



## UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI  
Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale

---

# COLORANTI TANNICI E FIBRE DI LANA

Studio integrato computazionale e spettroscopico dei  
complessi ferro-gallici con matrice proteica

Elaborato di Laurea Specialistica in Chimica Fisica

**Relatori:**

Prof.ssa Benedetta Mennucci  
Dr. Ilaria Degano

**Candidato:**

Sandro Jurinovich

**Controrelatore:**

Prof. Alessandro Tani

---

Anno Accademico 2010/11





## UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI  
Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale

---

# COLORANTI TANNICI E FIBRE DI LANA

## Studio integrato computazionale e spettroscopico dei complessi ferro-gallici con matrice proteica

Elaborato di Laurea Specialistica in Chimica Fisica

**Relatori:**

Prof.ssa Benedetta Mennucci .....

Dr. Ilaria Degano .....

**Controrelatore:**

Prof. Alessandro Tani .....

**Candidato:**

Sandro Jurinovich .....

---

Sessione di Laurea 16 Febbraio 2012  
Anno Accademico 2010/11



*Ad Alberto*



<b>1</b>	<b>I coloranti naturali a base di tannini</b>	<b>1</b>
1.1	I tannini in natura . . . . .	2
1.2	L'impiego dei coloranti naturali nei processi di tintura dei tessuti . . . . .	5
1.3	Cenni sui processi di degradazione dei tessuti . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Studi sperimentali sui complessi ferro-gallici</b>	<b>13</b>
2.1	Stato dell'arte nello studio dei complessi ferro-gallici . . . . .	14
2.1.1	I complessi ferro-gallici $\text{GAFe(III)}$ . . . . .	15
2.1.2	I complessi ferro-gallici $\text{GAFe(II)}$ . . . . .	18
2.2	I complessi ferro-gallici nella preparazione degli inchiostri . . . . .	20
2.3	Quale sistema modello studiare? . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Studio teorico-sperimentale dell'acido gallico (GA) e di <math>\text{GAFe(II)}</math></b>	<b>23</b>
3.1	Metodi computazionali . . . . .	23
3.1.1	Le tecniche di ottimizzazione di geometria . . . . .	25
3.1.2	L'approccio DFT . . . . .	28
3.2	Dettagli computazionali . . . . .	32
3.3	Analisi strutturale dell'acido gallico . . . . .	35
3.3.1	Transizioni elettroniche in GA . . . . .	36
3.4	Analisi strutturale dei complessi ferro-gallici . . . . .	39
3.4.1	Generalità sui complessi di $\text{Fe(II)}$ . . . . .	39
3.4.2	Analisi strutturale di $\text{GAFe(II)}$ in vuoto . . . . .	43
3.4.3	Complessi $\text{GAFe(II)}$ idratati . . . . .	46
3.4.4	Analisi delle cariche NBO . . . . .	48
3.4.5	Transizioni elettroniche in $\text{GAFe(II)}$ . . . . .	49

<b>4</b>	<b>Complessi ternari con amminoacidi liberi</b>	<b>55</b>
4.1	Analisi strutturale dei complessi ternari . . . . .	58
4.2	I complessi GAF <sub>e</sub> (II)-glicina . . . . .	60
4.2.1	I complessi GaFe(II)-glicina idratati . . . . .	63
4.3	I complessi GAF <sub>e</sub> (II)-serina . . . . .	64
4.4	I complessi GAF <sub>e</sub> (II)-cisteina . . . . .	67
4.5	I complessi GaFe(II)-aspartato . . . . .	69
4.6	Analisi delle binding energy . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Proposta di un modello di interazione con la fibra di lana</b>	<b>77</b>
5.1	La struttura tridimensionale delle proteine . . . . .	77
5.2	Le $\alpha$ -Cheratine: proteine della lana . . . . .	78
5.3	Modello computazionale dell' $\alpha$ -cheratina . . . . .	81
5.3.1	L'Homology Modelling . . . . .	82
5.3.2	Il modello computazionale . . . . .	84
5.4	Quali interazioni sono possibili? . . . . .	85
5.5	Strategia computazionale per lo studio di un sistema complesso . . . . .	88
5.5.1	Il metodo semiempirico PM6 . . . . .	88
5.5.2	Il metodo ONIOM . . . . .	89
5.5.3	Il metodo DFT con l'impiego di diversi set di base . . . . .	90
5.5.4	Descrizione della strategia computazionale utilizzata . . . . .	91
5.6	Interazioni della fibra con il complesso GAF <sub>e</sub> (II) . . . . .	93
5.6.1	Interazioni sulla catena polipeptidica principale (tipo I) . . . . .	93
5.6.2	Interazioni con la catena principale e il gruppo funzionale laterale (tipo II) . . . . .	99
5.6.3	Interazioni con il gruppo funzionale dei residui laterali (tipo III) . . . . .	101
5.6.4	Analisi delle binding energy . . . . .	103
<b>6</b>	<b>Conclusioni e sviluppi futuri</b>	<b>107</b>
<b>A</b>	<b>Condizioni sperimentali nelle analisi UV-Vis</b>	<b>111</b>
<b>B</b>	<b>Riproduzione del bagno di tintura</b>	<b>113</b>
<b>C</b>	<b>Complesso ternario GAF<sub>e</sub>(II)-tirosina</b>	<b>115</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>124</b>

---

## Introduzione

---

La chimica è uno strumento fondamentale per affrontare gli argomenti di interesse nel campo dei beni culturali, in particolare per quanto riguarda l'indagine della natura e della composizione dei materiali originali, dei processi di degradazione che avvengono nel tempo e dei cambiamenti chimico-fisici a cui le opere d'arte sono sottoposte. La caratterizzazione chimica dei materiali permette ai ricercatori di rivelare la ricchezza di informazioni contenuta al loro interno permettendo di approfondire numerosi aspetti connessi all'opera stessa, dalle tecniche di manifattura agli aspetti artistici, cronologici, storici e di significato socio-culturale. La branca della chimica maggiormente coinvolta nelle ricerche sui beni culturali è la chimica analitica che affronta il problema con un approccio di tipo sperimentale volto principalmente alla caratterizzazione dei materiali, alla rivelazione delle componenti organiche e dei prodotti di degradazione, spesso presenti in tracce all'interno di matrici complesse, attraverso tecniche di analisi morfologiche, spettroscopiche, cromatografiche e di spettrometria di massa.

Negli ultimi anni la chimica computazionale ha dato un grande contributo a numerose branche della scienza dei materiali, ma questo potente strumento è stato solo recentemente applicato al campo dei beni culturali. Ciò è stato possibile grazie allo sviluppo di metodi quantomeccanici che hanno permesso lo studio di sistemi complessi con un ragionevole compromesso tra l'accuratezza del risultato e il costo computazionale. Attraverso questo strumento possono essere investigate le strutture e le proprietà spettroscopiche di sistemi complessi in fase condensata, che si sono rivelate un valido sostegno alle indagini sperimentali. Le prospettive future della ricerca in questo campo tendono alla descrizione di sistemi che si avvicinano il più possibile ai materiali reali che si ritrovano nelle opere d'arte, aprendo la possibilità a studi della reattività e dei processi di degradazione a cui sono sottoposti, caratterizzando i diversi intermedi in modo non invasivo [1].

In questo elaborato di tesi l'uso di tecniche computazionali viene messo al servizio della conservazione dei beni culturali nell'ambito specifico dello studio di una classe di coloranti naturali utilizzati in passato per tingere in nero i tessuti a base di lana, seta e lino. Lo studio si è concentrato sui coloranti a base di tannini, impiegati nei processi di tintura insieme

a sostanze ausiliarie quali sali di ferro. Il componente base di questa classe di sostanze è l'*acido 3,4,5-triidrossibenzoico*, chiamato comunemente *acido gallico* (GA) mentre i suoi complessi con i sali di ferro, responsabili della colorazione nera, sono detti complessi *ferro-gallici*. L'interesse è stato rivolto verso questa particolare classe di sostanze perché importanti fenomeni di degrado connessi all'uso di tannini con mordente a base di ferro sono osservabili in tutti i tessuti, a partire dai grandi arazzi del XV-XVIII secolo, fino ad arrivare ai tessuti storici quali vesti e paramenti sacri. Il degrado da tannini provoca vaste lacune nel substrato tessile, mettendo a repentaglio la leggibilità e fruibilità dei manufatti e, nei casi più gravi, anche la loro stessa integrità. Fenomeni di degrado da tannini sono stati osservati ad esempio negli arazzi della prestigiosa serie di venti pezzi, raffigurante le Storie di Giuseppe Ebreo, tessute per incarico di Cosimo I dei Medici nella manifattura granducale alla metà del XVI secolo [2].



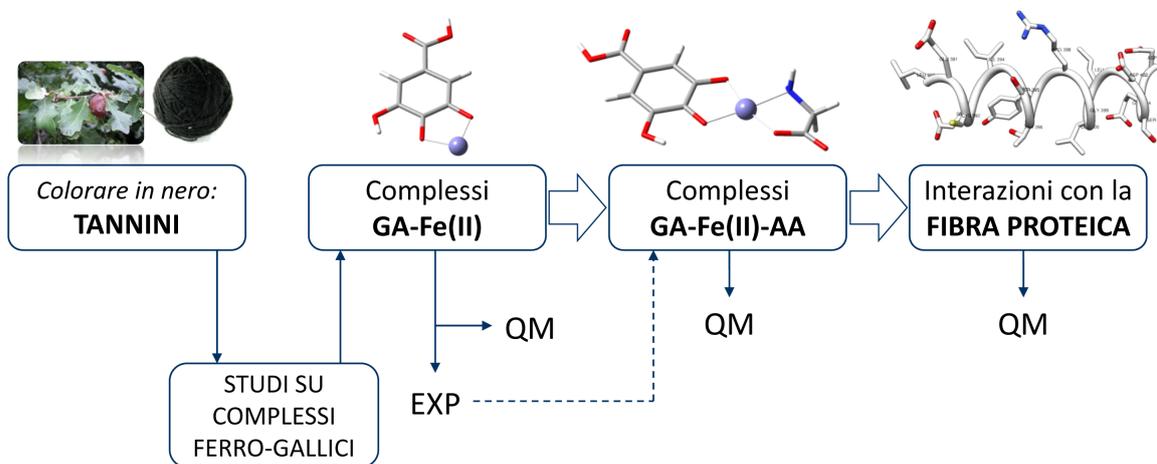
**Figura 1:** “L’assalto finale a Gerusalemme”. Manifattura di Tournai (1480), Museo Nazionale del Bargello, Firenze. Nella fotografia è visibile come le parti colorate in nero siano più degradate rispetto alle zone di tessuto diversamente colorate; in particolare, a sinistra, è ingrandita la porzione di tessuto raffigurante un’aquila nera alla quale, a causa di processi di degradazione, manca completamente la testa.

Fenomeni simili si possono osservare sulla carta ad opera degli inchiostri ferro-gallici. Queste miscele, preparate per scrivere in nero, sono costituite dalle stesse componenti di base con le quali vengono preparati i coloranti per tessuti, disciolte in un legante polisaccaridico. I manoscritti creati utilizzando inchiostri ferro-gallici sono soggetti a intensi processi di degradazione che compromettono le caratteristiche strutturali della cellulosa. Mentre i fenomeni di degrado relativi alla carta sono stati studiati permettendo la messa a punto di tecniche di restauro e conservazione preventiva, l'interesse della ricerca nel campo dei tessuti si è invece

soffermato soprattutto sullo studio di coloranti non tannici (flavonoici, antrachinonici e indigoidi), i quali presentano fenomeni di sbiadimento, ma la cui presenza non sembra alterare significativamente il substrato tessile [3].

L'esigenza di approfondire questa tematica, unita all'interesse nelle applicazioni della chimica computazionale e allo sviluppo di modelli applicabili allo studio di sistemi complessi sono stati gli scopi principali da cui è nato questo lavoro. In particolare l'elaborato di tesi rientra nell'ambito del progetto di ricerca denominato *“La Vita Breve del Tannino”* (VAT) (finanziato dalla Regione Toscana nell'ambito dei fondi PAR-FAS 2008-2013), all'interno del quale collaborano alcuni gruppi di ricerca di Chimica Computazionale e di Chimica dei Beni Culturali del nostro dipartimento, l'Opificio delle Pietre Dure di Firenze, e l'ICCOM-CNR di Pisa. Il progetto affronta la problematica con un approccio multidisciplinare volto all'elaborazione di un modello che spieghi le interazioni a livello molecolare tra colorante e substrato, alla comprensione dei processi di degradazione e alla messa appunto di una metodica per la conservazione dei manufatti.

Il lavoro svolto nell'ambito di questa tesi rappresenta uno studio preliminare centrato sullo sviluppo di un modello teorico in grado di descrivere le interazioni che si instaurano tra colorante e fibre del tessuto, in particolare lana. La comprensione delle interazioni a livello molecolare potrebbe infatti essere d'aiuto, in una fase successiva, alla razionalizzazione dei fenomeni di degradazione. Nella figura 2 è rappresentato uno schema a blocchi dove si riassumono i principali passaggi in cui può essere suddiviso l'elaborato.



**Figura 2:** Rappresetaione schematica della struttura della tesi. La complessità del sistema indagato cresce dal complesso ferro-gallico all'interazione dello stesso con la matrice proteica costituente le fibre di lana.

Nei primi due capitoli descriviamo le caratteristiche dei coloranti naturali a base dei tannini e i processi di tintura in cui vengono utilizzati, introducendo la problematica connessa alla degradazione del tessuto e passando in rassegna i lavori sperimentali presenti in letteratura che trattano dei complessi ferro-gallici. Le osservazioni dedotte dai lavori in letteratura ci guidano nella scelta di un semplice modello per il colorante, individuato nel complesso

GAFe(II), che è investigato nel Capitolo 3 dal punto di vista quantomeccanico e sperimentale, attraverso spettrofotometria UV-Vis. Negli ultimi due capitoli si descrivono le interazioni del complesso con il substrato proteico che costituisce le fibre della lana; in particolare nel Capitolo 4 vengono analizzate le interazioni del complesso GAFe(II) con alcuni amminoacidi liberi in modo da costruire un *background* di informazioni necessario per affrontare, nel Capitolo 5, il successivo studio del sistema proteico.

L'approccio sviluppato potrà così essere utilizzato in futuro come base per l'approfondimento delle tematiche sopra esposte, attraverso un incremento della complessità del modello sia dal punto di vista della qualità della descrizione teorica del sistema che dal punto di vista della complessità del sistema stesso. Il metodo sviluppato potrà inoltre essere utilizzato per indagare substrati simili.

---

## I coloranti naturali a base di tannini

---

I coloranti e i pigmenti di origine naturale sono stati impiegati dall'antichità fino alla metà del XIX secolo, quando l'invenzione dei primi coloranti sintetici ha portato ad un loro graduale rimpiazzo. Oggi l'impiego di coloranti naturali in processi di tintura sopravvive solo in alcuni mercati di nicchia. La tintura naturale dei tessuti risale ad epoche antichissime, quando l'uomo primitivo cominciò a decorare con i colori i propri abiti e le coperte necessari a ripararsi dalle intemperie. Studi archeologici rivelano che gli uomini vennero a conoscenza dell'uso del colore nella pittura già nel 25.000 a.C., come testimoniato dai celebri disegni rinvenuti nelle grotte di Altamira (Spagna) e Lascaux (Francia). Ad oggi non conosciamo con precisione quando le tecniche pittoriche furono applicate alla tintura dei tessuti, ma reperti archeologici dell'epoca neolitica, come quelli rinvenuti nei villaggi di Ledro, in Trentino, fanno presupporre con una certa approssimazione che gli uomini iniziarono a tingere il tessuto intorno al 3.000 a.C., in concomitanza con il passaggio dal nomadismo alla vita stanziale [4].

I coloranti naturali sono generalmente costituiti da molecole organiche dotate di cromofori in grado di assorbire le lunghezze d'onda della luce nella zona del visibile oppure di manifestare questa proprietà quando si legano al tessuto e/o ad altre sostanze, come ad esempio particolari ioni metallici. Sin dall'antichità è nota infatti la pratica della "mordenzatura" del tessuto, ovvero l'aggiunta di sali metallici al processo di tintura, impiegati per esaltare le caratteristiche cromatiche del colorante e aumentarne la resistenza al lavaggio. I coloranti naturali sono contenuti nelle piante e in alcune specie del mondo animale (insetti, molluschi etc.) in quantità variabile a seconda della specie di appartenenza e da queste vengono estratte per la preparazione dei bagni di tintura dove si immergono i tessuti da colorare. Nella tabella 1.1 riportiamo a titolo di esempio alcuni dei coloranti naturali di maggiore rilevanza storica e archeologica.

In questo lavoro ci occuperemo di una particolare classe di coloranti, i tannini con mordente a base di ferro, utilizzati sin da tempi antichissimi per tingere in nero i tessuti. Per

<i>Colore dominante</i>	<i>Gruppo chimico</i>	<i>Pianta da cui viene estratto</i>	<i>Note</i>
Rosso, viola	Antocianine	Uva, ontano nero, ribes, more	Sensibile al pH e al calore, applicabile con mordente al tannino
Rosa, rosso	Antrachinoni	Robbia	Colorante nelle radici, difficile da isolare
Giallo, marrone	Flavonoidi	Verga d'oro del Canada, reseda, camomilla	Sensibile alla luce
Blu	Indaco	Indaco indiano, Isatis, poligono tintore, bacche di ligustro	Diversi gruppi di coloranti e diversi metodi di tintura
Giallo, arancio, rosso	Carotenoidi	Carote, zucca, zafferano, semi di Annatto	Instabile alla luce e al calore, insolubile in acqua e solubile in oli
Verde	Clorofille	Spianci, erba, prezzemolo, broccoli, ortica	Solubile in acqua e sensibile alla luce e al calore

**Tabella 1.1:** Principali coloranti naturali impiegati nei processi di tintura dei tessuti [4].

questa classe di coloranti, il costituente principale è l'*acido 3,4,5-triidrossibenzoico*, chiamato comunemente acido gallico<sup>1</sup> (abbreviato nel corso del lavoro con la sigla GA), la cui struttura è riportata in figura 3.3. L'acido gallico, in seguito all'interazione con il mordente, manifesta un forte assorbimento che copre gran parte dello spettro di assorbimento nella zona del visibile, ed è in grado, interagendo con le fibre del tessuto, di conferirgli la colorazione nera. Nel seguito del capitolo descriveremo le caratteristiche generali dei tannini, con un breve accenno ai metodi di tintura; discuteremo infine dei processi di degradazione ai quali il tessuto è sottoposto quando questi coloranti sono presenti.

## 1.1 I tannini in natura

I tannini sono composti organici facenti parte della classe dei *polifenoli*, uno dei più diffusi e complessi gruppi di sostanze chimiche che si ritrovano in modeste concentrazioni nelle piante. Le strutture dei polifenoli sono costituite da uno o più anelli aromatici condensati ai quali sono legati sostituenti ossidrilici e altri gruppi funzionali come ad esempio gruppi carbonilici o carbossilici.

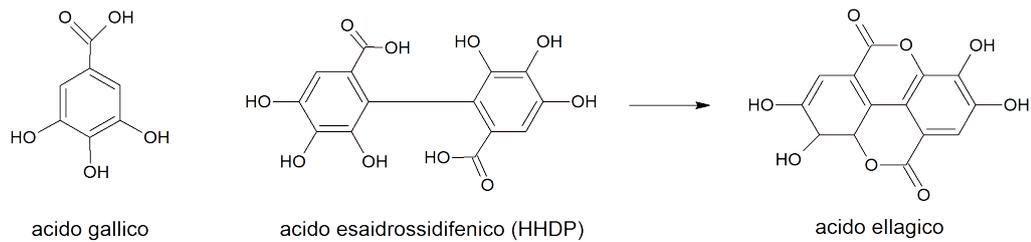
I polifenoli di cui sono costituiti i tannini naturali sono polimeri, macromolecole con un elevato peso molecolare, dotate di elevata reattività chimica legata alla facilità di coniugarsi con altre biomolecole attraverso i numerosi gruppi ossidrilici. Nelle piante si trovano principalmente due tipi di tannini: (1) i tannini idrolizzabili, e (2) i tannini condensati; entrambi sono contenuti principalmente nei vacuoli, nei tessuti epidermici e nella parete cellulare. Elevate quantità di tannini si trovano comunemente nel legno, nella corteccia, nel fogliame, nelle gemme, nei semi e radici e costituiscono un'elevata percentuale del peso secco della pianta.

---

<sup>1</sup>È bene precisare che, a discapito del nome, il composto non contiene l'elemento Gallio.

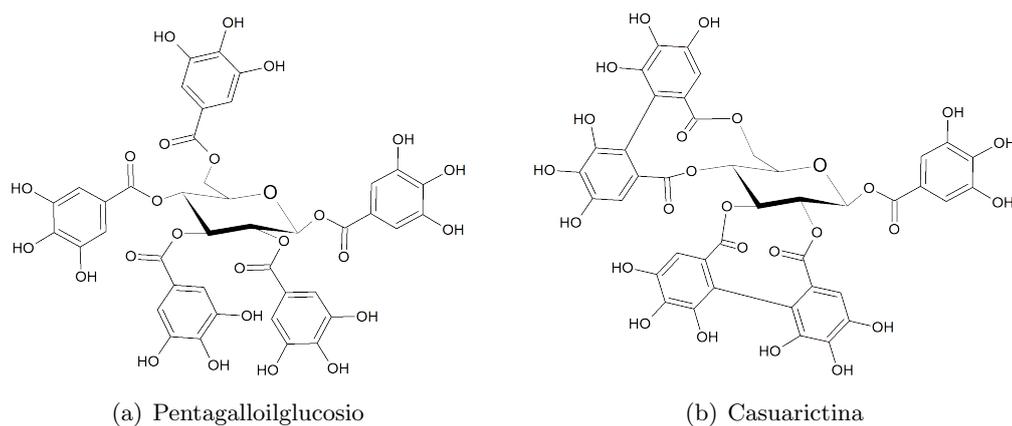
A seconda della specie, una pianta può contenere quantità variabili di tannini idrolizzabili o condensati oppure miscele complesse di entrambe i tipi.

I tannini idrolizzabili hanno un peso molecolare di circa 500 - 2000  $d$  e si possono a loro volta raggruppare in **gallotannini** e **ellagitannini**. I prodotti di depolimerizzazione dei tannini idrolizzabili, derivanti da processo di idrolisi, sono principalmente l'acido gallico, l'acido esaidrossidifenico (HHDP), e loro prodotti derivati che si formano come intermedi nei processi di degradazione delle macromolecole.



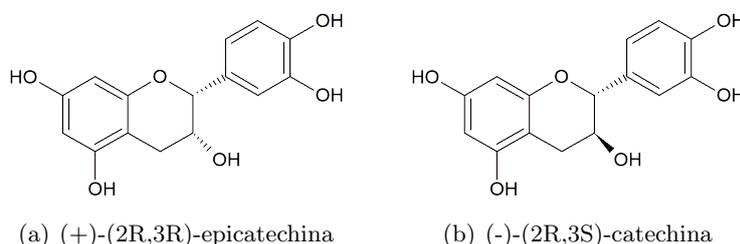
**Figura 1.1:** Formule di struttura dei componenti di base dei tannini idrolizzabili.

Nei gallotannini il componente più abbondante è l'acido gallico che si ritrova esterificato con i gruppi ossidrilici di un poliolo centrale, nella maggior parte dei casi costituito da glucosio. Il più semplice gallotanino è il  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagalloyl-*O*-*D*-glucopiranosio, chiamato comunemente pentagalloylglucosio (PGG), considerato il precursore di gallo- ed ellagitanni più complessi, la cui struttura è riportata in figura 1.2. Gli ellagitannini sono invece esteri dell'acido esaidrossidifenico, formato dal coupling ossidativo tra residui galloilici adiacenti, legati al poliolo centrale, che formano i gallotannini. In soluzione acquosa HHDP spontaneamente lattonizza a dare acido ellagico. Elevati contenuti di gallotannini si estraggono dall'ontano, della quercia e in Europa dal castagno.



**Figura 1.2:** Formula di struttura di un semplice gallotannino (a) ed ellagitannino (b).

I tannini condensati sono invece oligomeri o polimeri che in soluzione acquosa non si decompongono e, data la loro scarsa solubilità, formano precipitati di colore rosso noti come flobafeni. I tannini condensati si ottengono principalmente da vari tipi di acacia e i monomeri sono costituiti da unità di *polidrossiflavan-3-olo*, tra i quali il più diffuso sono *(-)-epicatechina* o *(+)-catechina*, legati tra loro attraverso legami semplici C-C. I tannini condensati, diversamente da quelli idrolizzabili, agiscono da pigmenti piuttosto che da coloranti nel senso che, data la loro insolubilità, formano dei precipitati che vanno ad aderire sulla fibre del tessuto mediante interazioni intermolecolari tra la macromolecola e il substrato. Le interazioni intermolecolari infatti, di per sé deboli se confrontate con veri e propri legami chimici, diventano significative per macromolecole che, grazie alla loro struttura estesa, hanno la possibilità di dar luogo a molteplici interazioni [4].



**Figura 1.3:** Formula di struttura dei monomeri costituenti i tannini condensati.

I tannini idrolizzabili sono i più impiegati nei processi di colorazione dei tessuti, grazie alla loro solubilità, alle loro caratteristiche cromatiche e alla capacità di interagire fortemente con il substrato grazie all'impiego di sali metallici. A seconda del tipo di pianta da cui si ricava l'estratto, la miscela di tannini ha una composizione specifica dalla quale si prepara un colorante con particolari caratteristiche cromatiche. Il metodo di estrazione più diffuso impiega acqua calda nella quale vengono immersi i prodotti raccolti dalla pianta, opportunamente macinati. La soluzione acquosa, a temperatura di circa 50-60°C favorisce l'estrazione e innesca i processi di idrolisi dei tannini idrolizzabili portando alla formazione dei componenti di base tra cui il più diffuso e abbondante è l'acido gallico. Nell'estratto possono essere presenti anche altri polifenoli, tra cui l'acido ellagico, flavonoidi etc. I coloranti più noti impiegati per tingere in nero sono: la galla, l'ontano nero, il sommacco, il catecù e il nero di noce. Tra questi il più diffuso è la galla, un colorante costituito da una miscela composta principalmente da tannini idrolizzabili che si ricava dalla noce di galla.

La noce di galla è un un'escrescenza ben localizzata e determinata che si sviluppa in un organo vegetale come reazione patologica allo stimolo esercitato da un elemento parassita. In particolare la noce di galla è prodotta dalla puntura di vari imenotteri appartenenti alla famiglia *Cynipidae* sul tronco, sulle foglie o sulle radici di alcune specie di piante, in modo particolare quelle della famiglia *Quercus Infectoria*, molto diffusa in Asia Minore, Persia e Oriente. La femmina dell'insetto perfora le gemme e vi depono le sue uova. La puntura provoca la formazione delle galle nelle quali le uova si schiudono dando alla luce le larve che poi diverranno insetti adulti. La parete delle galle è molto resistente e contiene un'elevata quantità di tannini, in percentuale variabile dal 30 al 70% a seconda della specie [2].



Figura 1.4: Noce di galla

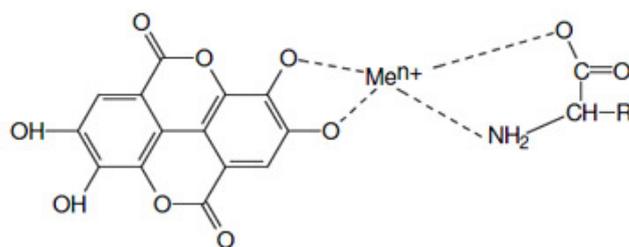
## 1.2 L'impiego dei coloranti naturali nei processi di tintura dei tessuti

I principali coloranti naturali, rinvenuti su tessuti di importanza artistica e storico-culturale, possono essere raggruppati, sulla base del loro metodo di applicazione, in tre gruppi: (1) coloranti diretti o sostantivi; (2) coloranti a mordente; (3) coloranti al tino [5].

I coloranti diretti, grazie alla loro particolare struttura molecolare, hanno la capacità di legarsi stabilmente alle fibre e possono essere impiegati nei processi di tintura, direttamente, senza l'ausilio di sostanze fissanti. Fanno parte di questo gruppo i coloranti che si estraggono dallo zafferano e dalla curcuma (i cui principi coloranti venivano usati per tingere di giallo) e da alcune cortecce. Un colorante diretto si lega alle fibre di lana generalmente attraverso interazioni elettrostatiche tipo dipolo-dipolo o Van der Waals.

I coloranti detti "a mordente", invece, non hanno la capacità di penetrare all'interno della fibra e di fissarsi in maniera stabile ad essa. Per favorire la colorazione del tessuto si ricorre quindi all'impiego di sostanze, denominate appunto "mordenti" (il termine deriva dal latino *mordere*), generalmente sali metallici che vengono adsorbiti dalle fibre di lana restando permanentemente e profondamente legati alle stesse mediante la formazione di legami chimici di complessazione. Il colorante a sua volta, durante la fase di tintura, penetra nella fibra legandosi chimicamente al sale metallico che si trova ancorato alle macromolecole costituenti le fibre del tessuto. Per ottenere tinture molto scure (nero, oliva, argento) i sali più diffusi in passato erano sali ferrosi. In questo caso il ruolo del mordente, oltre a quello di fissare il colorante, è decisivo per la formazione del colore in quanto il cromoforo è rappresentato proprio dal complesso colorante-mordente. In figura 1.5 è riportato un possibile schema di interazioni tra un colorante, l'acido ellagico, un generico catione metallico e un frammento di catena proteica.

L'ultima categoria di coloranti è costituita dai coloranti al tino. Questo nome deriva dai tini di legno che venivano usati anticamente per effettuare la tintura con questo tipo di colorante. Appartengono a questo gruppo importanti coloranti naturali di origine vegetale e animale quali l'indaco e la porpora. I coloranti al tino sono insolubili in acqua e solo in seguito ad un processo di riduzione in ambiente alcalino (ad esempio utilizzando idrosolfito



**Figura 1.5:** Schema della formazione di un complesso tra colorante, mordente e fibra proteica (schematizzata nella figura con un singolo residuo amminoacidico) [6].

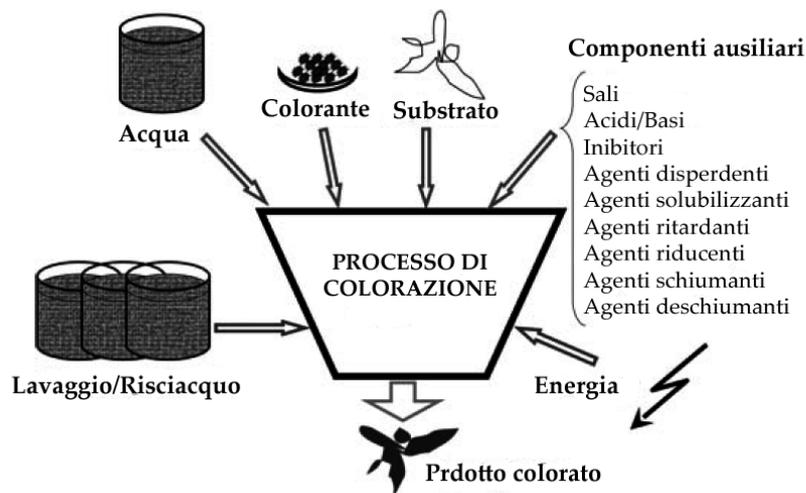
di sodio o altri energici riducenti) isomerizzano nella forma leuco. In seguito a esposizione all'ossigeno atmosferico, il colorante si ossida precipitando così sulla fibra.

Sulla base di questa classificazione, i tannini rientrano nella classe dei coloranti detti “a mordente” in quanto sono coloranti che richiedono la mordenzatura a base di sali di ferro per la formazione di complessi colorati in nero e blu scuro. In tutto il mondo le piante locali con alto contenuto di tannini sono state impiegate nei processi di colorazione per produrre grigi e vari toni scuri dal marrone al nero e il più antico oggetto in cui è stato identificato un gallotannino proviene dal sito archeologico di Ak-Alakha (nel sud della Siberia) e risale al IV secolo. Manoscritti del XIV secolo parlano diffusamente dell'uso delle galle e della corteccia dell'ontano per produrre coloranti neri di buona qualità. Vale la pena evidenziare che era già noto in passato come il ferro contenuto nel mordente rendesse più fragili le fibre di lana, per questo in diversi processi di tintura è sottolineato il fatto che l'utilizzo di sali ferrosi come mordenti dovesse essere accompagnato da un successivo accurato risciacquo delle matasse o dei tessuti dopo il processo di tintura.

## Bagni di tintura

Un generico processo di colorazione parte dal substrato grezzo non colorato per ottenere alla fine un prodotto con la colorazione voluta. I principali componenti del processo di tintura sono: il colorante, l'acqua e l'energia; i processi di tintura infatti avvengono in soluzione acquosa a caldo, alla temperatura di circa 50-60°C. Oltre ai tre componenti essenziali, possono essere impiegate anche altre sostanze chimiche definite come agenti ausiliari come ad esempio: mordenti, detergenti, agenti disperdenti etc., a seconda delle proprietà del colorante e dell'interazione tra substrato e colorante. Nella figura 1.6 è schematizzato un generico processo di tintura.

L'impiego del mordente è usato per promuovere la fissazione del colore, incrementare le proprietà di solidità e conferire particolari caratteristiche all'apparenza stesa del colore che, a seconda dei casi, può essere un effetto desiderato oppure un fenomeno collaterale da evitare. L'impiego di mordenti al ferro in genere porta a sostanziali differenze nella colorazione e il risultato ottenuto inizialmente tende a virare, con il tempo, verso un colore più scuro. In altri casi, come ad esempio nell'impiego di sali di alluminio, l'effetto è solo un incremento

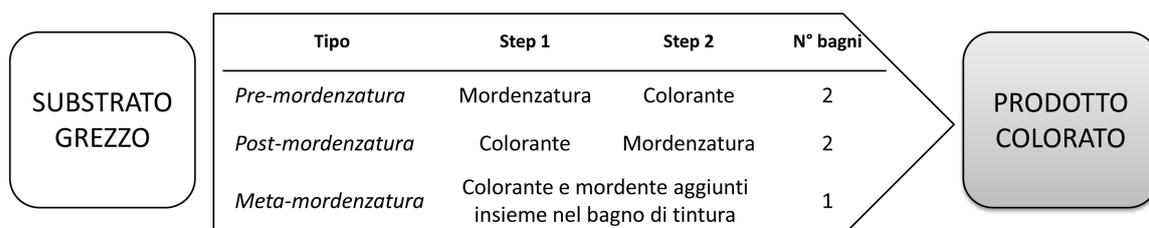


**Figura 1.6:** Requisiti necessari per un generico bagno di tintura

della brillantezza. Nel caso dei tannini, ai fini dell'ottenimento di una colorazione nera, i sali comunemente impiegati come mordenti sono principalmente sali ferrosi:

- solfato ferroso idrato  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , comunemente denominato “Vetriolo Verde”;
- acetato ferroso  $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ;
- cloruro ferroso  $\text{FeCl}_2$ ;
- nitrato ferroso  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ ;
- ossido ferroso  $\text{FeO}$ ;
- ruggine (inteso come una miscela di ossidi di ferro).

In generale si possono distinguere diverse tecniche di mordenzatura che differiscono per il momento in cui viene aggiunto il mordente al bagno di tintura. Vi sono infatti tre possibilità: (1) *pre-mordenzatura*, in cui il tessuto grezzo viene prima immerso in un bagno contenente il mordente, dopodichè estratto da questo e immerso in un secondo bagno contenente il colorante; (2) *post-mordenzatura*, in cui le due fasi sono invertite; (3) *meta-mordenzatura*, in cui colorante e mordente sono aggiunti insieme al bagno di tintura e il substrato grezzo viene immerso in un unico contenitore. La figura 1.7 riassume schematicamente le tre possibilità di colorazione [4].



**Figura 1.7:** Tecniche di mordenzatura: tre diversi tipi di tecniche sono mostrate nello schema che differiscono per il momento in cui viene aggiunto il colorante e per il numero di bagni richiesti.

In passato i bagni di tintura venivano preparati in grandi contenitori riempiti di acqua calda, dotati di particolari apparecchiature per l'immersione dei tessuti e il processo di colorazione durava circa un paio d'ore. Nella figura 1.8 è rappresentata la miniatura di un processo di tintura su lana grezza, così come veniva condotta nei famosi laboratori di arazzi francesi intorno al XVIII secolo.

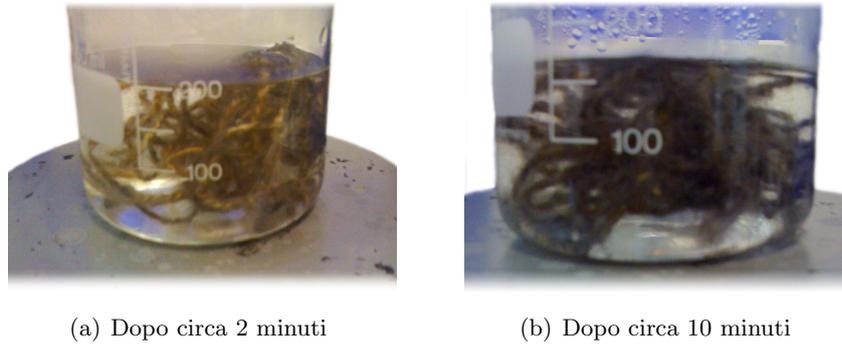


**Figura 1.8:** Una fase del processo di tintura a mano di una pezza di lana condotta intorno al diciottesimo secolo nei famosi laboratori di arazzi Gobelin vicino a Parigi.

### **Il bagno di tintura riprodotto in laboratorio**

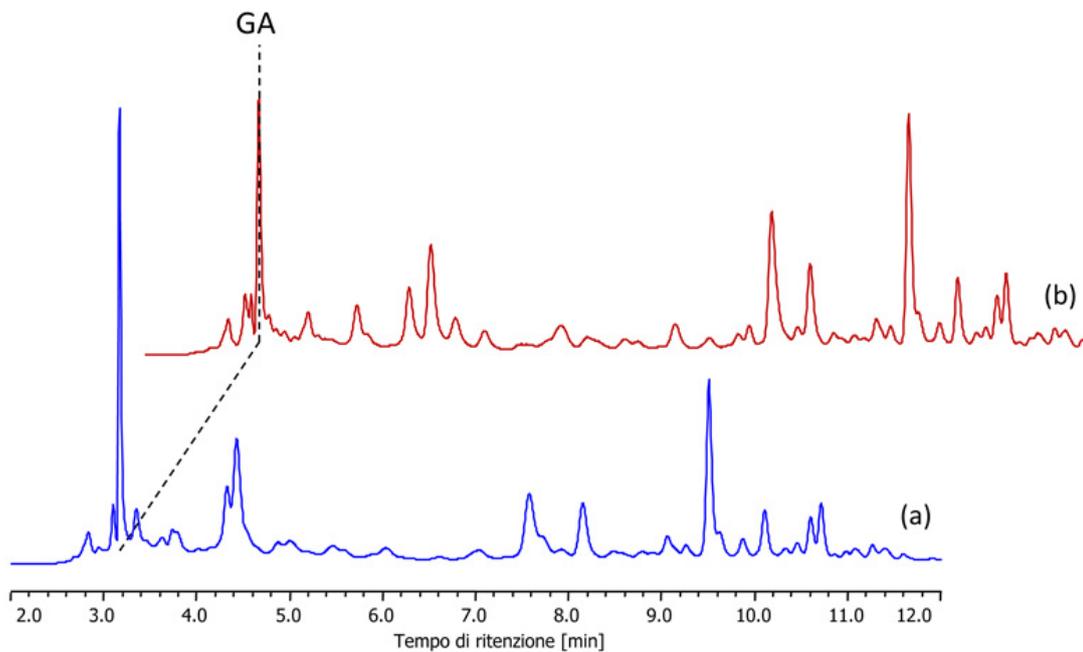
Prima di approfondire la descrizione chimico-fisica delle proprietà e della reattività dei complessi ferro-gallici abbiamo riprodotto in laboratorio un processo di tintura usando come colorante la noce di galla. Non avendo trovato in letteratura una ricetta storica che riportasse esattamente le proporzioni tra noce di galla, acqua e mordente, è stata elaborata una procedura nata da un ragionevole compromesso dei dati sperimentali disponibili per altri coloranti analoghi e procedure di tintura simili. La procedura adottata, basata sulla tecnica della pre-mordenzatura, è costituita da quattro passaggi: (1) lavaggio preliminare della lana; (2) mordenzatura con  $\text{FeSO}_4$ ; (3) estrazione del colorante dalle noci di galla e preparazione del bagno di tintura; (4) immersione della lana mordenzata nel bagno di tintura. Parallelamente alla preparazione del bagno con il colorante ottenuto dall'estrazione delle noci di galla è stato preparato un bagno a base di solo GA, ripetendo le fasi sopra descritte ad eccezione dell'estrazione. Le procedure sono riportate in dettaglio in Appendice B a pagina 113.

Il bagno di tintura ottenuto dall'estratto di noce di galla ha un pH pari a 4.0, paragonabile a quello stimabile per un bagno costituito solo da acido gallico. Inizialmente il bagno presenta una colorazione arancio-bruna molto chiara e dopo pochi minuti che viene immersa la lana mordenzata questa assume gradualmente una colorazione scura e anche il colore del bagno vira ad un marrone scuro. Le osservazioni testimoniano che l'interazione con il substrato mordenzato provoca netti cambiamenti nella composizione del bagno e porta alla



**Figura 1.9:** Fotografia del bagno di tintura riprodotto in laboratorio impiegando come colorante GA.

formazione dei complessi colorati in nero che aderendo alle fibre della lana ne impartiscono la colorazione voluta. La determinazione dei componenti del bagno di tintura è un'operazione molto complessa che può essere effettuata mediante separazione cromatografica in HPLC e rivelazione con sistema DAD o MS. La messa a punto di un metodo analitico appropriato richiede molto tempo ed esula dagli scopi del nostro lavoro. Ad ogni modo è significativo un confronto qualitativo tra i cromatogrammi del bagno di tintura fresco (appena estratto) ed esausto (dopo l'immersione della lana e la sua colorazione) ottenuti con HPLC-DAD che mostra un'evidente variazione nella composizione della miscela.



