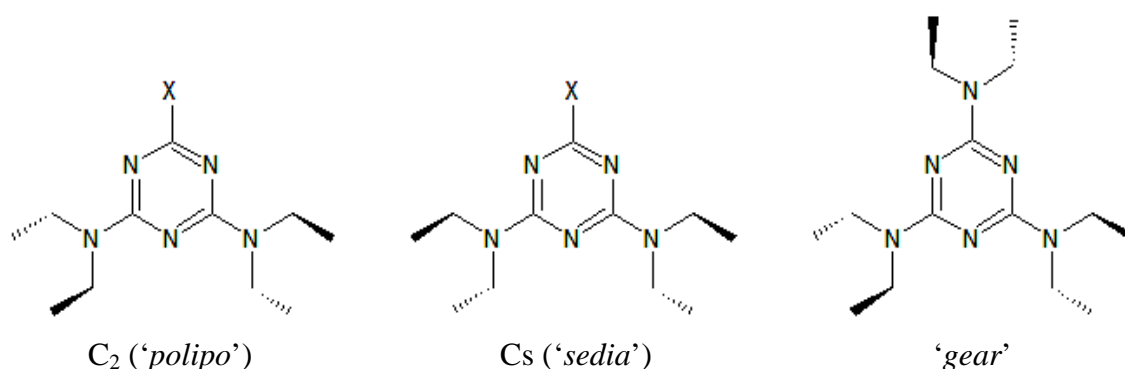


Figura 7. Possibili strutture di minima energia per triazine bi- e tri- sostituite con catene lineari.

La conformazione con simmetria C_2 (che noi abbiamo denominato 'polipo') è intuitivamente più stabile di quella a simmetria C_s (detta 'sedia'). Tuttavia, sulla base di studi a raggi X di alcuni composti, quest'ultima non è stata esclusa (si veda anche il rif. 5). Lo sdoppiamento dei segnali NMR nei composti bisostituiti è stato comunque attribuito al diverso intorno chimico sperimentato dalle catene più vicine o più lontane dall'atomo di cloro. Lo scambio chimico fra catene diverse avverrebbe quindi lentamente per rotazione intorno al legame $C_{\text{triazinico}}-N_{\text{amminico}}$ parzialmente doppio.

La barriera di energia libera per lo scambio in questione è stata valutata intorno a 17-18 kcal/mole sulla base delle temperature di coalescenza dei segnali del ^{13}C .

Metodi applicati alla risoluzione dei problemi proposti

Ecco dunque come si è tentato di fornire una risposta alle domande avanzate nel primo paragrafo di questo capitolo.

1) e 2) Per la determinazione delle conformazioni più stabili di Biboc e Triboc sono stati eseguiti calcoli teorici dal dott. Alberto Marini, utilizzando le risorse del PDC della Kungliga Tekniska Högskolan di Stoccolma. Il metodo di calcolo applicato [15] permette anche di prevedere accuratamente i valori di chemical shift dei protoni e soprattutto dei ^{13}C , tanto che un problema conformazionale non molto diverso dal nostro è stato di recente risolto mediante il confronto tra dati sperimentali e calcolati [15]. Si è quindi anche sperato di assegnare per questa via le catene A e B.

3) La barriera energetica per l'interconversione della catena A nella B e viceversa è stata determinata dalle temperature di coalescenza dei segnali del protone. Poiché lo scambio si mantiene *lento* almeno fino a 50°C , uno studio a più alta temperatura è stato svolto in DMSO-d_6 anziché in CDCl_3 .

Sono stati registrati anche spettri a bassa temperatura, fino a -35°C , su Biboc e Triboc in CDCl_3 , per individuare l'eventuale 'congelamento' di moti conformazionali che risultano *veloci* a temperatura ambiente, nelle due molecole.

4) La mobilità delle catene di Biboc e Triboc è stata studiata tramite l'andamento dei tempi di rilassamento longitudinale del protone, misurati con il metodo dell'*Inversion Recovery* [9] in funzione della temperatura, a 200 MHz e a 300 MHz, in CDCl_3 ed in DMSO-d_6 .

5) Per cercar di capire se lo scambio protonico tra gruppi ammidici sia principalmente intermolecolare o intramolecolare è stato studiato un campione di Biboc in CDCl_3 diluito circa 1:5 rispetto all'originale.

6) E' stato preparato un campione di Biboc in DMSO-d_6 , del quale, come già menzionato, sono stati registrati gli spettri ad alte temperature e misurati i tempi di rilassamento longitudinale in funzione della temperatura, a 200 MHz e 300 MHz.

Capitolo 3

Risultati dei calcoli teorici

I calcoli quantomeccanici hanno dimostrato che la conformazione ‘polipo’ è di gran lunga più stabile della ‘sedia’ (vedi Figura 7), con una differenza di energia di ben 200 kcal/mole. Una conformazione, non illustrata in figura, in cui le catene si estendono quasi nel piano, ottenuta a partire dal ‘polipo’ con rotazioni di $+120^\circ$ o -120° intorno ai quattro legami N-CH₂, è risultata assai più ragionevole della ‘sedia’, ma sempre molto improbabile, poiché la sua energia è 27 kcal/mole sopra quella del ‘polipo’.

Per quanto riguarda la molecola di Triboc, è stata minimizzata l’energia ed è stata ottimizzata la struttura a partire dalla conformazione ‘gear’ mostrata in Figura 7.

In tutti i casi le catene si estendono in forma essenzialmente *trans* ed è pienamente confermata la coplanarità dei legami amminici con l’anello triazinico, osservata sperimentalmente in molecole simili allo stato solido [13].

Nella Figura 8 è presentata la struttura di minima energia prodotta dal calcolo.