**Figura 1.10:** Cromatogramma HPLC del bagno di tintura (iniezione di  $20\mu\text{L}$ , flusso  $1\text{ml}/\text{min}$ , colonna C18, eluizione in fase inversa da  $85\% \text{H}_2\text{O}$  ( $0.1\% \text{TFA}$ ) e  $15\% \text{CH}_3\text{CN}$  a  $100\% \text{CH}_3\text{CN}$  in gradiente). Il cromatogramma (a) si riferisce al bagno di tintura fresco, (b) al bagno di tintura esausto.

La lana grezza, sottoposta al procedimento di tintura con il bagno preparato con il solo acido gallico, in ambiente tamponato a pH 4, per riprodurre lo stesso pH del bagno naturale, porta all'ottenimento di una colorazione del filato analoga a quella ottenuta con gli estratti naturali, con differenze cromatiche indistinguibili ad occhio nudo. È interessante verificare che usando come colorante l'acido gallico, in assenza di mordente, la lana grezza non subisce nessuna colorazione, a conferma del fatto che la colorazione sulla fibra è da imputare alla presenza del ferro, indispensabile per l'ottenimento dell'effetto cromatico voluto.

### 1.3 Cenni sui processi di degradazione dei tessuti

I manufatti tessili, realizzati mediante l'impiego di fibre naturali (lana, seta, cotone, lino, ecc.) e di coloranti estratti da vegetali o da organismi animali, a causa delle caratteristiche intrinseche dei componenti, subiscono inevitabili e inarrestabili processi di deterioramento i cui meccanismi sono strettamente collegabili alle tecnologie di fabbricazione, alle modalità di impiego e alle condizioni di conservazione. In generale, i fenomeni di alterazione delle proprietà chimico-fisiche di un tessile hanno inizio già con le prime fasi di lavorazione. Infatti, durante la filatura, la tintura, la tessitura e le operazioni di finissaggio, le fibre sono sottoposte a sollecitazioni termo-meccaniche e chimiche (rese più efficaci dalla presenza di acqua o umidità) che spesso comportano profonde modifiche nella struttura delle macromolecole di base con conseguente decadimento delle proprietà fisiche e minore capacità di resistenza agli agenti chimici, ambientali e biologici. L'invecchiamento dei tessuti è la risultante della sovrapposizione dei fenomeni di degrado di ciascuno dei componenti essenziali del manufatto, e cioè delle fibre, dei coloranti, dei mordenti e di altre sostanze utilizzate nelle operazioni di finitura. La delucidazione e la comprensione di questi processi di degradazione si scontra con la loro intrinseca complessità fenomenologica dovuta: (1) alla composizione chimica e all'architettura strutturale e morfologica delle fibre; (2) alla molteplicità dei fenomeni di deterioramento, causati da fattori di varia origine (chimica, fisica, meccanica, termica e biologica); (3) all'azione concomitante e/o successiva di agenti degradativi di natura diversa; (4) alla difficoltà di quantificare e mettere in relazione il danno con i fattori che lo hanno procurato e quindi di mettere a punto idonee misure di prevenzione [7].

I fenomeni di degradazione che investono tutti i tessuti sono essenzialmente riconducibili a processi di:

- invecchiamento fisico e meccanico, dovuto alle condizioni di temperatura e di umidità a cui è sottoposto il tessuto nell'arco degli anni. Variazioni di questi parametri sono connesse a fenomeni di riarrangiamento della struttura tridimensionale della fibra proteica che ne provocano una diminuzione delle proprietà meccaniche;
- foto-ossidazione e termo-ossidazione, provocate rispettivamente dall'azione combinata di luce e ossigeno e di calore e ossigeno. La degradazione foto-ossidativa, in particolare, è legata alla formazione di specie radicaliche dovuta a reazioni fotochimiche in cui è coinvolto l'ossigeno molecolare che reagiscono con i residui amminoacidici della fibra

portando alla formazione responsabili dell'ingiallimento dei tessuti. Reazioni fotochimiche possono però riguardare direttamente le specie assorbenti presenti nella fibra, come ad esempio i residui di cistina, tirosina, fenilalanina, triptofano e istidina [8];

- invecchiamento chimico, dovuto all'azione aggressiva di agenti specifici presenti come inquinanti nell'ambiente in cui i tessuti hanno svolto la loro funzione, sono stati conservati o esposti. Fenomeni di deterioramento chimico, causati da sostanze riducenti, ossidanti, basiche, acide e dall'azione di mordenti possono avere inizio anche durante le fasi di lavorazione dei manufatti tessili.

Particolare interesse suscitano i fenomeni di degrado connessi all'impiego di coloranti naturali e mordenti utilizzati nei processi di tintura dei tessili. A seconda della combinazione colorante/mordente impiegata, infatti, si possono osservare fenomeni diversi che riguardano sia campioni antichi che campioni di riferimento preparati in laboratorio e invecchiati artificialmente. In particolare l'aspetto che si vuole approfondire in questo lavoro è la connessione tra i fenomeni di degrado e l'impiego di tannini con mordente a basi di ferro. In questi casi, infatti, oltre alla perdita delle proprietà meccaniche, fenomeni di ingiallimento etc. siamo di fronte ad un uno stato di degrado più marcato rispetto a tessili trattati con altri coloranti, e che in alcuni casi porta vaste lacune nel substrato tessile mettendo a repentaglio l'integrità dei manufatti. Tali fenomeni possono essere imputati proprio alla presenza dei complessi ferro-gallici nella matrice proteica.

L'entità del danno causato dalla presenza dei complessi  $GAFe(II)$  nella matrice proteica dei tessuti è evidente anche da una semplice analisi morfologica della superficie dei tessili. Si mostrano di seguito, a titolo esemplificativo, alcuni risultati preliminari ottenuti con la tecnica (*Field Emission Scanning Electron Microscopy* (FESEM))<sup>2</sup> dalla dott.ssa A. Restivo nel corso delle sue ricerche nell'ambito del dottorato in Scienze Chimiche. La FESEM è una tecnica di microscopia elettronica non distruttiva in grado di fornire immagini ad alta risoluzione (fino ad 1 nm) della superficie dei campioni. Solitamente è accoppiata con uno spettrofotometro dispersivo a raggi X (EDX) in grado di fornire dati relativi alla composizione elementare della specifica zona di campione in esame.

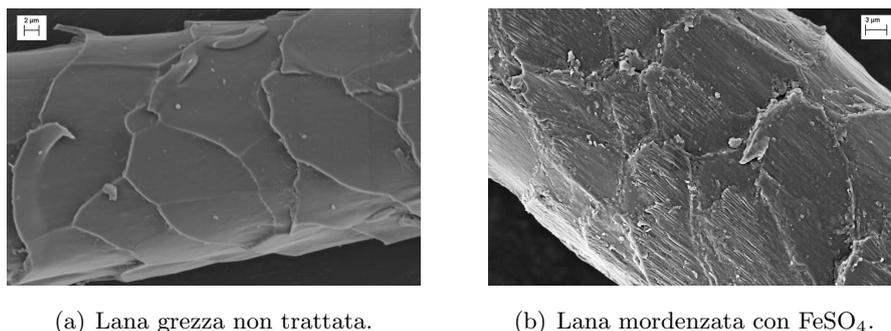
Nella figura 1.11 sono riportate le immagini di campioni di lana freschi<sup>3</sup> diversamente trattati. Risulta evidente l'effetto provocato dalla mordenzatura sul campione di lana grezza fresca in cui la caratteristica forma a scaglie della cuticola che riveste la parte esterna della fibra di lana appare significativamente rovinata.

Le immagini relative a campioni di tessuto antico trattato con coloranti a base ferro-gallica mostrano, a livello morfologico, evidenti fenomeni di degrado che talvolta portano ad una parziale distruzione del rivestimento esterno della fibra. In particolare, nella figura 1.12, sono riportate le immagini relative a due campioni prelevati da arazzi storici. È interessante

---

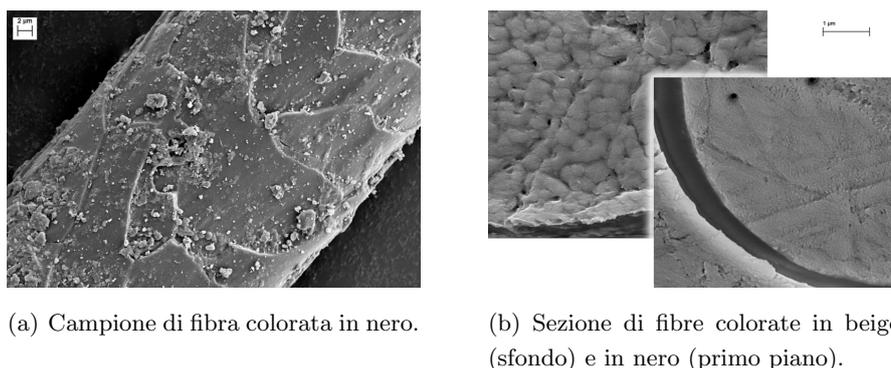
<sup>2</sup>L'analisi FESEM è stata effettuata presso i laboratori dell'*Istituto de Investigación en Ciencias Ambientales (IUCA), Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Spagna* su campioni di riferimento e campioni antichi preparati e raccolti dal gruppo di ricerca di Chimica dei Beni Culturali, grazie ad una collaborazione con la prof. J. Pérez-Arantegui.

<sup>3</sup>Per campioni freschi si intende campioni non sottoposti a processi di invecchiamento.



**Figura 1.11:** Immagini FESEM di campioni di riferimento di fibre di lana fresche.

osservare nella figura 1.12 (b), dove è rappresentata una sezione trasversale della fibra, come la variazione morfologica interessa anche le zone più interne della fibra. Nell'immagine sullo sfondo, che si riferisce ad un campione tinto in beige (utilizzando solo coloranti tannici senza mordente), è infatti riconoscibile la tipica struttura a microfibrille che invece è totalmente scomparsa nell'immagine in primo piano, relativa alla sezione di una fibra trattata con coloranti tannici e mordente a base di ferro.



**Figura 1.12:** Immagini FESEM di campioni antichi prelevati dall'arazzo “*L’assalto finale a Gerusalemme*” (vedi figura 1).

Inoltre, le informazioni sulla composizione elementare ottenute dalla microanalisi puntuale grazie all'accoppiamento FESEM-EDX indicano che nei campioni trattati con coloranti tannici con mordente a base di ferro si riscontra una variazione della composizione elementare dello zolfo rispetto ai valori di campioni non trattati, che potrebbe essere connessa ai fenomeni di degrado, e la presenza di una percentuale di ferro, variabile in media dal 3% all'8%, a testimonianza che questo elemento permane all'interno delle fibre.

Le informazioni riportate in letteratura e le indagini preliminari svolte mostrano un'evidente correlazione tra i marcati fenomeni di degrado dei tessuti e l'impiego di coloranti a base di tannini con mordenti al ferro. La mancanza di studi approfonditi in grado di mettere in relazione i due aspetti suggerisce la necessità di approfondire questa tematica, a partire dallo studio delle proprietà dei complessi ferro-gallici e delle loro interazioni con la matrice proteica.

---

### Studi sperimentali sui complessi ferro-gallici

---

Nel capitolo precedente abbiamo evidenziato che uno dei componenti essenziali e più abbondanti del bagno di tintura, in seguito all'impiego di coloranti estratti da piante con alto contenuto di galletannini, è l'acido gallico. Nel prosieguo del capitolo ci occuperemo quindi in dettaglio della sua reattività con gli ioni ferrosi e ferrici per formare i complessi ferro-gallici. La comprensione delle proprietà e della reattività dei complessi ferro-gallici rappresenta il punto di partenza per descrivere la chimica di un sistema complesso come il bagno di tintura e getta le basi per la costruzione di un sistema modello che cerchi di spiegare le interazioni di questi ultimi con il substrato proteico.

In letteratura si trovano diversi studi sperimentali in cui si tratta la reattività dei complessi ferro-gallici. Questi lavori rientrano principalmente in due ambiti di indagine: lo studio degli inchiostri ferro-gallici e lo studio dei polifenoli suscitato dall'interesse della loro reattività come agenti antiossidanti in ambito biologico. Le proprietà antiossidanti di questi composti sono ampiamente riconosciute dalla comunità scientifica in studi *in vitro* mentre ancora non è stato accertato se tali effetti si verificano anche *in vivo*. L'azione antiossidante si esplica principalmente attraverso: (1) il contributo all'eliminazione di specie radicaliche, (2) il processo di *quenching* dell'O<sub>2</sub> di singoletto che ne promuove la formazione e (3) l'azione di chelazione nei confronti di ioni metallici che attraverso cicli ossidativi sono direttamente coinvolti nella formazione di specie radicaliche e superossidi. L'inibizione o la riduzione della formazione di radicali liberi, interrompendo la loro propagazione in reazioni a catena, è in grado di prevenire i danni provocati da stress ossidativo a scapito delle membrane cellulari, delle proteine e del DNA. In particolare le proprietà chelanti, che ci interessano da vicino, riguardano l'occupazione dei siti di coordinazione liberi del metallo, la formazione di complessi insolubili, la presenza di ostacoli sterici prodotta dai leganti che impedisce l'interazione tra metalli. La maggior parte degli studi sulle proprietà antiossidanti dei polifenoli riguarda l'azione dei flavonoidi e anche se gli acidi fenolici più semplici, come GA, sono largamente

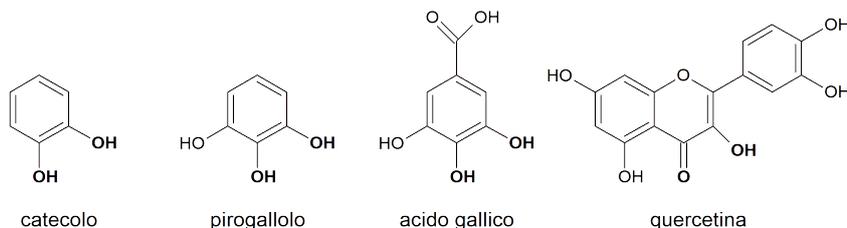
diffusi in natura, esistono pochi studi sulle loro proprietà di chelazione con i metalli [9].

## 2.1 Stato dell'arte nello studio dei complessi ferro-gallici

Il ferro esiste in natura in due stati di ossidazione, Fe(II) e Fe(III), piuttosto vicini in stabilità rispetto a quanto non si trovi per altri metalli di transizione. I principali sali ferrosi di Fe(II) sono composti cristallini di colore verde chiaro, in quanto contengono lo ione  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , presente nelle soluzioni acquose. Uno dai sali ferrosi più diffusi è il solfato ferroso idrato  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , chiamato volgarmente *vetriolo* che, come abbiamo visto, è il sale largamente impiegato per la mordenzatura dei tessuti neri. I composti ferrosi sono facilmente ossidabili ed è piuttosto difficile ottenerli puri. È noto che le soluzioni acquose di Fe(II) non sono stabili all'aria in quanto il  $\text{Fe}^{2+}$  tende ad ossidarsi a  $\text{Fe}^{3+}$  e la velocità di ossidazione dipende dal pH della soluzione: in particolare è favorita in ambiente alcalino e fortemente rallentata in ambiente acido. Il pH ha una grande influenza anche sulla solubilità in quanto la formazione di idrossidi insolubili avviene già a  $\text{pH} > 3$  per il Fe(III) e a  $\text{pH} > 7$  per Fe(II).

I cationi di ferro sono ottimi agenti complessanti che interagiscono con i più comuni leganti: alogenuri, ossidi di azoto, cianuri, acqua, fosfine, leganti polidentati come l'o-fenantrolina, EDTA etc. Gli ioni ferrosi interagiscono con leganti che si coordinano preferenzialmente attraverso gli atomi di ossigeno e assumono anche un ruolo biologico fondamentale all'interno di proteine come l'emoglobina; gli ioni ferrici prediligono invece gli atomi di azoto come donatori. La maggior parte dei complessi con il ferro sono esacoordinati con geometrie di tipo ottaedrico e generalmente la solubilità in acqua è maggiore per i complessi di Fe(II) piuttosto che per quelli con il Fe(III) [10].

I composti organici con gruppi polifenolici sono buoni complessanti per il ferro grazie alla presenza dei gruppi *orto-diidrossilici*. Il composto più semplice in questo caso è dell'*1,2-diidrossifenolo*, comunemente chiamato catecolo, in grado di formare complessi bidentati di tipo  $\eta^2(\text{O},\text{O})$  con il centro metallico. Questo modo di chelazione si ritrova anche nei derivati più complessi del catecolo nei quali si riconosce la struttura di base, come ad esempio il pirogallolo e l'acido gallico, per i quali sono noti complessi con il ferro in entrambi gli stati di ossidazione. Complessi con il ferro sono noti anche con i flavonoidi, in cui oltre ai gruppi ossidrilici c'è la possibilità di interazione con il gruppo carbonilico, come schematizzato in figura 2.1.



**Figura 2.1:** Strutture di semplici polifenoli in cui è riconoscibile la struttura del catecolo. In rosso sono evidenziati i gruppi ossidrilici che interagiscono con il centro metallico nella formazione dei complessi.

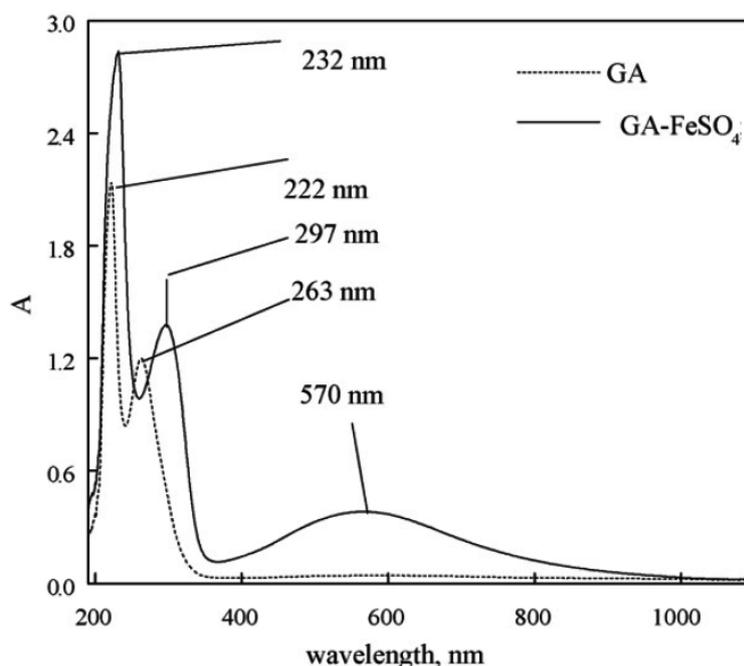
## La spettroscopia UV-Vis: un utile strumento di indagine

Le tecniche sperimentali più comunemente impiegate nello studio dei complessi sono di tipo potenziometrico e spettrofotometrico. Le prime sono applicabili quando la specie che si forma è sensibile alle variazioni di pH e la presenza di siti acidi o basici può essere rivelata attraverso una titolazione; nel secondo caso invece, il requisito fondamentale è che almeno una delle specie coinvolte nella formazione del complesso dia luogo ad assorbimenti rilevabili nel range UV-Vis. Entrambe le tecniche permettono una caratterizzazione della stechiometria e della termodinamica di formazione del complesso, permettendo anche di ricavare le costanti di equilibrio. Studi di tipo cinetico sono invece generalmente condotti attraverso spettrofotometria UV-Vis. Con particolare riferimento ai complessi ferro-gallici, in un recente studio preliminare è stata anche applicata la spettrometria di massa con ionizzazione ESI (*Electrospray Ionization*) volta alla caratterizzazione strutturale dei complessi degli inchiostri ferro-gallici in soluzione acquosa. I risultati ottenuti con questa tecnica, però, data l'elevata energia in gioco nel processo di ionizzazione, non hanno contribuito ad una precisa caratterizzazione del complesso [11].

La spettrofotometria di assorbimento UV-Vis si presta bene allo studio dei complessi tra polifenoli e metalli dal momento che essi presentano intense bande di assorbimento sia nella zona dell'UV che nel visibile. Lo studio delle proprietà di chelazione degli acidi fenolici, ad esempio, è comunemente investigata valutando lo spostamento nella zona dell'UV delle due bande caratteristiche e molto intense, note come banda (I) e (II), che caratterizzano lo spettro del polifenolo e derivano dall'assorbimento degli elettroni  $\pi$  dell'anello aromatico. I polifenoli più semplici come l'acido gallico o ellagico non assorbono nel visibile e le loro soluzioni sono perfettamente incolori. La presenza del centro metallico fa nascere anche un nuovo assorbimento nel visibile, caratterizzato da una banda molto slargata la cui larghezza copre decine di nanometri, responsabile della comparsa della colorazione scura. L'assorbimento è dovuto a transizioni elettroniche che coinvolgono trasferimenti di carica dall'anello aromatico al centro metallico. A titolo di esempio riportiamo nella figura 2.2 uno spettro di assorbimento del complesso  $\text{GAFe(II)}$ . Dalla figura si nota che la comparsa di un assorbimento a 570 nm, legata alla formazione del complesso, è accompagnata dagli shift delle banda (I) di GA da 263 nm a 297 nm e della banda (II) da 232 nm a 222 nm.

### 2.1.1 I complessi ferro-gallici $\text{GAFe(III)}$

La reazione tra  $\text{Fe(III)}$  con l'acido gallico e altri polifenoli è stata studiata in soluzione acquosa per via spettrofotometrica e potenziometrica. Il  $\text{Fe(III)}$  presenta caratteristiche debolmente ossidanti mentre GA, come molti altri polifenoli, è un agente riducente molto efficace. Il potenziale redox della coppia GA/o-chinone è 0.799V, molto vicino a quello della coppia  $\text{Fe(II)/Fe(III)}$ , pari a 0.749V. Questa caratteristica apre la possibilità ad un processo di ossidoriduzione in cui GA riduce il  $\text{Fe(III)}$  portando alla formazione di  $\text{Fe(II)}$  e del derivato chinonico. La reazione è particolarmente favorita a pH molto bassi,  $< 2$ , e il processo può essere schematizzato in due fasi: la formazione di un complesso  $\text{GAFe(III)}$  e la successiva

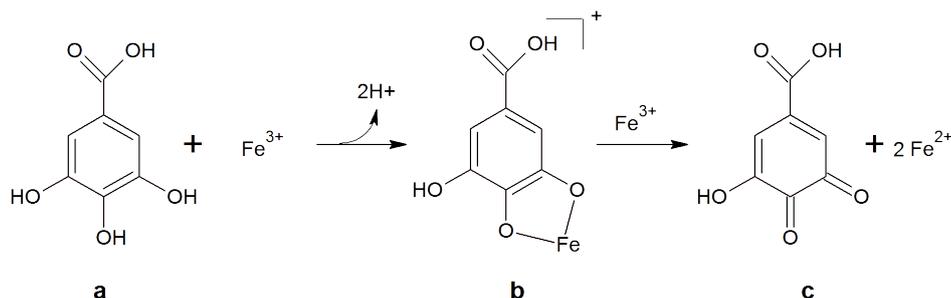


**Figura 2.2:** Tipico spettro UV-Vis di GA libero e complessato con  $\text{FeSO}_4$  in acqua a  $\text{pH}=5$ .  $[\text{Fe(II)}]=0.01 \text{ mol/L}$ ;  $[\text{GA}]=1.0 \cdot 10^{-5}$  [12].

reazione redox. A seconda delle condizioni il ferro ridotto può essere riossidato nuovamente attraverso reazioni tipo Fenton, con la produzione di radicali o superossidi.

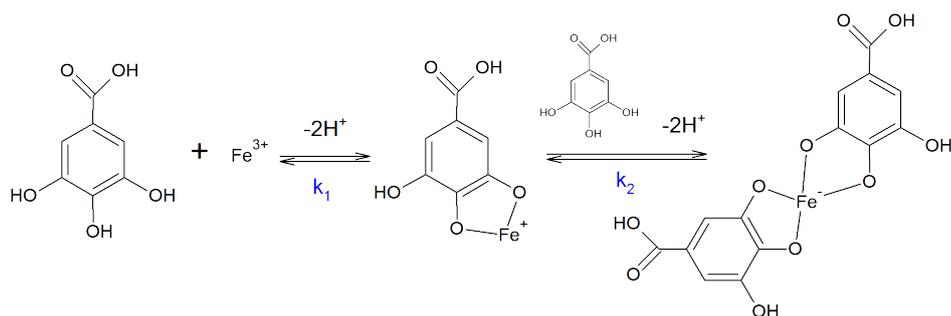
Le soluzioni acquose contenenti ioni ferrici sono sistemi molto complessi in quanto c'è la possibilità che si formino specie oligomere o idrolitiche per il  $\text{Fe(III)}$  anche  $\text{pH}$  molto bassi. Lo studio di cinetiche di reazione in condizioni di pseudo primo ordine con eccesso di metallo diventa quindi molto complesso anche in condizioni di media acidità. *Hynes e co.* [13] conduce i suoi esperimenti spettrofotometrici a  $\text{pH} < 2$  e osserva che l'aggiunta di un eccesso di  $\text{Fe(III)}$  a soluzioni acquose acide di acido gallico porta alla comparsa di una colorazione blu che rapidamente vira al giallo. La colorazione blu è attribuita alla formazione del complesso 1:1 tra GA e  $\text{Fe}^{3+}$  in cui il metallo si coordina con due gruppi ossidrilici adiacenti mentre il terzo gruppo ossidrilico, non coinvolto nell'interazione, rimane protonato a  $\text{pH}$  basso. La colorazione gialla è attribuita invece alla formazione dell'*o-chinone*, con una banda di assorbimento caratteristica intorno a 380 nm e una spalla a 445 nm, dovuta ad un trasferimento elettronico intermolecolare, come schematizzato in figura 2.3.

Questi risultati confermano quanto già osservato da *Powell e co.* [14] che, circa vent'anni prima, ha studiato le interazioni tra  $\text{Fe(II)}$  e  $\text{Fe(III)}$  con acido gallico e suoi omologhi attraverso titolazioni potenziometriche e spettrofotometriche. Egli mostra che, in condizioni di assenza di ossigeno, la reazione di formazione del derivato chinonico, a  $\text{pH}$  molto bassi, non è reversibile mentre la titolazione con basi delle soluzioni di  $\text{GAFe(III)}$  porta alla formazione di complessi  $\text{GAFe(II)}$  che inizia intorno a  $\text{pH} > 7$ . Tracce di ossigeno ossidano il  $\text{Fe}^{2+}$  che si forma nella processo di riduzione a  $\text{pH}$  acidi con formazione dei complessi  $\text{Fe(III)L}_2$  in condizioni di bassa acidità e  $\text{Fe(III)L}_3$  a  $\text{pH} > 7$ .



**Figura 2.3:** Schema di formazione dell'*o*-chinone (c) in seguito alla riduzione del Fe(III). In realtà il meccanismo di reazione è molto più complesso e intervengono specie reattive intermedie come  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  [13].

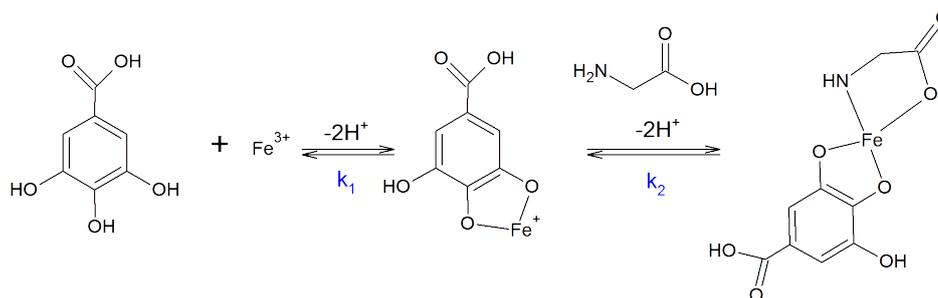
*Fazary et al* [15] ha determinato le costanti di acidità e di formazione per complessi di metalli di transizione con polifenoli e amminoacidi attraverso titolazioni potenziometriche con il metodo di Irving e Rossotti. I risultati ottenuti suggeriscono un meccanismo di formazione del complesso a step, come illustrato in figura 2.4. L'aggiunta di Fe(III) ad una soluzione di GA libero sposta la regione tampone del ligando a valori di pH più bassi, a conferma del fatto che la reazione di complessazione avviene mediante il rilascio del protone da ciascun ligando.



**Figura 2.4:** Meccanismo di reazione a step proposto per la formazione del complesso binario GAFe(III) [15].

Lo studio di *Fazary* è interessante in quanto è l'unico che prende in considerazione un sistema ternario in cui oltre a GA è presente anche un secondo chelante, la Glicina. La possibilità che si formi un complesso ternario con l'amminoacido supporta l'ipotesi che per i leganti "a mordente" l'interazione con la fibra avvenga attraverso la formazione di legami covalenti tra centro metallico e matrice proteica. In quest'ottica infatti l'amminoacido libero rappresenta un'approssimazione di ordine zero nei confronti di una catena polipeptidica. Quando in soluzione sono presenti i due leganti diversi, GA e Glicina, i risultati suggeriscono l'instaurarsi di un equilibrio secondo il quale entrambi i leganti possono combinarsi al centro metallico simultaneamente oppure in fasi successive a seconda del pH. Dai dati ottenuti si deduce che GA interagisce inizialmente con Fe(III) e successivamente con la Glicina e il complesso ternario si forma quindi con un meccanismo a stadi che può essere rappresentato secondo lo schema illustrato in figura 2.5. La stabilità del complesso ternario risulta addirittura maggiore rispetto a quella del complesso binario e questo può essere attribuito al fatto

che ci possono essere delle interazione inter-ligando o qualche coordinazione cooperativa.

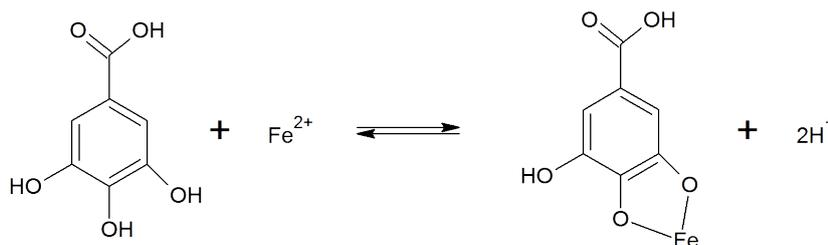


**Figura 2.5:** Meccanismo di reazione a step proposto per la formazione del complesso ternario  $\text{GAFe(III)}$ -Glicina [15].

### 2.1.2 I complessi ferro-gallici $\text{GAFe(II)}$

Le proprietà di chelazione di  $\text{Fe(II)}$  nei confronti di polifenoli costituiti da gruppi catecolici sono stati sistematicamente indagati con metodi spettrofotometrici. Nel 2003 *Kolayli et al* [16] ha studiato la capacità di chelazione della caffeina con diversi metalli per via spettrofotometrica e, sebbene la struttura di questa molecola sia diversa da quella dei polifenoli (nella chelazione sembrano coinvolti O e N di gruppi carbonilici e amminici), il lavoro è rilevante per i nostri scopi in quanto viene messo a punto un metodo che permette di valutare in modo semplice le costanti di *binding* per i complessi di tipo metallo-legante da misure di assorbimento. Il metodo viene sfruttato da *Andjelković et al* [9] che nei suoi studi spettrofotometrici prende in esame diverse strutture di semplici polifenoli, tra cui l'acido gallico. Lo studio è stato condotto in condizioni di assenza di ossigeno, in ambiente tamponato a pH fisiologico (pH 7.4) per valutare se, introdotti negli organismi attraverso la dieta, i polifenoli sono in grado di legare il  $\text{Fe}^{2+}$ . I risultati dello studio evidenziano che i polifenoli analizzati sono in grado di formare complessi stabili con  $\text{Fe(II)}$ . In particolare quelli dove è presente la porzione galloilica, fanno registrare costanti di equilibrio per la formazione del complesso  $\text{M} + \text{L} \rightarrow \text{ML}$  con GA più elevate.

Uno studio cinetico, che prende in esame la formazione del complesso  $\text{GAFe(II)}$  è stato condotto da *Li-li Lu et al* [12] nel 2009, nel range di pH 3.5 - 5.5. I risultati indicano che il complesso ha una stechiometria 1:1 e la reazione di formazione è del secondo ordine, in cui lo stadio determinante (stadio lento) è quello rappresentato in figura 2.6.



**Figura 2.6:** Reazione di formazione del complesso  $\text{GAFe(II)}$  [12].

Gli esperimenti condotti in condizioni di pseudo primo-ordine con largo eccesso di metallo o di legante, in condizioni di assenza di ossigeno, indicano che la velocità di reazione è determinata dall'equazione cinetica:

$$V = k[M][L] \quad (2.1)$$

e conducono all'espressione cinetica integrata:

$$[ML] = k' \cdot (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad k_{obs} = k_2[M]_0 \quad o \quad k_{obs} = k_2[L]_0 \quad (2.2)$$

Altri parametri che influenzano la velocità di reazione sono: (1) il pH che influenza la  $k$  secondo un andamento del tipo  $k = \frac{a}{[H^+]}$ , indicando che il complesso si forma più rapidamente a pH maggiori, in accordo con lo schema proposto; (2) la polarità del solvente che favorisce la cinetica se è bassa, in accordo con il fatto che l'interazione avvenga tra ioni di carica opposta.

I risultati di questo studio, eseguito in condizioni controllate, sembrano chiarire in modo esauriente la reazione di formazione del complesso e sono parzialmente in accordo con quelli ottenuti da uno studio spettrofotometrico precedente di *Jancovicova et al* [17] del 2007 nel quale si prende in considerazione un semplice inchiostro ferro-gallico, preparato con acido gallico e solfato ferroso. In questo lavoro i campioni preparati vengono monitorati per diversi giorni, conservati in contenitori chiusi, ma senza un controllo dell'ossigeno, per riprodurre condizioni sperimentali vicine a quelli di un inchiostro. Nel lavoro si misura l'assorbanza del complesso, il pH e si determina la quantità di  $Fe^{2+}$  libera in soluzione attraverso una reazione selettiva con *o-fenantrolina*, un legante specifico per il Fe(II). Nelle condizioni sperimentali si osserva, analogamente al caso precedente, la formazione di un complesso colorato che assorbe nel visibile. In condizioni di rapporto stechiometrico di circa 1:3 con concentrazioni dell'ordine di  $10^{-4}$  mol/L la formazione del complesso è lenta e continua per diverse ore, a differenza di quanto riscontrato in condizioni di eccesso di uno dei due reagenti nel lavoro di *Lu* dove la formazione del complesso risultava completa entro una decina di minuti dal mescolamento dei reagenti.

Insieme alle variazioni nello spettro, la misura del pH mostra che nella prima fase della reazione c'è una diminuzione del pH causato dalla formazione di  $HSO_4^-$  derivante come prodotto della formazione del complesso. La costante di formazione ricavata è di  $3.3 \cdot 10^4$  mol/L.<sup>1</sup> In mancanza di un controllo dell'ossigeno, in seguito all'aggiunta di  $FeSO_4$ , parte degli ioni Fe(II) possono ossidarsi a Fe(III) in grado di formare anch'essi un complesso intensamente colorato. Monitorando la concentrazione di  $Fe^{2+}$  nel corso della reazione emerge che durante la prima ora dalla preparazione delle soluzioni l'intensità di assorbimento della banda caratteristica del complesso è indirettamente proporzionale alla concentrazione di Fe(II). Questo fatto suggerisce che i due fenomeni siano legati e quindi la formazione del complesso sia dovuta alla formazione di  $GAFe(II)$ .

<sup>1</sup>Il valore della costante è fornito per il sistema in cui è presente anche l'1% di gomma arabica, un agente legante utilizzato nella preparazione degli inchiostri.

## 2.2 I complessi ferro-gallici nella preparazione degli inchiostri

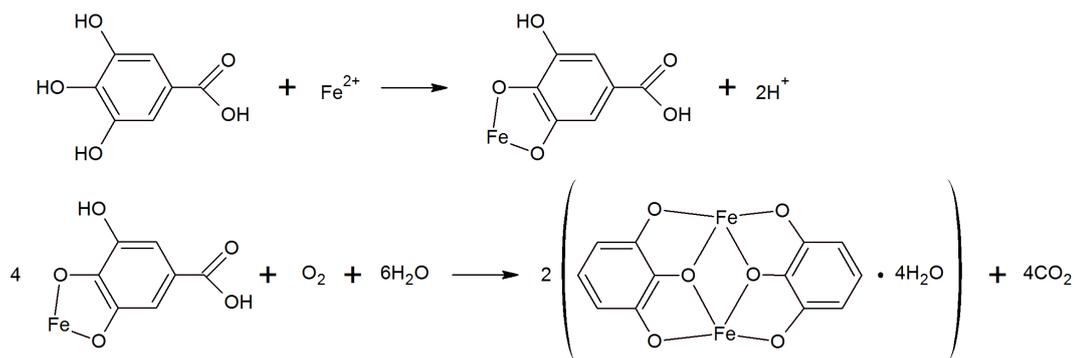
Dalla descrizione dei complessi ferro-gallici in soluzione acquosa emerge che il sistema è piuttosto articolato in quanto diverse specie sono coinvolte nella reazione: le condizioni di pH e la presenza di agenti ossidanti, ma anche l'ossigeno disciolto in soluzione sono determinanti per la reattività. I risultati sopra citati sono inoltre ottenuti in laboratorio, in condizioni controllate e con rapporti di concentrazioni che non sempre rispecchiano le reali proporzioni tra legante e centro metallico indicate nelle metodiche di preparazione dei bagni di tintura né le condizioni sperimentali del processo di tintura. Per completare il quadro generale sui complessi ferro-gallici vale la pena citare i risultati di studi condotti su un sistema simile ovvero gli inchiostri detti "ferro-gallici", utilizzati per scrivere in nero e preparati in modo analogo ai coloranti usati nei processi di tintura a partire da estratti vegetali con alto contenuto in gallotannini.

L'inchiostro ferro-gallico è stato usato dal medioevo fino al XX secolo per la scrittura. Questo tipo di inchiostro è formato essenzialmente da tre componenti principali: estratti di piante ricche di tannini, solfato ferroso, un legante come la gomma arabica che agisce da agente stabilizzante. Aggiungendo  $\text{FeSO}_4$  all'estratto si ottengono complessi di tipo Fe(II)-tannino e Fe(III)-tannino che impartiscono una forte colorazione scura alla soluzione. L'ossigeno disciolto in soluzione è in grado di ossidare i complessi Fe(II)-tannino e per questo motivo la conservazione dell'inchiostro richiede contenitori ben chiusi.

La velocità di ossidazione del Fe(II) a Fe(III) è relativamente elevata a pH alcalino e fortemente rallentata a pH acido. In molte preparazioni quindi veniva aggiunta alla miscela anche una piccola quantità di acido per mantenere l'inchiostro fluido durante la scrittura in quanto i complessi Fe(II)-tannino sono più solubili dei rispettivi complessi con Fe(III) anche se meno intensamente colorati. Al momento della stesura su carta la soluzione penetra all'interno della fibra e viene esposta al contatto con l'aria che innesca processi di ossidazione che conducono ad una graduale formazione di complessi  $\text{GAFe(III)}$  scarsamente solubili in acqua. In definitiva quindi l'inchiostro ferro-gallico si comporta in parte come colorante e in parte come pigmento disperso. Per l'uso che se ne deve fare è bene avere l'inchiostro completamente solubile; per questo motivo si aggiunge nella preparazione un legante come la gomma arabica che favorisce la formazione di una sospensione di particelle prevenendo la formazione di precipitati indesiderati.

In letteratura sono ipotizzate diverse strutture per il complesso responsabile della colorazione scura, ma purtroppo il processo di sintesi utilizzato per produrre cristalli isolabili da analizzare ai raggi X differisce drasticamente dalle condizioni in cui viene preparato l'inchiostro ferro-gallico. L'unica struttura a raggi X nota, riportata in figura 2.7 è stata ottenuta da *Krekel* [18] precipitando il complesso ferro-gallico a partire da una soluzione di  $\text{FeCl}_3$ , ma non vi sono evidenze in letteratura che testimonino l'esistenza di inchiostri nei manoscritti storici caratterizzati dalla struttura proposta.

È interessante infine citare i risultati ottenuti dall'indagine condotta da *Rouchon-Quillet et al* [19] nel 2004 in cui si valuta il ruolo dell'acido gallico nella corrosione degli inchiostri



**Figura 2.7:** Proposta di formazione del gallato di ferro(III), una delle possibili sostanze colorate nella composizione degli inchiostri ferro-gallici [18].

ferro-gallici attraverso spettroscopia Mössbauer. Questa tecnica spettroscopica permette di quantificare i metalli su una superficie e di determinarne il rapporto degli stati di ossidazione del Fe. I risultati mostrano che il processo di asciugatura di campioni di carta immersi in una soluzione fresca di solfato di ferro all'1% determina l'ossidazione del 99% del ferro a Fe(III). Ripetendo l'esperimento con una soluzione di Fe(II) e GA si osserva invece che nel processo di asciugatura il Fe(II) non viene ossidato a Fe(III) così velocemente e solo dopo alcuni giorni la percentuale di Fe(II) inizia a diminuire, a testimonianza del fatto che la chelazione del centro metallico contribuisce a diminuirne la reattività.

## 2.3 Quale sistema modello studiare?

Dalle osservazioni fatte finora appare evidente che non è semplice ottenere una descrizione dettagliata dei processi che avvengono all'interno di un sistema complesso come il bagno di tintura. Alla complessità del comportamento chimico del sistema considerato si accompagna inoltre la natura chimica tutt'altro che banale del substrato sottoposto a colorazione. Senza dubbio i processi che avvengono sono anche influenzati dalla tecnica di mordenzatura impiegata *pre- post- o meta*, di cui abbiamo parlato nella sezione 1.2, e dalla presenza nell'estratto naturale di altre sostanze, non solo di natura polifenolica, che possono ulteriormente influenzare i processi di formazione dei complessi colorati.

Una caratteristica comune a tutti i processi di tintura, però, è il largo impiego di sali ferrosi come agenti ausiliari. Dalle sezioni precedenti abbiamo visto che i sali di ferro(II) vanno incontro a processi di ossidazione in soluzione acquosa, dipendenti dal pH che ne influenza fortemente anche la solubilità. La formazione dei complessi stabili con acido gallico è possibile sia con Fe(II) che con Fe(III) e i due sistemi differiscono per la solubilità in acqua e per l'intensità della colorazione. Processi redox possono inoltre avvenire anche a livello del complesso già formato; i sali di Fe<sup>3+</sup> possono essere ridotti a sali ferrosi da processi ossidoriduttivi che coinvolgono i polifenoli e non si possono escludere processi inversi di riossidazione tipo Fenton. Il tutto è complicato dal fatto che la tintura avviene in genere a caldo intorno a 50-60°C e la temperatura influenza sia le cinetiche di reazione che gli equilibri.