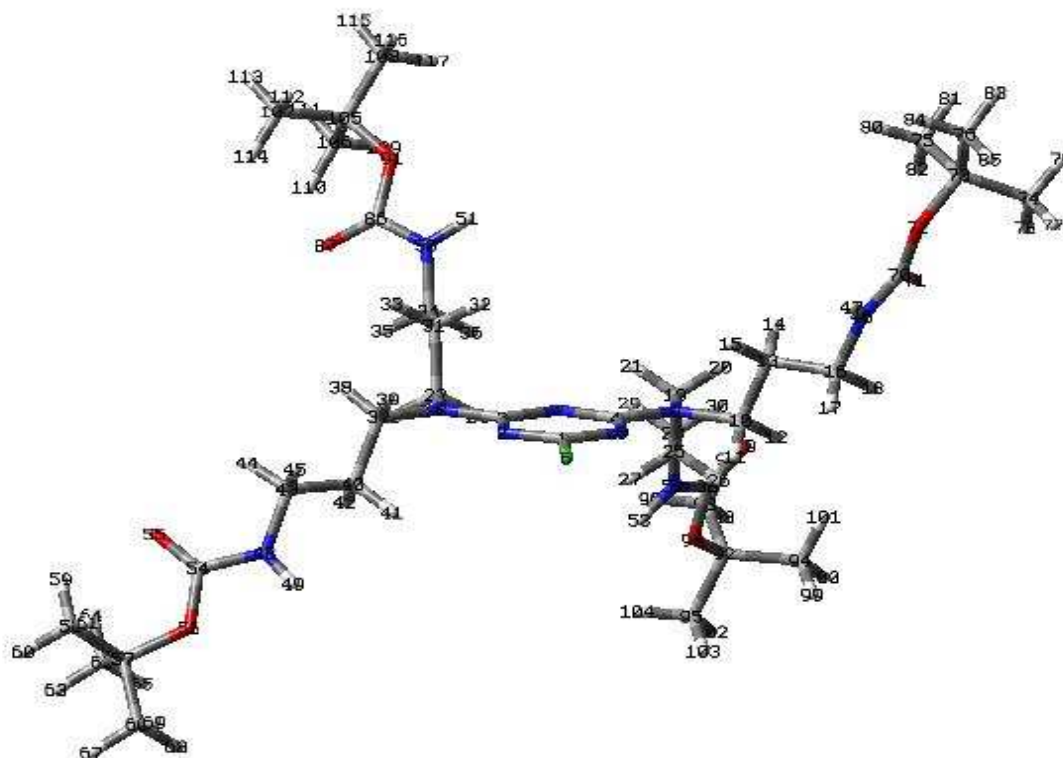


Figura 8. La struttura di minima energia prodotta dal calcolo.

Passiamo ora al confronto fra i valori di chemical shift sperimentali e calcolati nel vuoto per la molecole di Biboc. Il livello di correlazione fra dati sperimentali e calcolati può essere percepito osservando i grafici seguenti.

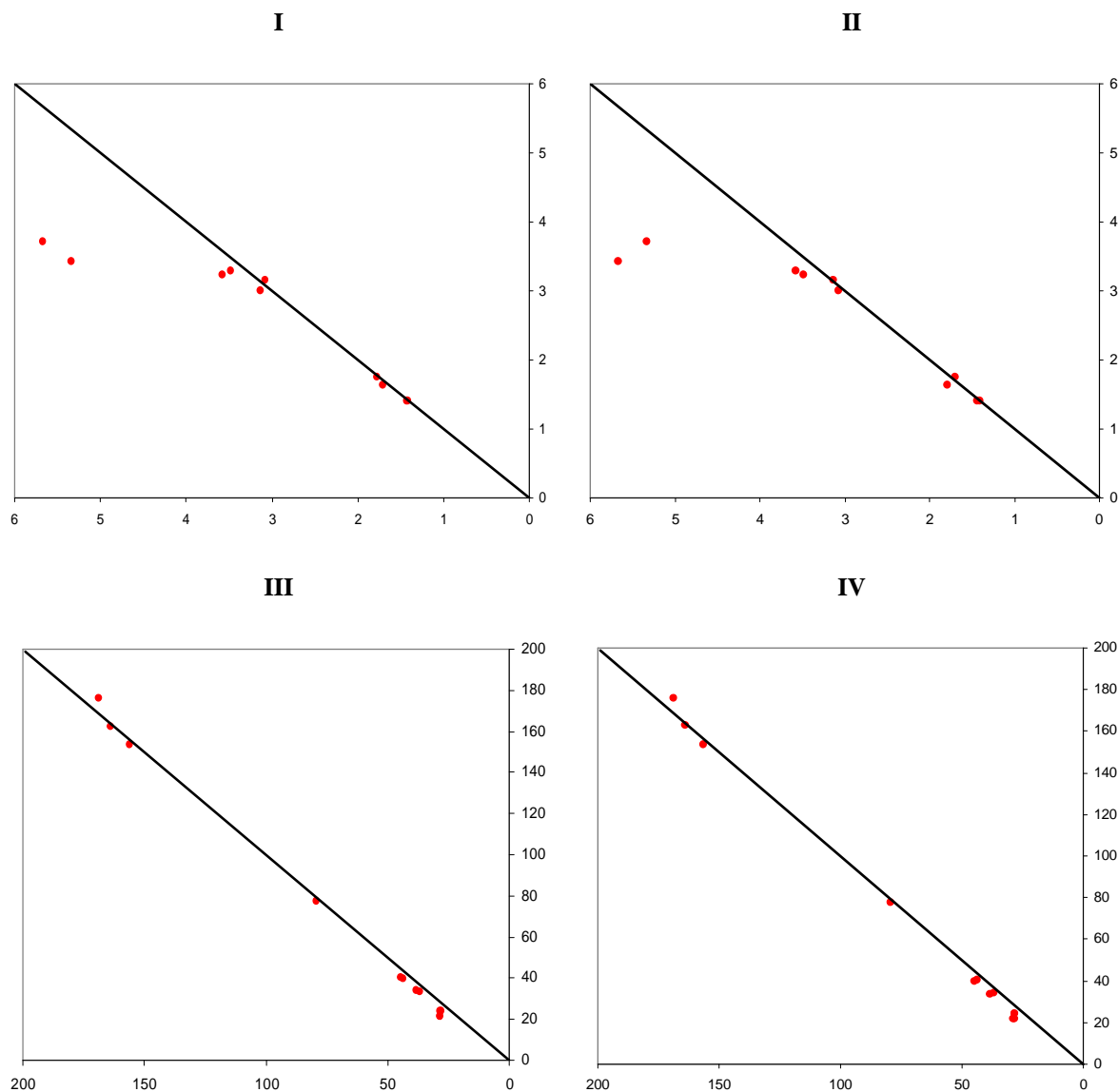


Figura 9. Confronto dei valori di chemical shift (ppm) sperimentali in ascissa, con quelli calcolati in ordinata.

I grafici I e II sono relativi agli spettri protonici, III e IV agli spettri del ¹³C.

Nei grafici I e III l'assegnazione dell'etichette A e B rispecchia quella indicata inizialmente nella Figura 1. Nei grafici II e IV l'assegnazione delle due catene è stata invertita. L'accordo fra dati sperimentali e calcolati è discreto tranne che nel caso dei protoni ammidici evidentemente soggetti ad interazioni specifiche di cui il calcolo non tiene conto.

I valori calcolati per il ^{13}C , ad eccezione di quello del carbonio 6T legato al cloro, sono sistematicamente più bassi di quelli sperimentali di circa 3 ppm. Tale difetto potrebbe essere dovuto a un'imperfezione nella determinazione teorica del valore di riferimento (TMS).

Osservando nel dettaglio le coppie di segnali relative ai metileni sulle catene A e B, in base al confronto fra i grafici III e IV sembra che l'assegnazione più corretta sia quella iniziale (grafico III), che riproduce meglio la sequenza sperimentale dei segnali. I grafici relativi al protone non permettono di confermare questa indicazione. Va però tenuto presente che i valori di chemical shift calcolati per il carbonio sono probabilmente meglio confrontabili con gli sperimentali che non i valori del protone, essendo questi ultimi nuclei più esterni nella molecola e quindi più soggetti all'influenza dell'ambiente circostante.

Spettri ^1H e ^{13}C NMR di Biboc in DMSO-d_6

Poiché, per quanto riguarda Biboc, le misure a temperatura variabile e le misure di tempi di rilassamento sono state fatte non solo in CDCl_3 , ma anche in DMSO-d_6 , presentiamo subito gli spettri a temperatura ambiente di Biboc in quest'ultimo solvente.

Lo spettro ^1H NMR è riportato in Figura 10, da confrontarsi con gli spettri di Figura 2.

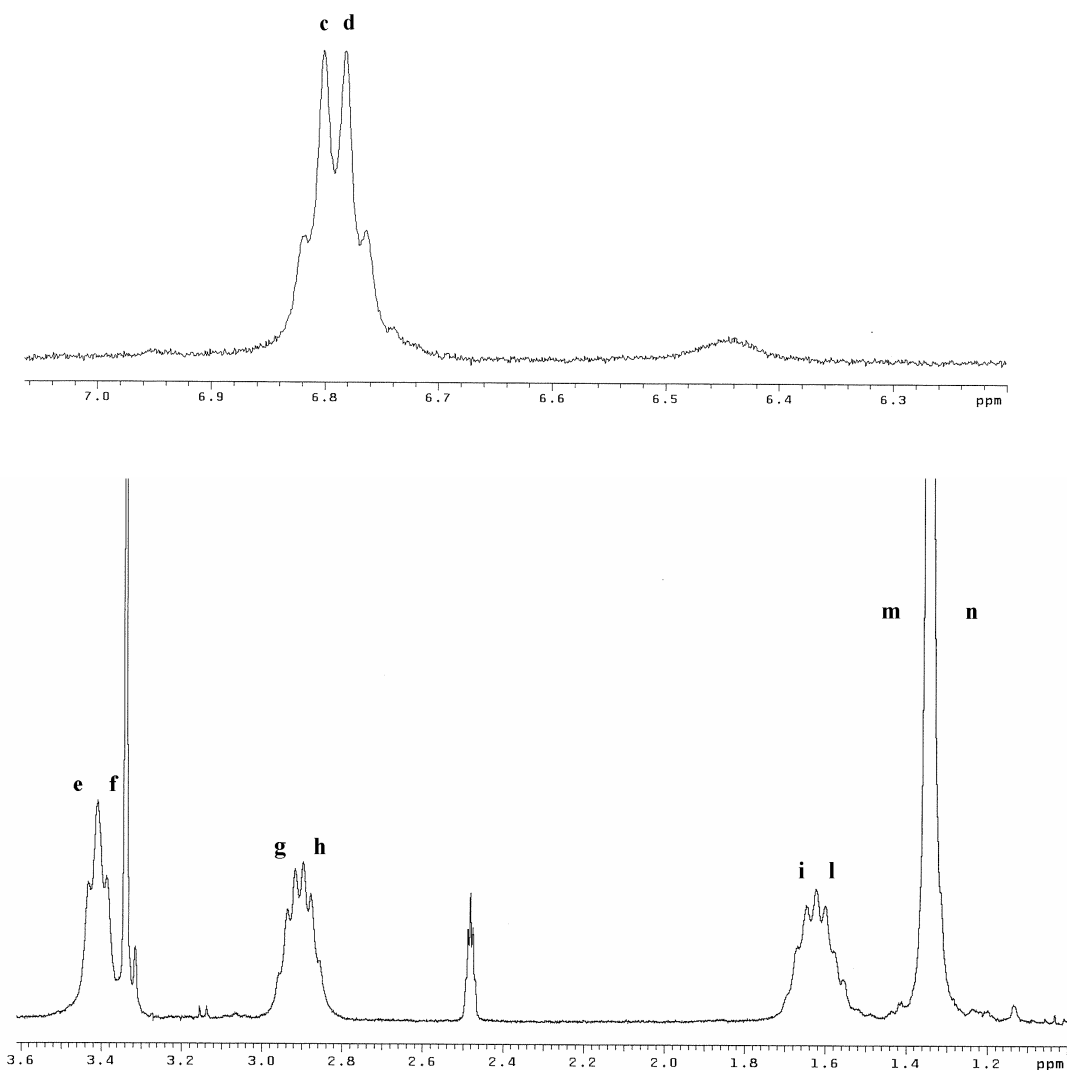


Figura 10. ^1H NMR in DMSO-d_6 . In basso un'espansione da 1.00 a 3.6 ppm. In alto il particolare dei segnali c e d.

Si osserva che:

- i protoni amminici risuonano intorno a 7 ppm, chiaro segno del loro totale coinvolgimento in legami a idrogeno; l'apparente quartetto è dovuto alla parziale sovrapposizione dei due tripletti originati dai nuclei delle catene A e B, accoppiati con i protoni del metilene adiacente;
- i tripletti 1A e 1B sono praticamente sovrapposti;
- molto ravvicinati rispetto a quanto visto in CDCl₃, e in parte sovrapposti, sono anche i segnali delle coppie 2A-2B e 3A-3B;
- tutti i multipletti sono ben risolti, anche quelli relativi alla catena B, benché lo spettro sia registrato a temperatura di poco superiore a quella di congelamento del solvente puro (18.5°C). Anche nello spettro ¹³C NMR lo sdoppiamento dei segnali delle due catene è presente, ma in misura molto ridotta rispetto al caso in CDCl₃.

Misure a temperatura variabile

Misure ad alta temperatura

Dinamica della interconversione fra le catene A e B in DMSO-d₆

L'interconversione fra le catene A e B può essere considerata *lenta* a temperatura ambiente ed a temperature superiori, fino a quando gruppi corrispondenti danno segnali distinti, che non cambiano significativamente e non tendono a convergere aumentando la temperatura.

Queste condizioni indicano che lo scambio avviene con frequenza molto inferiore alla differenza delle frequenze di risonanza del nucleo in esame nei siti A e B, ($\nu_A - \nu_B$).

Aumentando la temperatura la frequenza dello scambio aumenta, fino a diventare comparabile con la differenza ($\nu_A - \nu_B$). Da questo momento i segnali si allargano considerevolmente e si spostano fino a convergere verso un valore di chemical shift medio. La temperatura alla quale i due segnali si fondono in un'unica banda slargata e spesso appiattita sulla sommità è detta temperatura di coalescenza, T_c . La trattazione teorica di questo fenomeno [16,17] prevede che, per questa temperatura particolare e per uno scambio fra due siti equipopolati, la frequenza o costante cinetica di scambio k possa essere valutata sulla base della semplice formula

$$k(T_c) = (\pi/2)(\nu_A - \nu_B)$$

Quindi, individuando le temperature di coalescenza di segnali con separazione ($\nu_A - \nu_B$) diversa, si ottiene la costante di scambio a diverse temperature. A temperature superiori il segnale appare unico, ma slargato. La frequenza di scambio può essere ottenuta dalla formula

$$k(T) = (\pi/2)(\nu_A - \nu_B)(r^2 - 1/r^2 + 2)$$

dove $r = (\nu_A - \nu_B)/[w(T) - w_0]$, con $w(T)$ e w_0 larghezze di riga rispettivamente a temperatura T e in condizioni di scambio *lento* o molto *veloce*.