È evidente che lo studio di questo sistema richiede quindi delle semplificazioni, già adottate nei lavori sperimentali sopra descritti in cui non si considerano miscele complesse di polifenoli, ma si trattano singolarmente semplici molecole, e dall'esecuzione di esperimenti in condizioni controllate. L'elaborazione di un modello che sia in grado di descrivere, almeno a livello qualitativo, le complesse interazioni tra colorante, mordente e substrato deve essere necessariamente sviluppato in *step* successivi con un aumento progressivo della sua complessità. Per questi motivi, dopo la panoramica completa descritta finora, abbiamo dovuto scegliere un sistema modello per il colorante ferro-gallico che utilizzeremo nel corso del lavoro.

Il colorante ferro-gallico, scelto come modello, è il complesso 1:1  $GAFe(II)$  in quanto: (1) GA è il componente principale degli estratti naturali e i suoi complessi sono stati studiati dal punto di vista sperimentale, (2) il  $Fe(II)$ , proveniente principalmente da sali ferrosi come  $FeSO_4$  è stato largamente impiegato come mordente nella preparazione dei bagni di tintura. È chiaro che non si può escludere la possibilità che all'interno del bagno di tintura si formino complessi con  $Fe(III)$ . Dalle considerazioni fatte, se pensiamo ad esempio ad un processo di tintura preparato con la tecnica della *meta-mordenzatura*, è plausibile però che l'impiego di  $Fe(II)$  sia compatibile con la formazione iniziale di complessi  $GAFe(II)$  (che esistono e godono di una certa stabilità) in grado di interagire inizialmente con la fibra di lana attraverso la potenziale formazione di legami covalenti tra il centro metallico e la fibra. Cosa poi accada durante i processi di asciugatura e di invecchiamento del tessuto è un problema da affrontare in uno studio successivo ed è evidente che la presenza di ossigeno e i processi redox condurranno ad un'ossidazione del ferro a  $Fe(III)$ .

Ad un primo livello il nostro interesse è dunque quello di indagare le interazioni colorante-metallo-fibra e la definizione iniziale del sistema modello ci ha permesso di elaborare una strategia di indagine per descriverle in modo sistematico.

---

## Studio teorico-sperimentale dell'acido gallico (GA) e di GAF<sub>e</sub>(II)

---

L'analisi del problema inizia dallo studio di GA e dei suoi complessi con lo ione ferroso che, come abbiamo visto nel capitolo precedente, rappresentano il nostro modello di colorante impiegato per tingere in nero i tessuti. Nel seguito del capitolo presenteremo brevemente le principali tecniche computazionali usate per lo studio dei sistemi molecolari trattati nel lavoro di tesi ed effettueremo un'analisi strutturale ed elettronica, a livello teorico, di GA e dei suoi complessi binari con Fe<sup>2+</sup>. La descrizione chimico-fisica è completata dai risultati sperimentali ottenuti con la spettroscopia UV-Vis che rappresenta uno dei metodi di indagine più adatto allo studio di questi sistemi.

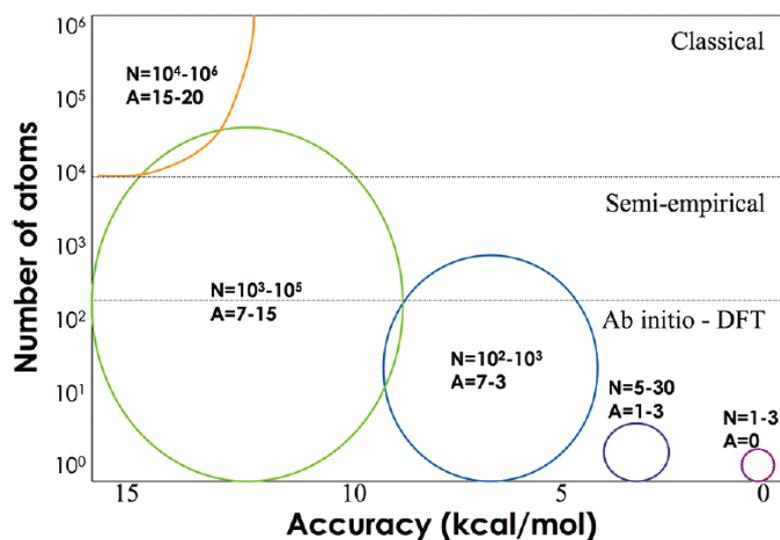
### 3.1 Metodi computazionali

La chimica computazionale include una raccolta di tecniche che possono essere classificate in base all'accuratezza del metodo rispetto al costo computazionale. In genere il costo computazionale scala con una potenza  $>1$  rispetto alla dimensione del sistema, determinata dal numero di atomi e di elettroni che lo costituiscono, pertanto è necessario raggiungere un compromesso tra i due aspetti che fornisca risultati di buona qualità con uno sforzo contenuto. In figura 3.1 riportiamo una rappresentazione schematica dell'ordine di grandezza del sistema in funzione dell'accuratezza del calcolo relativa a diversi metodi computazionali.

All'interno di questo contesto la meccanica quantistica (intesa come teoria della funzione d'onda) rappresenta il livello di calcolo più alto che permette, in linea di principio, di calcolare esattamente la funzione d'onda e tutte le proprietà di un certo insieme di atomi. Nella pratica però ci dobbiamo accontentare di soluzioni approssimate dell'equazione di Schrödinger che si ottengono applicando i metodi *ab-initio*<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Il termine *ab-initio* deriva dal fatto che la risoluzione delle equazioni quantomeccaniche richiede la sola conoscenza di grandezze fisiche fondamentali come la velocità della luce e la costante di Plank e di grandezze



**Figura 3.1:** Rappresentazione schematica del numero di atomi in funzione dell'accuratezza (Kcal/mol) dei metodi computazionali.

Il capostipite dei metodi *ab-initio* è il metodo Hartree-Fock, la cui accuratezza è stata negli anni migliorata attraverso le correzioni introdotte con la teoria perturbativa (MP<sub>n</sub>, n=2,3,4) e con lo sviluppo dei metodi *Coupled Cluster* (CC) e multiconfigurazionali (CAS-SCF/CASPT2). Un approccio differente è rappresentato dalla *Density Functional Theory* (DFT), nella formulazione di Kohn-Sham. I metodi DFT vengono in genere considerati metodi *ab-initio* ma in realtà al loro interno contengono dei funzionali parametrizzati, impiegati nella descrizione della correlazione elettronica, per la quale non sono note le forme esatte. Il vantaggio offerto dai metodi DFT deriva dalla possibilità di ottenere risultati con una richiesta di risorse di calcolo paragonabile a quella dei più semplici metodi *ab-initio*, tipo Hartree-Fock, ma con una maggiore accuratezza, paragonabile a quella ottenuta con livelli di calcolo più elevati e decisamente più onerosi.

Per sistemi di grandi dimensioni è necessario introdurre ulteriori approssimazioni che stanno alla base dei metodi *semi-empirici* nei quali si utilizza una descrizione approssimata degli elettroni introducendo dei parametri derivanti anche da dati sperimentali. In questo caso la velocità di calcolo diventa molto rapida ma la scelta del set appropriato di parametri è fondamentale per ottenere una corretta descrizione del sistema. Diversi metodi *semi-empirici* sono stati sviluppati per specifiche tipologie di sistemi, come ad esempio i metodi AM1 e PM6, che descrivono bene polimeri biologici come le proteine [1].

---

che dipendono dal sistema considerato come la massa e la carica di nuclei ed elettroni.

### 3.1.1 Le tecniche di ottimizzazione di geometria

In questo elaborato di tesi l'uso di tecniche computazionali è rivolto principalmente alla determinazione delle geometrie di equilibrio delle strutture molecolari di interesse, al fine di effettuare un'analisi energetica della stabilità relativa dei sistemi molecolari e delle loro proprietà. Il processo di ricerca della geometria di minima energia (ottimizzazione) rappresenta il primo passo alla base di un qualsiasi studio computazionale.

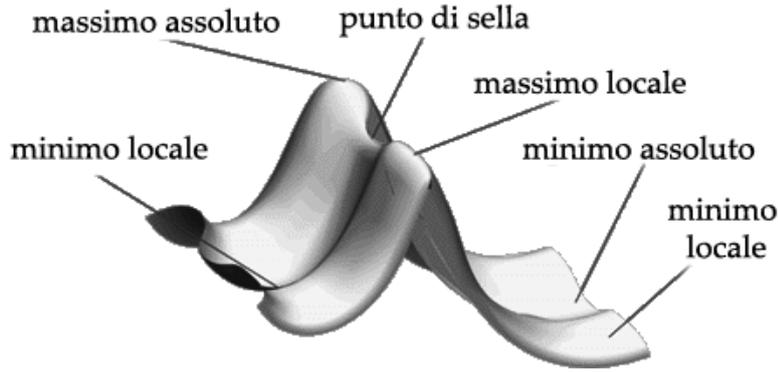
In generale l'energia  $E(\mathbf{x})$  è una complicata funzione di tutte le coordinate atomiche, il cui valore si può ottenere dalla risoluzione dell'equazione di Schrödinger elettronica, nell'ambito dell'approssimazione di Born-Oppenheimer, applicando uno dei metodi descritti nella sezione 3.1. Con il termine generico di ottimizzazione si intende il processo di ricerca dei punti stazionari della funzione multidimensionale energia  $E(\mathbf{x})$ , che dipende da da  $3N$  variabili dove  $N$  rappresenta numero di atomi, in cui le derivate prime rispetto agli spostamenti lungo le coordinate sono nulle. L'equazione 3.1 esprime la condizione di stazionarietà attraverso il vettore gradiente  $\mathbf{g}$ , le cui componenti sono le derivate prime della funzione:

$$\mathbf{g} = \nabla E(\mathbf{x}) = \left( \frac{\partial E(\mathbf{x})}{\partial x_1}, \frac{\partial E(\mathbf{x})}{\partial x_2}, \dots, \frac{\partial E(\mathbf{x})}{\partial x_N} \right) = 0 \quad (3.1)$$

Nella maggior parte dei casi il punto stazionario che si desidera ricercare è un punto di minimo, ad esempio la geometria di equilibrio di un molecola, in cui le derivate seconde sono tutte positive; in altri casi invece il punto desiderato è un punto di sella del primo ordine in cui le derivate seconde sono positive in tutte le direzioni ad eccezione di una in cui la derivata seconda è negativa, come accade per uno stato di transizione in un cammino di reazione. Molte procedure di ottimizzazione determinano il punto stazionario più vicino rispetto alle coordinate iniziali dei nuclei, ma una funzione multidimensionale può contenere moltissimi punti stazionari dello stesso tipo. Il minimo con il valore di energia più bassa è detto minimo globale, o assoluto, mentre tutti gli altri sono detti minimi locali. In figura 3.2 è schematizzata una superficie di energia potenziale (PES) in tre dimensioni dove l'energia è funzione di due sole coordinate. Sul grafico si possono riconoscere i diversi punti caratteristici: massimi, minimi e punti di sella.

La ricerca della geometria della struttura più stabile per una certa molecola si traduce quindi in un problema matematico di ricerca del minimo assoluto sull'ipersuperficie descritta dalla funzione energia a partire da un un certo set di coordinate (*guess*) che individua la posizione iniziale dei nuclei. Il problema può essere schematizzato in questo modo. Supponiamo di voler localizzare il minimo  $E_{x_{min}}$  della funzione  $E(\mathbf{x})$  partendo da un certo set di coordinate  $\mathbf{x}_0$ , in cui il valore di  $E(\mathbf{x}_0)$  è noto, e di volerci spostare in una certa direzione in modo da avvicinarci ad  $E_{x_{min}}(\mathbf{x})$ , procedendo per passi successivi. Per poter determinare il nuovo punto dobbiamo decidere: (1) la direzione da seguire nella ricerca del minimo; (2) la grandezza dello spostamento lungo quella direzione (lunghezza del passo).

La differenza tra i diversi metodi di ottimizzazione risiede nella scelta della direzione e dello *step*. In particolare i metodi più impiegati nell'ambito della chimica computazionale sono raggruppabili in due grandi categorie:



**Figura 3.2:** Esempio di una PES tridimensionale in cui si riconoscono i punti di minimo locale e globale, relativi a geometrie di equilibrio (strutture stabili), punti di massimo locale e globale, punti di sella (massimi in una direzione e minimi in tutte le altre) che corrispondono a strutture di transizione che connettono due strutture di equilibrio.

- i metodi a gradiente, che sfruttano le derivate prime della funzione per determinare la direzione dello spostamento, come ad esempio i metodi *Steepest Descent* (SD) e *Conjugate Gradient* (CG). I gradienti possono essere calcolati in modo analitico oppure attraverso una differenziazione numerica;
- i metodi che prevedono anche il calcolo della matrice delle derivate seconde, detta matrice Hessiana ( $\mathbf{H}$ ), come ad esempio i metodi tipo *Newton-Raphson* che sfruttano un'espansione quadratica della funzione:

$$E(\mathbf{x}) = E(\mathbf{x}_0) + \mathbf{g}(\mathbf{x}_0)(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0) + \frac{1}{2}(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0)^T \mathbf{H}(\mathbf{x}_0)(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0) \quad (3.2)$$

dove gli elementi della matrice Hessiana sono dati da  $H_{ij} = \frac{\partial^2 E}{\partial x_i \partial x_j}$ . Dal momento che in un punto stazionario il gradiente è nullo, si può scrivere che:

$$\mathbf{g}(\mathbf{x})|_{\mathbf{x}=\mathbf{x}^*} = \mathbf{g}_0 + \mathbf{H}_0(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0) = 0 \quad (3.3)$$

dove con  $\mathbf{x}^*$  intendiamo le coordinate del minimo. Pertanto il passo *Newton-Raphson*, definito come  $\mathbf{s}_{NR} = \mathbf{x}^* - \mathbf{x}_0$ , è dato da:

$$\mathbf{s}_{NR} = -\mathbf{H}_0^{-1} \mathbf{g}(\mathbf{x}_0) \quad (3.4)$$

In pratica, invertendo la matrice Hessiana si determina il vettore di coordinate del nuovo punto che, nel caso in cui l'espansione della funzione troncata al secondo ordine sia esatta, rappresenta direttamente il punto stazionario cercato. I metodi che fanno uso delle derivate seconde hanno il vantaggio di generare punti sufficientemente vicini al minimo con un numero di passi inferiore rispetto ai metodi a gradiente. La richiesta di un minor numero di passi non è detto che coincida con un minor costo computazionale in quanto il calcolo e il trattamento delle derivate seconde è molto oneroso in termini di risorse. [20].

Nel software di calcolo da noi utilizzato è implementato l'algoritmo di minimizzazione di Broyden [21] che fa parte dei metodi *quasi-Newton*. Questi metodi sfruttano i vantaggi offerti dai metodi a gradiente e da quelli basati sulle derivate seconde aggirandone gli svantaggi attraverso una riduzione del costo computazionale speso per determinare  $\mathbf{H}$ . Invece di calcolare esattamente le sue componenti, la matrice Hessiana viene infatti stimata con il metodo proposto da *Broyden, Fletcher, Goldfarb, e Shanno* [22], noto con l'acronimo BFGS, che ne approssima gli elementi.

Nei primi passi dell'ottimizzazione viene utilizzato un algoritmo *Steepest Descent* e una volta che i gradienti scendono sotto un certo valore soglia si passa alla stima della matrice Hessiana che permette di migliorare la ricerca del minimo quando siamo vicini ad esso. Per ciascun passo del processo di ottimizzazione l'algoritmo di Broyden opera nel modo seguente. Consideriamo una funzione  $E(\mathbf{x})$  dipendente da  $n$  variabili e il gradiente ad  $n$  dimensioni della stessa funzione. Desideriamo costruire una serie di passi che ci portino ad un punto stazionario di  $E_{min}$ , dove il gradiente è nullo. Assumendo che siano già stati compiuti  $p$  passi, al passo  $p+1$  conosciamo il valore della funzione e del suo gradiente sui punti precedenti. Attraverso lo *step* precedente conosciamo anche la matrice  $\mathbf{H}$ , di dimensioni  $n \times n$  che è un'approssimazione della vera matrice delle derivate seconde. Un singolo *step* di ottimizzazione può quindi essere diviso in 3 parti:

1. ottenere le correzioni alla matrice approssimata delle derivate seconde;
2. ricercare un minimo lungo la linea che unisce il punto corrente e il precedente attraverso un fit polinomiale (in genere è utilizzato un polinomio di quarto grado);
3. stimare la posizione del punto stazionario nell'intero spazio  $n$ -dimensionale usando il gradiente e la matrice approssimata delle derivate seconde.

Ad ogni *step* il gradiente e i vettori spostamento vengono testati per verificare se l'ottimizzazione è giunta a convergenza. Lo scarto quadratico medio (RMS) del gradiente e del valore assoluto della sua componente più grande devono stare al di sotto di un certo valore soglia, così come per lo spostamento. Se queste quattro condizioni sono soddisfatte l'ottimizzazione è completata, in caso contrario il processo continua fino al raggiungimento di un numero massimo di *step* imposti. Dal punto di vista computazionale è chiaro che la funzione e le sue derivate possono essere calcolate solo con una precisione finita che dipende dal tipo di metodo implementato e dalla precisione numerica. La posizione esatta del punto stazionario quindi non può essere localizzata, così come il gradiente non potrà mai essere ridotto esattamente a zero.

### 3.1.2 L'approccio DFT

Lo studio quantomeccanico dei sistemi molecolari di nostro interesse, viste le loro dimensioni, è stato effettuato mediante l'impiego dei metodi DFT. Si parte infatti dalla trattazione di sistemi di piccole dimensioni come GA (18 atomi, 90 elettroni) fino ad arrivare a sistemi più grandi come i complessi ternari con gli amminoacidi liberi (circa 30 atomi e 170 elettroni) e complessi con il frammento di polipeptide (275 atomi, 1116 elettroni) per il quale dedicheremo nella sezione 5.5 un approfondimento sulla strategia di calcolo.

I metodi DFT sono basati sui teoremi di Hohenberg e Kohn (HK) i quali dimostrano che l'energia elettronica dello stato fondamentale di una sistema multielettronico e tutte le altre proprietà elettroniche sono completamente determinate dalla funzione densità elettronica  $\rho(x, y, z)$ , la cui espressione è riportata nell'equazione 3.5<sup>2</sup>. In altre parole esiste una corrispondenza univoca tra la densità elettronica di un sistema e la sua energia. Il vantaggio di questo tipo di approccio risiede nel fatto che la funzione densità elettronica, data dal quadrato della funzione d'onda integrata su  $N - 1$  coordinate elettroniche, dipende solamente da 3 variabili indipendentemente dalle dimensioni del sistema in esame, diversamente da quanto invece accade per i metodi *ab-initio* in cui si considera una funzione d'onda che dipende da  $3N$  variabili.

$$\rho(\mathbf{x}) = N \int |\Psi(x_1 \cdots x_{3N})|^2 dx_2 \cdots dx_{3N} \quad (3.5)$$

L'energia dello stato fondamentale è vista quindi come un funzionale della densità  $E = E[\rho]$ , ovvero una relazione matematica che lega l'energia alla funzione densità, che a sua volta dipende dalle coordinate elettroniche delle particelle. Sebbene sia stata dimostrata l'esistenza di tale relazione univoca, la forma matematica del funzionale purtroppo non è nota e i metodi DFT hanno come fine ultimo quello di definire la relazione che lega l'energia alla densità elettronica.

In analogia con l'approccio utilizzato nella teoria quantomeccanica basata sulla funzione d'onda, il funzionale dell'energia può essere suddiviso in tre parti: (1) il funzionale dell'energia cinetica associata al moto degli elettroni  $T[\rho]$ , (2) il potenziale di attrazione tra nuclei ed elettroni  $V_{ne}[\rho]$ , (3) il potenziale di repulsione elettrone-elettrone  $V_{ee}[\rho]$ . Nell'ambito dell'approssimazione di Born-Oppenheimer, all'interno della quale vengono condotti i calcoli molecolari, la repulsione nucleo-nucleo è considerata una costante additiva. In modo simile al metodo Hartree-Fock, la repulsione elettrone-elettrone può essere ulteriormente suddivisa in due contributi: una repulsione di tipo Coulombiano  $J[\rho]$  e un'interazione puramente quantistica di scambio  $K[\rho]$ .

I termini  $V_{ne}[\rho]$  e  $J[\rho]$  possono essere tradotti mediante le loro espressioni classiche mentre, nella prima formulazione del DFT risalente agli anni trenta, i funzionali  $T[\rho]$  e  $K[\rho]$  vengono formulati sulla base del modello del gas di elettroni non interagenti. Questo tipo di approccio introduce un errore sull'energia totale non trascurabile (dal 15 al 50 %) ma soprat-

---

<sup>2</sup>N indica il numero totale di elettroni e  $\Psi$  la funzione d'onda; in questa analisi stiamo considerando le variabili spaziali.

tutto non è in grado di predire la formazione di legami chimici. Il problema viene risolto nel 1965 da Kohn e Sham (KS) che gettano le basi per la costruzione di metodi DFT applicabili alla chimica computazionale. Il problema principale è costituito infatti dal termine di energia cinetica per il quale non si riesce ad ottenere una rappresentazione sufficientemente realistica. L'idea di KS è quella di aggirare il problema mediante: (1) l'introduzione di densità elettroniche rappresentate attraverso speciali orbitali  $\phi_i$ , detti appunto *orbitali di Kohn-Sham*, (2) il concetto di sistemi di particelle non interagenti. Così facendo il funzionale può essere diviso in due parti: una esattamente calcolabile grazie alle approssimazioni introdotte e l'altra che costituisce un piccolo termine di correzione alla prima.

Il fatto di considerare un sistema di elettroni non interagenti non è fisicamente reale ma permette di sfruttare la conoscenza della sua soluzione, rappresentata da un singolo determinante di Slater (prodotto antisimmetrizzato di orbitali  $\phi_i$ ). In questo modo si può calcolare la funzione d'onda per il sistema fittizio e da questa la corrispondente energia cinetica e la densità elettronica:

$$T_S[\rho] = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \langle \phi_i | \nabla^2 | \phi_i \rangle \quad (3.6)$$

Il prezzo che viene pagato è la reintroduzione degli orbitali che incrementa la complessità da 3 a  $3N$  variabili mentre la correlazione elettronica riemerge come termine separato. È chiaro che  $T_S[\rho]$  rappresenta la forma esatta del funzionale nel caso di elettroni non interagenti ma è soltanto un'approssimazione rispetto al valore esatto di  $T[\rho]$ , riferito al sistema reale. Ad ogni modo si presume che la correzione sia piccola e che possa essere assorbita all'interno di un termine di scambio-correlazione in cui è incluso anche  $K[\rho]$ . Il funzionale dell'energia elettronica DFT può quindi essere scritto come:

$$E_{DFT}[\rho] = T_s[\rho] + V_{ne}[\rho] + J[\rho] + XC[\rho] \quad (3.7)$$

mentre l'energia esatta è data da:

$$E_{exact}[\rho] = T[\rho] + V_{ne}[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (3.8)$$

Uguagliando le due equazioni si ottiene una definizione del termine di scambio-correlazione  $XC[\rho]$  che contiene tutti gli errori dovuti commessi nelle approssimazioni fatte, formalmente costituito dalla parte non classica dell'energia inter-elettronica (diminuita della parte Coulombiana  $J[\rho]$ ) che include sia l'energia di scambio che la correlazione e dalla differenza tra l'esatto (e sconosciuto) funzionale dell'energia cinetica  $T[\rho]$  e il funzionale esatto per particelle non interagenti  $T_S[\rho]$ . Nella formulazione KS il funzionale dell'energia viene quindi scritto come:

$$XC[\rho] = (T[\rho] - T_s[\rho]) + (V_{ee}[\rho] - J[\rho]) \quad (3.9)$$

Supponendo di conoscere un'espressione per  $XC[\rho]$ , si può minimizzare il funzionale totale dell'energia per trovare la densità elettronica e l'energia dello stato fondamentale. A questo punto il problema da risolvere diventa analogo a quello che si incontra nella teoria Hartree-Fock: determinare un set di orbitali ortonormali che minimizzino il funzionale dell'energia

totale. Dato che quest'ultimo dipende dalla densità elettronica totale che, a sua volta, dipende dal set di orbitali  $\phi_i$ , il problema richiede una risoluzione di tipo iterativo. La soluzione viene ricercata definendo un operatore monoelettronico  $\hat{h}_{KS}$ :

$$\hat{h}_{KS} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + \hat{v}_{eff} \quad (3.10)$$

dove il potenziale efficace è definito dalla seguente espressione:

$$\hat{v}_{eff}(\mathbf{x}) = \hat{V}_{ne}(\mathbf{x}) + \int \frac{\rho(\mathbf{x}')}{|\mathbf{x} - \mathbf{x}'|} d\mathbf{x}' + \hat{v}_{XC}(\mathbf{x}') \quad (3.11)$$

Una volta che è stato definito il funzionale di scambio correlazione  $XC[\rho]$ , il potenziale  $\hat{v}_{XC}$  da inserire nell'equazione 3.11 si ottiene in modo semplice attraverso la derivata funzionale:

$$\hat{v}_{XC}(\mathbf{x}) = \frac{\partial XC[\rho]}{\partial \rho(\mathbf{x})} \quad (3.12)$$

Applicando uno schema risolutivo simile a quello dei metodi Hartree-Fock si ottengono le equazioni a pseudo-autovalori, dette equazioni di Kohn-Sham:

$$\hat{h}_{KS} |\phi_i\rangle = \epsilon_i |\phi_i\rangle \quad (3.13)$$

le cui autofunzioni costituiscono il set di *orbitali canonici di Kohn-Sham*. È bene sottolineare che gli autovalori  $\epsilon_i$  non possono essere associati a grandezze fisiche come le energie orbitaliche in quanto non è nota l'esatta forma del funzionale  $XC[\rho]$  che, se invece fosse veramente esatto, fornirebbe l'energia elettronica totale esatta, includendo anche la correlazione elettronica. Nel processo di risoluzione autoc coerente gli orbitali di KS vengono espansi su un insieme di funzioni di base. Un approfondimento sulla scelta del set di base è riportato nella sezione 3.2 [20].

L'elemento che diversifica i metodi DFT è quindi la scelta del funzionale dell'energia di scambio-correlazione, per il quale la teoria non fornisce particolari restrizioni. Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi funzionali, in grado di fornire una descrizione elettronica sempre più accurata, e i diversi metodi si raggruppano in quattro grandi categorie:

**LDA** È la prima generazione di funzionali che nasce dalla *Local Density Approximation* in cui si assume che la densità possa essere trattata localmente<sup>3</sup> con il modello del gas omogeneo di elettroni. Il funzionale XC è dato dalla formula di Dirac:

$$XC^{LDA}[\rho] = -C_{XC} \int \rho^{4/3}(x) dx \quad (3.14)$$

Nel caso generale in cui vi sia un eccesso di spin, i funzionali della densità allora dipendono dalla densità locale di spin  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\rho_\sigma$ ) e si adotta una generalizzazione della LDA, nota come *Local Spin Density Approximation* (LSDA), in grado di fornire buoni risultati per lo studio della fisica dello stato solido ma non per i sistemi molecolari in quanto sovrastima le energie di legami e sottostima l'altezza delle barriere energetiche.

<sup>3</sup>Con il termine locale intendiamo che la densità non dipende dal gradiente.

**GGA** La seconda generazione di funzionali è detta *Generalized Gradient Approximation* (GGA) in cui oltre alla densità locale si introduce la dipendenza dal gradiente della densità  $\nabla\rho_\sigma$ . B88 fu il primo e più diffuso funzionale di scambio GGA proposto da Becke [23] come correzione all'energia di scambio LSDA. B88 contiene al suo interno la dipendenza dal gradiente e un parametro determinato sulla base di fitting con dati di atomi di gas nobili che determina il peso relativo della parte locale e non locale. I funzionali GGA forniscono risultati più accurati a livello di termochimica ma tendono ancora a sottostimare le barriere energetiche.

**m-GGA** L'estensione logica dei metodi GGA è l'introduzione della dipendenza del funzionale di scambio-correlazione dalle derivate di ordine  $> 1$  della densità elettronica. Nascono così i funzionali *meta*-GGA che includono nel termine  $XC[\rho]$  una quantità chiamata densità di energia cinetica  $\tau_\sigma(r)$  e/o la dipendenza dalle derivate seconde della densità  $\nabla_\rho^2$ . Nonostante i miglioramenti introdotti, anche la terza generazione di funzionali continua ad avere un "carattere locale", nel senso che l'energia elettronica in un certo punto dello spazio dipende solo dal comportamento della densità elettronica e dell'energia cinetica in quel punto e nel suo intorno.

**ibridi** La descrizione elettronica può essere ancora migliorata combinando linearmente il funzionale locale  $XC[\rho]$  con un funzionale di scambio tipo Hartree-Fock (HF). Tale combinazione è giustificata dalla teoria della connessione adiabatica. I funzionali che contengono una certa "percentuale di scambio Hartree-Fock" sono detti ibridi e offrono una descrizione più accurata della termochimica dei gruppi principali.

Negli ultimi dieci anni lo sviluppo di funzionali *meta*-GGA e ibridi ha messo a disposizione potenti strumenti con una vasta applicabilità in molte aree della chimica. Uno dei funzionali ibridi più diffuso è senza dubbio il B3LYP [24], al quale si deve il fatto che i metodi DFT siano diventati strumenti così popolari nella chimica computazionale. Il funzionale B3LYP non sempre rappresenta la scelta più adatta per tutti sistemi molecolari e alcune sue peculiarità non lo rendono completamente soddisfacente per applicazioni come ad esempio: la stima delle barriere energetiche; le descrizioni delle interazioni non covalenti a medio raggio (es. nei complessi di Van der Waals e in sistemi biologici); la chimica dei metalli di transizione [25].

In tutti i sistemi molecolari trattati nel corso del lavoro, ad eccezione di GA è presente il ferro, un metallo appartenente alla prima serie di transizione. Come è noto i metalli di transizione mostrano un grande versatilità della formazione dei legami con altri atomi e la loro configurazione elettronica, che prevede orbitali di tipo *d* semi-riempiti, richiede un accurato trattamento e un contesto teorico flessibile che si in grado di trattare tutti gli stati di spin energeticamente accessibili, gli accoppiamenti di spin e gli stati di valenza in modo equilibrato. Tutto ciò si ottiene, nella teoria della funzione d'onda, con un trattamento di tipo multiconfigurazionale. La presenza di metalli di transizione costituisce una difficoltà in più per i metodi DFT perché tutte le informazioni relative al carattere multiconfigurazionale della funzione d'onda sono contenute nell'energia di scambio-correlazione  $E_{XC}$  che viene

calcolata dalla densità elettronica che è a sua volta ottenuta da una funzione d'onda di tipo monodeterminante [26].

Il fatto che il funzionale B3LYP non sia la migliore scelta per la descrizione della chimica di metalli di transizione ci ha spinto a ricercare altri funzionali in grado di fornire una migliore descrizione per sistemi organometallici. La scelta è ricaduta sulla famiglia di funzionali ibridi, chiamati M06 e M06-2X [27], sviluppati nel 2007 dal team di *Truhlar* e collaboratori. Entrambi i funzionali contengono una dipendenza dalla densità elettronica, dal suo gradiente e dalla densità di energia cinetica. Il primo è parametrizzato includendo metalli di transizione e non metalli mentre il secondo, che contiene un'alta delocalizzazione dovuta ad una doppia quantità di scambio non locale (2X), è parametrizzato solo per non metalli. Le performance dei nuovi funzionali sono state accuratamente testate comparando i risultati con altri funzionali rispetto a dati sperimentali contenuti in database che includono anche specificatamente molecole contenenti metalli di transizione. Il funzionale scelto per i calcoli in questo lavoro è quindi M06 che lo stesso *Truhlar* consiglia per applicazioni alla chimica organometallica e per la descrizione di interazioni non-covalenti.

## 3.2 Dettagli computazionali

In questo lavoro di tesi l'approccio computazionale si è centrato sulla ricerca delle geometrie di equilibrio e sull'analisi della loro energia relativa e i sistemi indagati vengono descritti solo dal punto di vista statico. Per i calcoli quantomeccanici è stato utilizzato il software Gaussian09 [28] mentre per la visualizzazione e le operazioni grafiche sono stati impiegati i software GaussView05 e Chimera, in particolare per la parte riguardante il polipeptide.

Le ottimizzazioni di geometria sono state condotte utilizzando il funzionale DFT ibrido denominato M06. Per i sistemi più semplici è stato fatto anche un confronto di risultati ottenuti mediante l'impiego del funzionale B3LYP. Se non diversamente specificato, i calcoli sono condotti sul sistema molecolare isolato (calcoli in vuoto), mentre nel caso dell'aggiunta di un solvente continuo è stato utilizzato il modello di solvatazione polarizzabile (PCM) [29, 30] nel formalismo delle equazioni integrali (IEF-PCM) [31], con i parametri delle cavità settati su valori di default.

### Le funzioni di base

Nella teoria DFT di Kohn-Sham vengono chiamati in gioco gli orbitali di KS ( $\phi_i^{KS}$ ) che, nel processo iterativo di risoluzione del problema elettronico, vengono espansi su un insieme di funzioni di base secondo lo schema *Linear Combination of Atomic Orbitals* (LCAO). Oltre al funzionale, è necessario quindi scegliere un set di funzioni di base ovvero una rappresentazione matematica degli orbitali KS, in modo analogo a quanto avviene per l'espansione degli orbitali molecolari nei metodi tipo HF.

Gli orbitali atomici hanno una dipendenza, rispetto alla distanza dei nuclei, di tipo  $e^{-r}$ . L'integrazione di tali funzioni, nel calcolo delle interazioni elettrone-elettrone, risulta numericamente complessa ma il problema può essere risolto sostituendo queste ultime con delle

funzioni Gaussiane di forma  $e^{-r^2}$  di cui è nota la soluzione analitica degli integrali. Combinando funzioni Gaussiane diverse, pesate con opportuni coefficienti, si cerca la migliore approssimazione della reale funzione d'onda atomica che troverà un'esatta rappresentazione solo nel caso in cui il set di base abbia una dimensione infinita. Da un punto di vista fisico la base non è altro che la "localizzazione" di ciascun elettrone in una certa regione dello spazio. Dal momento che in meccanica quantistica gli elettroni hanno probabilità di esistere in tutto lo spazio, la loro rappresentazione matematica attraverso un set di funzioni di base finito limita questa proprietà introducendo delle inevitabili approssimazioni.

I diversi set di base si distinguono in base al numero e al tipo di Gaussiane che li formano, ed è evidente che maggiore è il numero di funzioni incluse nel set, più accurata sarà la rappresentazione. La scelta della base è dettata sia dal tipo di sistema in esame sia dalle proprietà che si vogliono calcolare, senza dimenticare che il costo computazionale cresce in modo non lineare all'aumentare delle dimensioni della base stessa. Il fatto che il nostro sistema contenga un metallo della prima serie di transizione presuppone che il set minimo di base da utilizzare contenga funzioni di tipo  $d$ , in grado di descriverne correttamente la struttura elettronica. L'aggiunta di funzioni di polarizzazione, con numero quantico  $l$  più elevato rispetto a quello strettamente necessario per descrivere lo stato fondamentale è consigliata per garantire una maggiore flessibilità nella descrizione degli ibridi, ottenendo un notevole miglioramento nella descrizione di legami di tipo  $\pi$ , anelli tensionati con ibridi  $sp^3$  con angoli minori di  $109^\circ$  e consente un miglior trattamento della correlazione elettronica, in particolare della correlazione angolare [32].

In particolare, il set di base gaussiano impiegato nei calcoli di ottimizzazioni di geometria è di tipo 6-311G(d,p). Si tratta di un set di base denominato "split-valence" in quanto gli orbitali interni sono rappresentati da un singolo set di funzioni mentre quelli di valenza sono suddivisi in tre set costituiti rispettivamente da tre, una e una Gaussiane. La denominazione  $p$  aggiunge delle funzioni di polarizzazione, per gli atomi di H mentre l'indice  $d$  per gli atomi diversi da H.

### Simulazione di spettri UV-Vis con il metodo LR-TDDFT

I metodi DFT sono stati originariamente sviluppati per lo studio dello stato elettronico fondamentale. In seguito diverse teorie sono state sviluppate per il calcolo delle proprietà di stati elettronici eccitati. Tra queste, la teoria più diffusa è la *Linear Response Time-Dependent DFT* (LR-TDDFT) che si basa sull'applicazione della teoria perturbativa dipendente dal tempo allo stato elettronico fondamentale della molecola che viene perturbato attraverso un debole e uniforme campo elettrico esterno oscillante. L'effetto del campo applicato alla densità elettronica dello stato fondamentale  $\rho_0$  dipende da una somma di termini in cui compare anche la differenze di energia  $E_j - E_0$  tra diversi stati elettronici eccitati  $E_j$  e lo stato elettronico fondamentale  $E_0$ , relativi alla stessa geometria molecolare (eccitazione verticale). Usando delle specifiche tecniche matematiche si possono calcolare sia le differenze di energia per ciascun stato elettronico eccitato che la forza dell'assorbimento elettronico nella transizione  $0 \rightarrow j$  permettendo così di prevedere lo spettro di assorbimento UV-Vis.

La teoria LR-TDDFT si applica correttamente solo a stati eccitati caratterizzati da eccitazioni a singolo elettrone. In generale per transizioni di elettroni di valenza gli errori sono dell'ordine di 0.1 ÷ 0.5 eV ma possono diventare più grandi per molecole con una lunga catena di legami  $\pi$  coniugati e per stati eccitati che coinvolgono trasferimenti di carica. Il vantaggio dell'impiego del LR-TDFT è la possibilità di studiare molecole di medie e grandi dimensioni, non accessibili con i metodi *ab-initio* [33].

Calcoli TDDFT sono stati condotti nei sistemi più semplici, quali GA e i complessi GAF<sub>e</sub>(II) per simularne gli spettri UV-Vis da confrontare con le misure sperimentali. Le simulazioni TDDFT degli spettri UV-Vis sono state ottenute sulle strutture di equilibrio ottimizzate impiegando i funzionali B3LYP e CAM-B3LYP [34], adatti per questo tipo di descrizione, e una base di tipo 6-311+g(d,p) che include funzioni diffuse.

### Analisi NBO

Per analizzare in dettaglio le variazioni sulla distribuzione di carica elettronica è utile introdurre una localizzazione della funzione d'onda in termini atomici o di legame. Per fare questo esistono diverse strategie; nel presente lavoro abbiamo utilizzato il metodo NBO [35].

In tale metodo si introducono i cosiddetti “*Natural Bond Orbitals*” cioè gli orbitali localizzati su uno o due atomi che meglio descrivono il network di legami. Utilizzando gli orbitali localizzati NBO è possibile ottenere una descrizione della densità elettronica in termini di contributi atomici introducendo le cosiddette “cariche naturali”. La carica naturale associata ad ogni atomo è definita come la differenza tra la carica nucleare e la popolazione elettronica su quell'atomo ottenuta in base all'analisi NBO. Nell'applicare tale analisi ai sistemi studiati è stato utilizzato lo stesso livello di calcolo usato per le ottimizzazioni di geometria.

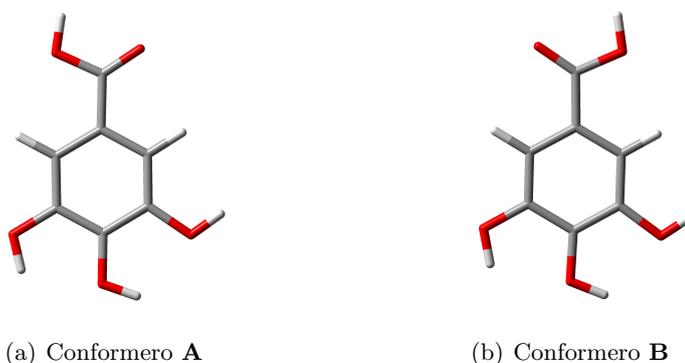
### 3.3 Analisi strutturale dell'acido gallico

L'acido *3,4,5-triidrossibenzoico*, chiamato comunemente acido gallico (GA) è il costituente di base più semplice dei tannini. È un derivato dell'acido benzoico in cui le posizioni meta e para sono sostituite con gruppi ossidrilici, per questo motivo rientra nella classe dei polifenoli. GA ha caratteristiche di acido debole e da un calcolo approssimato che tiene conto solo della prima costante di dissociazione acida, relativa al protone del gruppo carbossilico, risulta che il pH di una soluzione 0.001M di GA in acqua è di circa 3.5 unità, con un grado di dissociazione del 28%. La presenza dell'anello aromatico ne limita la solubilità in acqua che, per il composto anidro, è di circa 1.1g/100ml a 20°C.

<b>pKa1</b>	4.10 ± 0.01
<b>pKa2</b>	8.38 ± 0.01

**Tabella 3.1:** pKa acido gallico [36].

Le proprietà conformazionali e spettroscopiche di GA in vuoto e in solvente sono state ampiamente esplorate a livello teorico. L'analisi della superficie di energia potenziale (PES) dell'acido gallico rivela che le due strutture più stabili sono quelle planari, riportate in figura 3.3, in cui ciascun atomo di idrogeno dei gruppi fenolici è orientato in modo tale da massimizzare l'interazione *H-bond* con il gruppo adiacente. I due conformeri differiscono per una rotazione di 180° del gruppo carbossilico. Tali risultati sono ben riprodotti dai calcoli DFT effettuati con l'uso dei funzionali B3LYP e M06.



**Figura 3.3:** Strutture ottimizzate a livello di calcolo M06/6-311g(d,p), in vuoto, dei conformeri più stabili di GA.

L'analisi conformazionale condotta a livello di calcolo B3LYP/6-311++G(d,p), tenendo conto dell'energia di punto zero (ZPE) e delle correzioni termiche, indica che il conformero **A** è più stabile e la differenza tra i due è pari a 0.350 Kcal/mol in vuoto e di 0.059 Kcal/mol in solvente (IEFPCM) [37].