Infine, a temperature superiori, la forma di riga del segnale medio diventa indipendente da T .

Nel caso di Biboc in $CDCl_3$, la frequenza di interconversione tra A e B si manteneva nel limite *lento* fino ad almeno $50^\circ C$, sia negli spettri registrati a 300 MHz, sia in quelli registrati a 200 MHz (l'uso di uno strumento a basso campo favorisce il più rapido raggiungimento della temperatura di coalescenza). La bassa temperatura di ebollizione del solvente non ha permesso di andare oltre.

In $DMSO-d_6$, invece, è stato possibile registrare spettri fino a $120^\circ C$, temperatura alla quale tutti i segnali, inizialmente sdoppiati, avevano superato la coalescenza e avevano raggiunto il limite dello scambio veloce. Come già detto, la differenza di chemical shift fra segnali corrispondenti delle due catene è minore in $DMSO-d_6$ che in $CDCl_3$, cosa che abbassa la temperatura di coalescenza.

Dalle temperature di coalescenza dei gruppi 4A-4B, 3A-3B e 2A-2B e dagli allargamenti di riga dei segnali 3 e 4 oltre la coalescenza abbiamo potuto stimare cinque valori della frequenza di scambio k in funzione di T , riportati nei grafici seguenti (Figura 11).

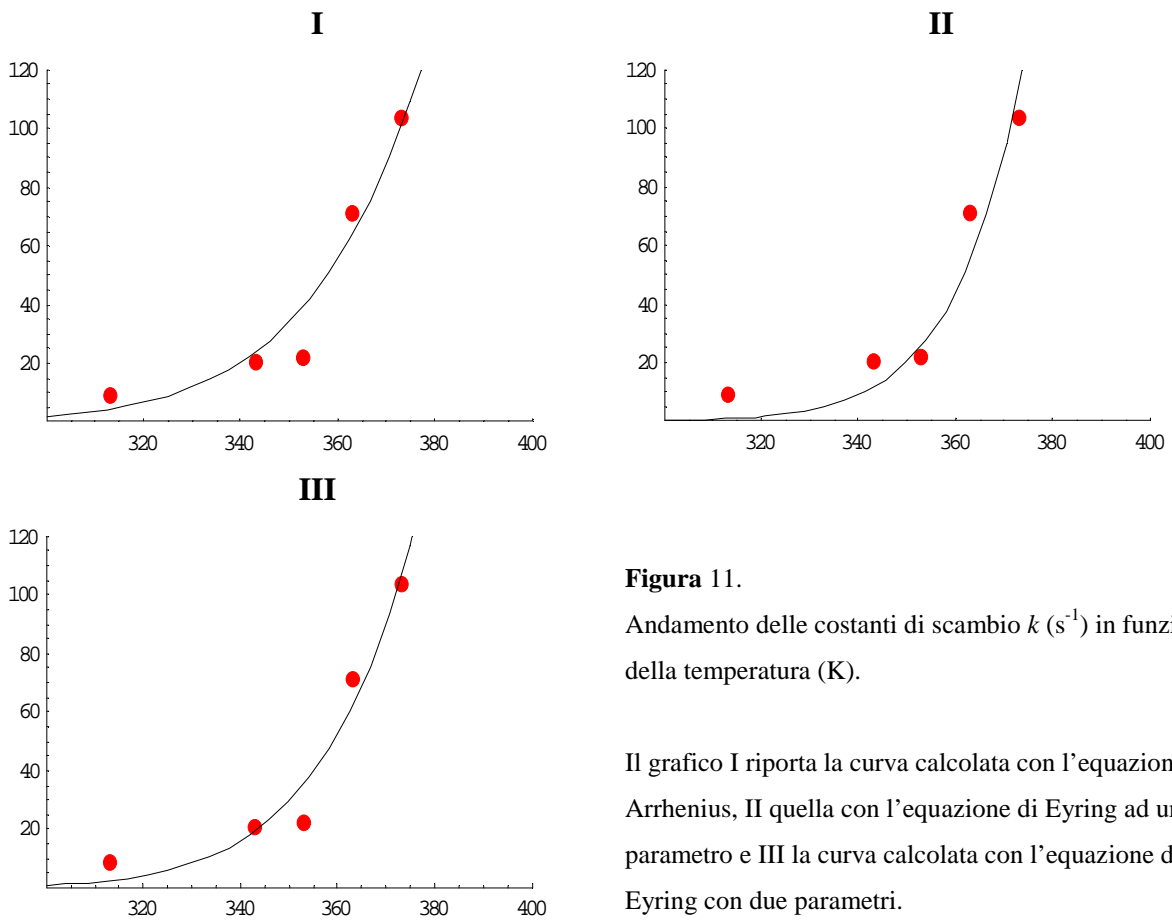


Figura 11.
Andamento delle costanti di scambio k (s^{-1}) in funzione della temperatura (K).

Il grafico I riporta la curva calcolata con l'equazione di Arrhenius, II quella con l'equazione di Eyring ad un solo parametro e III la curva calcolata con l'equazione di Eyring con due parametri.

Le curve continue sono state ottenute dal fitting dei dati sperimentali (programma di calcolo Mathematica) con tre diverse equazioni [18]:

I - Equazione di Arrhenius

$$k = A e^{\frac{-E^a}{RT}}$$

mediante la quale sono stati ottenuti i valori

$A = 1.22 \times 10^9 s^{-1}$ fattore preesponenziale, considerato indipendente dalla temperatura;

$E^a = 12 \text{ kcal/mole}$ energia di attivazione;

II – Equazione di Eyring con un solo parametro

$$k = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT} \right)}$$

mediante la quale è stato ottenuto il valore

$\Delta G^\ddagger = 18 \text{ kcal/mole}$ energia libera di attivazione, considerata indipendente dalla temperatura;

III – Equazione di Eyring a due parametri

$$k = S \left(\frac{k_B T}{h} \right) \cdot e^{\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT} \right)}$$

mediante la quale sono stati ottenuti i valori

$\Delta H^\ddagger = 14$ kcal/mole entalpia di attivazione;

$S = 1.3 \times 10^{-3}$ fattore preesponenziale legato all'entropia di attivazione:

$$S = e^{\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right)}$$

Si può quindi stimare $\Delta S^\ddagger = 13$ cal/moleK.

Il risultato di energia libera di attivazione ottenuto con l'equazione di Eyring è in ottimo accordo con i valori riportati in letteratura per casi analoghi [13].

Va comunque notato che i risultati da noi ottenuti possono essere soggetti ad una notevole incertezza sperimentale dovuta principalmente ad una determinazione approssimativa delle temperature di coalescenza. Ciò deve indurre ad interpretare con cautela soprattutto i risultati del terzo fitting.