Come test preliminare abbiamo verificato che il calcolo condotto con una base meno estesa e con un il funzionale DFT M06 riproduca un risultato analogo. Nella tabella 3.2 sono riportati i dati ottenuti. Il valore di  $\Delta E$  riportato si riferisce alla differenza di energia libera elettronica

e non tiene conto della correzione vibrazionale e termica. Per i nostri scopi, sarà comunque sufficiente considerare solo le differenze di energia elettronica.

	<b>vacuo</b>	<b>water</b>
<sup>a</sup> $\Delta E^{B3LYP}$	0.35	0.06
<sup>b</sup> $\Delta E^{B3LYP}$	0.45	0.05
<sup>b</sup> $\Delta E^{M06}$	0.45	0.06

**Tabella 3.2:** Dati strutturali ed energetici dei conformeri **A** e **B** dell'acido gallico a livello di calcolo DFT (<sup>a</sup> base 6-311++G(d,p); <sup>b</sup> base 6-311G(d,p)) in vuoto e in solvente IEFPCM. La differenza di energia tra i due conformeri, espressa in Kcal/mol, è data da  $\Delta E = E_B - E_A$ .

La piccola differenza di energia tra i due conformeri può essere trascurata nel prosieguo dell'analisi, pertanto sarà per noi indifferente considerare l'uno o l'altro conformero. Il gruppo carbossilico e i tre gruppi fenolici presenti nella struttura di GA danno luogo ad una complessa rete di interazioni tipo legame ad idrogeno. La struttura cristallina di GA conferma l'alta planarità della molecola [38]. In soluzione acquosa sufficientemente diluita, GA dà luogo a legami ad idrogeno con molecole d'acqua. Dagli studi di dinamica molecolare emerge che le molecole d'acqua della prima sfera di solvatazione interagiscono ad una distanza tipica per la formazione di legami ad idrogeno (circa 2.5 Å) con gli atomi che non sono coinvolti nei legami ad idrogeno intermolecolari [37].

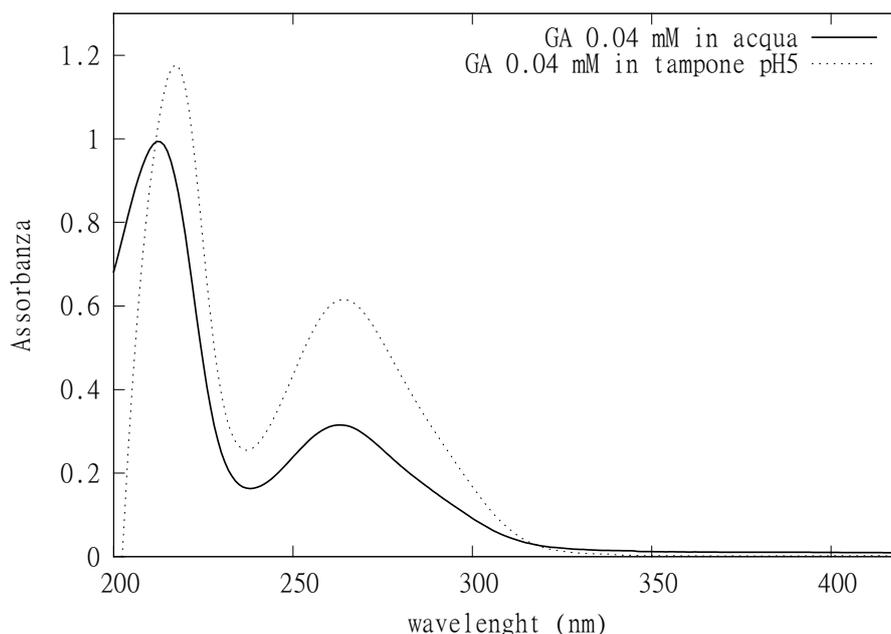
### 3.3.1 Transizioni elettroniche in GA

Le soluzioni di acido gallico sono incolori ma il composto manifesta un forte assorbimento nell'UV con due bande particolarmente intense, note come banda (I) a 263 nm e banda (II) a 212 nm. La posizione esatta del picco dipende dallo stato di ionizzazione delle molecole di acido gallico. L'elevato coefficiente di estinzione molare impone di lavorare con concentrazioni di acido gallico inferiori a  $10^{-3}$ M per evitare assorbanze eccessivamente elevate.

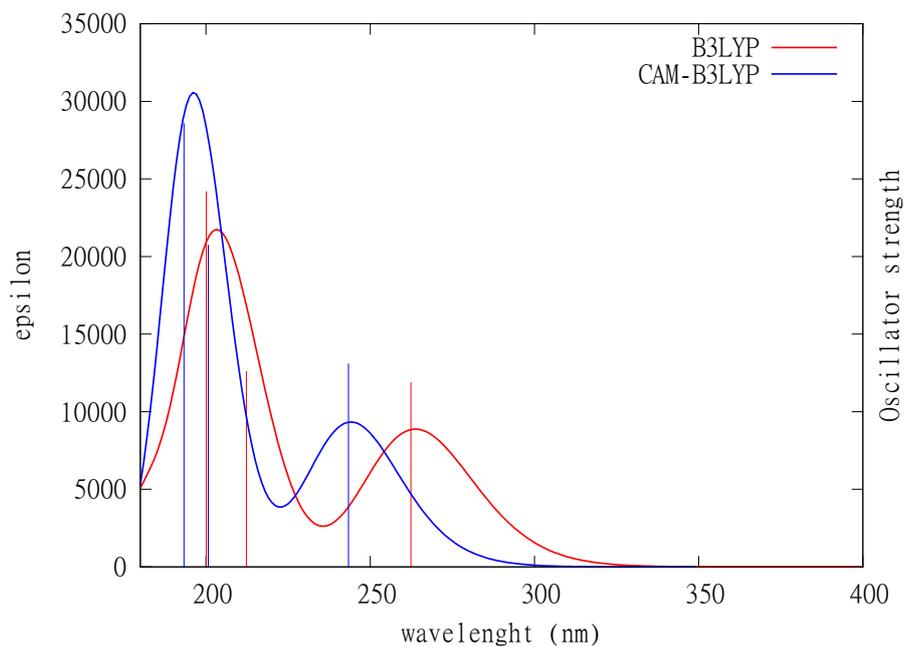
In figura 3.4 sono riportati gli spettri di assorbimento di acido gallico in acqua e in tampone a pH 5. I due spettri sono molto simili, la presenza del tampone non ha effetti significativi sullo spettro ad eccezione del fatto che anch'esso ha un elevato assorbimento nell'UV e quindi rende difficile la misura corretta dall'assorbanza a  $\lambda < 210$  nm se nella cella di riferimento è presente come bianco il tampone alla stessa concentrazione del campione per errori di sottrazione strumentale.

Lo spettro UV-VIS di GA è correttamente riprodotto dal calcolo TD-DFT. I due spettri riportati in figura 3.5 sono calcolati testando due funzionali diversi, B3LYP e CAM-B3LYP. Entrambi i funzionali ben riproducono l'intensità relativa delle due bande e in particolare il B3LYP riproduce più fedelmente la posizione dei massimi mentre il CAM-B3LYP tende a sovrastimare le energie di eccitazione.

Dall'analisi degli orbitali molecolari emerge che la banda (I), ad energie di eccitazioni minori, deriva essenzialmente una transizione HOMO-LUMO di tipo  $\pi - \pi^*$ . L'orbitale molecolare HOMO coinvolge principalmente l'anello aromatico mentre il LUMO ha importanti

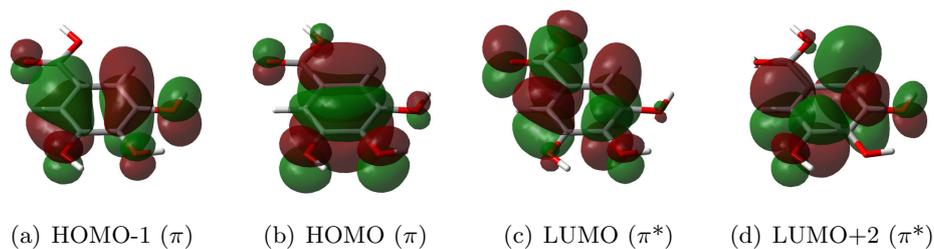


**Figura 3.4:** Spettro UV-Vis dell'acido gallico  $[GA]=4 \cdot 10^{-5}$  mol/L in acqua e in tampone AcOH/AcNa 0.01 M a pH 5.



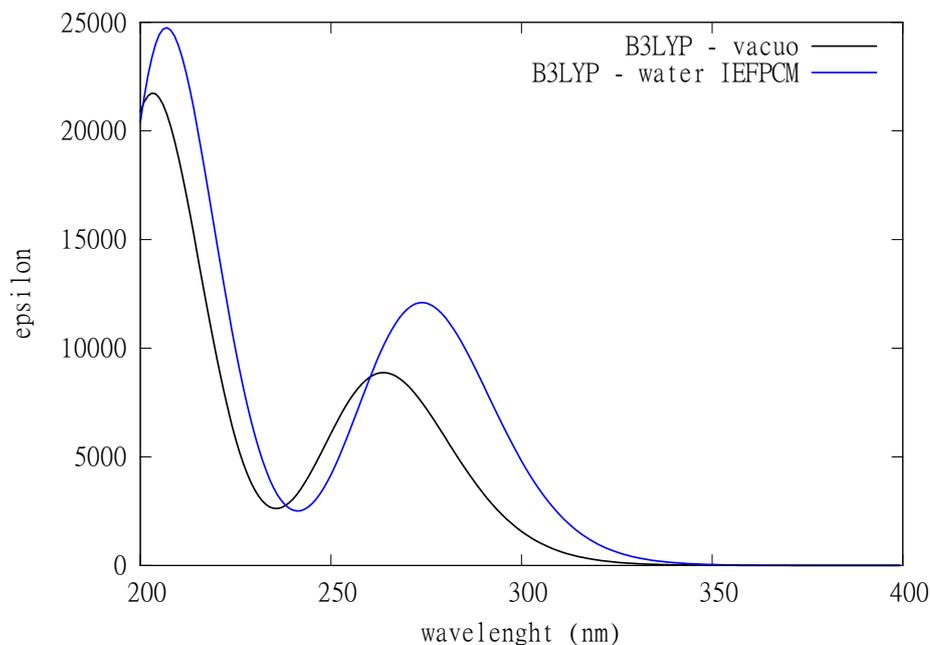
**Figura 3.5:** Spettro UV-Vis simulato a livello TDDFT/6-311+G(d,p) in vuoto. I segmenti verticali indicano l'energia delle transizioni elettroniche; la forma della spettro è ottenuta mediante una combinazione lineare di funzioni gaussiane, ciascuna centrata su ogni riga di assorbimento.

contributi anche da parte del gruppo carbonilico. La banda (II) è costituita invece dalla parziale sovrapposizione di due transizioni, che coinvolgono ancora orbitali di tipo  $\pi - \pi^*$ , in particolare HOMO - LUMO+2 e HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO+2, schematizzati in figura 3.6.



**Figura 3.6:** Rappresentazione grafica degli orbitali di frontiera in GA.

L'effetto dell'ambiente sulle transizioni elettroniche è principalmente di tipo elettrostatico e lo shift delle bande di assorbimento dovuto al solvente è quasi del tutto recuperato utilizzando un modello di solvente continuo [37]. L'effetto del solvente è batocromo con uno spostamento dei picchi di assorbimento di 10 nm per la banda (I) che si rivela più sensibile all'effetto di un campo elettrostatico esterno rispetto alla la banda (II) che si sposta di soli 3 nm.



**Figura 3.7:** Spettri UV-VIS di GA simulati a livello TDDFT B3LYP/6-311+G(d,p) in vuoto e in acqua (modello di solvatazione continuo IEFPCM).

### 3.4 Analisi strutturale dei complessi ferro-gallici

Dopo aver descritto le proprietà di GA, prendiamo adesso in esame il suo complesso binario con il  $\text{Fe}^{2+}$  che costituisce il nostro modello molecolare del colorante. Come evidenziato nel lavoro di *Li-Lu et al.* del 2009 [12], in letteratura non sono presenti studi teorici sistematici su  $\text{GAFe(II)}$  e ulteriori ricerche nella letteratura più aggiornata confermano che i complessi ferro-gallici non sono mai stati trattati dal punto di vista modellistico. Per questi motivi è interessante approfondirne le proprietà strutturali e spettroscopiche, con l'obiettivo di acquisire una conoscenza chimico-fisica che ci permetta di studiarne successivamente le interazioni con gli amminoacidi liberi e con la catena polipeptidica.

Recentemente *Russo e co.* [39] si è occupato dello studio teorico a livello DFT di un semplice flavonoide, la quercetina. Tale sistema presenta una maggiore complessità strutturale rispetto all'acido gallico in quanto è caratterizzato da un nucleo flavonoide formato da due anelli benzenci legati tra loro attraverso un anello eterociclico piranoico. Nello studio si prendono in considerazione i complessi del polifenolo con il  $\text{Fe}^{2+}$ , valutando la stabilità dei complessi metallo-legante 1:1 e 1:2, in vuoto e in solvente, ottimizzando diversi isomeri che differiscono per il sito di attacco del  $\text{Fe}^{2+}$ . Studi simili sono stati successivamente condotti sulla quercetina, e suoi derivati, con ferro e altri metalli [40, 41]. In tutti i sistemi investigati si riconosce l'effetto di donazione elettronica del leganti al centro metallico, noto come *Ligand to Metal Charge Transfer* (LMCT), che viene valutato attraverso l'analisi strutturale, l'analisi delle cariche, lo studio degli orbitali molecolari di frontiera e della transizioni elettroniche. L'analogia tra questi sistemi e il complesso  $\text{GAFe(II)}$  suggerisce uno sviluppo della discussione basato su un sistematico esame delle proprietà del complesso ferro-gallico, seguendo la strategia proposta negli studi su sistemi simili.

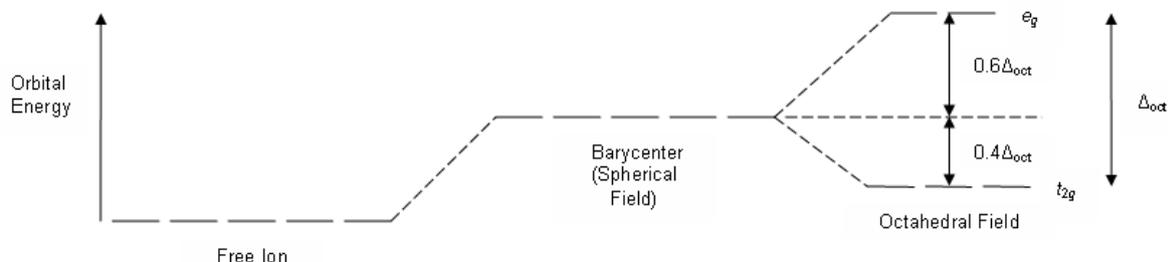
#### 3.4.1 Generalità sui complessi di $\text{Fe(II)}$

La maggior parte dei complessi con il catione  $\text{Fe}^{2+}$  è esacoordinata, con una geometria ottaedrica, anche se talvolta si trovano complessi con alogenuri con geometria tetraedrica. La configurazione elettronica del catione  $\text{Fe}^{2+}$  è di tipo  $d^6$  e la previsione dei possibili stati di spin del centro metallico può essere fatta applicando la teoria del campo dei leganti (LFT).

La teoria del campo dei leganti fornisce una descrizione del legame nei complessi dei metalli di transizione basata sull'interazione elettrostatica tra il centro metallico, considerato come uno ione di carica positiva pari al suo numero di ossidazione, e i leganti negativi (o neutri) che lo circondano, in grado di donare una coppia di elettroni al centro metallico. È evidente che il modello LFT fornisce una descrizione qualitativa della struttura elettronica che è comunque in grado di spiegare gli spettri elettronici più semplici e le proprietà magnetiche dei complessi.

Nello ione metallico isolato i cinque orbitali  $d$  sono degeneri. Quando attorno al metallo viene avvicinato un campo sfericamente simmetrico di cariche negative l'energia degli orbitali si innalza a causa della repulsione degli elettroni presenti sul metallo ma la degenerazione è comunque mantenuta. In generale, però, i leganti reali si dispongono con una simmetria

inferiore a quella sferica, pertanto gli orbitali  $d$  del metallo non interagiscono più tutti allo stesso modo e l'energia si innalza in modo diverso a seconda della geometria del campo dei leganti e della simmetria degli orbitali atomici, generando uno *splitting* energetico tra gruppi di orbitali.



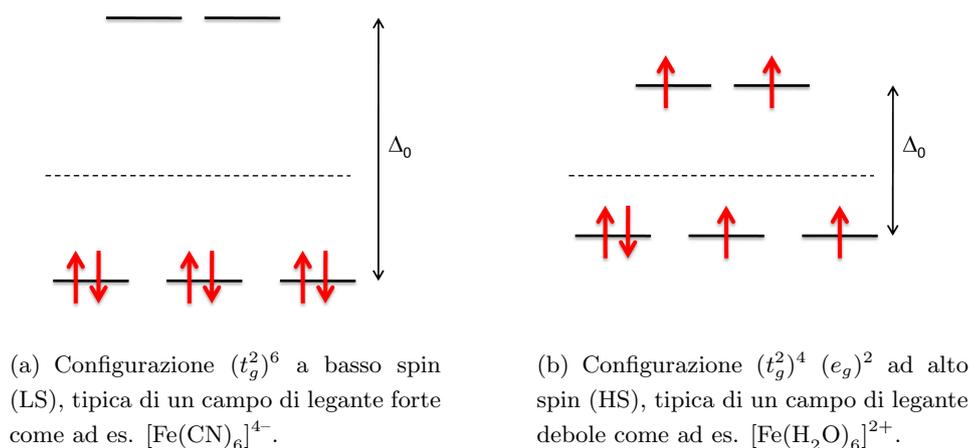
**Figura 3.8:** Schematizzazione dell'energia degli orbitali  $d$  per effetto dell'interazione con un campo di leganti ottaedrico. A sinistra è rappresentata l'energia degli orbitali  $d$  degeneri dell'atomo isolato, al centro l'energia degli orbitali sale per effetto di un campo sferico (leganti che si avvicinano da lontano) e a destra è rappresentato lo *splitting* energetico dovuto alla geometria ottaedrica assunta dai leganti.

Nella figura 3.8 è schematizzato lo *splitting* dovuto ad un campo di leganti ottaedrico. Il parametro  $\Delta_O$  esprime la differenza di energia tra i due gruppi di orbitali di simmetria a più bassa energia ( $t_g^2$ ) e ad energia più alta ( $e_g$ ). Il baricentro energetico degli orbitali rimane pari a quello degli orbitali nel campo sferico. Per mantenere invariato il baricentro energetico gli orbitali  $t_g^2$  sono stabilizzati nella misura  $0.4 \Delta_O$  e questa quantità è chiamata proprio energia di stabilizzazione del campo cristallino.

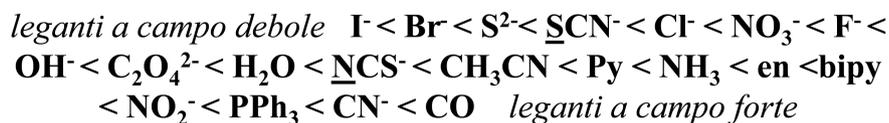
Per gli ioni metallici con configurazione  $d^1-d^3$  la disposizione degli elettroni negli orbitali seguirà la regola di Hund, occupando i tre orbitali a più bassa energia. Nel caso  $d^6$  questo non è possibile e necessariamente almeno uno degli elettroni dovrà appaiarsi nel livello  $t_{2g}$ , come illustrato nella rappresentazione (b) della figura 3.9. L'appaiamento di un elettrone innalza l'energia del sistema di una quantità  $P$ , chiamata energia di appaiamento.

Se la separazione dei livelli energetici è piuttosto grande, è possibile che l'energia spesa per ottenere l'appaiamento degli elettroni sia comunque inferiore a quella derivante dalla stabilizzazione del campo cristallino. In questo caso il complesso può assumere la configurazione a guscio chiuso rappresentata nella figura 3.9 (a).

Il valore di  $\Delta_O$  dipende da diversi fattori, tra i quali: la natura dei leganti e la carica del centro metallico. I cationi trivalenti in genere si trovano generalmente nello stato di LS in quanto l'alta carica garantisce un'elevata separazione energetica. Negli altri casi invece sono possibili entrambe le configurazioni ed è principalmente la natura dei leganti a determinarne la configurazione elettronica. Sulla base di osservazioni sperimentali relative ad un grande numero di complessi con diversi centri metallici e leganti, è stato possibile costruire la serie spettrochimica dei leganti, riportata in figura 3.10 che ordina i leganti in base alla loro attitudine a determinare un campo debole o un campo forte [42, 10].



**Figura 3.9:** Diagramma dei livelli energetici degli orbitali d in un campo ottaedrico relativo ad una configurazione elettronica di tipo  $d^6$ .



**Figura 3.10:** Serie spettrochimica dei leganti.

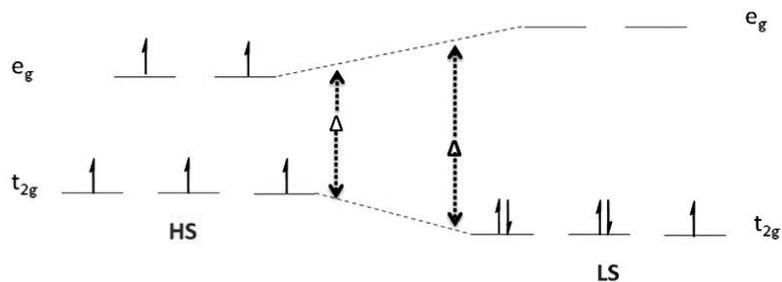
### Come prevedere lo stato di spin per il complesso $\text{GAFe(II)}$ ?

Dalle considerazioni generali della LFT, possiamo facilmente prevedere che il  $\text{Fe(II)}$ , per una geometria di tipo ottaedrico, sia stabile in due stati di spin: uno stato a basso spin (LS) di singoletto e uno stato ad alto spin (HS) di quintetto. Dal punto di vista quantomeccanico è importante stabilire lo stato di spin del sistema per avere una corretta descrizione della densità elettronica, delle interazioni di legame e quindi della geometria molecolare. Lo ione ottaedrico esaquoferroso  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , ad esempio, esiste in soluzione acquosa nello stato di alto spin, in accordo con la posizione del legante  $\text{H}_2\text{O}$  all'interno della serie spettrochimica mentre lo stato a basso spin è noto per l'analogo complesso esacianoferroso  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Questi due composti sono esempi classici che rappresentano i due casi estremi [42].

Una predizione realistica dello spin dello stato fondamentale dei metalli di transizione rimane un compito difficoltoso sia per la teoria che per l'esperimento. Dal lato sperimentale la situazione può essere complicata da reazioni di scambio di leganti, processi di dimerizzazione, di ossidazione/riduzione, di impurezze etc. In linea di principio, la teoria dovrebbe aiutare nell'interpretazione dei dati sperimentali predicendo lo spin dello stato fondamentale ma in realtà anche dal punto di vista teorico la questione non è priva di problemi [43].

Il quadro generale è complicato dal fatto che per alcuni complessi, in particolare quelli contenenti metalli della prima serie di transizioni aventi configurazione elettronica  $d^4$ - $d^7$ , come ad esempio  $\text{Fe}^{2+}$  ( $d^6$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  ( $d^5$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $d^7$ ), esibiscono il fenomeno dell' *Spin CrossOver* (SCO), sia allo stato solido che in soluzione acquosa, quando si trovano in una geometria ottaedrica e in particolare proprio  $\text{Fe(II)}$  e  $\text{Fe(III)}$  sono i centri metallici per i quali sono noti

il maggior numero di composti SCO. [44] Lo SCO è un fenomeno riferito alle transizioni e al comportamento all'equilibrio degli stati di spin che avviene per effetto di stimoli esterni come una variazione di temperatura, pressione, irradiazione con luce e influenza di un campo magnetico. Con riferimento alla LFT, la variazione dello stato di spin corrisponde ad una transizione da basso spin ad alto spin, o viceversa, della configurazione elettronica dello stato fondamentale dei degli orbitali atomici del centro metallico. Una variazione dell'energia di stabilizzazione del campo cristallino può determinare una configurazione HS o LS, come illustrato in figura 3.11.



**Figura 3.11:** Schematizzazione dell'effetto SCO per un complesso  $d^5$  ottaedrico. L'effetto di una perturbazione esterna, come ad esempio una variazione della temperatura, determina l'aumento dello splitting  $\Delta_O$  e favorisce la transizione  $LS \rightarrow HS$ .

I complessi di Fe(II) che presentano il fenomeno dello SCO sono caratterizzati in generale dalla presenza di polidentati<sup>4</sup> contenenti principalmente atomi di N e P come donatori. Esempi classici sono composti bipyrimidinici, fenantrolina, terpiridina, tetrazoli, isoazoli, fosfoalcani, fosfine, leganti contenenti gruppi NCS,  $N_2O_4$ . Per composti come GA o per leganti di amminoacidico, non si trovano in letteratura manifestazioni di questo fenomeno e quindi possiamo pensare che la molteplicità dello stato elettronico fondamentale, determinata dal campo dei leganti, non sia influenzata da perturbazioni esterne e che la frazione di molecole HS/LS dipenda esclusivamente dalla differenza energetica dei due isomeri:  $\Delta E_{el} = E_{el}^{HS} - E_{el}^{LS}$ .

Ad ogni modo i complessi SCO sono sistemi molecolari di grande interesse per la chimica computazionale in quanto permettono di testare i metodi di calcolo verificando la previsione del corretto stato di spin dello stato elettronico fondamentale. Le variazioni in termini di energia elettronica rispetto ai valori assoluti di energia elettronica calcolabili per i complessi sono dell'ordine delle ppm. Dal momento che l'energia di un complesso metallo di transizione non può essere calcolato con accuratezza maggiore di poche Kcal/mol è evidente che una valutazione della  $\Delta E$  dipenda da una cancellazione di errori che devono coinvolgere entrambi gli isomeri in modo analogo, evitando un effetto non fisico di stabilizzazione di un particolare stato di spin [45].

Una corretta previsione dello stato di spin del livello fondamentale potrebbe essere effettuata con metodi *ab-initio* molto accurati (CCSD, MRCI etc.) che richiedono però uno sforzo di calcolo notevole e non si adattano ad un impiego di routine. L'uso di un livello di calcolo

<sup>4</sup>Per legante polidentato intendiamo una molecola in grado di legarsi al centro metallico mediante due o più atomi donatori. Il complesso in questo caso prende il nome di *chelato*.

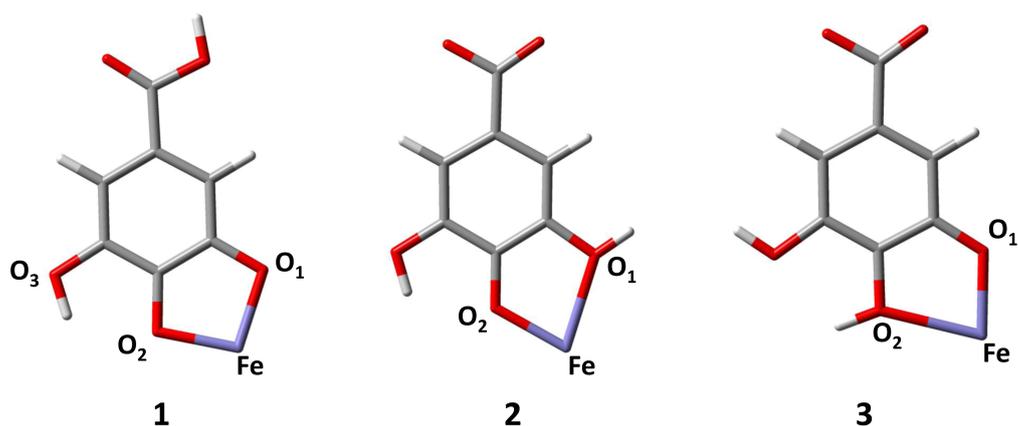
inferiore non porta sempre al corretto risultato, ad esempio i metodi *Hartree-Fock* favoriscono sistematicamente i sistemi ad alto spin per il fatto che la correlazione elettronica tra elettroni con spin opposto, in questo schema, non è contemplata. I metodi DFT, che invece riescono a descrivere meglio la correlazione elettronica, in genere prevedono il corretto stato di spin anche se in questo caso c'è una tendenza opposta verso la stabilizzazione dei sistemi ad alto spin. I risultati migliori in questo caso si ottengono con l'impiego di funzionali ibridi che contengono una percentuale di scambio Hartree-Fock minore, come ad esempio il funzionale OPBE [43] che sembra fornire ottimi risultati per la determinazione accurata delle energie per complessi con il ferro. Dal momento che il nostro interesse è comunque volto alla determinazione dello stato di spin più stabile piuttosto che ad un'accurata analisi delle differenze tra gli stati di spin che invece è interessante per i complessi SCO, l'impiego del funzionale M06, introdotto nella sezione 3.1, è in grado di fornire risultati attendibili sul corretto stato di spin dello stato elettronico fondamentale e può essere impiegato nel seguito dell'analisi.

### 3.4.2 Analisi strutturale di GAFe(II) in vuoto

L'ottimizzazione di geometria di diversi isomeri strutturali del complesso GAFe(II), con stechiometria 1:1, è stata effettuata a livello di calcolo DFT impiegando due diversi funzionali, B3LYP ed M06, con il set di base di funzioni Gaussiane 6-311G(d,p). Il complesso viene considerato globalmente neutro, come indicato in figura 2.6. L'analisi strutturale, in vuoto e in solvente, è stata effettuata sui complessi a basso spin nello stato di singoletto (LS) e sui complessi ad alto spin nello stato di quintetto (HS). La trattazione di sistemi a guscio chiuso (*closed-shell*) si basa sul fatto che la parte spaziale della funzione d'onda per una coppia di elettroni appaiati è la stessa (metodo *restricted*) mentre nel caso dei sistemi a guscio aperto (*open-shell*) questa approssimazione non è più valida e il vincolo di degenerazione deve essere rimosso (metodo *unrestricted*). Per questo motivo i calcoli su sistemi *closed-shell* sono molto più rapidi di quelli *open-shell* e richiedono circa la metà del tempo di calcolo impiegato per questi ultimi. L'effetto del solvente è stato trattato sia con un modello continuo (IEFPCM) che in modo esplicito, mediante l'aggiunta di molecole d'acqua fino a saturare le sfera di coordinazione del centro metallico.

I dati strutturali e le differenze relative di energia sono raccolti nella tabella 3.3 mentre nella figura 3.12 sono riportate le strutture ottimizzate per il complesso ad alto spin. L'analisi strutturale rivela che le strutture HS sono energeticamente molto più favorite rispetto a quelle LS e, in entrambi i casi, l'ordine relativo di stabilità è mantenuto. La struttura più stabile, sia in vuoto che in solvente, è la **1** in cui entrambi gli atomi di ossigeno che agiscono da leganti sono deprotonati ed è presente un'interazione tipo legame idrogeno tra il protone del gruppo fenolico e l'ossigeno O2, distanti 2.17 Å (HS in vuoto).

Nei complessi HS la geometria della struttura **1** è perfettamente planare e la distanza media Fe-O è di 1.83 Å. Il legame Fe-O2 è di poco più lungo rispetto a quello Fe-O1 e la differenza tra le due è dovuta alla formazione del legame ad idrogeno che impoverisce di densità elettronica O2 rendendolo meno efficace come donatore. Le strutture **2** e **3** differiscono tra loro di circa 4 Kcal/mol mentre la differenza di energia tra **1** e **2-3** è di circa 70 Kcal/mol



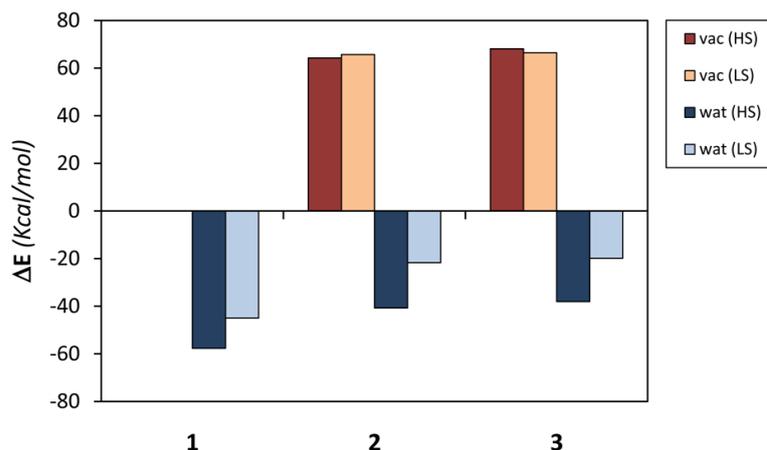
**Figura 3.12:** Strutture di GAF<sub>e</sub>(II) ottimizzate a livello M06/6-311G(d,p), in vuoto HS.

in vuoto; le distanze di legame Fe-O aumentano e nelle strutture **2-3**, in particolare dove l'ossigeno è protonato la lunghezza di legame raggiunge i 2.15 Å. L'aggiunta di un potenziale esterno dovuto alla presenza del solvente, simulato con un modello continuo, ha l'effetto di stabilizzare le strutture a più alta energia riducendo il gap tra la **1** e **2-3** a 20 Kcal/mol.

<i>struttura</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
$\Delta E_{HL}$	59.0	60.5	57.4
<b>r Fe-O1</b>	1.824 (1.723)	2.151 (1.934)	1.899 (1.713)
<b>r Fe-O2</b>	1.845 (1.848)	1.917 (1.733)	2.156 (1.930)
<i>struttura</i>	<b>1w</b>	<b>2w</b>	<b>3w</b>
$\Delta E_{HL}$	71.7	78.1	77.2
<b>r Fe-O1</b>	1.934 (1.807)	2.184 (1.963)	1.904 (1.801)
<b>r Fe-O2</b>	1.971 (1.893)	1.904 (1.812)	2.147 (1.956)
$\Delta E_{w-vac}$	57.7 (45.0)	105.0 (87.5)	106.2 (86.3)

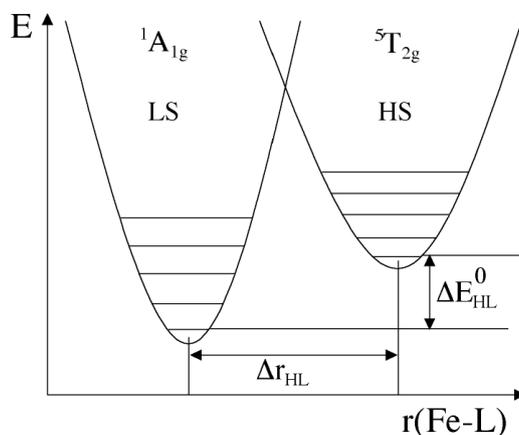
**Tabella 3.3:** Dati strutturali ed energetici per il complesso GAF<sub>e</sub>(II) ottimizzato a livello di calcolo M06/6-311G(d,p), HS in vuoto.  $\Delta E_{HL}$  esprime la differenza di energia (in Kcal/mol) tra la struttura ad alto spin e l'analoga struttura a basso spin ed è definito come:  $\Delta E_{HL} = E_{LS} - E_{HS}$ .  $\Delta E_{w-vac}$  è la differenza di energia (Kcal/mol) tra le strutture in vuoto e in solvente, calcolata come  $\Delta E_{w-vac} = E_{vac} - E_w$ , dove le strutture "w" fanno riferimento a quelle idratate IEFPCM. Le distanze di legame sono riportate in Å e tra parentesi i valori relativi alle strutture LS.

Nei complessi LS la differenza di energia tra la struttura stabile **1** e le due strutture ad alta energia è analoga al caso HS e il solvente tende a stabilizzare queste ultime. La differenza tra le distanze Fe-O nelle tre strutture è dello stesso ordine di grandezza di quella osservata per le strutture ad alto spin. Dal punto di vista strutturale, a parità di geometria di coordinazione, è noto che lo stato di spin del complesso influenza la distanza di legame tra centro metallico e leganti. La regola generale indica che le distanze di legame siano sostanzialmente più grandi



**Figura 3.13:** Variazione di energia delle diverse strutture, ottimizzate a livello di calcolo M06/6-311g(d,p) in vuoto, calcolata rispetto alla struttura **1**. Le differenze sono espresse in Kcal/mol. Le strutture “wat” fanno riferimento a quelle idratate IEFPCM.

dei rispettivi complessi a basso spin. Questo è dovuto principalmente al fatto che, nello stato HS, due dei sei elettroni di tipo  $d$  popolano gli orbitali di non legame  $e_g$  mentre nello stato di basso spin tutti gli elettroni  $d$  risiedono negli orbitali leganti. Nel nostro caso, come previsto dalla teoria del campo cristallino, si ottengono infatti distanze di legame Fe-O più corte di circa  $0.2 \text{ \AA}$  per i complessi a basso spin.



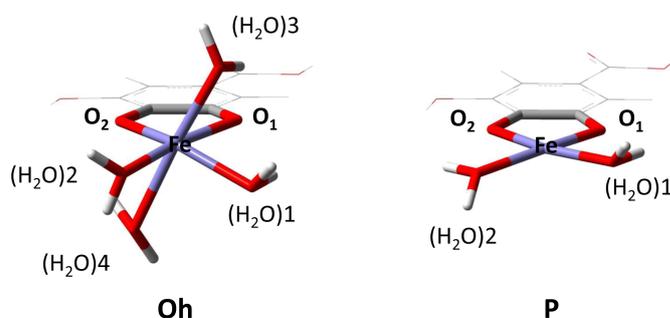
**Figura 3.14:** Rappresentazione schematica delle curve di energia potenziale adiabatica per stati di alto e basso spin per un complesso ottaedrico in funzione della variazione della coordinata di spostamento totalsimmetrico  $r(\text{Fe-L})$  [44].

I risultati ottenuti con il funzionale B3LYP sono analoghi a quelli ottenuti con M06. I due funzionali sono in accordo sia per quanto riguarda l'ordine di stabilità che per l'andamento delle distanze di legame e in generale il B3LYP fornisce distanze Fe-O mediamente più corte di  $0.02 \text{ \AA}$  rispetto ad M06. Da segnalare che l'ottimizzazione di geometria con il funzionale B3LYP in vuoto porta ad ottenere le strutture **2** e **3** non perfettamente planari.

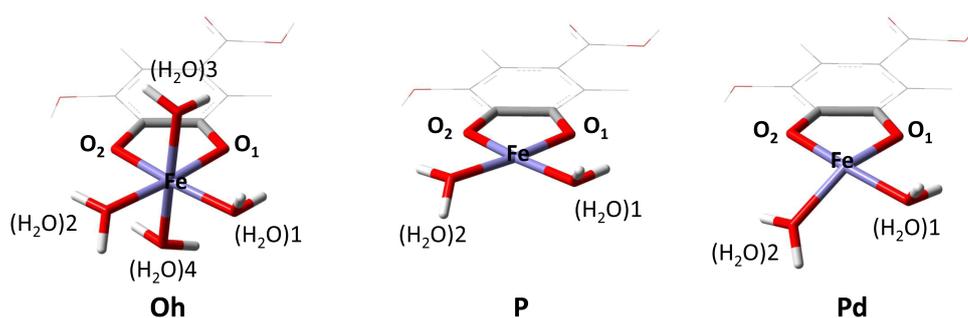
L'analisi strutturale indica chiaramente che la struttura energeticamente favorita è la **1** e che difficilmente gli atomi di ossigeno che si legano al centro metallico potranno essere protonati, a meno che l'ambiente non sia fortemente acido. La struttura ad alto spin è energeticamente favorita e il gallato esibisce un comportamento da legante "a campo debole", analogo a quello osservato per il complesso esaquoferroso che esiste nello stato HS.

### 3.4.3 Complessi GAF<sub>e</sub>(II) idratati

È noto che il catione Fe<sup>2+</sup> in soluzione acquosa è presente sotto forma di aquocomplesso con un numero variabile di molecole d'acqua e solitamente la forma idrata più stabile è quella con coordinazione ottaedrica [39]. Per questo motivo sono state aggiunte al complesso due e quattro molecole d'acqua per formare rispettivamente i complessi tetra- ed esacordinati. Le strutture ottimizzate ad alto e basso spin sono riportate nelle figure 3.16 e 3.15 e si ottengono strutture esacordinate con geometria ottaedrica **Oh** e tetraordinate, planari **P**.



**Figura 3.15:** Strutture dei complessi  $[GAFe(H_2O)_m]$ ,  $m=2, 4$ , ottimizzate a livello di calcolo M06/6-311G(d,p), in vuoto HS.



**Figura 3.16:** Strutture dei complessi  $[GAFe(H_2O)_m]$ ,  $m=2, 4$ , ottimizzate a livello di calcolo M06/6-311G(d,p), in vuoto LS.

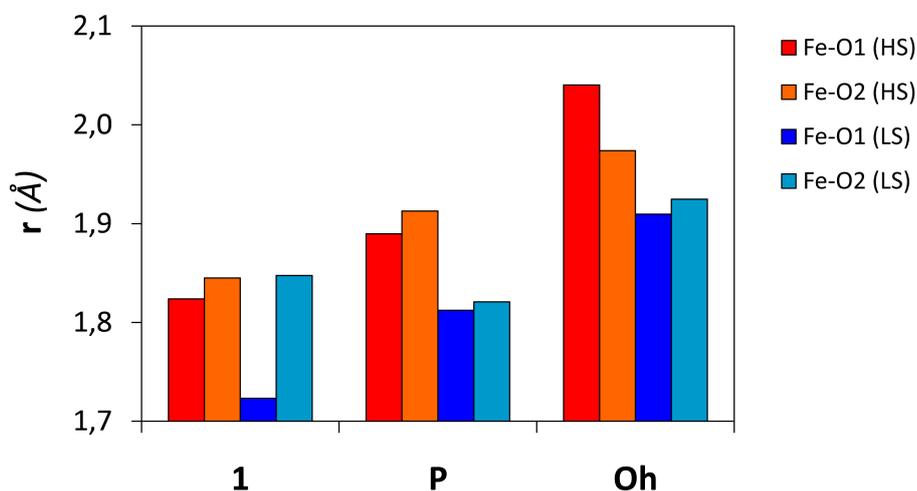
Per il complesso LS è presente anche una struttura di tipo planare distorto **Pd**, più stabile di quella planare per circa 10 Kcal/mol. È interessante notare che questo tipo di struttura distorta la ritroveremo anche in seguito nell'analisi delle strutture del complesso GAF<sub>e</sub>(II) con gli amminoacidi liberi. Nel caso HS la struttura **Pd** invece non è stabile e anche partendo da

un *guess* di geometria di tipo tetraedrico, alla fine dell'ottimizzazione, si ottiene una struttura perfettamente planare.