Misure a bassa temperatura

Sono stati registrati spettri di Biboc e Triboc in CDCl_3 a temperature comprese fra i 19°C (temperatura ambiente) e i -35°C per individuare l'eventuale 'congelamento' dei moti conformazionali che risultano *veloci* a temperatura ambiente. Nessun cambiamento significativo è stato osservato negli spettri in questo intervallo di temperature.

Misure dei tempi di rilassamento longitudinale T_1 del Protone

Il paragrafo seguente, in corsivo, contiene una breve spiegazione della sequenza di impulsi usata per la misura dei tempi T_1 , discussi in seguito.

La tecnica che ha reso possibile la misura di questi tempi di rilassamento si chiama sequenza di Inversion Recovery [9]. Essa si basa sull'applicazione di una sequenza di due impulsi, separati da un intervallo di tempo variabile. Per registrare un normale spettro protonico si invia un impulso a 90° , capace di spostare il vettore magnetizzazione dall'asse z , dove si trova quando il campione è sottoposto al campo magnetico ma non alla radiazione, sul piano xy . In seguito a ciò il vettore magnetizzazione comincerà a ruotare con moto di precessione intorno all'asse z e, contemporaneamente, a rilassare, cioè diminuirà la sua componente sul piano xy (rilassamento trasversale) e crescerà la sua componente z (rilassamento longitudinale), fino a ritornare alla condizione di equilibrio; mentre si svolgono questi fenomeni viene registrato il FID, dal quale, in seguito all'applicazione della trasformata di Fourier, è possibile ottenere lo spettro. L'intensità di ogni segnale nello spettro è proporzionale alla sua componente di magnetizzazione nel piano xy subito dopo l'impulso di 90° , cioè prima che il rilassamento trasversale la riduca.

Nella sequenza Inversion Recovery il primo impulso applicato è di 180° , in modo da ruotare la posizione del vettore magnetizzazione fino ad invertirla, creando perciò da un vettore M_0 un vettore $-M_0$. A questo punto il vettore perturbato inizierà il suo rilassamento longitudinale fino a tornare alla sua posizione iniziale, ma senza passare per il piano xy . Per poter misurare l'intensità di tale vettore, si deve applicare un ulteriore impulso a 90° che lo porta dall'asse $-z$ sul piano xy . In questo modo è possibile 'misurare' le componenti della magnetizzazione sul piano registrando il FID e, dopo la trasformata di Fourier, valutando l'intensità dei segnali nello spettro. Tali segnali sono intensi, ma in antifase, quando l'intervallo di tempo τ fra gli impulsi a 180° e a 90° è breve rispetto al tempo caratteristico del rilassamento longitudinale T_1 ; perdono di intensità all'aumentare di τ fino ad annullarsi; all'aumentare ulteriore di τ i segnali dello spettro crescono di intensità con fase positiva, sempre più moderatamente fino a diventare indipendenti da τ . La relazione fra $M(\tau)$ e T_1 è la seguente:

$$M(\tau) = M_0(1 - 2e^{-\frac{\tau}{T_1}})$$

La magnetizzazione, misurata tramite l'intensità del segnale nello spettro, si annulla quando $\tau/T_1 = \ln 2$. Quindi i valori di T_1 possono essere rapidamente determinati dal valore di τ per il quale il segnale si annulla in un esperimento di Inversione Recovery. Un esempio di una serie di spettri utili per la rapida determinazione dei T_1 di diversi nuclei è riportato in Figura 12.

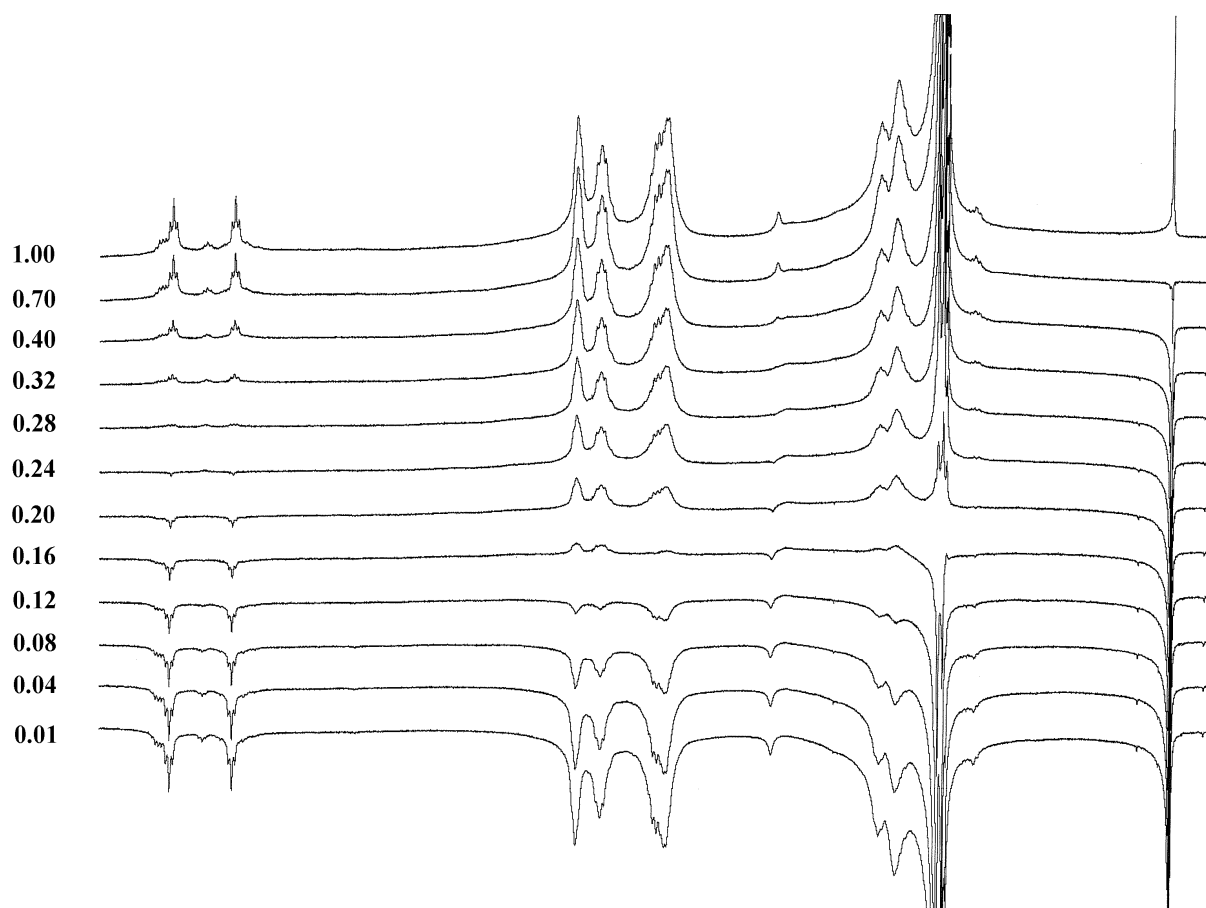


Figura 12. Sequenza di spettri per la misura di T_1 dei protoni di Biboc in CDCl_3 a -25°C . A sinistra sono riportati i valori di τ in secondi.