	<b>Oh</b>		<b>P</b>		<b>Pd</b>	
$\Delta E_{HL}$	34.4		61.2		-	
<b>r Fe-O1</b>	2.040	(1.910)	1.890	(1.812)	-	(1.774)
<b>r Fe-O2</b>	1.974	(1.925)	1.913	(1.821)	-	(1.892)
<b>r Fe-(H<sub>2</sub>O)1</b>	2.159	(2.045)	2.091	(1.962)	-	(2.003)
<b>r Fe-(H<sub>2</sub>O)2</b>	2.119	(2.045)	2.074	(1.964)	-	(1.918)
<b>r Fe-(H<sub>2</sub>O)3</b>	2.203	(2.020)				
<b>r Fe-(H<sub>2</sub>O)4</b>	2.310	(2.020)				

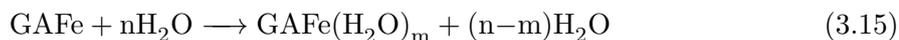
**Tabella 3.4:** Dati strutturali dei complessi GAFe(II) idratati ottimizzati a livello di calcolo M06/6-311G(d,p), in vuoto HS.  $\Delta E_{HL}$  esprime la differenza di energia (in Kcal/mol) tra la struttura ad alto spin e l'analoga struttura basso spin ed è definito come:  $\Delta E_{HL}=E_{HS}-E_{LS}$ . Le distanze di legame sono espresse in Å e tra parentesi sono riportati i valori per le strutture LS.

Le distanze di legame Fe-O sono più lunghe rispetto al complesso nudo. Questo fatto suggerisce che le molecole d'acqua aggiunte alla sfera di coordinazione rendono più debole il legame Fe-O sia per un effetto di ingombro sterico che di donazione di carica che riduce la carica positiva del centro metallico. Le differenze delle lunghezze di legame Fe-O dei complessi idratati rispetto al complesso in vuoto sono riportati nel grafico 3.17.



**Figura 3.17:** Andamento delle distanze di legame, espresse in Å, relative ai legami Fe-O delle strutture **1**, **P** e **Oh** ad alto spin e basso spin, calcolate a livello di calcolo M06/6-311g(d,p).

Anche in questo caso i complessi ad alto spin sono energeticamente favoriti e un'analisi delle *binding energy* (BE), calcolata sulla base dell'equazione:



indica che il complesso esacoordinato è energeticamente favorito con un valore di BE pari a -112.9 Kcal/mol contro i -68.7 Kcal/mol del tetraordinato planare (HS), confermando che il Fe<sup>2+</sup> predilige una geometria ottaedrica.

### 3.4.4 Analisi delle cariche NBO

L'effetto di donazione dei leganti è stato indagato attraverso un'analisi di popolazione tipo NBO. Nella tabella 3.5 riportiamo il valore delle cariche del centro metallico e dei leganti (calcolate come somma delle cariche sull'atomo di O e di C ad esso legato) che risultano gli atomi più sensibili alla variazione di carica dovuta all'aggiunta delle molecole d'acqua e alla diversa molteplicità del centro metallico.

In tutti i casi la carica sul centro metallico è inferiore a  $+2q$ , compatibile con l'esistenza di un trasferimento di carica dal metallo al catione. È interessante notare la differenza di carica marcata che si ha per il ferro nei diversi stati di spin: passando dal caso LS al caso HS la carica positiva sul centro metallico aumenta e parallelamente cresce la carica negativa sui leganti. Questo andamento sembra indicare che il trasferimento di carica  $O^- \rightarrow Fe^{2+}$  è meno efficiente nel caso HS. Il fatto che il complesso HS risulti più stabile dal punto di vista energetico dipende da una descrizione elettronica quantomeccanica e non può essere semplicemente descritto come un'interazione elettrostatica classica tra centro metallico e leganti.

L'effetto di donazione di carica dovuto all'aggiunta delle molecole d'acqua accentua la carica negativa presente sul centro metallico (le molecole di acqua risultano infatti mediamente cariche positivamente di  $+0.22q$ ) e accresce le differenze di carica del Fe tra i due stati di spin.

	GAF <sub>e</sub> (II)		GaFe(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub>	
	<b>1</b>		<b>Oh</b>	
Fe	1.52	( 1.30)	1.02	( 0.48)
O1	-0.60	( -0.54)	-0.51	( -0.44)
O2	-0.52	( -0.38)	-0.55	( -0.51)

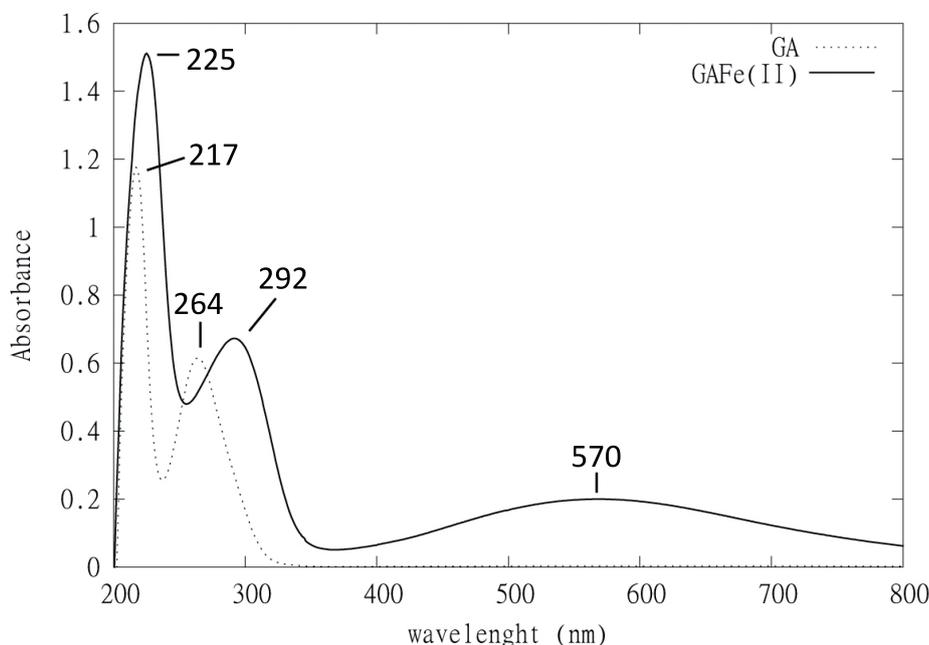
**Tabella 3.5:** Cariche NBO calcolate in vuoto a livello M06/6-311++G(2d,p) sulla geometria ottimizzata delle strutture **1** e **Oh**. Tra parentesi il valore per le strutture LS.

### 3.4.5 Transizioni elettroniche in GAF<sub>e</sub>(II)

In laboratorio sono state effettuate misure di assorbimento UV-Vis su complessi ferro-gallici, a supporto del lavoro teorico e per verifica dei risultati riportati nei lavori di letteratura discussi nella sezione 2.1. Le misure sono state condotte utilizzando soluzioni preparate di fresco ma senza l'impiego di un'atmosfera controllata. Le specifiche dei reagenti sono riportate in Appendice A.

Il mescolamento di soluzioni di GA e di solfato ferroso determina la comparsa, entro pochi minuti, di una colorazione bluastra attribuibile al complesso GAF<sub>e</sub>(II). La velocità di formazione del complesso è fortemente dipendente dalla concentrazione dei reagenti e dal pH. Gli spettri registrati sono acquisiti in soluzione acquosa neutra oppure in ambiente tamponato con tampone CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa a pH=4. La scelta del pH deriva dal fatto che a pH acidi la reazione di ossidazione del Fe<sup>2+</sup> è rallentata e inoltre questo valore di pH è quello caratteristico del bagno di tintura naturale (vedi sezione 1.2).

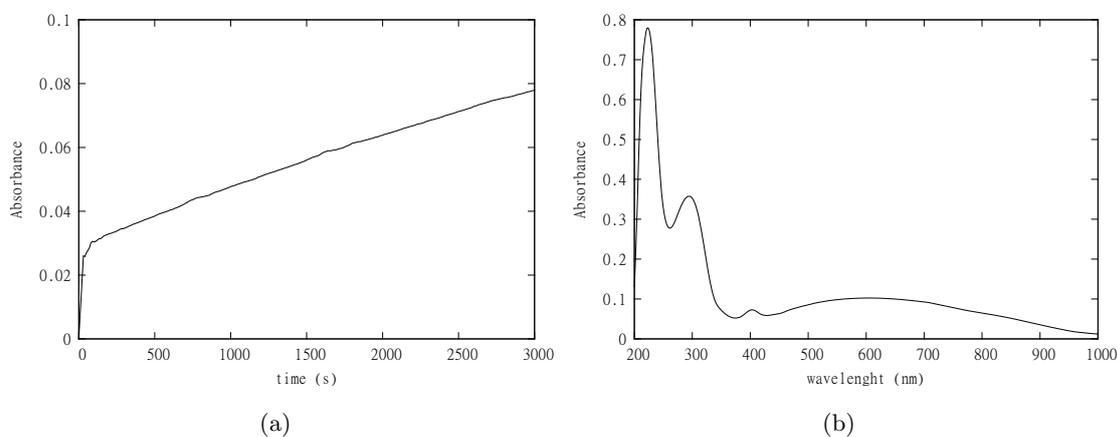
Sperimentalmente, in seguito alla formazione del complesso, le bande di assorbimento di GA subiscono un effetto batocromo di 30 nm per banda (I) e di 8 nm per la banda (II). Il rapporto tra le intensità relative delle due bande si mantiene costante; la banda (I) subisce un leggero allargamento e compare una nuova banda molto larga intorno a 570 nm, responsabile della colorazione blu scura del complesso. Nella figura 3.18 sono riportati gli spettri sovrapposti di GA libero e del complesso (registrato dopo 5 minuti dalla sua preparazione). Il risultato è coerente con quanto riportato in letteratura.



**Figura 3.18:** Spettro UV-Vis di GA (linea tratteggiata)  $[GA]=0.08 \cdot 10^{-3}$  mol/L e del complesso GAF<sub>e</sub>(II)  $[Fe(II)]=0.004$  mol/L,  $[GA]=0.08 \cdot 10^{-3}$  mol/L (linea continua), in soluzione acquosa tamponata a pH 4 con CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa 0.01M.

Gli studi cinetici condotti da *Lu et al.* [12] in atmosfera controllata in assenza di ossigeno,

mostrano curve cinetiche relative alla formazione del complesso GAF<sub>e</sub>(II) in cui il valore di assorbanza a 570 nm raggiunge un *plateau* dopo circa 15 minuti. Ripetendo la misura in laboratorio, nelle stesse condizioni di concentrazione, ma in assenza di uno stretto controllo dell'ossigeno, si ottengono i risultati riportati in figura 3.19.

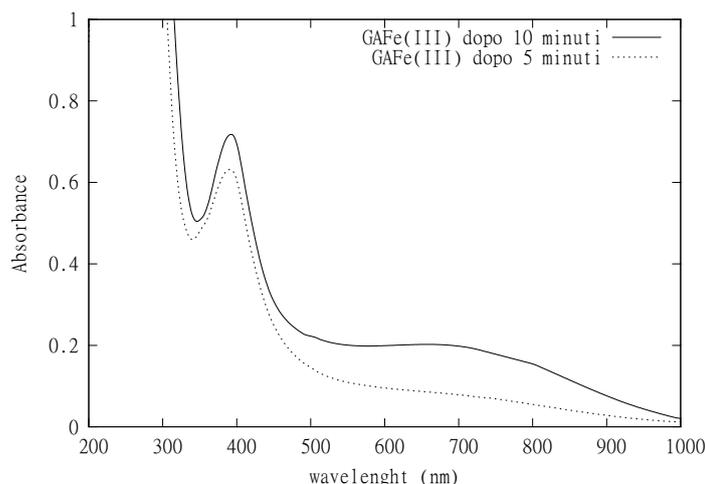


**Figura 3.19:** (a) Cinetica di formazione del complesso GAF<sub>e</sub>(II). L'assorbanza è valutata a 570 nm in funzione del tempo, in condizioni di pseudo-primo ordine, a pH=4. GA=0.04·10<sup>-3</sup> mol/L, [Fe<sup>2+</sup>]=0.01 mol/L. (b) Spettro UV-Vis del complesso GAF<sub>e</sub>(II) registrato dopo 150 minuti.

In questo caso si nota che l'assorbanza continua a crescere senza raggiungere un valore costante entro tempi ragionevoli; ciò indica che dopo 50 minuti la reazione non ha ancora raggiunto uno stato di equilibrio. Possiamo quindi formulare due ipotesi: (1) la formazione del complesso in queste condizioni sperimentali è molto lenta; (2) la specie che si forma all'inizio della reazione, responsabile della comparsa dell'assorbimento a 570 nm, non è stabile e man mano che si forma reagisce per dare un altro prodotto avente uno spettro di assorbimento simile, ma un diverso coefficiente di estinzione. Gli studi condotti senza controllo dell'ossigeno indicano che la formazione del complesso prosegue per alcuni giorni; nel lavoro di *Jančovičova et al* [17] si riporta infatti che il massimo valore di assorbanza viene raggiunto dopo 7 giorni<sup>5</sup>. È evidente che una cinetica di questo tipo non si può spiegare ipotizzando una semplice reazione di complessazione, ma è necessario tenere conto che nell'ambiente di reazione avvengono anche altri fenomeni più articolati. Il fatto che la banda di assorbimento nel visibile sia così slargata purtroppo non permette di interpretare a fondo quali fenomeni avvengano in soluzione. Un dato interessante che emerge esaminando lo spettro UV-Vis del campione dopo circa 150 minuti dall'inizio della reazione è però la comparsa di un assorbimento intorno a 400 nm, riconducibile al chinone che deriva dall'ossidazione di GA ad opera di agenti ossidanti quali, ad esempio, ioni Fe<sup>3+</sup>. La forma dello spettro UV-Vis relativo alla formazione del complesso GAF<sub>e</sub>(III) a partire da GA e FeCl<sub>3</sub> (figura 3.20) ci fornisce una conferma che la specie assorbente deriva dalla presenza di ioni ferrici in soluzione.

Osserviamo inoltre che in questo caso la colorazione visibile ad occhio nudo è più scura rispetto al caso precedente ed è caratterizzata da una tonalità diversa, presumibilmente per

<sup>5</sup>[GA]=0.18·10<sup>-3</sup> mol/L, [Fe<sup>2+</sup>]=0.61·10<sup>-3</sup> in soluzione acquosa.



**Figura 3.20:** Spettro UV-Vis di GAFe(III),  $[GA]=0.08$  mmol/L,  $[Fe^{3+}]=0.08$  mmol/L, in soluzione acquosa acidificata a pH 2.5 con HCl.

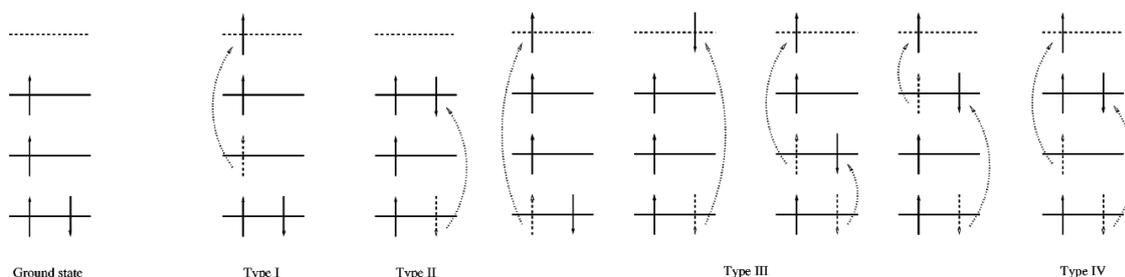
effetto dell'assorbimento intorno a 400 nm. Con soluzioni diluite di reagenti equimolari le assorbanze risultano nettamente più elevate rispetto al caso  $Fe^{2+}$ , a conferma del fatto che la specie GAFe(III) è caratterizzata da un coefficiente di estinzione più elevato. Il picco di assorbimento relativo al composto chinonico non è invece rilevabile nei primi minuti della formazione del complesso GAFe(II), come si può notare dallo spettro UV-Vis in figura 3.18 che non presenta alcuna banda apprezzabile in quella finestra spettrale.

### Interpretazione teorica delle transizioni elettroniche

L'analisi strutturale indica che lo stato elettronico fondamentale dei complessi GAFe(II) è quello ad alto spin di quintetto. Tenuto conto di ciò diventa molto difficile ottenere la corretta energia di eccitazione per sistemi con una molteplicità così elevata. I comuni metodi TD-DFT, largamente utilizzati in campo modellistico, permettono infatti di simulare con buoni risultati gli spettri di assorbimento per sistemi *closed-shell* in cui si vi sono eccitazioni mono-elettroniche di tipo  $S^0 \rightarrow S^1$  mentre solo un ristretto numero di lavori tratta delle energie di eccitazione e delle proprietà di stato eccitato di sistemi *open-shell*, come ad esempio radicali organici e composti di metalli di transizione. Il limitato range di applicazione del TDDFT ai sistemi *open-shell* è probabilmente legato alla difficoltà della trattazione della simmetria degli spin molecolari all'interno della teoria DFT, aspetto cruciale per i calcoli di proprietà molecolari che si basano sulla conoscenza della densità di spin reale (imperturbata) del sistema. I comuni metodi TDDFT, applicabili al calcolo delle energie di eccitazione in molecole *open-shell*, sono basati sul formalismo *unrestricted* di Kohn-Sham e sono affetti dal problema della contaminazione di spin, specie se il momento angolare di spin totale  $\langle S^2 \rangle$  viene valutato usando il modello delle particelle non interagenti o del gas omogeneo di elettroni [46, 47]. Anche se molti sforzi sono stati condotti elaborando nuove teorie basate su manipolazioni del modello originale, come ad esempio l'approccio *unrestricted open TDDFT*, TRICKS-TDDFT, etc..., queste non sono direttamente implementate all'interno del software di calcolo da noi

utilizzato e costituiscono ancora applicazioni di nicchia la cui reale efficacia nella predizione delle eccitazioni deve essere confermata.

Un'altra possibilità è la scelta di impiegare metodi *post-HF*, come ad esempio metodi CASSCF e MRCI, che sono in grado di fornire una trattazione più raffinata della correlazione elettronica e di descrivere eccitazioni complesse grazie all'inclusione di più determinanti nella funzione d'onda molecolare. In questo caso però sorgono inevitabilmente problemi derivanti dalla dimensione del sistema. L'impiego di questi metodi, inoltre, non è un'operazione di routine e richiede un'approfondita conoscenza delle tecniche e del sistema molecolare che permetta di definire in modo corretto lo spazio attivo e i determinanti da includere nel calcolo per la descrizione corretta delle eccitazioni. A titolo di esempio riportiamo in figura 3.21 uno schema delle possibili transizioni riguardanti l'eccitazione di un singolo elettrone a partire da un livello fondamentale con elevata molteplicità di spin. Un lavoro di questo tipo esula dagli scopi della nostra tesi e non aggiungerebbe comunque informazioni significative all'analisi.



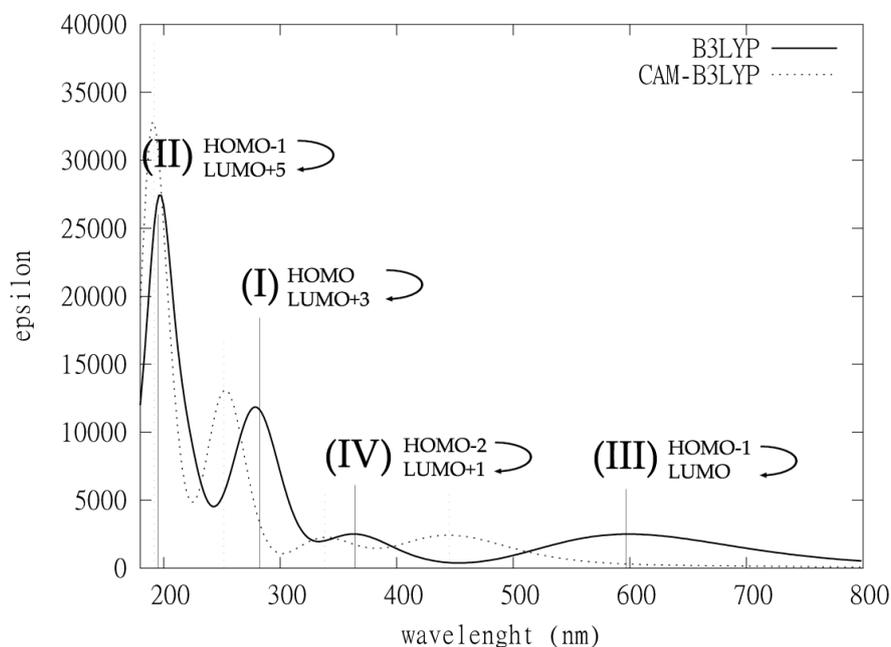
**Figura 3.21:** Esempio della complessità delle possibili transizioni elettroniche (permesse dalla regola della conservazione della molteplicità di spin) per un sistema ad alto spin nello stato fondamentale.

Se vogliamo capire a che cosa dà origine alla comparsa della banda nell'UV-Vis per il complesso ferro-gallico, possiamo ipotizzare che l'assorbimento sia dovuto a transizioni elettroniche accompagnate da un trasferimento di carica nel passare dallo stato fondamentale allo stato eccitato, associate ad una forte variazione del momento di dipolo dovuta proprio al processo *charge-transfer* che, per il complesso ferro-gallico, abbiamo dedotto essere di tipo legante  $\rightarrow$  metallo (LMCT).

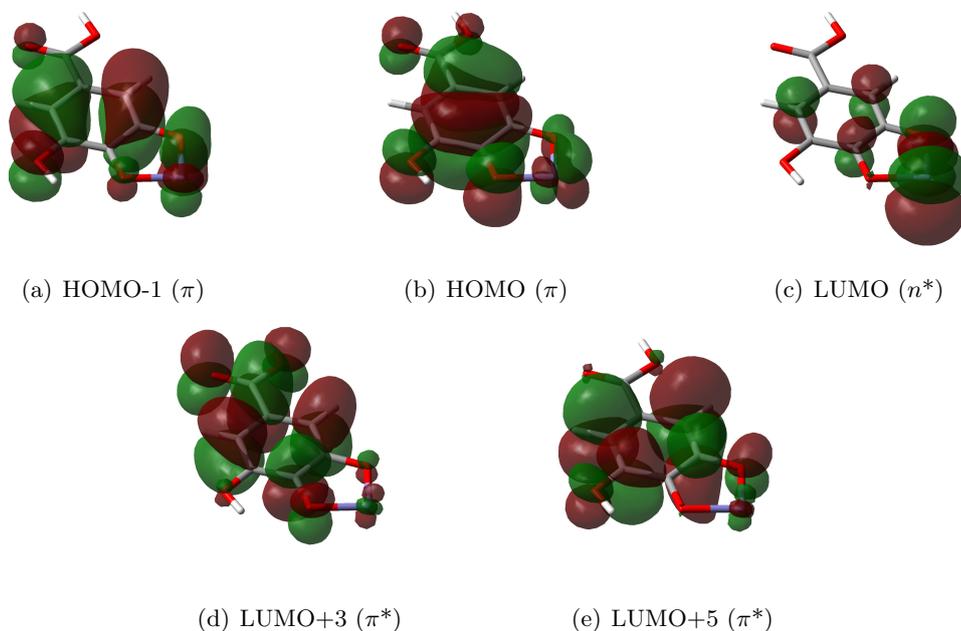
Questo comportamento può essere messo in evidenza visualizzando gli orbitali molecolari di frontiera di GAF<sub>e</sub>(II) e simulando lo spettro di eccitazione con il TDDFT del complesso a basso spin. In prima approssimazione infatti gli OM del complesso HS subiscono uno *shift* in energia rispetto ai LS, dovuto al fatto che stiamo considerando un guscio aperto. Inoltre gli OM risultano diversi per gli elettroni  $\alpha$  e  $\beta$ , ma conservano una parte spaziale simile a quella che si ritrova nel sistema LS.

Nella figura 3.22 è riportato lo spettro UV-Vis simulato del complesso GAF<sub>e</sub>(II) **1**. La forma dello spettro è analoga a quella sperimentale: sono infatti ben riprodotti sia lo spostamento delle bande di assorbimento caratteristiche di GA che la comparsa della nuova banda di assorbimento a lunghezza d'onda nel visibile. Come osservato in precedenza, il funzionale

B3LYP è quello che descrive meglio la posizione delle bande e fornisce una descrizione delle eccitazioni analoga al CAM-B3LYP, adatto alla descrizione di sistemi CT e per il quale è noto l'effetto non realistico dello *shift* ipsocromo degli assorbimenti.



**Figura 3.22:** Spettro UV-VIS del complesso GAFe(II), struttura **1**, calcolato a livello TDDFT/6-311+g(d,p), in vuoto LS.



**Figura 3.23:** Rappresentazione grafica degli orbitali di frontiera in GAFe(II).

Nella figura 3.23 è riportata la rappresentazione grafica degli OM coinvolti nelle transizioni. Le bande (I) e (II) coinvolgono degli OM simili a quelli che si ritrovano nel GA libero

e sono transizioni di tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , poco influenzati dalla presenza del metallo e localizzati principalmente sull'anello aromatico. L'assorbimento a più bassa energia, intorno a 590 nm (banda III) coinvolge il LUMO, localizzato sul metallo e simile ad un orbitale  $d$  del metallo libero, è una transizione di tipo  $\pi \rightarrow n^*$ . In pratica è come se gli OM di frontiera leganti siano in relazione con la capacità di donazione di carica e quelli antileganti con la capacità di accettare densità elettronica; il quadro è quindi compatibile con l'ipotesi che il l'assorbimento sia di tipo LMCT, così come prevedibile dall'analisi delle cariche NBO.

L'assorbimento a 363 nm (banda IV) non si ritrova nello spettro sperimentale mentre qui viene simulato con intensità paragonabile a quello della banda III. L'analisi degli OM coinvolti in questa transizione indica un coinvolgimento di OM dell'anello a 5 termini che portano ad un OM sul ferro poco realistico.

---

## Complessi ternari con amminoacidi liberi

---

Nei capitoli precedenti abbiamo caratterizzato sperimentalmente e a livello teorico il complesso binario  $G\text{AFe(II)}$ . Ciò rappresenta il primo passo per comprendere l'interazione del colorante con la fibra proteica. Tuttavia, prima di passare all'elaborazione del modello completo, è utile descrivere le interazioni del complesso ferro-gallico con i principali amminoacidi costituenti la catena proteica. In letteratura si trovano numerosi lavori aventi per oggetto le interazioni binarie tra coloranti e metalli o anche tra metalli e amminoacidi liberi o peptidi ma, ad oggi, non esistono pubblicazioni concernenti la struttura e le proprietà di complessi ternari. Questa analisi ci permetterà quindi di valutare dal punto di vista teorico la stabilità e le geometrie di minima energia del complesso ternario *colorante-metallo-amminoacido*.

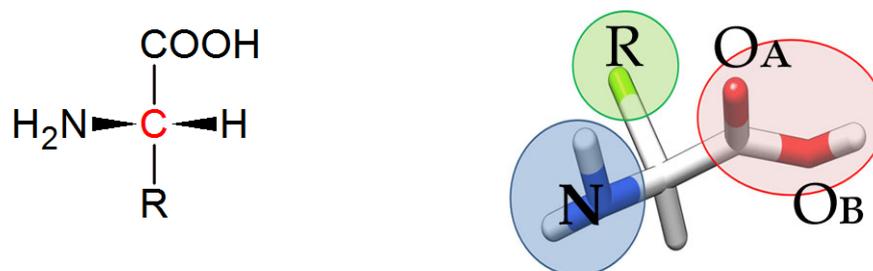
Gli amminoacidi sono noti come  $\alpha$ -amminoacidi in quanto possiedono un gruppo amminico primario  $-\text{NH}_2$  in qualità di sostituente dell'atomo di carbonio  $\alpha$ , adiacente al gruppo carbossilico  $-\text{COOH}$ . I 20 amminoacidi naturali di cui sono composte le proteine differiscono per quanto concerne la struttura della catena laterale legata al carbonio  $\alpha$ . La catena laterale, indicata genericamente con il simbolo R, è costituita da gruppi funzionali che conferiscono all'amminoacido proprietà caratteristiche, come ad esempio una diversa reattività e polarità. In base alla polarità delle catene laterali, gli amminoacidi vengono classificati come: (1) non polari, costituiti da residui laterali di tipo alifatico o contenenti gruppi aromatici ingombranti e scarsamente polari; (2) polari non carichi, che possiedono gruppi ossidrilici, amminici o tiolici; (3) polari carichi, le cui catene laterali, a pH neutro, sono polari e ionizzate. Vale la pena ricordare che nei polipeptidi naturali tutti gli amminoacidi, ad eccezione della glicina, sono otticamente attivi in quanto il carbonio  $\alpha$  costituisce un centro chirale. Gli amminoacidi derivati dalle proteine si trovano tutti nella configurazione L, come schematizzato in figura 4.1.

I gruppi amminici e carbossilici degli amminoacidi possono andare incontro a ionizzazione. In generale il valore di  $\text{pK}_a$  del gruppo  $-\text{COOH}$  è circa 2.2 mentre quello del gruppo  $-\text{NH}_2$  è

intorno a 9.4; ne consegue che in soluzione acquosa neutra i gruppi amminici sono protonati e quelli carbossilici si trovano nella forma di carbossilato. La particolare forma dipolare dell'amminoacido è definita *zwitterionica* ed è la forma preponderante in cui l'amminoacido si trova. A sua volta anche il gruppo funzionale inserito nella catena laterale può essere soggetto ad un equilibrio acido-base e, in base al proprio valore di  $pK_a$ , può essere ionizzato o meno [48].

A seconda del tipo di amminoacido, la struttura offre diverse possibilità di chelazione nei confronti del centro metallico. Potenzialmente un generico amminoacido possiede tre siti di attacco attraverso i quali può instaurare un'interazione di tipo donatore-accettore con il centro metallico:

- l'azoto amminico, indicato nel seguito con **N**;
- gli ossigeni del gruppo carbossilico, denominati **O<sub>A</sub>** e **O<sub>B</sub>**;
- il gruppo laterale (**R**) in cui è inserito un gruppo funzionale in grado di agire da donatore, come ad es. un gruppo ossidrilico -OH, tiolico -SH, fenolico, acetato ecc.



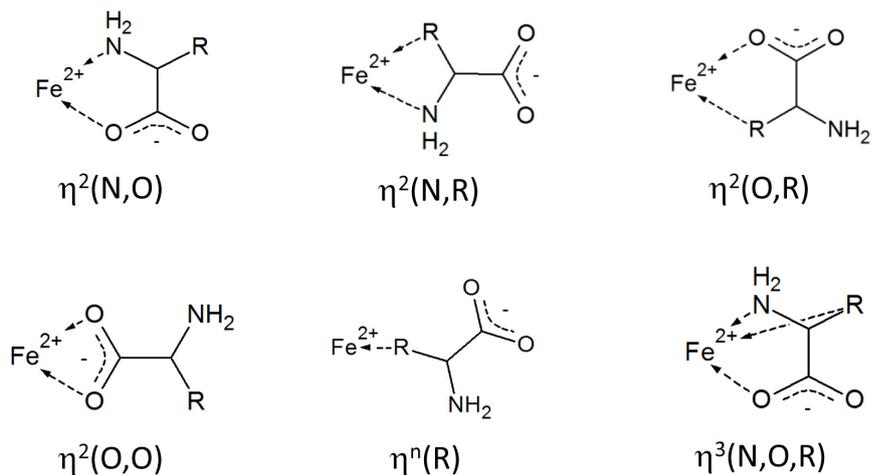
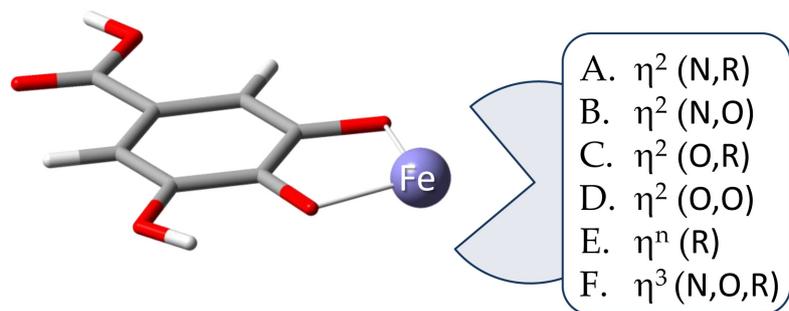
(a) Proiezione di Fischer. In rosso è evidenziato il carbonio chirale  $\alpha$ .

(b) Rappresentazione tridimensionale.

**Figura 4.1:** Struttura generale di un L- $\alpha$ -amminoacido.

I siti di attacco possono essere impegnati in diversi modi nella formazione del legame e in figura 4.2 sono schematizzate le principali possibilità di chelazione di un generico amminoacido funzionalizzato. Nel prosieguo dell'analisi le lettere, utilizzate per identificare le strutture, sono coerenti con lo schema proposto mentre i numeri che compaiono al loro fianco vengono impiegati per distinguere i diversi isomeri configurazionali individuati per uno stesso modo di chelazione.

Le strutture dei complessi ternari sono state costruite impiegando forme deprotonate dell'amminoacido. La scelta deriva dal fatto che in questa fase l'interesse è quello di valutare la forza dell'interazione tra gli atomi donatori e il centro metallico nonché il modo di chelazione preferito dal sistema. Considerare l'amminoacido deprotonato esalta le caratteristiche donatrici dei gruppi coinvolti nell'interazione, oltre a permettere il confronto diretto tra le energie relative di ciascun isomero strutturale. Questa scelta è inoltre coerente con alcuni autori che,



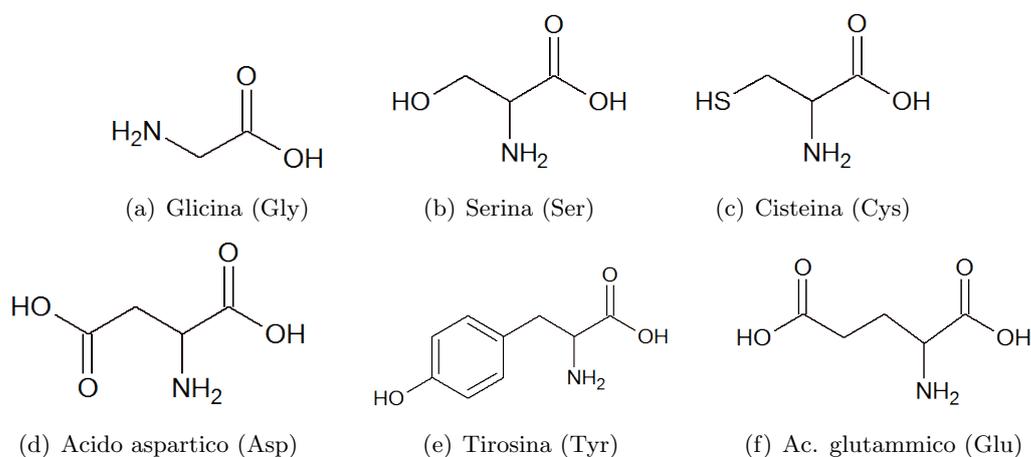
**Figura 4.2:** Rappresentazione schematica delle possibili interazioni tra amminoacidi liberi e centro metallico. Il simbolo R indica il generico residuo laterale funzionalizzato. Ad es. nel caso della Serina: R =  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . L'amminoacido è qui rappresentato in forma deprotonata.

in recenti pubblicazioni, indagano le interazioni tra ioni metallici e amminoacidi. *Laasononen et al* [49], ad esempio, effettua un'approfondita analisi teorica a livello DFT delle interazioni tra cisteina e diversi metalli di transizione tra cui anche il ferro, considerando l'amminoacido nella forma deprotonata  $[\text{Cys}]^{2-}$ .

L'effetto della presenza del legante amminoacidico potrebbe inoltre alterare la stabilità relativa tra gli stati di spin del complesso ferro-gallico individuata nel capitolo precedente, per questo motivo i calcoli sui complessi ternari sono stati ripetuti per le configurazioni elettroniche ad alto e basso spin. L'obiettivo di questo capitolo è quello di individuare l'esistenza di un modo di chelazione particolarmente stabile rispetto ad altri e le geometrie di minima energia dei complessi ternari con alcuni amminoacidi *test* che potranno essere sfruttate in seguito per la costruzione del *guess* di geometria nel modello della fibra proteica. Nella sezione 4.6 calcoleremo inoltre le *binding energy* per valutare l'esistenza, dal punto di vista energetico, di un complesso che gode di una maggiore stabilità rispetto agli altri. I valori delle *binding energy* potranno inoltre essere confrontati con quelli ottenuti nel modello con la fibra per valutare se l'effetto dell'intorno, inteso sia come fattore sterico che modifica le geometrie di legame sia come fattore elettronico dovuto alla presenza degli altri residui amminoacidici che formano la catena proteica, influenza in modo significativo i risultati ottenuti in questa fase.

## 4.1 Analisi strutturale dei complessi ternari

La geometria di diversi complessi ternari  $GA-Fe(II)$ -amminoacido è stata determinata in vuoto e lo studio si è concentrato solo su alcuni dei 20 amminoacidi naturali. La scelta è stata suggerita sia da esigenze modellistiche che della percentuale relativa della presenza di tali residui nelle fibre di lana, riportata nella tabella 4.1. I residui di acido glutammico, cisteina e serina raggiungono percentuali maggiori del 10%, seguiti da glicina, leucina, acido aspartico e arginina che si attestano intorno al 6-7%. Per una maggiore chiarezza riportiamo in figura 4.3 le formula di struttura dei principali amminoacidi che verranno citati in seguito nel testo.



**Figura 4.3:** Strutture degli amminoacidi presi in esame, in forma neutra.

Ad una prima analisi emerge che le proteine costituenti le fibre di lana sono ricche di residui acidi caratterizzati dal gruppo funzionale carbossilico  $-COOH$ . Sulla base dei dati a nostra disposizione abbiamo scelto di focalizzare l'analisi strutturale sui seguenti amminoacidi:

- Glicina - è l'amminoacido strutturalmente più semplice e permette, dal punto di vista modellistico, di effettuare uno studio completo delle possibili interazioni del gruppo funzionale amminoacidico senza prendere in considerazione l'effetto della catena laterale (interazioni  $\eta^2(N,O)$  e  $\eta^2(O,O)$  in figura 4.2). La glicina è anche un buon *probe* molecolare per confrontare i risultati ottenuti con quelli di letteratura, dove trovano diversi studi teorici riguardanti l'interazione della glicina o catene di poliglicina con cationi metallici.
- Serina - è uno degli amminoacidi più abbondanti nelle fibre di lana e permette di studiare l'effetto della catena laterale funzionalizzata con un gruppo ossidrilico. L'interazione di tipo bidentata  $\eta^2$ , in cui sono coinvolti il gruppo carbossilico o amminico e il gruppo ossidrilico dell'amminoacido, sembra particolarmente favorita in quanto conduce alla formazione di un anello a 5 termini non tensionato, analogo a quello che si ottiene per l'interazione  $\eta^2(N,O)$ .

Amminoacido		Percentuale
Alanina	Ala	4.5 - 5.8
Arginina	Arg	6.2 - 7.7
Acido aspartico <sup>a</sup>	Asp	5.4 - 6.9
Acido glutammico <sup>b</sup>	Glu	11.1 - 12.1
Glicina	Gly	8.2 - 7.5
Cisteina <sup>c</sup>	Cys	10.0 - 13.1
Istidinea	His	0.6 - 0.8
Isoleucina	Ile	2.5 - 3.3
Leucina	Leu	6.3 - 7.9
Lisina	Lys	2.1 - 3.4
Metionina	Met	0.4 - 0.6
Fenilalanina	Phe	2.5 - 2.7
Prolina	Pro	6.4 - 7.2
Serina	Ser	9.4 - 10.8
Treonina	Thr	6.0 - 6.5
Tirosina	Tyr	3.2 - 3.8
Valina	Val	4.6 - 5.8

**Tabella 4.1:** Composizione amminoacidica delle fibre di lana. Le percentuali si riferiscono a diverse pubblicazioni e le variazioni del contenuto amminoacidico sono dovute sia ai parametri analizzati che alla provenienza della lana stessa in quanto l'alimentazione delle pecore, il clima e le influenze esterne possono influire sulla composizione proteica delle fibre. <sup>a</sup>*Include asparagina*, <sup>b</sup>*Include glutammina*, <sup>c</sup>*Contributo dovuto alla cisteina* [50].

- Cisteina - è l'amminoacido peculiare che caratterizza le fibre della lana, presente in concentrazione particolarmente elevate proprio in questo tipo di proteine. La cisteina ha una struttura simile a quella della serina, ma si differenzia da essa per il gruppo tiolico che sostituisce quello ossidrilico. In realtà la cisteina non è presente nelle fibre in questa forma ma è spesso impegnata nella formazione di legami a ponte di zolfo con altri residui di cisteina appartenenti a catene proteiche diverse.
- Acido aspartico - è uno dei due amminoacidi, insieme al glutammato, caratterizzato dalla presenza del gruppo acido e presente in percentuale maggiore nella fibra. Il residuo laterale ci permette di prendere in considerazione le interazioni di tipo  $\eta^2(\text{R})$  con  $\text{R} = -\text{COO}^-$ .

## 4.2 I complessi GAF<sub>e</sub>(II)-glicina

La glicina (Gly) è il più piccolo e semplice amminoacido e per questi motivi viene largamente impiegato come sistema modello per studi teorici e sperimentali riguardanti le interazioni in gioco tra cationi metallici e sistemi biologici. Gly, essendo sprovvista di un residuo laterale funzionalizzato, può coordinarsi con il centro metallico solo attraverso gli atomi di ossigeno del gruppo carbossilico e l'atomo di azoto del gruppo amminico formando complessi di tipo  $\eta^2(\text{N},\text{O})$  oppure  $\eta^2(\text{O},\text{O})$ . Studi sperimentali indicano che la chelazione  $\eta^2(\text{N},\text{O})$  è energeticamente favorita in quanto si forma un chelato costituito da un anello a cinque membri [51]. Diversi studi teorici prevedono anche la possibilità che si formi il complesso stabile di tipo  $\eta^2(\text{O},\text{O})$  in cui entrambi gli atomi di ossigeno del gruppo carbossilico agiscono da leganti, con la formazione di una sorta di ciclo a tre termini [52, 53].

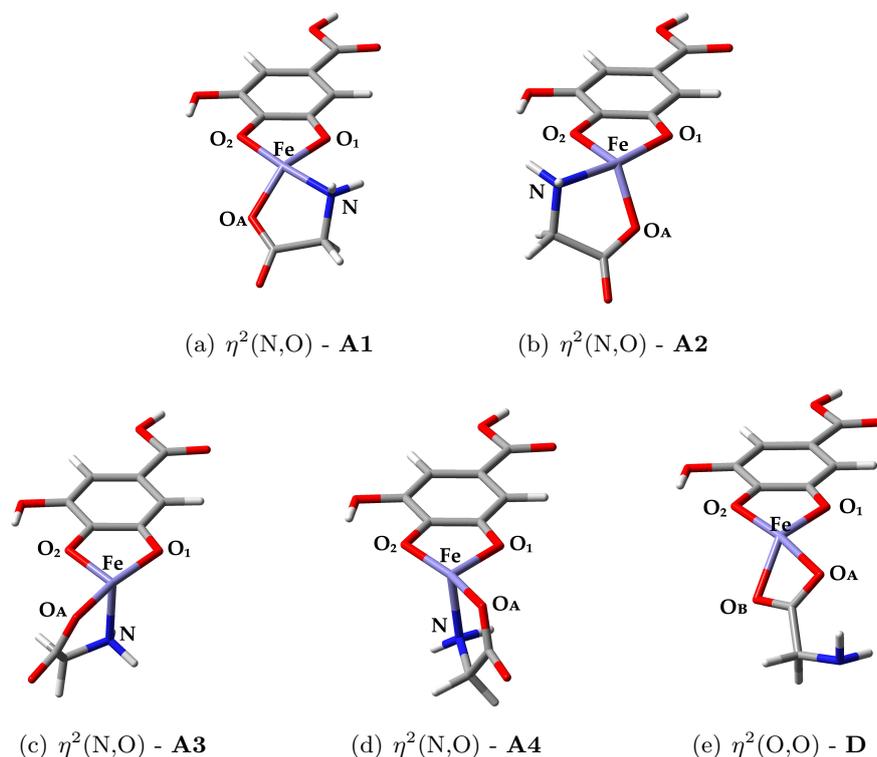
A differenza degli studi presenti in letteratura, la nostra analisi prende in esame il complesso ternario in cui, oltre a Gly, è presente anche l'acido gallico come legante. Vengono quindi esaminati entrambi i possibili modi di chelazione e ottimizzati i complessi ternari a partire da *guess* di geometria diversi, di tipo planare e tetraedrico, in modo da individuare tutti i possibili isomeri. Nei nostri calcoli abbiamo considerato la forma deprotonata di Gly, prendendo in esame lo stato elettronico fondamentale di singoletto (LS) e di quintetto (HS).

L'analisi strutturale, eseguita in vuoto, individua per lo stato a basso spin due tipi diversi di geometrie, una planare distorta e una di tipo *see-saw*, mentre nello stato ad alto spin risulta stabile solo la geometria planare. In figura 4.4 sono riportate le cinque strutture LS ottenute.

Per quanto riguarda il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{N},\text{O})$ , la struttura **A1** differisce dalla **A2** in quanto l'atomo di azoto della Gly si trova rispettivamente in posizione *cis* o *trans* rispetto all'ossigeno  $\text{O}_1$  di GA. Le due strutture hanno una geometria planare distorta in cui l'ossigeno  $\text{O}_A$  forma un angolo di circa  $70^\circ$  rispetto al piano molecolare mentre l'azoto è coplanare con l'anello aromatico. La distanza media tra il ferro e l'ossigeno di GA è di 1.88 Å mentre le distanze medie Fe- $\text{O}_A$  e Fe-N, per le strutture **A1** e **A2**, sono rispettivamente 1.87 e 2.00 Å. Nelle strutture **A3** e **A4** l'ossigeno  $\text{O}_A$  giace sul piano molecolare mentre l'azoto si trova perpendicolare ad esso, in corrispondenza del centro metallico, dando luogo ad una geometria di tipo *see-saw*. In questo caso i legami Fe- $\text{O}_A$  sono più lunghi di 0.7 Å rispetto alle due precedenti strutture mentre quelli Fe-N sono 0.5 Å più corti, a testimonianza di un'interazione di legame più forte dell'atomo di N con il centro metallico. Nel complesso **D**, con coordinazione di tipo  $\eta^2(\text{O},\text{O})$ , la distanza Fe- $\text{O}_A$  e Fe- $\text{O}_B$  è rispettivamente di 2.05 e 1.95 Å, maggiore di quella trovata nelle strutture di tipo A. I valori di energia relativa indicano che il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{N},\text{O})$  è favorito di circa 10 kcal/mol rispetto al modo  $\eta^2(\text{O},\text{O})$  e le strutture di tipo **A** sono molto vicine tra loro in energia. L'analisi energetica suggerisce il seguente ordine di stabilità per le strutture a basso spin:

$$\mathbf{A1} > \mathbf{A3} > \mathbf{A4} > \mathbf{A2} \gg \mathbf{D}$$

(10 Kcal/mol)



**Figura 4.4:** Strutture dei complessi  $[\text{GAF}_2(\text{II})\text{Gly}]^-$ , ottimizzati in vuoto LS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

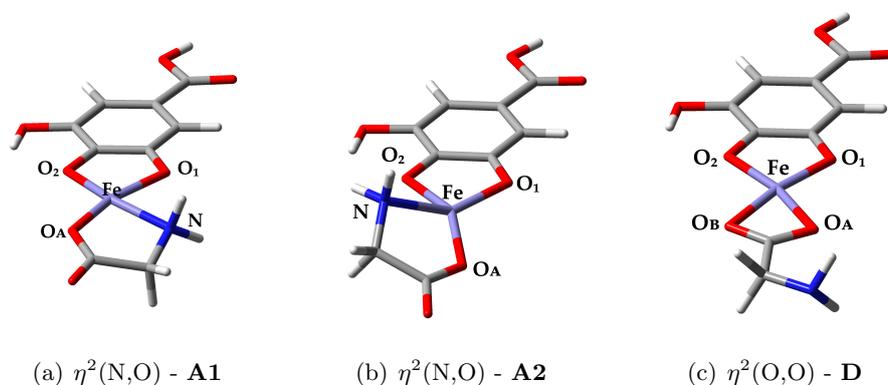
	$\eta^2(\text{N,O})$						$\eta^2(\text{O,O})$			
	<b>A1</b>		<b>A2</b>		<b>A3</b>		<b>A4</b>		<b>D</b>	
$\Delta E$	0.0	(0.0)	1.2	(3.7)	-	(1.1)	-	(2.7)	4.2	(13.7)
$\Delta E_{HL}$	51.2		53.7		-		-		60.7	
<b>r Fe-O<sub>1</sub></b>	1.944	(1.815)	1.908	(1.901)	-	(1.905)	-	(1.883)	1.909	(1.817)
<b>r Fe-O<sub>2</sub></b>	1.949	(1.928)	1.994	(1.843)	-	(1.891)	-	(1.924)	1.952	(1.909)
<b>r Fe-O<sub>A</sub></b>	1.960	(1.873)	1.962	(1.874)	-	(1.944)	-	(1.941)	2.110 <sup>a</sup>	(2.001) <sup>a</sup>
<b>r Fe-N</b>	2.192	(1.981)	2.189	(1.999)	-	(1.940)	-	(1.936)	-	-

**Tabella 4.2:** Dati strutturali ed energetici dei complessi  $[\text{GAF}_2(\text{II})\text{Gly}]^-$  ottimizzati a livello di calcolo M06/6-311G(d,p) in vuoto, HS.  $\Delta E$  esprime la differenza di energia (Kcal/mol) rispetto alla struttura più stabile;  $\Delta E_{HL}$  rappresenta la differenza di energia (Kcal/mol) tra la struttura ad alto spin e l'analoga struttura a basso spin ed è definito come:  $\Delta E_{HL} = E_{HS} - E_{LS}$ . Le distanze di legame sono espresse in Å e tra parentesi sono riportati i valori per le strutture LS. <sup>a</sup>Distanza media Fe-O<sub>A</sub>, Fe-O<sub>B</sub>.

Dalle geometrie ottimizzate a basso spin sono stati costruiti gli input per l'ottimizzazione del complesso ad alto spin e il processo di ottimizzazione ha condotto alle strutture planari **A1** e **A2**, riportate in figura 4.6. Le strutture **A3** e **A4** non costituiscono geometrie di minimo sulla PES della molecola ad alto spin ed evolvono rispettivamente verso le due geometrie **A1** e **A2** già identificate. La struttura **D** è invece ancora presente e la differenza di energia

rispetto alle strutture più stabili è nettamente inferiore rispetto al caso LS. È interessante evidenziare due aspetti:

- i complessi ad alto spin, come nel caso del complesso binario, hanno un'energia nettamente più bassa rispetto alle corrispondenti strutture a basso spin dell'ordine delle 50 Kcal/mol;
- in tutti i casi la geometria del complesso HS tende ad essere planare e le distanze di legame tra il centro metallico e gli atomi ad esso coordinati sono più lunghe. In particolare la differenza è di circa 0.1 Å per le distanze Fe-O e di 0.2 Å per le distanze Fe-N, in accordo con i risultati ottenuti nel capitolo precedente.



**Figura 4.5:** Strutture dei complessi  $[\text{GAFe(II)Gly}]^-$ , ottimizzati in vuoto HS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

La distanza media tra il ferro e gli atomi di ossigeno di GA è di 1.95 Å e il legame in posizione *trans* rispetto ad N risulta di 0.05 Å più lungo. La distanza media Fe- $\text{O}_A$  è di 1.87 Å e mentre quella Fe-N risulta di 2.09 Å. I valori ottenuti sono in linea con quelli riportati in letteratura per i complessi Fe(II)-Gly e Fe(II)-glicilglicina [52, 54].

Nella struttura **D** la distanza Fe- $\text{O}_A$  e Fe- $\text{O}_B$  è rispettivamente di 2.05 e 1.95 Å. I valori di energia relativa indicano che il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{N,O})$  è favorito di circa 4 kcal/mol rispetto al modo  $\eta^2(\text{O,O})$  ed evidenziano il seguente ordine di stabilità per i complessi ad alto spin:

$$\mathbf{A1} \sim \mathbf{A2} > \mathbf{D}$$

(4 Kcal/mol)

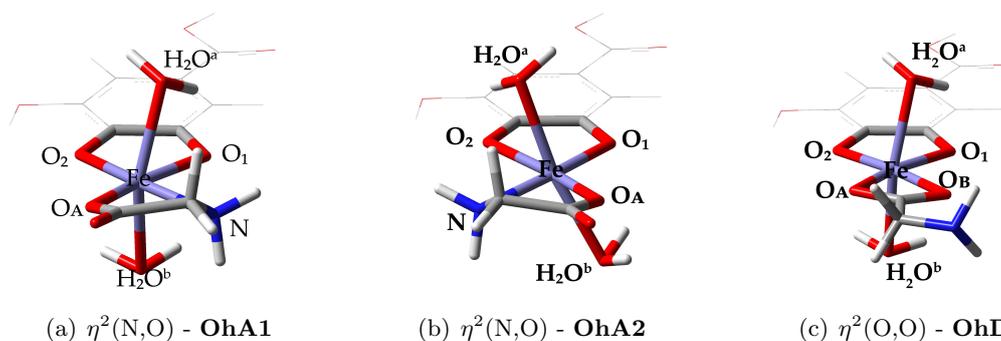
Nei lavori di *Russo e co.* [52] e di *H. Ai e co.* [53] del 2005, la struttura più stabile dell'addotto  $\text{Fe}^{2+}$ -Gly nello stato di quintetto (con la glicina considerata in forma neutra) è quella di tipo  $\eta^2(\text{O,O})$ , con una differenza dell'ordine di 10 Kcal/mol rispetto alla struttura  $\eta^2(\text{N,O})$ . L'ordine di stabilità da noi individuato sembra contrastare con questi dati ma è doveroso sottolineare la differenza sostanziale tra i due sistemi indagati, sia dal punto di vista della carica che per la presenza dell'acido gallico come ulteriore legante. Ad ogni modo questi

risultati suggeriscono che le interazioni di tipo  $\eta^2(\text{O},\text{O})$  devono essere prese in considerazione anche nelle analisi successive, in particolar modo per quei sistemi che hanno una catena laterale funzionalizzata con un gruppo carbossilico in grado di dar luogo ad una interazione di tipo  $\eta^2(\text{R})$  analoga a  $\eta^2(\text{O},\text{O})$ .

#### 4.2.1 I complessi GAF<sub>2</sub>(II)-glicina idratati

A partire dalle strutture ottimizzate dei complessi in vuoto, sono state esplicitamente aggiunte due molecole d'acqua in modo da ottenere una sfera di coordinazione ottaedrica saturando tutti i siti di legame del centro metallico. Entrambe le molecole d'acqua aggiunte vengono ritenute durante l'ottimizzazione di geometria e i dati strutturali ed energetici dei complessi ternari idratati sono riportati in tabella 4.3. La distanza media tra ferro e l'ossigeno delle molecole d'acqua, indicata come Fe-(H<sub>2</sub>O), risulta di 2.06 Å nel sistema LS e di 2.32 Å nel sistema HS. La presenza delle molecole di acqua rende le geometrie **A1** e **A2** a basso spin perfettamente planari e inoltre riduce la differenze di energia tra le strutture A ad un valore trascurabile. L'aggiunta esplicita di molecole d'acqua riduce la differenza di energia tra i due stati di spin a circa 35 Kcal/mol.

Le strutture ottimizzate dei complessi idratati HS sono riportate in figura 4.6. È interessante notare che le due molecole di acqua tendono a non occupare perfettamente i vertici dell'ottaedro ma la geometria di **A1** e **A2** è lievemente distorta mentre la struttura **D** esibisce una geometria perfettamente ottaedrica. La presenza delle molecole di acqua determina inoltre un sensibile aumento della lunghezza dei legami tra ferro e gli atomi donatori, come già avevamo osservato per i complessi GAF<sub>2</sub>(II) idratati.



**Figura 4.6:** Strutture dei complessi  $[\text{GAF}_2\text{Gly}(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ , ottimizzate in vuoto HS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

In conclusione possiamo affermare che i complessi ad alto spin risultano più stabili di quelli a basso spin e la geometria delle strutture ottimizzate è simile in entrambi i casi, fatta eccezione per le distanze di legame tra ferro e atomo donatore che nel primo caso risultano più lunghe. Il complesso HS predilige entrambi i leganti posizionati sullo stesso piano, come confermato dall'assenza delle strutture **A3** e **A4**. L'aggiunta esplicita di molecole d'acqua non modifica in modo sostanziale la geometria e ha l'effetto di ridurre le differenze di energie sia tra le diverse strutture che tra i due stati di spin. Nel complesso idratato le distanze di

	OhA1		OhA2		OhA3		OhA4		OhD	
$\Delta E$	0.2	(0.0)	0.0	(0.8)	3.3	(0.1)	(3.5)	6.0	(12.7)	
$\Delta E_{LS-HS}$	34.2		35.2		31.1		-	41.1		
<b>r Fe-O<sub>1</sub></b>	2.090	(1.969)	1.997	(1.967)	-	(1.971)	-	(1.951)	2.030	(1.961)
<b>r Fe-O<sub>2</sub></b>	2.077	(1.975)	2.115	(1.979)	-	(1.962)	-	(1.965)	2.080	(1.967)
<b>r Fe-O<sub>A</sub></b>	1.973	(1.988)	2.030	(1.987)	-	(1.989)	-	(1.956)	2.154 <sup>a</sup>	(2.064)
<b>r Fe-N</b>	2.205	(1.996)	2.188	(2.005)	-	(1.979)	-	(1.970)	-	-
<b>r Fe-H<sub>2</sub>O<sup>a</sup></b>	2.295	(2.059)	2.327	(2.058)	-	(2.084)	-	(2.095)	2.256	(2.049)
<b>r Fe-H<sub>2</sub>O<sup>b</sup></b>	2.304	(2.057)	2.325	(2.063)	-	(2.083)	-	(2.097)	2.261	(2.031)

**Tabella 4.3:** Dati strutturali ed energetici dei complessi  $[\text{GaFeGly}(\text{H}_2\text{O})_2]^-$  ottimizzati a livello di calcolo M06/6-311G(d,p) in vuoto, HS.  $\Delta E$  esprime la differenza di energia (Kcal/mol) rispetto alla struttura più stabile;  $\Delta E_{HL}$  rappresenta la differenza di energia (Kcal/mol) tra la struttura ad alto spin e l'analogo struttura a basso spin ed è definito come:  $\Delta E_{HL} = E_{HS} - E_{LS}$ . Le distanze di legame sono espresse in Å e tra parentesi sono riportati i valori per le strutture LS. <sup>a</sup> *distanza media Fe-O<sub>A</sub>, Fe-O<sub>B</sub>*.

legame tra centro metallico e leganti sono più lunghe rispetto al complesso nudo in quanto le due molecole d'acqua aumentano l'ingombro sterico e inducono una diminuzione della carica positiva del centro metallico.

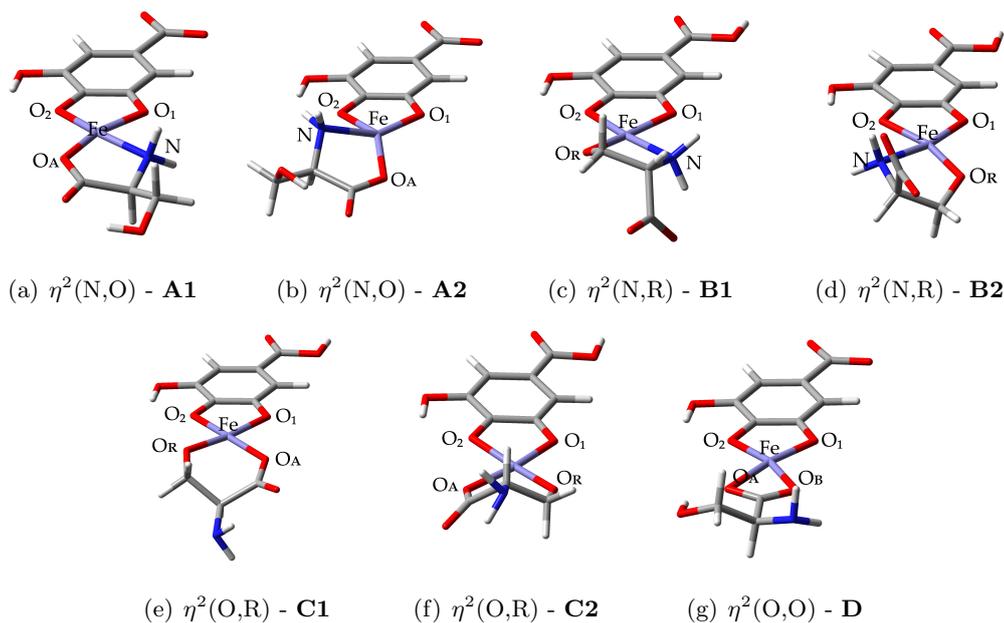
### 4.3 I complessi GAFe(II)-serina

La serina (Ser) è uno dei più abbondanti amminoacidi presenti nelle fibre di lana. La catena laterale  $[\text{R} = \text{CH}_2\text{OH}]$  è caratterizzata dalla presenza del gruppo funzionale ossidrilico. Evidenze sperimentali indicano che Ser, nei confronti di cationi metallici, si comporta come legante bidentato attraverso gli atomi donatori N e O del gruppo amminico e carbossilico legati al C $\alpha$  mentre, come già osservato anche per la Gly, non c'è evidenza di coordinazione attraverso entrambi gli atomi di ossigeno del COO<sup>-</sup> in soluzioni acquose. Alcuni autori tuttavia suggeriscono anche la possibilità di una coordinazione diretta del gruppo ossidrilico [55].

Nell'analisi strutturale condotta in vuoto, oltre al modo di coordinazione di "base"  $\eta^2(\text{N},\text{O})$ , comune a tutti gli amminoacidi, si individuano anche altre possibilità di interazione con il centro metallico che coinvolgono il gruppo funzionale ossidrilico. Potenzialmente, Ser, ha tre siti di legame disponibili che aprono la possibilità ad una chelazione tridentata con la formazione di due anelli a cinque termini.

Per l'analisi strutturale ed energetica abbiamo scelto di impiegare come sistema modello il complesso  $[\text{GAFe(II)Ser}]^{2-}$ . Le due cariche negative, derivanti dalla rimozione di due atomi di idrogeno, consentono di costruire isomeri configurazionali con la stessa composizione atomica che permettono un confronto diretto delle energie relative tra tutte le strutture riferite a diversi modi di chelazione. Questa scelta garantisce inoltre che tutti i potenziali gruppi

donatori possano essere deprotonati, massimizzando così le interazioni con il centro metallico. In figura 4.7 sono riportate le strutture dei complessi ternari bidentati ad alto spin.



**Figura 4.7:** Strutture dei complessi bidentati  $[\text{GAFe}(\text{II})\text{Ser}]^{2-}$ , ottimizzate in vuoto HS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

I calcoli sono stati ripetuti per entrambi gli stati di spin e i risultati confermano anche in questo caso che lo stato HS è energeticamente favorito e la differenza di energia con le analoghe strutture a basso spin si aggira intorno alle 50 Kcal/mol, valore paragonabile a quello ottenuto per il complesso con Gly. Nella tabella 4.4 riportiamo i parametri energetici e strutturali relativi alle strutture HS ottimizzate in vuoto. I complessi bidentati esibiscono geometrie di tipo planare o planare distorto mentre le geometrie *see-saw*, in cui l'azoto del gruppo amminico è posto perpendicolarmente al centro metallico, sono stabili solo nello stato LS, come già precedentemente osservato.

Le strutture planari **A1** e **A2** sono analoghe a quelle individuate per  $[\text{GAFe}(\text{II})\text{Gly}]^-$ . In questo caso però è opportuno confrontarle con i rispettivi isomeri che hanno il gruppo carbossilico di GA protonato a scapito del gruppo ossidrilico. Come presumibile dalla differenza dei valori di pKa dei due gruppi, i risultati indicano che le strutture più stabili sono quelle riportate in figura 4.7. Il gruppo ossidrilico, che in entrambe le strutture non interagisce con il centro metallico, forma inoltre un legame ad idrogeno intramolecolare con con  $\text{O}_B$  del carbossilato con una distanza di 1.81Å tra l'idrogeno e  $\text{O}_B$ .

Le strutture di tipo **B** differiscono dalle precedenti in quanto a legarsi è il gruppo ossidrilico (nella forma deprotonata) al posto del carbossilato. La geometria rimane ancora di tipo planare distorta, con la formazione di un anello a cinque termini che evita l'instaurarsi di eccessive tensioni strutturali. In questa configurazione il carbossilato si dispone in modo tale da avvicinarsi il più possibile all'idrogeno del gruppo amminico, con una distanza tra  $\text{O}_A$  e  $\text{H}_N$  di circa 1.89 Å. Nelle strutture di tipo **C** l'interazione coinvolge gli atomi di ossigeno del

carbossilato e del gruppo ossidrilico portando alla formazione di un eterociclo a sei termini con una conformazione stabile a “semi-sedia”. È interessante notare che la conformazione a “sedia”, tipica del cicloesano, è ostacolata dalla coplanarità tra il centro metallico e i due atomi di O dell’amminoacido.

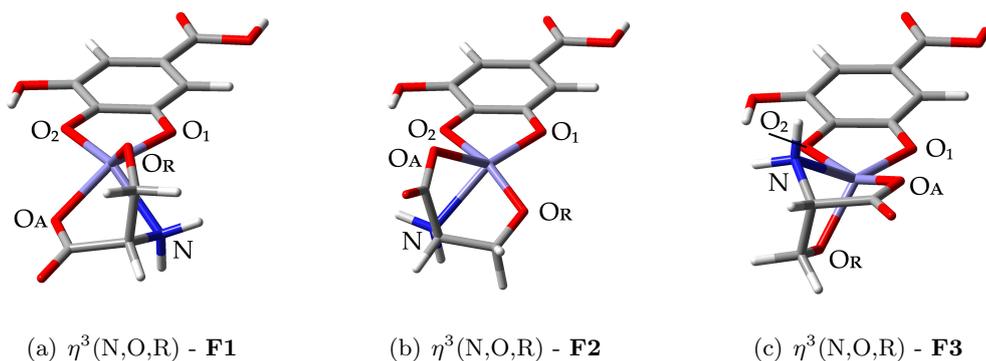
	$\eta^2(\text{N},\text{O})$		$\eta^2(\text{N},\text{R})$		$\eta^2(\text{O},\text{R})$		$\eta^2(\text{O},\text{O})$	$\eta^3(\text{N},\text{O},\text{R})$		
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>D</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
$\Delta\mathbf{E}$	10.5	12.5	2.6	3.2	0.0	0.0	18.4	4.9	2.6	5.4
$\Delta\mathbf{E}_{HL}$	51.1	52.1	48.4	51.2	55.9	58.0	72.1	48.5	51.8	42.7
<b>r Fe-O<sub>1</sub></b>	1.920	1.877	1.992	1.976	1.907	1.879	1.882	2.020	2.008	2.013
<b>r Fe-O<sub>2</sub></b>	1.901	1.957	2.043	2.066	1.912	1.950	1.902	2.076	2.096	2.084
<b>r Fe-O<sub>A</sub></b>	2.030	2.024	-	-	2.665	2.426	2.123 <sup>a</sup>	2.085	2.183	2.089
<b>r Fe-N</b>	2.203	2.227	2.157	2.156	-	-	-	2.286	2.275	2.311
<b>r Fe-O<sub>R</sub></b>	-	-	1.880	1.882	1.910	1.930	-	2.014	1.950	2.008

**Tabella 4.4:** Dati strutturali ed energetici dei complessi  $[\text{GaFeSer}]^{2-}$  ottimizzati a livello di calcolo M06/6-311G(d,p), in vuoto HS.  $\Delta\mathbf{E}$  esprime la differenza di energia relativa (Kcal/mol) rispetto alla struttura più stabile;  $\Delta\mathbf{E}_{HL}$  rappresenta la differenza di energia (Kcal/mol) tra la struttura ad alto spin e l’analoga struttura a basso spin ed è definito come:  $\Delta\mathbf{E}_{HL} = E_{HS} - E_{LS}$ . Le distanze di legame sono espresse in Å. <sup>a</sup> Distanza media Fe-O<sub>A</sub>, Fe-O<sub>B</sub>.

Le distanze di legame tra il centro metallico e gli atomi donatori risultano più lunghe rispetto al complesso  $[\text{GAFe(II)Gly}]^-$  (circa 0.1 Å per le distanze Fe-O<sub>n</sub> e 0.2 Å per le distanze Fe-O<sub>A</sub>, Fe-N) e la differenza può essere imputabile alla diversa carica dei due sistemi. È interessante osservare che la forte interazione Fe-O<sub>R</sub>, che conduce ai complessi più stabili, è in relazione con la lunghezza di legame di 1.89 Å, piuttosto corta se confrontata ad esempio con una lunghezza tipica di un legame Fe(II)-OH<sub>2</sub> in un complesso ottaedrico ad alto spin che rientra nel range 2.07-2.19 Å [56].

I complessi tridentati  $\eta^3(\text{N},\text{O},\text{R})$ , riportati in figura 4.8, assumono una geometria pseudo ottaedrica, con un sito di coordinazione vacante in grado di accogliere una molecola d’acqua per completare la sfera di coordinazione. L’energia delle strutture **F** è paragonabile a quella delle strutture **B**, l’aumento del numero di coordinazione, quindi, non sembra avere un effetto particolarmente stabilizzante per il complesso.

I valori di energia relativa indicano che il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{O},\text{R})$  è più stabile rispetto agli altri. La struttura **D**, in cui il centro metallico interagisce con entrambi gli atomi di O del carbossilato, è perfettamente planare e si trova ad un’energia di circa 20 Kcal/mol più alta rispetto alle strutture **C** mentre la differenza di energia rispetto alla struttura **A1** è circa doppia rispetto a quella riscontrata tra le strutture analoghe in  $[\text{GAFe(II)Gly}]^-$ . Ciò è probabilmente dovuto ad una maggiore instabilità della struttura **A** in Gly, come confermato dall’analisi delle *binding energy* nella sezione 4.6. Il processo di ottimizzazione relativo alla struttura di tipo  $\eta^1(\text{R})$ , che coinvolge solo il gruppo ossidrilico, converge verso le strutture bidentate già descritte.



**Figura 4.8:** Strutture dei complessi tridentati  $[\text{GAFe}(\text{II})\text{Ser}]^{2-}$ , ottimizzate in vuoto HS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

È interessante notare che le differenze di energia tra isomeri all'interno dello stesso modo di coordinazione sono trascurabili rispetto a quelle riscontrate tra isomeri appartenenti a modi di coordinazione diversi. Pertanto, possiamo qualitativamente individuare un ordine di stabilità basato sul modo di coordinazione:

$$\eta^2(\text{O},\text{R}) > \eta^2(\text{N},\text{R}) \sim \eta^3(\text{N},\text{O},\text{R}) > \eta^2(\text{N},\text{O}) > \eta^2(\text{O},\text{O})$$

(3 Kcal/mol)                      (10 Kcal/mol)      (20 Kcal/mol)

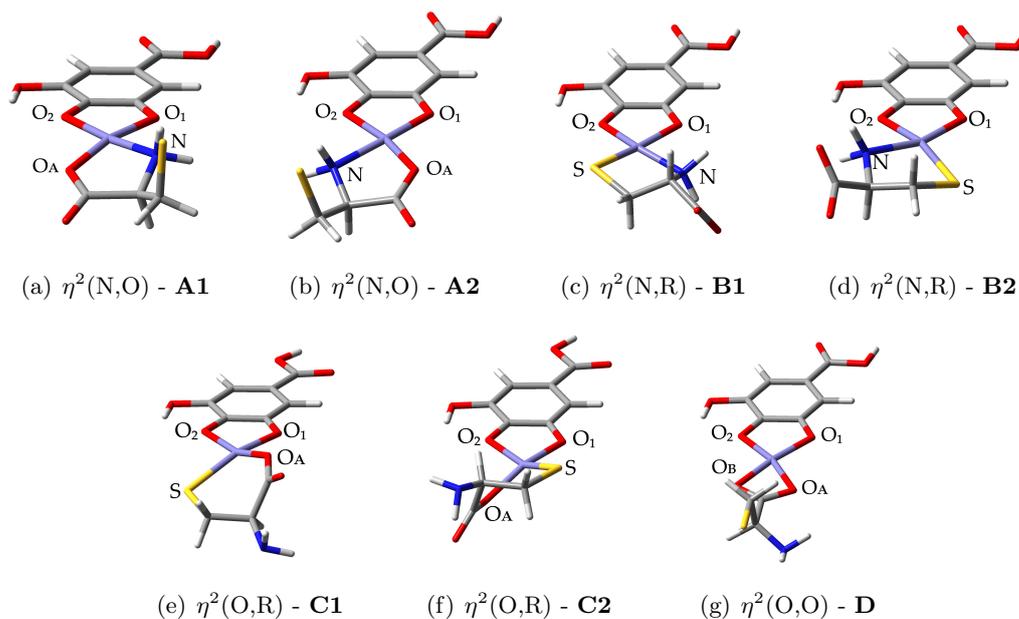
## 4.4 I complessi GAFe(II)-cisteina

La catena laterale della cisteina (Cys) è caratterizzata dalla presenza del gruppo funzionale tiolico  $[\text{R} = \text{CH}_2\text{SH}]$  che rende questo amminoacido unico rispetto agli altri. Come noto, la cisteina è facilmente ossidabile a cistina, un dimero in cui due unità di Cys sono legate da un ponte disolfuro. In questa analisi ci occuperemo però soltanto delle interazioni con il monomero. Cys possiede tre potenziali siti di interazione e può agire da legante bidentato e tridentato. La struttura è analoga a quella di Ser, ad eccezione del gruppo -SH che sostituisce il gruppo -OH.

È noto che gruppi funzionali diversi abbiano una diversa affinità con i metalli di transizione. Considerazioni di tipo qualitativo possono essere fatte applicando la teoria degli acidi e basi hard-soft (HSAB). Secondo questa teoria il gruppo tiolato può essere infatti classificato come una base *soft*, a differenza dei gruppi amminico e carbossilico finora studiati che sono comunemente considerati basi *hard*. Da questa semplice analisi si può prevedere, ad esempio, l'elevata affinità di Cys nei confronti di metalli *soft* come ad esempio  $\text{Hg}^{2+}$  o  $\text{Pd}^{2+}$  e una minore affinità con metalli *hard*, come ad esempio  $\text{Fe}^{3+}$  o cationi alcalini. All'interno dello schema HSAB il catione  $\text{Fe}^{2+}$  possiede caratteristiche intermedie tra le due categorie e pertanto è difficile stimare a priori se l'affinità con il centro metallico sia superiore o meno a quella di Ser [49].

Nell'analisi strutturale ed energetica, per le stesse considerazioni fatte in precedenza per Ser, abbiamo adottato come modello il complesso  $[\text{GAFe}(\text{II})\text{Cys}]^{2-}$ . Le geometrie ottimizzate

dei complessi bidentati ad alto spin sono riportate in figura 4.9 e risultano molto simili a quelle individuate per il sistema  $[\text{GAFe(II)Ser}]^{2-}$ , anche per quanto riguarda le distanze di legame, fatta eccezione per la distanza media Fe-S che risulta di 2.41 Å, in linea con il valore di 2.33 Å riportato in letteratura per un complesso ottaedrico analogo. A differenza del complesso con Ser, per le strutture di tipo **A**, è più stabile l'isomero con il gruppo tiolico deprotonato a favore del gruppo carbossilico di GA, con una differenza di energia tra le due strutture di circa 30 Kcal/mol.



**Figura 4.9:** Strutture dei complessi bidentati  $[\text{GAFe(II)Cys}]^{2-}$ , ottimizzate in vuoto HS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

I complessi tridentati  $\eta^3(\text{N,O,R})$ , riportati in figura 4.10, presentano una geometria pseudo ottaedrica maggiormente distorta rispetto a quella individuata per  $[\text{GAFe(II)Ser}]^{2-}$ , dovuta alla distanza di legame piuttosto lunga Fe-S.

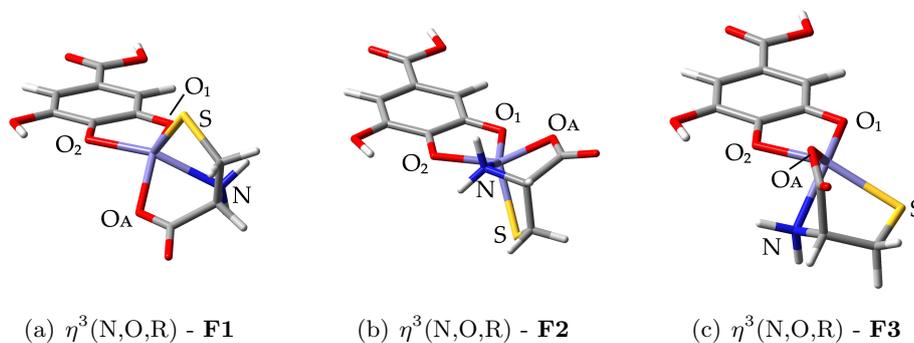
La presenza dell'atomo del gruppo tiolico non ha grande influenza sulla stabilità relativa delle strutture. Dall'esame delle energie relative emerge che la struttura più stabile è **B1**; le altre strutture, ad eccezione di **D**, sono comunque energeticamente molto vicine ad essa. Il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{O,O})$  ha un'energia di circa 10 Kcal/mol superiore a quella della struttura più stabile. La differenza energetica con la struttura **A1** è ridotta rispetto a quella individuata per il complesso con Ser e paragonabile a quella trovata in  $[\text{GAFe(II)Gly}]^-$ . L'analisi suggerisce quindi il seguente ordine di stabilità per i diversi modi di coordinazione:

$$\eta^2(\text{N,R}) > \eta^2(\text{N,O}) \sim \eta^3(\text{N,O,R}) \sim \eta^2(\text{O,R}) \gg \eta^2(\text{O,O})$$

*(3 Kcal/mol)*
*(10 Kcal/mol)*

	$\eta^2(\text{N,O})$		$\eta^2(\text{N,R})$		$\eta^2(\text{O,R})$		$\eta^2(\text{O,O})$	$\eta^3(\text{N,O,R})$		
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>D</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
$\Delta E$	3.8	4.1	0.0	0.4	4.1	3.8	9.3	1.8	3.0	3.2
$\Delta E_{HL}$	51.0	53.8	47.6	50.0	53.9	55.3	61.0	49.2	48.2	43.9
<b>r Fe-O<sub>1</sub></b>	1.930	1.877	1.992	1.956	1.988	1.976	1.937	2.004	2.016	1.997
<b>r Fe-O<sub>2</sub></b>	1.899	1.962	2.017	2.066	2.048	2.064	1.990	2.078	2.067	2.094
<b>r Fe-O<sub>A</sub></b>	2.014	2.017	-	-	1.984	1.986	2.064 <sup>a</sup>	2.073	2.083	2.119
<b>r Fe-N</b>	2.228	2.222	2.130	2.128	-	-	-	2.239	2.245	2.243
<b>r Fe-S</b>	-	-	2.347	2.349	2.383	2.379	-	2.451	2.453	2.470

**Tabella 4.5:** Dati strutturali ed energetici dei complessi  $[\text{GAFe(II)Cys}]^{2-}$  ottimizzati a livello di calcolo M06/6-311G(d,p) in vuoto, HS.  $\Delta E$  esprime la differenza di energia (Kcal/mol) rispetto alla struttura più stabile;  $\Delta E_{HL}$  rappresenta la differenza di energia (Kcal/mol) tra la struttura ad alto spin e l'analoga struttura a basso spin ed è definito come:  $\Delta E_{HL} = E_{HS} - E_{LS}$ . Le distanze di legame sono espresse in Å. <sup>a</sup>Distanza media Fe-O<sub>A</sub>, Fe-O<sub>B</sub>



**Figura 4.10:** Strutture dei complessi tridentati  $[\text{GAFe(II)Cys}]^{2-}$ , ottimizzate in vuoto HS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

## 4.5 I complessi GaFe(II)-aspartato

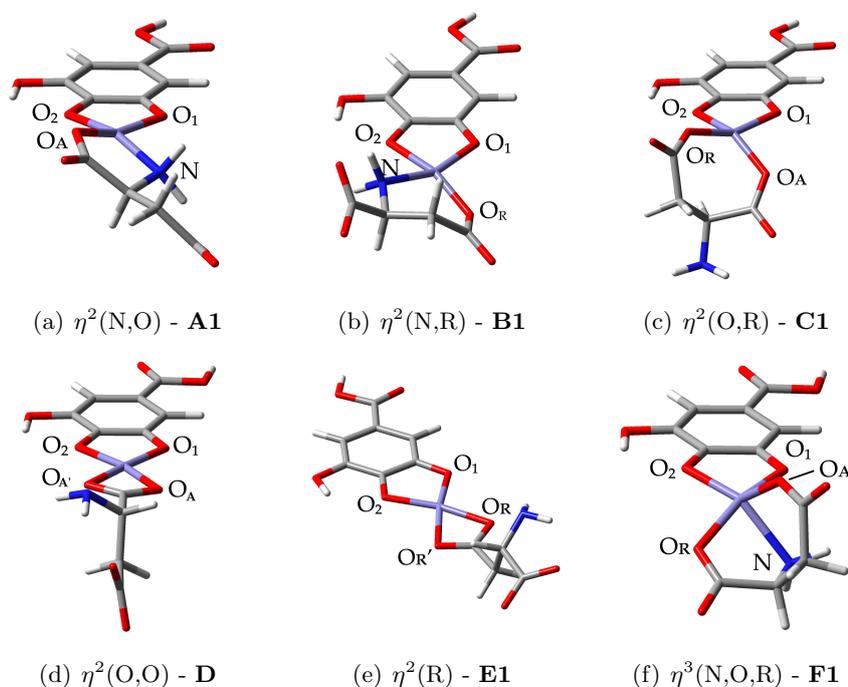
Gli amminoacidi con residui acidi come l'acido glutammico (Glu) e l'acido aspartico (Asp) contengono la funzionalità carbossilica ad entrambe le estremità della molecola. La catena laterale di Glu  $[\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{COOH}]$  ha un gruppo metilenico in più rispetto a quella di Asp  $[\text{R} = \text{CH}_2\text{COOH}]$  e tale differenza strutturale influenza la stabilità relativa dei complessi in quanto nelle interazioni  $\eta^2(\text{N,R})$  e  $\eta^2(\text{O,R})$  si creano strutture ad anello più tensionate. La tabella 4.6 riassume schematicamente i potenziali modi di legame per entrambi gli amminoacidi. In base ai risultati ottenuti nelle sezioni precedenti, l'analisi strutturale viene condotta sulle strutture ad alto spin di Asp, prendendo in esame solo l'isomero **1** di ciascun modo di coordinazione, visto che le differenze di energia tra isomeri configurazionali dello stesso modo di chelazione sono piccole. Per Asp la possibilità di una coordinazione di tipo  $\eta^2(\text{O,R})$  è confermata anche da studi sperimentali in cui si impiega  $\text{Al}^{3+}$  come centro metallico [57].

Per il sistema modello  $[\text{GAFe(II)Asp}]^{2-}$  è interessante prendere in esame anche l'interazione  $\eta^2(\text{R})$  riguardante il gruppo  $\text{COO}^-$  del residuo laterale, analoga alla  $\eta^2(\text{O,O})$  in cui

	$\eta^2(\text{N},\text{O})$	$\eta^2(\text{N},\text{R})$	$\eta^2(\text{O},\text{R})$	$\eta^2(\text{O},\text{O})$	$\eta^2(\text{R})$	$\eta^3(\text{N},\text{O},\text{R})$
ASP	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GLU	✓	X	X	✓	✓	X

**Tabella 4.6:** Possibili modi di coordinazione per Asp e Glu. Il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{R})$  è analogo a  $\eta^2(\text{O},\text{O})$ , l'unica differenza riguarda il gruppo  $\text{COO}^-$  coinvolto nel legame.

lo stesso gruppo funzionale si trova direttamente legato al  $\text{C}\alpha$  dell'amminoacido. Come abbiamo visto, l'interazione che coinvolge entrambe gli ossigeni del gruppo carbossilico gode di una certa stabilità ed è interessante prenderla in considerazione per il successivo studio sul modello proteico. I residui laterali come Asp e Glu, con il gruppo  $\text{COO}^-$  che protende verso l'esterno della catena, infatti, possono essere efficaci siti di interazione nel polipeptide grazie alla minore repulsione sterica esercitata dalla catena proteica, inevitabilmente presente negli altri modi di coordinazione bidentati.