Questo tipo di rilassamento, chiamato longitudinale o spin-reticolo, è capace di ricostruire la magnetizzazione lungo l'asse z fino alla posizione di equilibrio, dopo una perturbazione, per esempio un impulso. Questo processo dipende in particolar modo dalla mobilità che hanno i nuclei, perché è provocato dalle fluttuazioni del campo magnetico locale che scaturiscono dai movimenti dell'intorno chimico del nucleo, detto anche reticolo. Il rilassamento spin-reticolo è caratterizzato da un parametro, il tempo di rilassamento T_1 che è quello che è stato misurato per ogni nucleo della molecola in esame [16].

Esiste un'equazione che lega il tempo di rilassamento T_1 con un altro parametro temporale, che caratterizza il grado di mobilità riorientazionale della molecola, chiamato "correlation time" e indicato con τ_c . Indicativamente, τ_c rappresenta il tempo mediamente impiegato dalla molecola per compiere un giro di 180° intorno ad uno qualsiasi dei suoi assi [10].

Il rilassamento spin-reticolo di un nucleo è in buona parte dovuto alle fluttuazioni del suo accoppiamento dipolare con altri nuclei vicini. Per una coppia di nuclei a distanza r la relazione fra T_1 e τ_c è la seguente:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{20} \left(\frac{g_N^4 \beta_N^4}{\hbar^2 r^6} \right) \left\{ \frac{2\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{8\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right\}$$

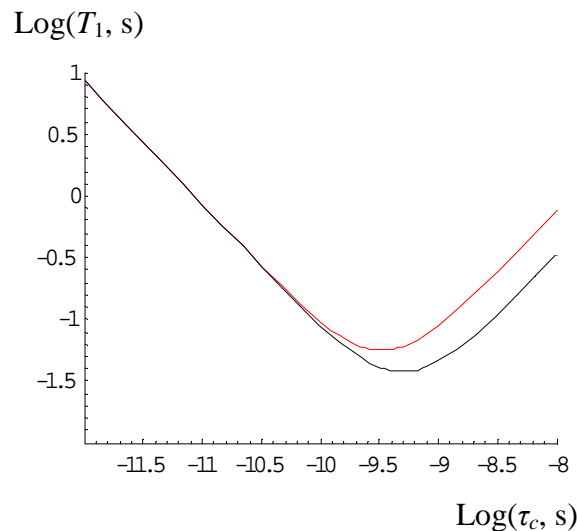
dove ω_0 è la frequenza di Larmor impiegata, in radianti al secondo, e $g_N \beta_N = \gamma_N \hbar$, con γ_N rapporto giromagnetico del nucleo in questione.

Si possono distinguere due casi:

-quando il prodotto $\omega_0 \tau_c \ll 1$, il tempo di rilassamento T_1 diventa inversamente proporzionale al tempo di correlazione.

-quando il prodotto $\omega_0 \tau_c \gg 1$, il tempo di rilassamento diventa proporzionale al τ_c .

L'andamento di $\text{Log}(T_1)$ in funzione di $\text{Log}(\tau_c)$ è illustrato in Figura 13 nel caso di due protoni distanti 3\AA , per due frequenze di Larmor diverse.



T ←

Figura 13. Andamento di $\text{Log}(T_1)$ in funzione di $\text{Log}(\tau_c)$ per $\nu = 200$ MHz (curva nera) e $\nu = 300$ MHz (curva rossa).

Il punto di minimo di ciascuna curva si realizza per $\omega_0 \tau_c = 1$.

La misura dei T_1 dei nuclei di una molecola permette quindi di studiare la diversa mobilità dei suoi frammenti e di trarre informazioni utili dal punto di vista conformazionale. E' però importante poter disporre di valori di T_1 in funzione di τ_c , per poter capire in quale zona della curva ci troviamo a lavorare. Il parametro essenziale per far variare τ_c è la temperatura. Infatti, in base all'equazione di Stokes-Einstein, valida per molecole piccole ma anche per macromolecole in soluzione, si ha:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT}$$

dove η è la viscosità della soluzione e a il raggio molecolare.

Presentiamo quindi, in Figura 14, una serie di grafici dei tempi di rilassamento da noi misurati in funzione di $1/T$ per Biboc in CDCl_3 e in DMSO-d_6 , a 200 MHz e a 300MHz. Nelle serie di dati in CDCl_3 a 300 MHz l'intervallo di temperature esplorato va da 50°C a -35°C , nelle serie in DMSO-d_6 da 80°C a 20°C .