**Figura 4.11:** Strutture dei complessi tridentati  $[\text{GAFe}(\text{II})\text{Asp}]^{2-}$ , ottimizzate in vuoto HS, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

Per quanto riguarda il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{N},\text{O})$  abbiamo valutato l'energia relativa dei due possibili isomeri che differiscono per la protonazione del gruppo carbossilico sulla catena laterale. Risulta più stabile per circa 30 Kcal/mol la struttura deprotonata **A1**; un risultato analogo lo si ottiene per gli isomeri **D** e **E1**. Questo dato suggerisce che il complesso è stabilizzato dalla maggiore densità di carica negativa presente sull'amminoacido, anche quando il gruppo  $\text{COO}^-$  non è direttamente coinvolto nel legame.

Confrontando le energie relative dei complessi con entrambe i gruppi carbossilici deprotonati, le cui strutture sono riportate in figura 4.11, emerge che le strutture più stabili sono

	$\eta^2(\text{N,O})$	$\eta^2(\text{N,R})$	$\eta^2(\text{O,R})$	$\eta^2(\text{O,O})$	$\eta^2(\text{R})$	$\eta^3(\text{N,O,R})$
	<b>A1</b>	<b>B1</b>	<b>C1</b>	<b>D</b>	<b>E1</b>	<b>F1</b>
$\Delta\mathbf{E}$	1.0	0.3	9.3	9.3	10.1	0.0
<b>r Fe-O<sub>1</sub></b>	1.959	1.953	1.971	1.937	1.937	2.009
<b>r Fe-O<sub>2</sub></b>	2.005	2.052	2.037	1.986	1.986	2.059
<b>r Fe-N</b>	2.115	2.113	-	-	-	2.225
<b>r Fe-O<sub>A</sub></b>	1.969	-	1.991	2.065 <sup>a</sup>	-	2.095
<b>r Fe-O<sub>R</sub></b>	-	1.932	1.971	-	2.064 <sup>b</sup>	2.035

**Tabella 4.7:** Dati strutturali ed energetici dei complessi  $[\text{GaFeAsp}]^{2-}$  HS ottimizzati a livello di calcolo M06/6-311G(d,p) in vuoto.  $\Delta\mathbf{E}$  esprime la differenza di energia relativa (Kcal/mol) rispetto alla struttura più stabile. Le distanze di legame sono espresse in Å. <sup>a</sup>distanza media Fe-O<sub>A</sub>, Fe-O<sub>A'</sub>; <sup>b</sup>distanza media Fe-O<sub>R</sub>, Fe-O<sub>R'</sub>.

**A1** e **B1** in cui i gruppi  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_2$  sono direttamente coinvolti nell'interazione, con la formazione di anelli a cinque e sei termini. La struttura **C1**, in cui la chelazione dà origine a un anello a sette termini piuttosto tensionato, si trova ad un'energia paragonabile a quella delle strutture  $\eta^2(\text{O,O})$  con una differenza di circa 10 Kcal/mol rispetto alle strutture precedenti. L'interazione bidentata con  $\text{COO}^-$  conduce a geometrie perfettamente planari e le strutture **E1** e **D**, che differiscono per il gruppo carbossilico che si lega (nel primo caso quello legato al C  $\alpha$ , nel secondo quello del residuo laterale), hanno la stessa stabilità relativa. Ciò indica che il gruppo funzionale gioca un ruolo importante nell'interazione mentre il resto della struttura è meno influente. Il complesso tridentato **F1**, con geometria pseudo ottaedrica, ha un'energia paragonabile alle strutture **A1** e **B1**. In conclusione possiamo individuare il seguente ordine di stabilità, raggruppando in due insiemi i modi di coordinazione con energia paragonabile.

$$\eta^2(\text{N,O}) \sim \eta^2(\text{N,R}) \sim \eta^3(\text{N,O,R}) > \eta^2(\text{O,R}) \sim \eta^2(\text{O,O}) \sim \eta^2(\text{R})$$

(10 Kcal/mol)

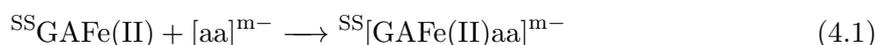
## 4.6 Analisi delle binding energy

Nelle sezioni precedenti abbiamo preso in esame complessi ternari con diversi amminoacidi, individuando le strutture energeticamente stabili per ciascun modo di coordinazione. Il parametro energetico esaminato è  $\Delta E$  ovvero la differenza di energia tra la struttura considerata e quella energeticamente più stabile. Il confronto diretto tra i valori di energia interna è stato possibile perché le strutture erano tra di loro isomere e il  $\Delta E$  ci ha fornito indicazioni per individuare quali modi di coordinazione fossero energeticamente favoriti all'interno di ogni "famiglia" di complessi. Per semplicità di lettura riportiamo nella tabella 4.8 i risultati ottenuti nelle sezioni precedenti:

$[\text{GAFe(II)Gly}]^-$	$\eta^2(\text{N,O})$	$>$	$\eta^2(\text{O,O})$		
$[\text{GAFe(II)Ser}]^{2-}$	$\eta^2(\text{O,R})$	$>$	$\eta^2(\text{N,R})$	$>$	$\eta^2(\text{N,O}) > \eta^2(\text{O,O})$
			$\eta^3(\text{N,O,R})$		
$[\text{GAFe(II)Cys}]^{2-}$	$\eta^2(\text{N,R})$	$>$	$\eta^2(\text{O,R})$	$>$	$\eta^2(\text{O,O})$
			$\eta^2(\text{N,O})$		
			$\eta^3(\text{N,O,R})$		
$[\text{GAFe(II)Asp}]^{2-}$	$\eta^2(\text{N,O})$	$>$	$\eta^2(\text{O,R})$		
	$\eta^2(\text{N,R})$		$\eta^2(\text{O,O})$		
	$\eta^3(\text{N,O,R})$		$\eta^2(\text{R})$		

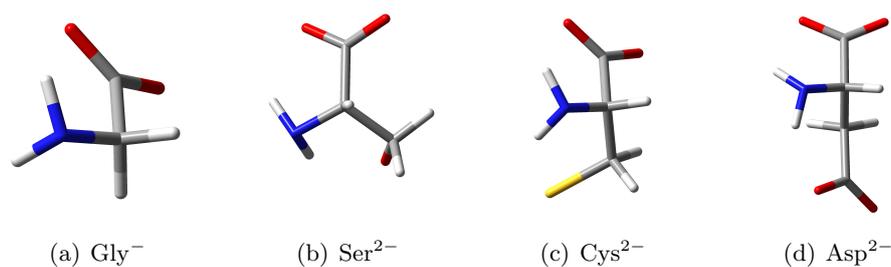
**Tabella 4.8:** Riepilogo dell'ordine di stabilità relativa dei modi di coordinazione nei complessi ternari indagati. I vari blocchi contengono le strutture che differiscono tra loro per  $< 3$  Kcal/mol.

Per valutare la stabilità relativa tra complessi ternari con diversi amminoacidi, si rende necessario ricorrere ad un altro parametro, la *binding energy* (BE), interpretabile come l'energia che si libera nella formazione del complesso a partire dai leganti e dal centro metallico non interagenti tra loro. Nel nostro caso consideriamo il processo di formazione del complesso ternario a partire dal complesso binario  $\text{GAFe(II)}$  neutro e l'amminoacido libero, considerato con carica pari a quella del complesso finale ottenuto secondo la reazione 4.1 <sup>1</sup>.



Nella figura 4.12 sono riportate le strutture ottimizzate degli amminoacidi liberi la cui energia è stata utilizzata per il calcolo di BE. È importante sottolineare che il valore di energia dell'amminoacido libero è stato determinato sulla base della struttura ottimizzata a partire dalla geometria di equilibrio dell'amminoacido stesso all'interno del complesso ternario. È evidente che un'analisi di questo tipo non è in grado di fornire risultati di BE quantitativamente attendibili e direttamente confrontabili con dati sperimentali, considerato anche il fatto che le energie di complessazione così calcolate risultano fortemente dipendenti dalla scelta del livello di calcolo e del funzionale [49]. Il confronto interno tra i risultati ottenuti

<sup>1</sup>L'apice <sup>SS</sup> indica lo stato di spin della molecola.



**Figura 4.12:** Strutture degli amminoacidi liberi, ottimizzate in vuoto, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

seguendo la metodologia descritta è però in grado di fornire informazioni utili sulla stabilità relativa e i risultati sono riportati nella tabella 4.9.

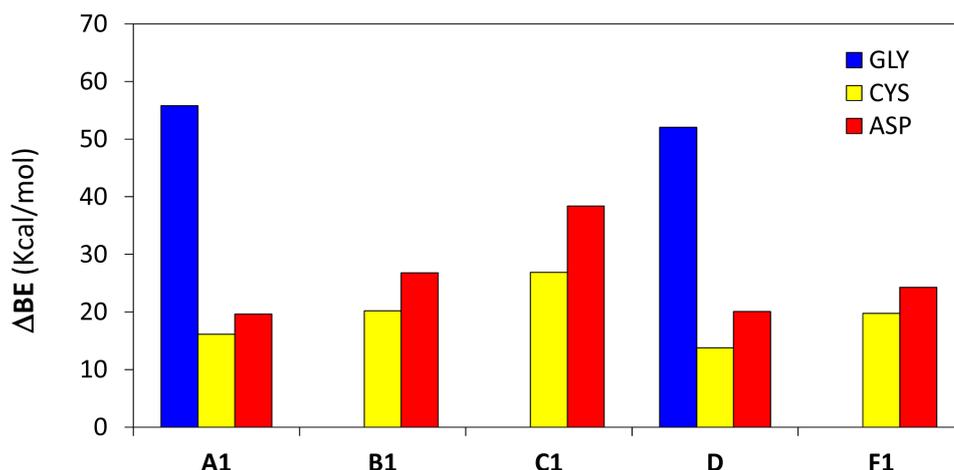
	[GAFe(II)Gly] <sup>-</sup>	[GAFe(II)Ser] <sup>2-</sup>	[GAFe(II)Cys] <sup>2-</sup>	[GAFe(II)Asp] <sup>2-</sup>
<b>A1</b>	-115 (66)	-170 (10)	-154 (27)	-151 (30)
<b>B1</b>	- -	-178 ( 3)	-158 (23)	-152 (29)
<b>C1</b>	- -	-181 ( 0)	-154 (27)	-143 (38)
<b>D</b>	-111 (70)	-163 (18)	-149 (32)	-142 (38)
<b>E1</b>	-	-	-	-142 (39)
<b>F1</b>	-	-176 ( 5)	-156 (25)	-152 (29)
	-113 <i>61</i>	-174 <i>0</i>	-156 <i>18</i>	-147 <i>27</i>

**Tabella 4.9:** BE (Kcal/mol) riferita al processo di formazione del complesso ad alto spin (eq. 4.1). Tra parentesi è rappresentata la differenza rispetto al valore di BE più basso. Nell'ultima riga sono riportate le BE medie per ciascun complesso ternario, accompagnate in *corsivo* dal valore della differenza rispetto al valore medio di [GAFe(II)Ser]<sup>2-</sup>.

Dall'analisi delle *binding energy* emerge che i valori sono compresi nel range -111 ÷ -187 Kcal/mol. Il valore di BE più basso si ha per il modo di coordinazione  $\eta^2(\text{N,R})$  di Ser. In generale si osserva che i valori di BE relativi a Ser sono inferiori rispetto agli altri, indicando che la formazione del complesso è energeticamente favorita. Per visualizzare meglio l'ordine di stabilità dei complessi, nell'ultima riga della tabella 4.9 sono riportati i valori medi di BE per ciascun complesso e in corsivo la differenza rispetto al più stabile. Questo dato evidenzia una differenza di stabilità tra i quattro sistemi e suggerisce il seguente ordine di stabilità:



È interessante infine confrontare le differenze dei valori di BE tra i diversi sistemi per ciascun modo di coordinazione. Nel grafico in figura 4.13 si riporta l'andamento di  $\Delta\text{BE}$ , definito come la differenza tra la BE del complesso considerato rispetto a quella più bassa, per ciascun modo di coordinazione. L'esame dei dati indica che, a prescindere dal modo di coordinazione, il complesso più stabile è [GAFe(II)Ser]<sup>2-</sup> e l'ordine di stabilità conferma quanto indicato dai valori di BE medi.



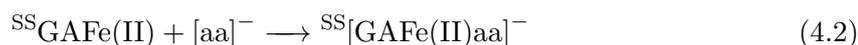
**Figura 4.13:** Andamento di  $\Delta\text{BE}$ , definito come la differenza tra la BE del complesso considerato rispetto a quella di  $[\text{GAFe(II)Ser}]^{2-}$  (che risulta sempre la più bassa e nel grafico è posta a zero), per ciascun modo di coordinazione.

I complessi  $[\text{GAFe(II)Gly}]^-$  hanno una BE molto più alta rispetto agli altri e anche i valori delle distanze di legame medie Fe-leganti differiscono sensibilmente, come evidenziato dai dati in tabella 4.10. Queste differenze possono essere imputate essenzialmente a due fatti: (1) la mancanza del residuo laterale in  $[\text{GAFe(II)Gly}]^-$ , che negli altri casi favorisce invece la formazione del complesso; (2) la differenza della carica totale tra i sistemi.

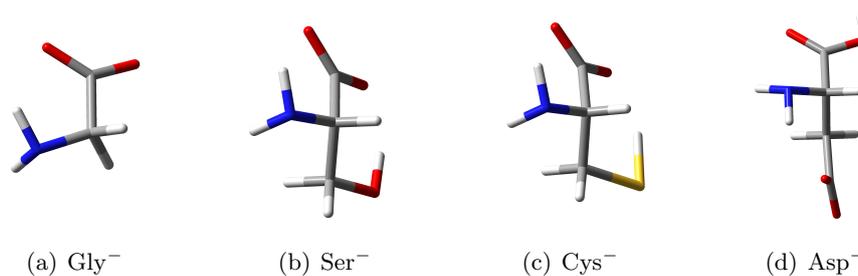
	$[\text{GAFe(II)Gly}]^-$	$[\text{GAFe(II)Ser}]^{2-}$	$[\text{GAFe(II)Cys}]^{2-}$	$[\text{GAFe(II)Asp}]^{2-}$
<b>r Fe-O<sub>n</sub></b>	1.88	1.99 (1.94)	1.98 (1.94)	1.98 (1.94)
<b>r Fe-O<sub>A</sub></b>	1.87	2.07 (1.98)	2.04 (1.97)	1.97 (1.97)
<b>r Fe-N</b>	2.00	2.24 (2.19)	2.21 (2.19)	2.15 (2.19)
<b>r Fe-R</b>	-	1.89	2.37	1.96

**Tabella 4.10:** Distanze di legame medie Fe-leganti per i complessi bidentati espresse in Å. Tra parentesi sono riportate le distanze di legame riferite alla struttura **A1** per i complessi  $[\text{GAFe(II)aa}]^-$  ottimizzati a livello di calcolo M06/6-311g(d,p).

Per valutare l'effetto della carica totale abbiamo effettuato un test calcolando i valori di BE per le strutture **A1** dei quattro complessi, considerati tutti con una unità di carica negativa. In questo caso la BE è riferita all'equazione:



Il calcolo dei nuovi valori di BE richiede la conoscenza dell'energia dei singoli amminoacidi liberi con la corretta carica, le cui strutture ottimizzate sono riportate in figura 4.14. I risultati riportati in tabella 4.11 confermano l'ipotesi che sia l'effetto della carica totale del sistema a determinare la differenza di BE emersa nell'analisi precedente tra  $[\text{GAFe(II)Gly}]^-$  e gli altri complessi.



**Figura 4.14:** Strutture degli aminoacidi liberi, ottimizzate in vuoto, a livello di calcolo M06/6-311G(d,p).

I nuovi valori di BE calcolati risultano infatti molto vicini tra loro e in particolare, per gli aminoacidi che possiedono una catena laterale funzionalizzata, la differenza è contenuta entro le 2 Kcal/mol, diversamente da quanto osservato per i sistemi doppiamente carichi. Per quanto riguarda le differenze riscontrate nelle distanze di legame, invece, i valori rimangono sostanzialmente inalterati rispetto al dato calcolato per il sistema doppiamente carico.

	BE	$\Delta$ BE
[GAFe(II)Gly] <sup>-</sup>	-115	0
[GAFe(II)Ser] <sup>-</sup>	-108	7
[GAFe(II)Cys] <sup>-</sup>	-108	7
[GAFe(II)Asp] <sup>-</sup>	-110	5

**Tabella 4.11:** Binding energy (Kcal/mol) per le strutture **A1** dei complessi [GAFe(II)aa]<sup>-</sup>. Il valore  $\Delta$ BE è calcolato come differenza rispetto al valore di BE più basso.

Il risultato suggerisce che il confronto delle BE è sensibile alla carica totale del sistema e per ottenere dati confrontabili, affetti da un minor errore, è conveniente considerare sistemi con la stessa carica. Il test effettuato riguarda solo il modo di coordinazione di base  $\eta^2(\text{N},\text{O})$ , in cui nell'interazione con il metallo non entra in gioco la catena laterale. Il risultato ottenuto conferma che la catena laterale non ha grande influenza sulla stabilità se non è direttamente coinvolta nell'interazione. In ultima analisi, se la chelazione avviene secondo il modo  $\eta^2(\text{N},\text{O})$ , non esiste un complesso ternario significativamente più stabile degli altri, ma tutti i sistemi hanno *binding energy* simili.

A riguardo delle altre strutture, in cui il residuo laterale è direttamente coinvolto nell'interazione con il centro metallico, l'analisi fatta in precedenza rimane valida in quanto i tre sistemi confrontati possiedono tutti la stessa carica e mette in evidenza che l'interazione in cui il gruppo laterale agisce da legante, come ad es. nei modi  $\eta^2(\text{N},\text{R})$  e  $\eta^2(\text{O},\text{R})$ , gode in generale di una maggiore stabilità rispetto a  $\eta^2(\text{N},\text{O})$ .



---

## Proposta di un modello di interazione con la fibra di lana

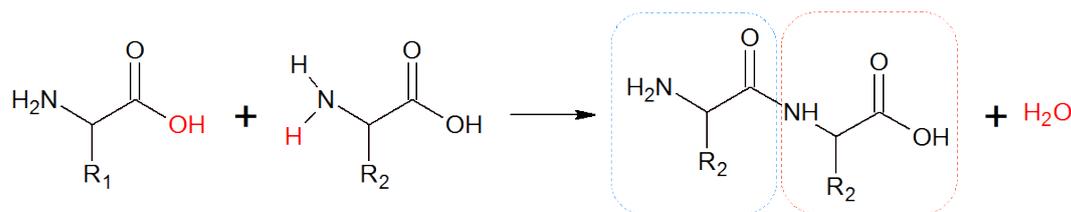
---

Nei capitoli precedenti abbiamo acquisito il *background* necessario per affrontare lo studio di un sistema più complicato in cui si cerca di descrivere l'interazione del complesso ferro-gallico all'interno di una matrice proteica e non semplicemente con il singolo amminoacido libero. Come vedremo nel corso del capitolo, la complessità del sistema impone l'introduzione di pesanti semplificazioni modellistiche per riuscire ad estrapolare dati semi-quantitativi che permettano di capire se esistono, all'interno del *probe* molecolare indagato, siti di legame preferenziali per il complesso ferro-gallico e, in ultima analisi, se la stabilità relativa e la geometria di legame all'interno della matrice proteica rispecchiano o meno i risultati ottenuti per gli amminoacidi liberi. Inizieremo quindi con una breve introduzione descrittiva della struttura delle proteine con particolare riferimento alle  $\alpha$ -cheratine, la famiglia di proteine più abbondante all'interno delle fibra di lana, dopodiché descriveremo il sistema modello e le tecniche computazionali adottate per il suo studio e infine discuteremo i risultati ottenuti.

### 5.1 La struttura tridimensionale delle proteine

Le proteine sono macromolecole naturali costituite da amminoacidi. Una breve introduzione sulle caratteristiche strutturali degli amminoacidi e delle loro proprietà è riportata nel capitolo 4. Come tutte le molecole polimeriche, le proteine possono essere descritte in termini di livelli di organizzazione, da un livello primario fino al quaternario, caratterizzati da una complessità strutturale via via crescente.

La struttura primaria delle proteine consiste nella sequenza amminoacidica ovvero nell'ordine in cui i monomeri sono legati a formare la catena proteica. Ciascun residuo è legato al successivo attraverso un legame peptidico, la cui reazione di formazione è schematizzata in figura 5.1, e in generale una proteina composta da  $n$  amminoacidi contiene  $n - 1$  legami peptidici nello scheletro.



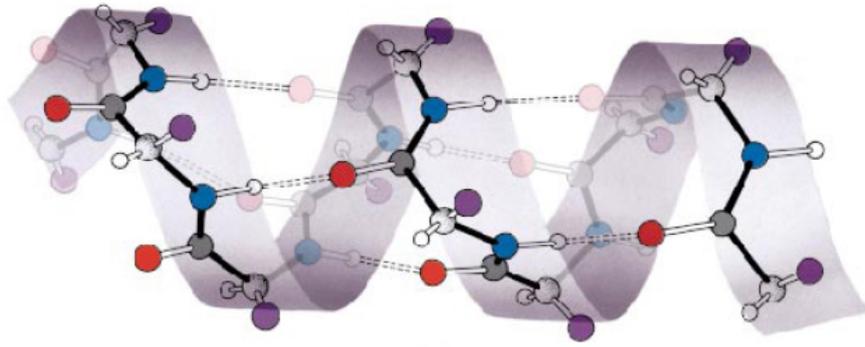
**Figura 5.1:** Reazione di formazione di un legame peptidico tra due amminoacidi. L'amminoacido con il gruppo amminico libero (indicato in blu) è detto *N-terminale* mentre quello con il gruppo carbossilico libero (indicato in rosso) è detto *C-terminale*.

Il processo di condensazione degli amminoacidi altera le loro proprietà elettroniche e la loro reattività. Nel capitolo 4 l'interazione con gli atomi donatori è stata investigata in condizioni ottimali per la formazione del legame e le caratteristiche elettroniche degli atomi donatori, soprattutto in termini di disponibilità di carica, è significativamente diversa dalla nuova situazione nel polipeptide. Le caratteristiche di una singola proteina dipendono in primo luogo dalla sequenza e dalla composizione amminoacidica che inevitabilmente ne influenzano i livelli di organizzazione strutturale superiore, riferiti alla conformazione tridimensionale delle catene, in particolare: (1) la struttura secondaria, rappresentante la conformazione spaziale assunta a livello locale dagli atomi nello scheletro polipeptidico; (2) la struttura terziaria, riferita alla distribuzione tridimensionale dell'intero polipeptide; (3) la struttura quaternaria che riguarda la disposizione spaziale di una o più catene polipeptidiche all'interno di una proteina costituita da due o più subunità.

Le caratteristiche peculiari del legame peptidico permettono di individuare, all'interno della proteina, una catena principale formata dagli atomi che partecipano ai legami peptidici e che per effetto di essi sono complanari, trascurando gli atomi costituenti le catene laterali dei residui amminoacidici. Lo scheletro proteico può quindi essere descritto come una successione di gruppi peptidici rigidi e planari. Per questo motivo è sufficiente indicare due angoli diedri di torsione intorno al legame  $C\alpha-N$  ( $\phi$ ) e al legame  $C\alpha-C$  ( $\psi$ ) di ciascun residuo per descrivere la conformazione della catena. La rotazione attorno ai due angoli è impedita da ragioni steriche e solo alcune coppie di angoli  $\phi$  e  $\psi$  conducono a conformazioni stabili sia dal punto di vista della repulsione sia per la geometria che favorisce la formazione di legami ad idrogeno intramolecolari. Tra le possibili conformazioni permesse le più note e ricorrenti sono essenzialmente: (1) l' $\alpha$ -elica, in cui la catena principale si avvolge come un'elica destrorsa; (2) il foglietto  $\beta$  in cui catene polipeptidiche, mediamente composte da sei residui amminoacidici, si affiancano parallelamente. Nella figura 5.2 è riportata una rappresentazione schematica dell' $\alpha$ -elica, che approfondiremo in seguito, in quanto è la struttura che si ritrova principalmente nelle proteine costituenti le fibre di lana [48].

## 5.2 Le $\alpha$ -Cheratine: proteine della lana

La lana è una fibra tessile naturale che si ottiene dal vello degli ovini (pecore e alcuni tipi di capre), conigli, camelidi (cammelli) e alcuni tipi di lama. La lana appartiene alla classe



**Figura 5.2:** Rappresentazione di una catena polipeptidica in conformazione  $\alpha$ -elica. Le linee tratteggiate rappresentano i legami ad idrogeno che si instaurano tra gli atomi di O (in rosso) e di H (in bianco) della catena principale. In viola sono indicate genericamente le catene laterali [48].

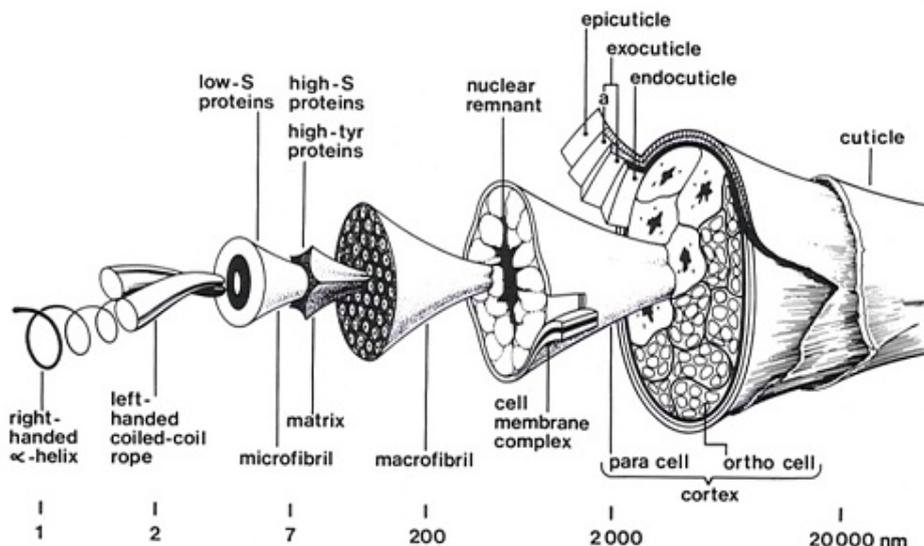
delle cheratine, una famiglia di proteine fibrose insolubili molto resistenti dal punto di vista meccanico e presenti in tutti i vertebrati dove svolgono un ruolo protettivo, di collegamento e di sostegno. Le cheratine sono la componente principale dello strato epidermico esterno corneo e delle sue appendici ed essenzialmente derivano dall'accumulo di tessuto cellulare morto. A seconda delle proprietà fisiche, le cheratine, possono essere *hard* (costituiscono capelli, lana, unghie, becchi, artigli, piume etc.) o *soft* (formano la struttura di base dell'epidermide). A seconda del loro pattern di diffrazione ottenuto ai raggi X possono essere classificate come  $\alpha$  o  $\beta$ . In particolare, le  $\alpha$ -cheratine, caratterizzate da una struttura tipo  $\alpha$ -elica, sono tipiche dei mammiferi mentre le  $\beta$ -cheratine, presenti negli uccelli e nei rettili, hanno una struttura che deriva da una sorta di allungamento dell' $\alpha$ -elica ordinaria.

La fibra della lana è un sistema estremamente complesso e il 97% del suo peso è costituito da materiale proteico. È stato stimato che la lana contenga più di 170 diverse proteine, distribuite in modo eterogeneo lungo la fibra. Queste proteine sono accomunate dalla caratteristica di possedere un elevato contenuto di zolfo e numerosi legami disolfuro tra catene diverse, formatesi in seguito a processi di ossidazione post-sintetici tra residui di cisteina adiacenti. Il restante 3% del peso della fibra è costituito da materiale non proteico come lipidi, polisaccaridi, acidi nucleici, carboidrati e da materiale inorganico, essenzialmente sali minerali. La composizione amminoacidica è stata già descritta nella sezione 4.1 e la tabella 4.1 riassume la percentuale di residui amminoacidici che si trovano nella fibre.

I primi studi sulla struttura molecolare delle fibre di lana risalgono agli anni quaranta e rivelano che il complesso miscuglio di proteine costituente la fibra è formato essenzialmente da tre tipi di proteine: (1) le proteine a basso contenuto di zolfo (*low-sulphur protein*) che hanno essenzialmente una struttura ad  $\alpha$ -elica e costituiscono le strutture filamentose nelle cellule; (2) le proteine ad alto contenuto di zolfo (*high-sulphur protein*) che non hanno una struttura secondaria organizzata e formano la matrice; (3) proteine caratterizzate da un alto contenuto in glicina e un contenuto medio di amminoacidi aromatici superiore alle altre. Nella sezione trasversale della fibra di lana, il cui diametro è compreso tra 10 e 130  $\mu\text{m}$ , si possono

individuare essenzialmente tre tipi di cellule, disposte in modo concentrico:

- **cuticolari**, costituiscono la parte esterna della fibra formando delle scaglie disposte ad embrice e ricoperte da una sottile pellicola impermeabilizzante, l'epicuticola, che costituisce lo strato più esterno delle cellule cuticolari;
- **corticali**, rappresentano il 90% in peso della fibra e sono costituite da cellule di diametro pari a  $1 \div 3 \mu\text{m}$  (fibrille), a loro volta formate da fasci filamentosi intermedi, detti microfibrille, di dimensioni 10-20 volte inferiori ( $0.05\text{-}0.1 \mu\text{m}$ ). Si distinguono inoltre due tipi di cellule corticali, presenti in misura variabile a seconda della specie animale: (1) *orto-corticali*, di struttura meno compatta e più rigonfiabile, (2) *para-corticali* di struttura più fibrosa e meno penetrabile da parte dei coloranti;
- **midollari**, sono situate nella parte interna e costituiscono la porzione porosa della fibra attraverso cui può circolare aria, producendo così un'azione termocoibente. Sono normalmente presenti solo nelle fibre di alcune specie animali (lama, alpaca) e possono essere distribuite in modo continuo per tutta la lunghezza della fibra o solo nelle parti più spesse.



**Figura 5.3:** Diagramma schematico della fibre di lana. *Fonte: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO).*

Le proteine costituenti le microfibrille, che rappresentano il cuore della fibra, appartengono alla classe delle *low-sulphur protein* e contengono una percentuale di residui di cisteina più bassa rispetto alle altre e un peso molecolare compreso nel range 40.000-58.000 uma. Questo tipo di proteine sono particolarmente ricche di residui amminoacidici che favoriscono la formazione della struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica che caratterizza circa il 50% della loro

struttura. Le microfibrille si trovano immerse in una matrice amorfa di *high-sulphur protein* contenente principalmente residui di cisteina, prolina, serina, tirosina e glicina [58, 50].

Le strutture elicoidali, individuabili in seguito alla digestione proteolitica di una miscela di *low-sulphur protein*, possono essere separate in due tipi: tipo (I), caratterizzato da una percentuale di  $\alpha$ -elica intorno al 60-80%; tipo (II), avente una percentuale di  $\alpha$ -elica inferiore, intorno al 18-36%. Il pattern di diffrazione delle strutture elicoidali mostra un passo dell'elica di 5.1 Å, più corto rispetto a quello di una normale  $\alpha$ -elica che risulta di 5.4 Å. La diminuzione della lunghezza del passo è dovuta al fatto che due catene polipeptidiche di  $\alpha$ -cheratina si avvolgono l'una sull'altra formando un'elica sinistrorsa che conduce ad una organizzazione strutturale definita *coiled-coil*. Tale conformazione, nella  $\alpha$ -cheratina, è favorita dalla struttura primaria in cui si ritrova una ripetizione periodica di 7 residui dove, nelle posizioni I e IV, prevalgono amminoacidi non polari. La conformazione *coiled-coil* favorisce l'allineamento dei residui non polari lungo un lato di ciascuna  $\alpha$ -elica massimizzando l'interazione laterale tra i due filamenti che si avvolgono su se stessi [48].

### 5.3 Modello computazionale dell' $\alpha$ -cheratina

Lo studio computazionale di sistemi biologici complessi si è sviluppato molto negli ultimi anni grazie all'aumento delle prestazioni dei calcolatori, allo sviluppo di tecniche quantomeccaniche (QM) molto efficienti, all'applicazione di tecniche ibride QM/MM e allo sviluppo di metodi semi-empirici accurati. Tutto ciò ha reso accessibile lo studio di sistemi costituiti da centinaia e migliaia di atomi attraverso protocolli di calcolo divenuti di *routine* nell'ambito della chimica computazionale.

Tra i diversi problemi affrontati attraverso l'applicazione di queste metodologie è diventata ormai una pratica comune lo studio a livello QM di sistemi complessi, come ad esempio gli enzimi, per indagarne le proprietà strutturali, i processi di eccitazione, di trasferimento di energia, i cammini di reazione etc. La principale difficoltà in questo campo di ricerca è rappresentata dalla complessità del sistema, derivante in primo luogo dall'elevato numero di atomi da trattare. La costruzione di un modello diventa molto difficile sia a livello di *input* del calcolo sia per quanto riguarda la procedura di ricerca della geometria di minima energia. Un approccio comune per la risoluzione di tali problematiche consiste nell'utilizzo di strutture molecolari determinate sperimentalmente attraverso tecniche cristallografiche (diffrazione di raggi X) o spettroscopia NMR multidimensionale. Così facendo, il chimico teorico, ha a disposizione strutture tridimensionali che riproducono fedelmente il sistema reale, impiegabili per lo studio teorico di proprietà chimico-fisiche. Tuttavia, pur conoscendo la disposizione spaziale degli atomi nel sistema reale, permane il problema del numero di atomi che può essere risolto solo adottando delle semplificazioni modellistiche, ad esempio individuando una porzione di interesse all'interno della struttura, da trattare con metodi QM *ab-initio*, e descrivendo la restante porzione molecolare ad un livello di calcolo inferiore.

La forte limitazione nell'impiego di questa metodologia di calcolo risiede nella disponibilità dei dati sperimentali relativi alle molecole di interesse. Purtroppo nel caso delle proteine

della famiglia delle cheratine costituenti le fibre di lana, è nota la sequenza amminoacidica, determinata con tecniche di sequenziamento o dall'analisi genetica, ma i database non contengono dati strutturali sperimentali. Il problema viene quindi risolto ricorrendo alle tecniche di *Homology Modelling* che riescono a predire la struttura secondaria e terziaria di una proteina basandosi sul confronto strutturale di proteine simili per le quali sono note le strutture.

### 5.3.1 L'Homology Modelling

La tecnica di *Homology Modelling* consente di costruire il modello tridimensionale della proteina *target* con risoluzione atomica, a partire dalla conoscenza della sua sequenza amminoacidica e dalle strutture di una famiglia di proteine simili, dette proteine *template*. Per un certo *target*, il sistema ricerca all'interno di una libreria di strutture proteiche sperimentali dei *template* adatti, basandosi su algoritmi che in primo luogo tengono conto dell'allineamento tra le sequenze amminoacidiche. La qualità dei risultati dipende molto dall'allineamento e dalla risoluzione dei *template*.

L'assunzione alla base dell'applicabilità della tecnica di *Homology Modelling* è che due proteine aventi una sequenza amminoacidica coincidente per circa il 30% hanno generalmente anche una struttura simile. Il concetto di similarità tra le strutture viene tradotto attraverso il parametro RMSD, ovvero la distanza quadratica media delle posizioni degli atomi (solitamente i  $C\alpha$ ) tra la proteina *target* e i *template* e la valutazione della qualità del modello generato viene condotta attraverso strumenti specifici che ne valutano l'affidabilità, come ad esempio il CASP (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*). La presenza di un mancato allineamento delle sequenze in certe regioni strutturali, specialmente nel caso delle zone di loop<sup>1</sup>, può portare a modelli completamente diversi dalla realtà. Fortunatamente, nel nostro caso, questa possibilità è limitata dal fatto che la proteina *target* ha una struttura secondaria ben definita e una conformazione terziaria nota.

Sebbene il concetto alla base dell'*Homology Modelling* sia semplice ed esistano delle regole di base precise per costruire un buon modello, l'applicazione della tecnica è complessa. Per il nostro scopo siamo comunque alla ricerca di un modello non esattamente uguale ad una certa proteina ma richiediamo soltanto che la struttura sia rappresentativa di una certa configurazione spaziale, tipica delle fibre di lana, e che la sequenza amminoacidica contenga una distribuzione di residui analoga a quella individuata nella tabella 4.1. Queste richieste giustificano l'impiego di SWISS-MODEL Workspace [59, 60], uno dei server più utilizzati nel campo dell'*Homology Modelling*, in grado di effettuare in modo automatizzato le operazioni di base per ottenere un modello *target* direttamente fruibile da parte di operatori non specializzati nel settore. SWISS-MODEL Workspace, in particolare, è un sistema integrato di *Homology Modelling Web-based* che permette all'utente di inoltrare richieste di modellazione di strutture direttamente dall'interfaccia Web.

Come abbiamo potuto osservare nella descrizione della struttura della fibra di lana (sezione 5.2), il sistema è molto eterogeneo e complesso, per questi motivi non è semplice identificare subito il modello molecolare da studiare, a differenza di quanto avviene ad esempio nello studio

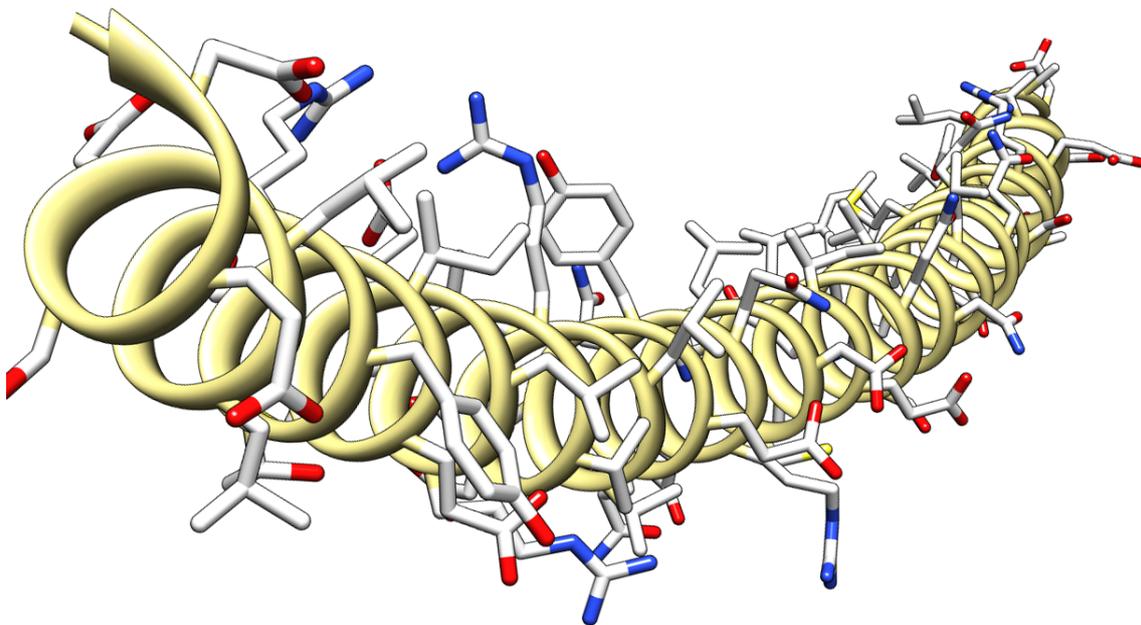
---

<sup>1</sup>Per zone di loop si intendono le regioni lungo una catena che fanno da collegamento tra regioni strutturate.

di altri sistemi biologici come uno specifico enzima. Dall'analisi della composizione delle fibre di lana è emerso che, a prescindere dalla specifica proteina, il sistema molecolare peculiare che ne determina le proprietà chimico-fisiche e meccaniche è costituito essenzialmente da filamenti polipeptidici ad  $\alpha$ -elica con la tipica conformazione *coiled-coil*.

La proteina modello scelta come *probe* molecolare è B0LK1, una proteina appartenente alla famiglia delle  $\alpha$ -cheratine della pecora (*Ovis aries*), costituita da 455 residui amminoacidici con un peso molecolare di 50'456 uma. In particolare, B0LK1 si ritrova nei filamenti intermedi (IF), i sistemi fibrosi alla base del citoscheletro e dell'involucro nucleare, e il suo dominio strutturale è di tipo *coiled-coil* [61]. Nella *repository* di SWISS-MODEL, per questa proteina, sono presenti le strutture relative a due porzioni del filamento: (1) 95-131 che non contiene zolfo; (2) 335-407 contenente zolfo. La scelta è quindi ricaduta sul frammento polipeptidico 335-407 che, oltre a contenere un residuo di cisteina che ci interessa includere nell'analisi, ha una struttura basata sul *template* 1x8y, una proteina fibrosa di origine umana costituita da due unità di  $\alpha$ -elica avvolte in conformazione *coiled coil* che condivide per il 33% la sequenza amminoacidica della proteina *target*.