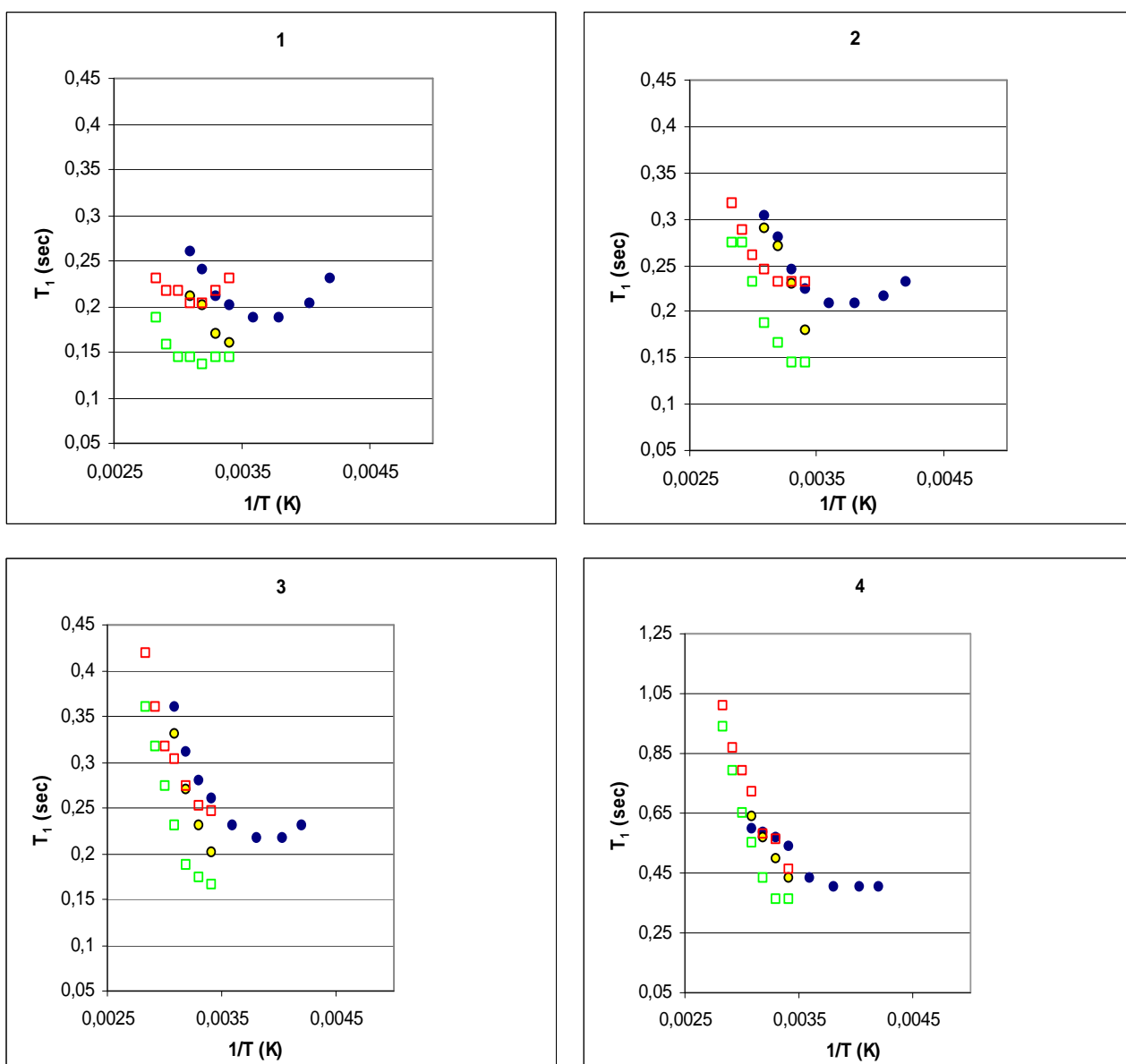


Figura 14. L'andamento dei T_1 dei vari protoni. In blu è rappresentato l'andamento di Biboc in CDCl_3 misurato a 300 MHz e in giallo a 200 MHz; in rosso è indicato l'andamento dei T_1 dei protoni del Biboc in DMSO-d_6 registrato a 300 MHz e in verde a 200 MHz.

Osserviamo subito che in nessuna della serie di misure su Biboc è stata rilevata la minima differenza fra i valori di T_1 della catena A e quelli della catena B, i cui segnali si annullavano sempre simultaneamente. Nessuna significativa differenza di mobilità interna alle due catene emerge quindi da queste misure.

Notiamo invece che:

- in tutti i casi si differenziano le misure svolte a 200 MHz e a 300 MHz, come previsto dalla teoria (vedi Figura 13);
- andando dai protoni del metilene 1 a quelli del 2, poi a quelli del 3 e infine al protone ammidico, i valori di T_1 sperimentali si collocano sempre più a sinistra sulla curva teorica. Ciò significa che, a parità di temperatura, di mano in mano che ci si allontana dal nucleo triazinico della molecola, i diversi gruppi manifestano una mobilità crescente, quindi valori di τ_c decrescenti. Ciò è chiaramente dovuto ad un aumento della mobilità interna alla catena in funzione della distanza dal centro della molecola.

Dalla posizione dei minimi di T_1 a 300 MHz possiamo infine stimare le temperature alle quali corrisponde, per i diversi gruppi, il valore di $\tau_c = 5 \cdot 10^{-10}$ s.

	Protoni	1	2	3	4
CDCl ₃	T(°C)	-10	-15	-20	-30
DMSO-d ₆	T(°C)	40	30		

Il confronto mette in evidenza la notevole differenza di mobilità della molecola di Biboc nei due solventi, sicuramente riconducibile alla loro diversa viscosità.

Effetti della concentrazione

Alcuni esperimenti hanno coinvolto anche una variazione della concentrazione del campione iniziale per osservare gli effetti che produceva questo cambiamento di condizioni in particolare per i protoni ammidici del Biboc.

Un'aliquota del campione originale in CDCl₃ è stata diluita circa 1:5, ottenendo una soluzione approssimativamente 0,02 M di cui è stato registrato lo spettro a temperatura ambiente. I segnali alifatici dello spettro sono identici a quelli relativi alla soluzione concentrata, ma salta

all'occhio l'assenza del segnale relativo al protone ammidico 4A, come mostrato in Figura 15. Il segnale rimanente integra per un protone, quindi non è dovuto alla sovrapposizione dei due segnali 4A e 4B. In una mappa NOESY registrata su questo campione, il segnale del protone ammidico non risulta correlato con nessun altro segnale dello spettro.

Un'ipotesi ragionevole è la seguente: il protone 4A è in scambio tra siti a diverso chemical shift con frequenza intermedia tra i regimi di scambio *lento* e scambio *veloce*. In questa condizione il segnale può allargarsi tanto da perdersi nella linea di base dello spettro. Per testare questa ipotesi abbiamo registrato spettri a temperature inferiori a quella ambiente, fino a -45°C . A partire da circa -30°C compare un segnale largo intorno a 6 ppm; a -45°C sono presenti vari segnali che ricordano la sequenza a-b-c-d vista nello spettro della soluzione concentrata in Figura 2. L'insieme di questi segnali integra per due protoni, vedi Figura 15.

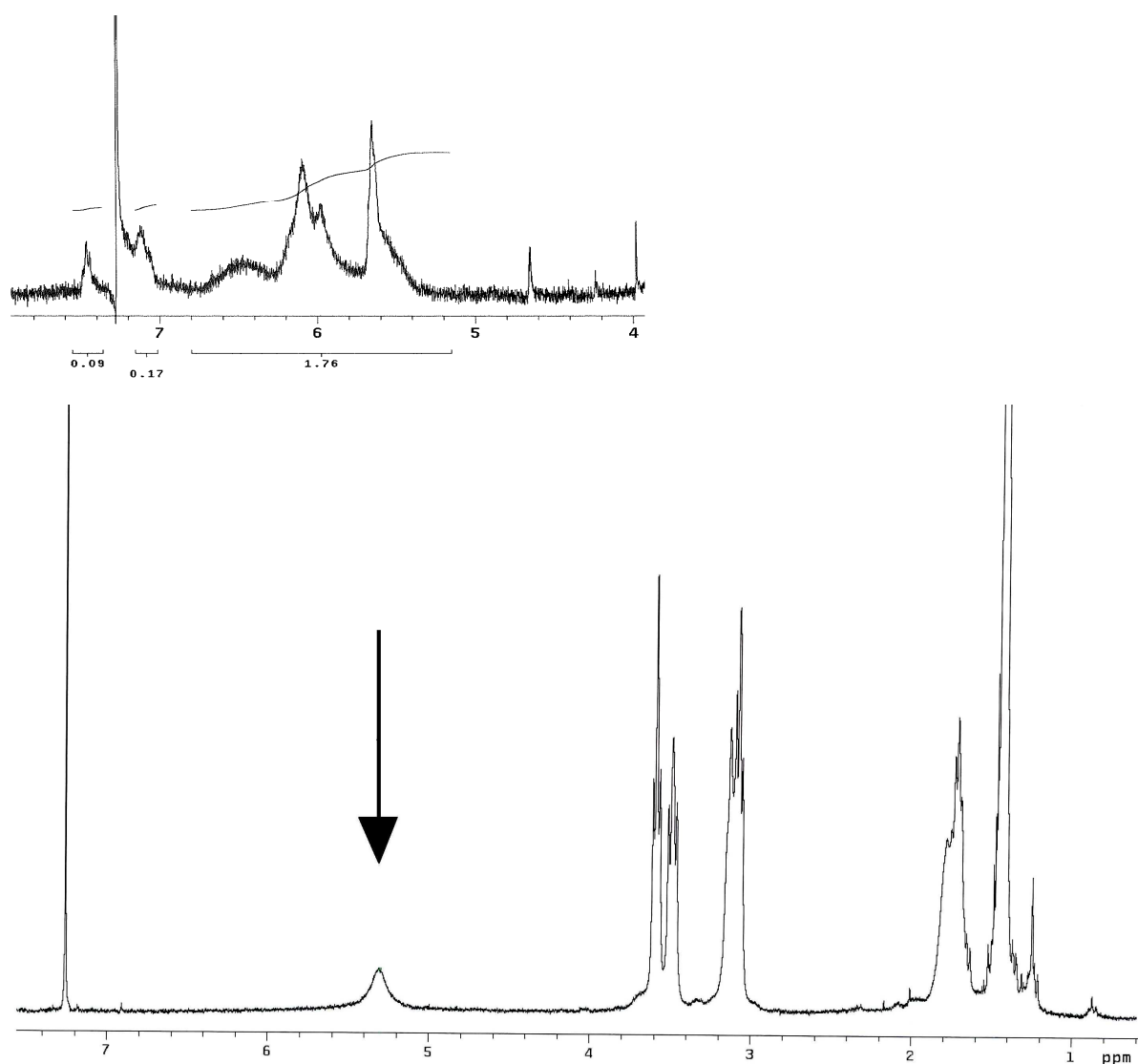


Figura 15. In basso lo spettro di Biboc in una soluzione diluita circa 1:5 rispetto all'originale, da confrontarsi con la Figura 2. In alto, l'espansione mostra la zona dei protoni ammidici nello spettro a -45°C .

Al momento non è chiaro quale meccanismo produca una simile dipendenza dello scambio del protone ammidico 4A dalla concentrazione.

Sezione sperimentale

Gli spettrometri NMR utilizzati sono stati un Varian VXR300 e un Gemini 200.

Su entrambi gli strumenti è stato calibrato l'impulso a 90° sul protone, che è risultato di $17.5 \mu\text{s}$ sul VXR300 e $24.5 \mu\text{s}$ sul Gemini 200. Per altri parametri che sarebbe stato necessario calibrare sono stati accettati valori ottimizzati in precedenza.

Tutti gli esperimenti si sono basati su sequenze di impulsi standard presenti nel software degli strumenti.

Le operazioni a bassa temperatura sono state svolte applicando un flusso di aria fredda proveniente da un bagno di azoto liquido e sono stati fatti unicamente sullo spettrometro a 300 MHz; le basse temperature presentavano un'oscillazione fino a $\pm 2^\circ\text{C}$, mentre le temperature sopra la temperatura ambiente erano molto più stabili, con un'oscillazione di $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Conclusioni

Sulla base di calcoli teorici, alla molecola protagonista di questo lavoro, il Biboc, è stata attribuita, come struttura più stabile, quella a 'polipo', in cui i sostituenti legati a ciascun azoto amminico si estendono in piani perpendicolari rispetto a quello dell'anello triazinico, da parti opposte. Questa conformazione prevede due tipi di catene, il cui intorno chimico si differenzia per la diversa posizione rispetto all'atomo di cloro. Dal confronto tra valori sperimentali e teorici di chemical shift del protone e del ^{13}C non è stato però possibile trarre un'indicazione conclusiva per l'attribuzione delle sequenze di segnali denominate A e B negli spettri NMR alle catene nelle due diverse condizioni strutturali.

L'interconversione tra A e B comporta la rotazione intorno ad un legame C-N parzialmente doppio ed avviene con una barriera di energia di attivazione di 12-14 kcal/mole, o di energia libera di attivazione di 18 kcal/mole.

Tramite le misure dei tempi di rilassamento T_1 del protone in due solventi e in funzione della temperatura non è stata riscontrata alcuna differenza di mobilità tra le catene A e B.

E' stata invece messa in chiara evidenza la crescente mobilità interna alle catene all'aumentare della distanza del frammento in esame dal nucleo triazinico.

Infine, la registrazione di spettri NMR a varie temperature su un campione diluito rispetto al primo ha rivelato un fenomeno di scambio che coinvolge i protoni ammidici, il cui meccanismo e la cui correlazione con la concentrazione del campione non sono stati chiariti.

Bibliografia.

- [1] H:\Dendrimeri nanocomposti per la medicina Le Scienze Web News.mht.
- [2] *Dendrimers*, Topic in Current Chemistry, vol.197, Springer, vol. ed. F. Vogtle.
- [3] Simona Samaritani, *Sintesi, Caratterizzazione e Proprietà di Nuovi Derivati della 1,3,5-Triazina*, tesi di Dottorato, Università di Pisa, **1995**.
- [4] S. Lalwani, A. Chouai, L. M. Perez, V. Santiago, S. Shaunak, E. E. Simanek, *Macromolecules*, **2009**, 42, 6723.
- [5] Z. Brzozowski, F. Sączewski, M. Gdaniec, *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, 35, 1053.
- [6] C. Lee, G. F. Jin, J. H. Yoon, Y. J. Jung, J. Lee, S. Cho, H. Nakamura, S. O. Kang, *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 159.
- [7] R. M. Silverstein, F. X. Webster, *Identificazione Spettroscopica dei Composti Organici*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, **1999**.
- [8] A. R. Katritzky, D. C. Oniciu, I. Ghiviriga, R. A. Barcock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. **1995**, 785.
- [9] J. K. M. Sanders, B. K. Hunter, *Modern NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.
- [10] D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, New York, **1989**.
- [11] J. Jeener, B. H. Meier, P. Ban, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546.
- [12] N. V. Shokhiriev, *NMR Tutorials*, <http://www.shokhirev.com/nikolai/abc/nmrtut/NMRtut3b.html>
- [13] A. R. Katritzky, I. Ghiviriga, P. J. Steel, D. C. Oniciu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. **1996**, 443.
- [14] N. D. Reddy, A. J. Elias, A. Vij, *J. Chem. Research (S)*, **1998**, 504.
- [15] A. Marini, *Structure, orientational order and magnetic properties from simple to complex liquid crystalline materials: a combined multinuclear NMR spectroscopy and ab initio calculations approach.*, Tesi di Perfezionamento, Scuola Normale Superiore, Pisa, **2009**.
- [16] A. Carrington, A. D. Mc Lachlan, *Introduction to Magnetic Resonance*, A Harpor International Edition, HARPOR & ROW, New York, Evanston & London and JOHN WEATHERHILL, INC., Tokio, **1974**.
- [17] L.Lunazzi, *Principi di NMR Dinamico*, in *Scuola su recenti sviluppi*, Torino, 5-9 settembre, **1983**.
- [18] P. W. Atkins, *Chimica Fisica*, Zanichelli Editore S.p.a., **1997**.