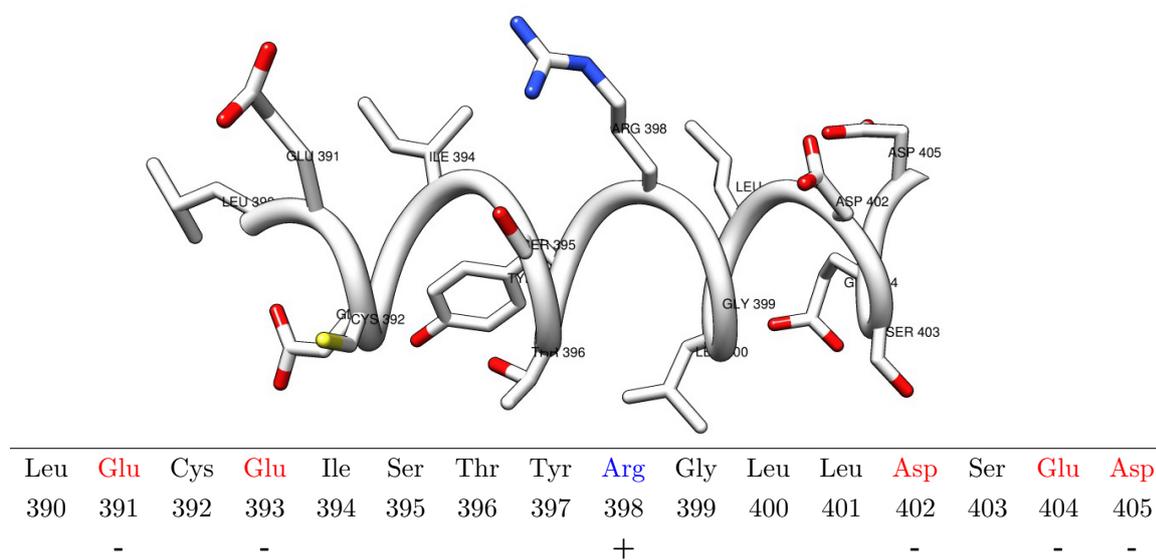
Nella figura 5.4 si riporta la rappresentazione tridimensionale della struttura del frammento polipeptidico generata con SWISS-MODEL. Il risultato è un modello di una porzione di una delle due subunità che costituiscono il sistema *coiled coil* a doppio filamento avvolto. Chiaramente, nel modello semplificato da noi adottato, non possono essere prese in considerazione le interazioni intermolecolari con la catena proteica del secondo filamento.



**Figura 5.4:** Rappresentazione tridimensionale della proteina B0LK1. La catena principale è colorata in giallo chiaro, sono visibili i residui laterali dove, per chiarezza, sono omessi gli atomi di idrogeno. È chiaramente visibile la conformazione *coiled-coil* del filamento

### 5.3.2 Il modello computazionale

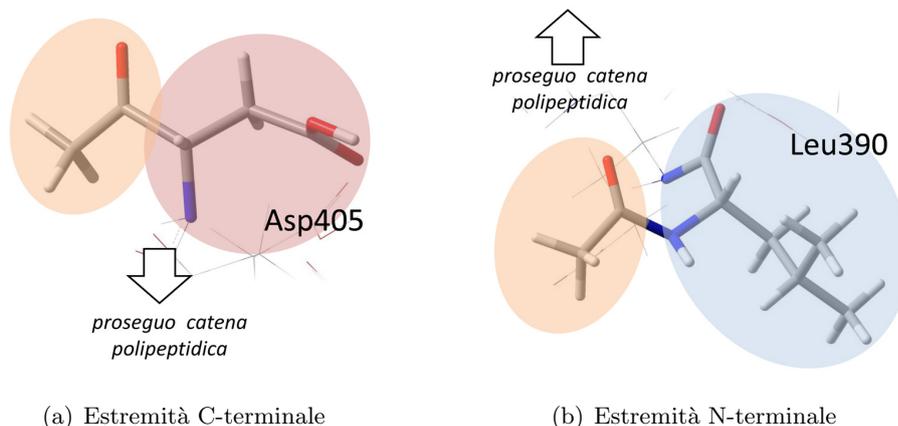
Il sistema modello, schematizzato in figura 5.4, è costituito da più di un migliaio di atomi e la sua trattazione computazionale, viste le dimensioni, richiede un approccio classico o semiempirico e non è pensabile l'impiego di metodi quantomeccanici *ab-initio*/DFT. In questa fase occorre tenere presente che l'obiettivo è lo studio dell'interazione del complesso ferrogallico con i residui amminoacidici sulla catena proteica per descrivere a livello teorico il tipo di interazione e individuare "modi" o siti di legame preferenziali rispetto ad altri. La catena polipeptidica può quindi essere ridotta estrapolando dal modello molecolare generato con l'*Homolgy Modelling* un frammento costituito un numero di residui sufficiente a garantire la riproduzione di un "effetto ambiente" e tale da contenere gli amminoacidi caratteristici. Nella figura 5.5 è riportata l'immagine tridimensionale del *probe* polipeptidico che verrà utilizzato nel prosieguo dell'analisi.



**Figura 5.5:** Rappresentazione tridimensionale *probe* polipeptidico utilizzato nel corso dell'analisi. Per chiarezza sono stati omessi gli atomi di idrogeno e la catena principale è schematizzata con un'elica.

Il modello selezionato è costituito da 258 atomi. È evidente che non può essere effettuato un taglio netto della catena all'altezza di un legame ammidico, per questo motivo alle estremità *N-terminale* e *C-terminale* è stato aggiunto un gruppo acetilico  $\text{CH}_3\text{CO}$ , come riportato in figura 5.6. Dal punto di vista della carica elettrica il frammento viene considerato complessivamente neutro. Se avessimo considerato deprotonati tutti i residui acidi (indicati in rosso nella tabella in figura 5.5) e protonati quelli basici (indicati in blu), la carica netta del sistema risulterebbe di  $-4q$ . Come confermato da test preliminari, considerare un sistema con una densità di carica negativa così elevata comporta problemi dal punto di vista computazionale, in particolare nella convergenza delle procedure SCF. Il problema si risolve considerando protonati tutti i residui acidi ad eccezione di Glu391 (spazialmente più vicino ad Arg398) e protonato anche l'unico residuo basico (Arg398). Così facendo si mantiene la molecola com-

pletivamente neutra, con la possibilità di deprotonare gruppi funzionali delle catene laterali esterne (es. il gruppo ossidrilico della serina) quando si considerano le interazioni con il centro metallico, spostando il protone sul residuo amminoacidico deprotonato. In questo modo è possibile confrontare direttamente le energie relative di diversi isomeri strutturali, contenenti il medesimo numero di atomi.

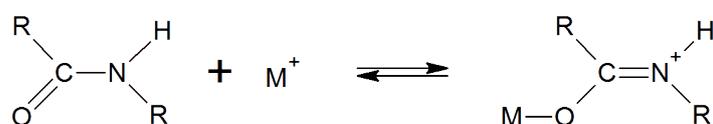


**Figura 5.6:** Rappresentazione tridimensionale delle terminazioni del frammento polipeptidico.

## 5.4 Quali interazioni sono possibili?

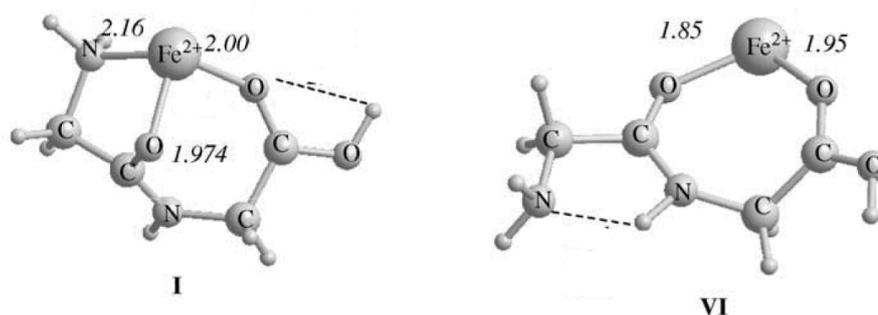
Le interazioni del complesso ferro-gallico con gli amminoacidi liberi costituiscono un *background* di informazioni dal quale attingere per lo studio sul *probe* polipeptidico. Se prendiamo in esame la catena principale, trascurando per il momento le catene laterali degli amminoacidi, siamo di fronte ad una situazione molto diversa rispetto a quella incontrata precedentemente per gli amminoacidi liberi. Il doppietto elettronico dell'atomo di azoto nel polipeptide non è completamente libero in quanto è coinvolto nella risonanza tipica del gruppo ammidico in cui il legame  $C_{\alpha}$ -N assume parziali caratteristiche di doppio legame. Anche la situazione per l'atomo di ossigeno è diversa: nel polipeptide non esiste più un gruppo carbossilico (il gruppo acido -OH è stato eliminato in seguito alla condensazione del residuo per formare la catena) ma sopravvive solo un ossigeno di tipo carbonilico.

Ad ogni modo la nuova situazione elettronica non esclude la possibilità di interazioni con il centro metallico. Nella *review* dedicata alle proprietà di coordinazione del legame ammidico, *Siegel e Martin* [51] propongono, per l'ammide neutra, lo schema riportato in figura 5.7 dove si osserva un incremento del carattere di doppio legame C-N e la metallazione all'ossigeno ammidico in seguito all'interazione dell'ammide con il metallo.



**Figura 5.7:** Reazione di O-metallazione del gruppo ammidico.

Lo studio teorico a livello DFT condotto da Xu [54] sulla glicilglicina, un dimero ottenuto dalla condensazione di due unità di glicina, mostra che il complesso ad energia più bassa prevede una chelazione tridentata che coinvolge i due atomi di ossigeno carbonilici e l'azoto terminale amminico (struttura I in figura 5.8). La struttura VI, prevista ad un'energia di sole 16 Kcal/mol più elevata, si riferisce al complesso bidentato che coinvolge i due ossigeni carbonilici.



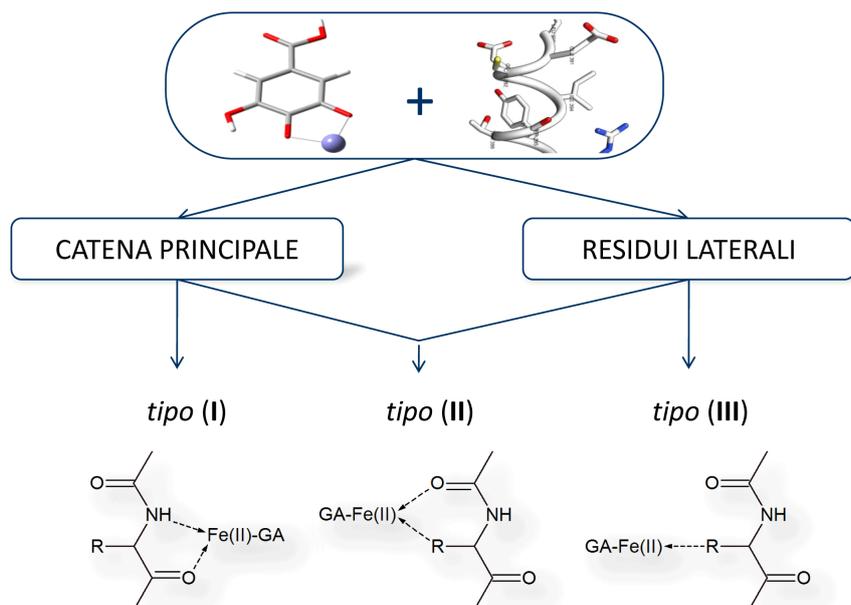
**Figura 5.8:** Strutture dei complessi Fe(II)-glicilglicina, ottimizzati in vuoto HS, a livello di calcolo PW91 LANL2DZ/6-311++G(d,p) [54].

La struttura ad  $\alpha$ -elica non permette le stesse interazioni prevedibili per un piccolo oligopeptide, riportate in figura 5.8. Nell'individuazione dei possibili siti di interazione si deve tener conto di due elementi strutturali peculiari: (1) la rigidità della catena principale che non può subire grandi deformazioni in quanto è vincolata dalle interazioni *H-bond* tra i diversi residui; (2) l'ingombro sterico delle catene laterali degli amminoacidi, che hanno poca influenza se consideriamo le interazioni con uno ione metallico libero, ma che diventano invece importanti quando è presente anche GA a causa delle sue dimensioni. Le catene laterali, inoltre, possono interagire con il complesso nel caso siano spazialmente vicine al sito di legame.

Se, oltre alla catena principale, consideriamo anche gruppi funzionali delle catene laterali degli amminoacidi, è evidente che possono nascere delle interazioni analoghe a quelle esaminate nel capitolo 4. A questo punto si apre una duplice possibilità: interazioni di tipo  $\eta^1(\text{R})$  in cui partecipa direttamente solo il gruppo funzionale e interazioni di tipo  $\eta^2(\text{N,R})$  o  $\eta^2(\text{O,R})$  in cui interviene anche l'atomo di ossigeno o di azoto facente parte della catena principale. Alla luce di questa discussione possiamo quindi raggruppare le interazioni in tre categorie, secondo lo schema riportato in figura 5.9.

Nella nostra analisi abbiamo preso in esame diversi residui amminoacidici, elencati in tabella 5.1, dove per ciascun sito di interazione è indicata la possibilità o meno che il complesso ferro-gallico si leghi alla catena. Le interazioni di tipo (I) sono possibili solo quando nella struttura primaria sono presenti residui di Gly perché l'assenza della catena laterale non ostacola stericamente l'interazione del complesso GAFe(II) con la catena principale; in tutti gli altri casi ciò non è possibile.

Per i residui di Ser e Cys, in cui la catena laterale è sufficientemente corta, sono possibili interazioni di tipo (II) ma non si riescono ad ottenere quelle di tipo (III) perché il complesso



**Figura 5.9:** Schema delle potenziali interazioni del complesso GAFe(II) con il *probe* polipeptidico. Le interazioni di tipo (I) coinvolgono solo gli atomi N,O della catena principale, le interazioni di tipo (III) invece coinvolgono esclusivamente i gruppi funzionali dei residui laterali, mentre quelle di tipo (II) coinvolgono entrambi i sistemi.

rimane troppo vicino alla catena e tende ad interagire con gli ossigeni carbonilici dando comunque un'interazione di tipo (II). Nel caso di Glu e Tyr, invece, la situazione è opposta in quanto la catena, più lunga o rigida, non permette interazioni di tipo (II). Nel caso di Asp sono invece possibili entrambe le interazioni in quanto il gruppo  $\text{COO}^-$  permette una coordinazione diretta di tipo  $\eta^2(\text{R})$  che mantiene GAFe(II) sufficientemente distante dalla catena principale.

Residuo	Tipo (I)	Tipo (II)	Tipo (III)
Gly399	✓	✗	✗
Ser395	✗	✓	✗
Asp402	✗	✓	✓
Cys392	✗	✓	✗
Glu393	✗	✗	✓
Tyr397	✗	✗	✓

**Tabella 5.1:** Possibili interazioni del complesso GAFe(II) con il *probe* polipeptidico.

## 5.5 Strategia computazionale per lo studio di un sistema complesso

Se al *probe* polipeptidico aggiungiamo anche il complesso ferro-gallico, il numero di atomi sale a 275 e un approccio di tipo DFT con una base di tipo 6-311g(d,p), ragionevolmente grande per descrivere correttamente gli elettroni del metallo e le interazioni *long-range*, prevede l'impiego di 3414 funzioni gaussiane. Il processo di calcolo dell'energia di singolo punto richiede circa 40 ore di tempo macchina per il sistema LS e circa 90 ore se consideriamo il caso ad alto spin per il quale si deve ricorrere all'approccio *unrestricted*. Questo impedisce di effettuare ottimizzazioni di geometria perché le risorse di calcolo a disposizione sono limitate. Ai fini dell'analisi non è comunque strettamente necessario percorrere questa strada ed è possibile elaborare una strategia computazionale diversa che rappresenti un buon compromesso tra l'efficacia della descrizione del sistema e il tempo macchina. Di seguito presentiamo brevemente le principali tecniche applicabili allo studio di grandi sistemi, riportando i risultati di alcuni test preliminari per verificarne l'attuabilità nel nostro caso.

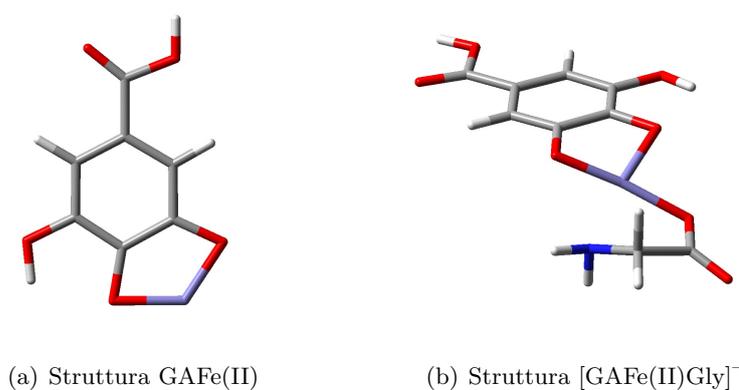
### 5.5.1 Il metodo semiempirico PM6

Come accennato nella sezione 3.1, i metodi semiempirici tentano di risolvere due limitazioni tipiche dei calcoli tipo *Hartree-Fock*: la bassa velocità e la scarsa accuratezza, omettendo o parametrizzando certi integrali sulla base di dati sperimentali, come ad esempio le energie di ionizzazione di atomi o i momenti di dipolo molecolari. I metodi semiempirici sono quindi molto veloci, applicabili a grandi molecole e in grado di fornire risultati accurati quando le molecole esaminate sono simili a quelle usate per la loro parametrizzazione. In particolare, i moderni metodi semiempirici, basati sul metodo *Neglect of Diatomic Differential Overlap* (NDDO), contengono diverse approssimazioni riguardanti gli integrali di sovrapposizione (considerati nulli se appartenenti ad OA diversi), e gli integrali mono- e bielettronici.

Nel corso degli anni sono state apportate modifiche al modello originale che, nella sua formulazione di base, non era in grado di descrivere correttamente i legami ad idrogeno, sovrastimava la repulsione internucleare e forniva risultati poco affidabili per i calori di formazione. Sono nati così i metodi AM1, PM3 e infine, l'ultimo della serie, PM6 (2007) che cercano di superare queste problematiche utilizzando delle equazioni modificate per la repulsione internucleare che generano delle forze di attrazione non-fisiche in grado di riprodurre interazioni *long-range*. Nello corso dello sviluppo dei modelli si elaborano parametrizzazioni sempre più accurate, in particolare il metodo PM6 [62] è caratterizzato da una completa parametrizzazione per 70 elementi ed è in grado di descrivere il comportamento di metalli di transizione grazie all'inclusione degli orbitali *d*. I parametri sono stati elaborati *ad hoc* per riprodurre fenomeni specifici come ad esempio il comportamento dei catalizzatori a base di complessi di ferro nelle reazioni di estrazione di idrogeno e le proprietà redox di proteine contenenti ferro. Sebbene il metodo PM6 non sia pensato per trattare i sistemi *open-shell*, la sua applicazione a sistemi proteici contenenti gruppi eme è di grande interesse biologico. In questi sistemi, infatti, il ferro è presente negli stati di ossidazione II e III, di tipo *open-shell*. I test effettuati

comparando le strutture ottimizzate con quelle di piccoli sistemi contenenti il gruppo eme, come ad esempio il citocromo C, forniscono risultati accettabili dal punto di vista strutturale e sono in grado di prevedere con buona approssimazione la corretta geometria dei leganti intorno al centro metallico [63].

Questi risultati ci hanno incoraggiato a effettuare test preliminari per verificare se la parametrizzazione del PM6 è in grado di descrivere i nostri sistemi. Purtroppo però, già nella procedura di ottimizzazione di geometria della semplice struttura di  $\text{GAFe(II)}$ , si ottengono strutture completamente errate nei casi LS e in tutti i complessi ottaedrici idratati. L'unica struttura correttamente ottimizzata è quella del complesso HS, riportata in figura 5.10 dove però le distanze di legame Fe-O, pari a  $1.80\text{\AA}$ , sono sottostimate rispetto al calcolo DFT e la posizione del metallo non è corretta.



**Figura 5.10:** Test ottimizzazione di geometria a livello di calcolo PM6 in vuoto HS.

Nel caso del complesso ternario la geometria è errata in quanto il centro metallico non mantiene la coplanarità con l'anello aromatico di GA ma si trova al di sotto del piano molecolare di circa  $30^\circ$ . Dai test effettuati appare evidente che il modello semiempirico non è adatto alla descrizione dei nostri sistemi molecolari più semplici e quindi non è possibile utilizzarlo nello studio delle interazioni sul *probe* polipeptidico. Probabilmente il modello riesce a descrivere meglio le interazioni Fe-N, analoghe a quelle presenti nelle porfirine contenenti il gruppo eme per le quali si ottengono buoni risultati, mentre la parametrizzazione è meno buona per le interazioni con gruppi fenolici o carbossilici.

### 5.5.2 Il metodo ONIOM

Se da una parte i metodi semi-empirici, adatti per la descrizione di grandi sistemi, si rivelano nel nostro caso non applicabili, dall'altra c'è l'impossibilità di applicare i metodi quanto-meccanici *ab-initio*/DFT ad un sistema contenente un elevato numero di atomi. Una possibile soluzione a questa problematica nasce dall'idea di suddividere il sistema molecolare di interesse in due o più parti, chiamate *layer*. La parte più difficilmente trattabile, o comunque quella di interesse per lo studio di proprietà con elevata accuratezza, è detta *inner layer* e viene trattata con un alto livello di teoria (HL) mentre il resto del sistema (*outer layer*) è descritto con metodi meno costosi, ad un livello di teoria più basso (LL).

I diversi metodi ibridi sviluppati differiscono essenzialmente per il modo attraverso cui: (1) viene trattata la regione di confine tra i due livelli, in particolare quando gli atomi appartenenti a livelli diversi sono connessi da legami covalenti; (2) vengono trattate le interazioni tra le parti *inner* e *outer* del sistema. Il metodo ONIOM, implementato all'interno del software Gaussian09, permette di trattare ciascun *layer* con un livello di teoria arbitrario e possono essere condotte ottimizzazioni di geometria su qualunque tipo di sistema. Indicando l'intero sistema molecolare con  $X - Y$  (dove con  $X$  definiamo l'*inner layer* e con  $Y$  l'*outer layer*) possiamo calcolare l'energia del sistema attraverso l'equazione:

$$E(X - Y) = E_{low}(X - Y) - E_{low}(X) + E_{high}(X) \quad (5.1)$$

L'energia così ottenuta è un'approssimazione dell'energia reale del sistema che è data da  $E_{real} = E(X - Y) + D$  dove  $D$  è un errore della procedura di estrapolazione che, se rimane costante per due diverse strutture, permette di valutare correttamente le differenze relative di energia [64].

L'idea è quella di applicare il metodo ONIOM(PM6:M06/6-311g\*\*) al nostro sistema, trattando l'*outer layer* con un metodo semiempirico e l'*inner layer*, costituito dalla porzione di nostro interesse contenente il centro metallico, con il metodo DFT. Dal momento che l'*outer layer*, costituito solo dagli elementi H, N, O, C, S, è trattato esclusivamente a livello LL, ci aspettiamo che le geometrie ONIOM per questa porzione molecolare siano simili a quelle ottenibili con i metodi semi-empirici, in grado di offrire per questo tipo di atomi un'ottima descrizione. Nell'*inner layer* i contributi derivanti dalla descrizione LL del sistema reale (*inner layer* + *outer layer*) dovrebbero cancellarsi con i contributi LL del sistema modello (*inner layer* + atomi di collegamento) e quindi la geometria ottimizzata ONIOM per questa porzione di sistema dovrebbe essere simile a quella ottimizzata con un calcolo DFT.

Alcuni test preliminari sono stati effettuati direttamente sul *probe* polipeptidico in quanto ha poco significato applicare il metodo a piccoli sistemi come i complessi ternari dove gli effetti di confine tra i due *layer* diventano importanti. I risultati ottenuti indicano che nelle ottimizzazioni di geometria della porzione descritta HL gli effetti della cattiva descrizione elettronica del PM6 non riescono ad annullarsi, specie per i calcoli ad alto spin, e le strutture che si ottengono non sono compatibili con quelle ottenute con metodi DFT puri.

### 5.5.3 Il metodo DFT con l'impiego di diversi set di base

La suddivisione del sistema in due porzioni da trattare con due livelli di calcolo diversi è un'idea interessante ed è possibile continuare con questo approccio impiegando lo stesso metodo di calcolo per tutto il sistema ma scegliendo due diversi set di funzioni di base per descrivere la porzione *inner* e *outer*. Così facendo siamo in grado di mantenere la buona descrizione del DFT, riducendo il costo computazionale grazie alla diminuzione del numero di funzioni di base complessivo impiegato nel calcolo degli integrali.

L'impiego di un set di base più piccolo implica una descrizione meno accurata delle proprietà elettroniche e questo si riflette, in modo particolare per i metodi DFT, sulla bontà della descrizione delle interazioni a lungo raggio. L'effetto globale di tipo elettrostatico è

comunque mantenuto nella descrizione. Per ottenere risultati confrontabili, il sistema descritto HL (con la base più estesa) deve essere definito in modo analogo per i diversi siti di interazione e per poter valutare le differenze relative di energia è necessario effettuare almeno un calcolo di energia di singolo punto (SPE) impiegando il set di base HL per tutto il sistema.

Alle metodiche di calcolo finora descritte si affianca la tecnica di ottimizzazione di geometria vincolata che permette di tenere bloccati nelle loro posizioni iniziali certi atomi e di lasciarne liberi altri durante la procedura di ottimizzazione. Il risultato è la convergenza verso la geometria di minima energia della porzione libera del sistema, tenendo conto dei vincoli imposti dall'esterno. L'impiego della tecnica di ottimizzazione di geometria vincolata è fondamentale nelle applicazioni biologiche, specialmente quando si trattano frammenti molecolari estratti da una struttura tridimensionale complessa. Se lanciassimo una procedura di ottimizzazione di geometria lasciando totalmente libero il frammento polipeptidico, quest'ultimo perderebbe memoria della conformazione originale ad  $\alpha$ -elica e subirebbe una deformazione strutturale non realistica con la conseguente perdita delle informazioni ottenute con l'*Homology Modelling*. Vincolare le posizioni di specifici atomi nello spazio permette invece di mantenere la conformazione originale e allo stesso tempo permettere la corretta ottimizzazione della porzione molecolare lasciata libera.

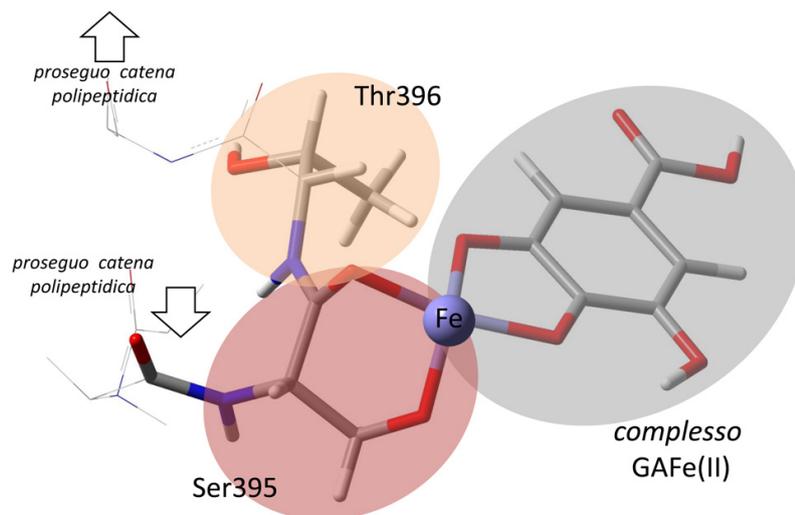
#### 5.5.4 Descrizione della strategia computazionale utilizzata

Al fine di ottenere il miglior compromesso tra accuratezza e costo computazionale, le ottimizzazioni di geometria del complesso ferro-gallico all'interno del *probe* polipeptidico sono state condotte a livello di calcolo DFT, con l'impiego di due diversi set di base unitamente alla tecnica di ottimizzazione di geometria vincolata.

La definizione della porzione di sistema descritta con la base estesa (HL) 6-311g(d,p) non può coinvolgere in tutti i casi lo stesso numero di atomi poiché per ciascun sito di interazione sono coinvolti amminoacidi diversi. È importante però cercare di definire sempre allo stesso modo la porzione HL. A titolo di esempio, nella figura 5.11, è rappresentata l'interazione del complesso ferro-gallico con il residuo Ser395; in questo caso il sistema descritto con la base estesa e libero di muoversi nella procedura di ottimizzazione è costituito da:

- gli atomi del complesso GAF<sub>e</sub>(II);
- gli atomi del residuo di Ser395 e del gruppo C=O del residuo precedente per mantenere una buona descrizione del legame ammidico;
- gli atomi della catena laterale del residuo di Thr396 che si trovano spazialmente vicini al complesso GAF<sub>e</sub>(II) per i quali non si può trascurare un loro interazione con il complesso ferro-gallico.

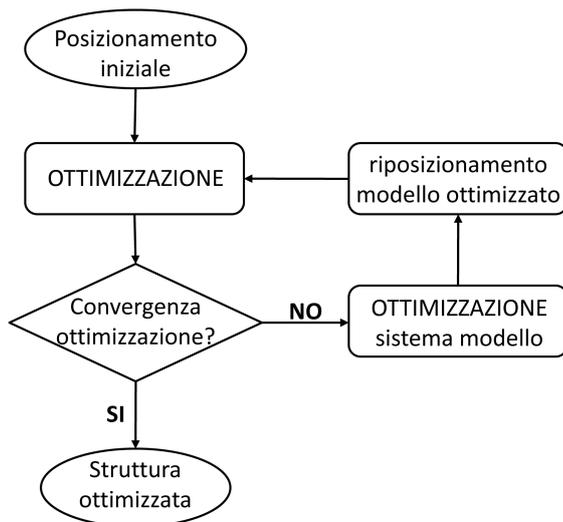
Gli atomi che costituiscono il resto della molecola sono invece rappresentati con un set di base più piccolo (LL), di tipo 3-21g, e le loro posizioni sono vincolate durante l'ottimizzazione di geometria. Le scelte modellistiche illustrate sono analoghe per gli altri casi.



**Figura 5.11:** Rappresentazione tridimensionale della geometria di *input* per l'interazione di GAFe(II) con il sito Ser395 (interazione tipo II). Il sistema descritto HL è rappresentato con i *tube* mentre il resto della catena polipeptidica (LL) è rappresentata in *wireframe* e sono omesse le catene laterali.

La corretta preparazione degli *input* per il calcolo prevede una prima fase in cui si posiziona il complesso GAFe(II) nel sito di interesse, cercando di riprodurre dal punto di vista geometrico una struttura simile a quelle ottenuta per i complessi con gli amminoacidi liberi; successivamente si definiscono gli atomi che verranno descritti HL e LL, vincolando le posizioni di questi ultimi e infine si lancia la procedura di ottimizzazione di geometria. A questo punto possono insorgere problemi di convergenza dei cicli SCF in quanto l'algoritmo di *default* implementato in Gaussian09 non sempre riesce a trovare un corretto *guess* iniziale per la densità elettronica. In questo caso conviene effettuare un'ottimizzazione di geometria di un sistema modello costituito dagli atomi HL, saturando le lacune di valenza con gruppi metilici. Le posizioni degli atomi che si trovano al confine del sistema modello e dei gruppi metilici aggiunti sono vincolate nell'ottimizzazione di geometria. Successivamente si procede al riposizionamento del sistema modello nella struttura originale, avendo cura di rimuovere da questa gli atomi già compresi nel sistema modello e i gruppi metilici aggiunti. Se il processo è stato ben condotto, la posizione degli atomi terminali nel sistema modello coincide con la loro posizione originale. Se non ci sono catene laterali spazialmente vicine al complesso si procede con l'ottimizzazione di geometria, altrimenti si modifica la posizione delle catene laterali in modo da ridurre le distanze interatomiche a valori ragionevoli, avendo cura di includere nell'ottimizzazione di geometria anche la porzione modificata. In quest'ultimo caso il numero di atomi descritti HL inevitabilmente è maggiore.

La procedura descritta è schematizzata in figura 5.12. È evidente che il ciclo di destra può essere percorso una sola volta e se non porta alla geometria ottimizzata si rinuncia all'ottimizzazione dell'interazione per quel sito, assumendo che non sia possibile ottenerla con il modello adottato. I risultati sono riportati nella sezione 5.6.



**Figura 5.12:** Diagramma di flusso del processo di ottimizzazione di geometria del complesso GAFe(II) all'interno del *probe* polipeptidico.

## 5.6 Interazioni della fibra con il complesso GAFe(II)

Le interazioni del complesso GAFe(II) con il *probe* polipeptidico sono state studiate attraverso l'analisi delle geometrie e distanze di legame, delle cariche atomiche e mediante un raffronto tra la stabilità relativa degli isomeri. Le interazioni investigate non ricoprono tutte le possibilità di formazione di legami offerte dal polipeptide. A livello modellistico sono stati selezionati solo alcuni siti di interazione sulla base delle informazioni acquisite nel capitolo 4 e sulla possibilità di prevedere la formazione di legami chimici stabili.

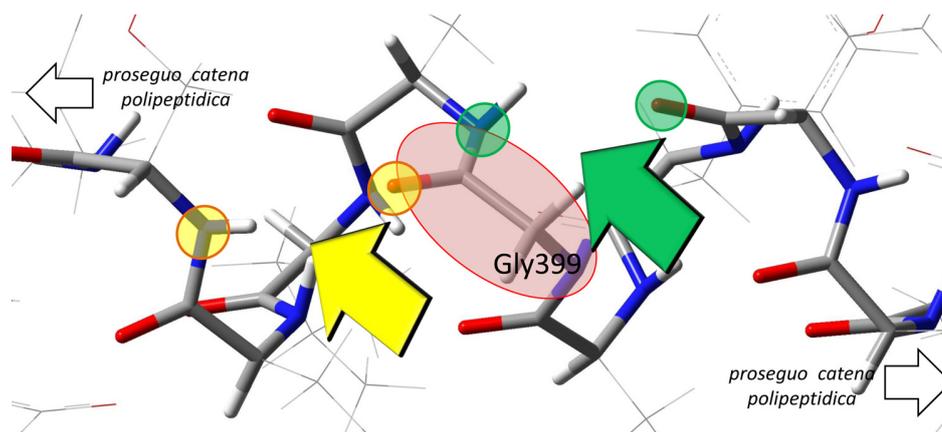
Le strutture sono state ottimizzate sia nello stato di alto che di basso spin. I dati non sono disponibili per entrambi gli isomeri a causa delle difficoltà riscontrate nei processi di ottimizzazione di geometria nei sistemi HS, per i quali non sempre il processo riesce ad fornire una geometria ottimizzata. Laddove l'ottimizzazione delle strutture è stata effettuata per entrambi gli stati di spin, le strutture HS risultano più stabili delle corrispondenti strutture LS di circa 60 Kcal/mol, un valore analogo a quello riscontrato nei calcoli effettuati sui complessi binari e ternari. Nel seguito dell'analisi ci limiteremo ad un confronto di tipo strutturale tra i sistemi HS/LS mentre le diverse possibili interazioni elencate in tabella 5.1 verranno indagate, a livello di stabilità energetica, sulla base delle strutture LS per le quali si hanno a disposizione tutti i dati necessari.

Il commento ai risultati ottenuti è organizzato in tre sottosezioni, ciascuna delle quali prende in esame uno specifico tipo di interazione, sulla base dello schema proposto in figura 5.9. Alla fine commenteremo la stabilità relativa degli isomeri e le loro *binding energy*.

### 5.6.1 Interazioni sulla catena polipeptidica principale (tipo I)

L'interazione più semplice di GAFe(II) con il polipeptide interessa la catena principale che si avvolge ad  $\alpha$ -elica. Dallo scheletro polipeptidico protendono verso l'esterno le catene laterali

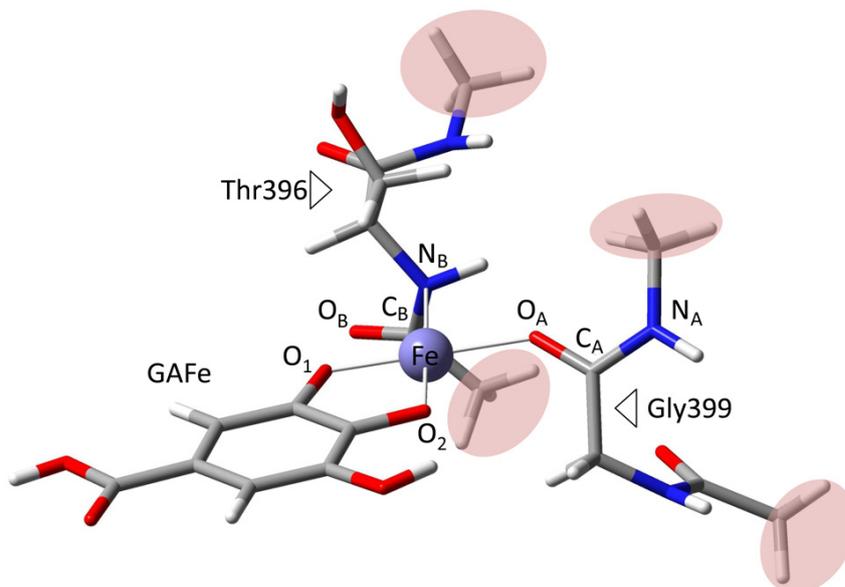
dei residui amminoacidici, responsabili dell'ingombro sterico che ostacola l'avvicinamento del complesso ferro-gallico alla catena principale. Per questo motivo l'interazione di tipo I può realizzarsi più facilmente laddove vi siano residui amminoacidici con catene laterali corte e poco ingombranti, come ad esempio in corrispondenza del residuo Gly399. Ipotizzando che il centro metallico interagisca con gli atomi di ossigeno e di azoto della catena principale, sono stati individuati due possibili siti di interazione spazialmente vicini al residuo Gly399 e liberi da un eccessivo ingombro sterico. La figura 5.13 ne fornisce una rappresentazione tridimensionale.



**Figura 5.13:** Possibili siti di interazione di tipo I del complesso GAFe(II)-polipeptide in due zone spazialmente vicine al residuo Gly399. Per semplificare la terminologia ci riferiremo ai due siti indicandoli rispettivamente Gly399 (a), identificato dalla colorazione gialla, e Gly399 (b), indicato in verde. È evidente comunque che l'interazione non riguarda esclusivamente atomi appartenenti a Gly399.

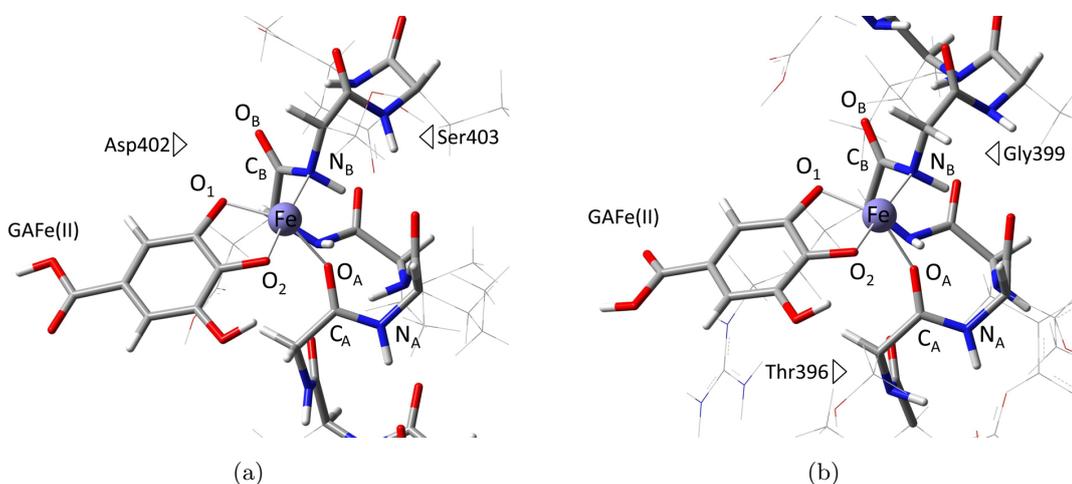
Prima di ottimizzare la struttura del complesso GAFe(II)-polipeptide è stata condotta, per ciascuno dei siti di interazione, l'ottimizzazione preliminare di un modello molecolare estratto dal polipeptide e formato dagli atomi che nella descrizione del sistema completo verranno trattati ad un livello di calcolo HL, secondo lo schema illustrato nella sezione 5.5. Ciò permette di osservare l'effetto dell' "ambiente molecolare", inteso come l'influenza dell'intera struttura polipeptidica sul sito di interazione stesso. Nella figura 5.14 è riportato il modello tridimensionale del sito Gly399 (a) ottimizzato a partire da un *guess* di geometria coerente con il modo di chelazione  $\eta^2(\text{N},\text{O})$  descritto nel capitolo 4. Una struttura analoga si ottiene per il sito Gly399 (b), per il quale si mantiene la stessa notazione.

Nel sito Gly399 (a) gli atomi del complesso GAFe(II)  $\text{O}_A$  e  $\text{N}_B$ , rimangono sullo stesso piano molecolare individuato da GAFe(II) mentre per il sito (b) la geometria dei leganti è lievemente distorta per la presenza nel modello di un gruppo metilico terminale che non permette a GAFe(II) di assumere una conformazione complanare con gli atomi  $\text{O}_A$  e  $\text{N}_B$ . In figura 5.15 riportiamo la struttura ottimizzata dei complessi GAFe(II)-polipeptide. Sebbene le interazioni coinvolgono due zone spazialmente diverse, le posizioni del legante e del centro metallico sono molto simili sia per quanto riguarda gli angoli che per le distanze di legame, come si può evincere dai valori riportati in tabella 5.2. I valori relativi alle distanze di legami



**Figura 5.14:** Struttura del sito Gly399 (a), ottimizzata in vuoto LS, a livello di calcolo M06/6-311g(d,p). I gruppi metilici evidenziati in rosso, posti alle estremità dei due frammenti molecolari, vengono mantenuti bloccati durante il processo di ottimizzazione di geometria.

Fe-leganti sono compatibili con quelli osservati per le analoghe strutture LS di tipo  $\eta^2(\text{N},\text{O})$  nei complessi con gli amminoacidi liberi, ad eccezione dei legami  $\text{Fe}-\text{O}_A$  e  $\text{Fe}-\text{N}_B$  i quali risultano mediamente più lunghi di circa 0.1 Å.



**Figura 5.15:** Strutture GAFe(II)-polipeptide, ottimizzate in vuoto LS a livello di calcolo M06/6-311g(d,p)/3-21g, relative all'interazione dei siti Gly399.

La geometria ottimizzata per Gly399 (a) appare diversa se confrontata con il modello in figura 5.14. In particolare si nota che la coplanarietà dei leganti non è mantenuta e il complesso GAFe(II) sembra inclinarsi verso il basso. L'effetto è simile per entrambi i siti e la sua giustificazione deve essere ricercata non tanto nell'effetto sterico "locale", dovuto alla presenza dei residui laterali degli amminoacidi spazialmente vicini, ma piuttosto in una

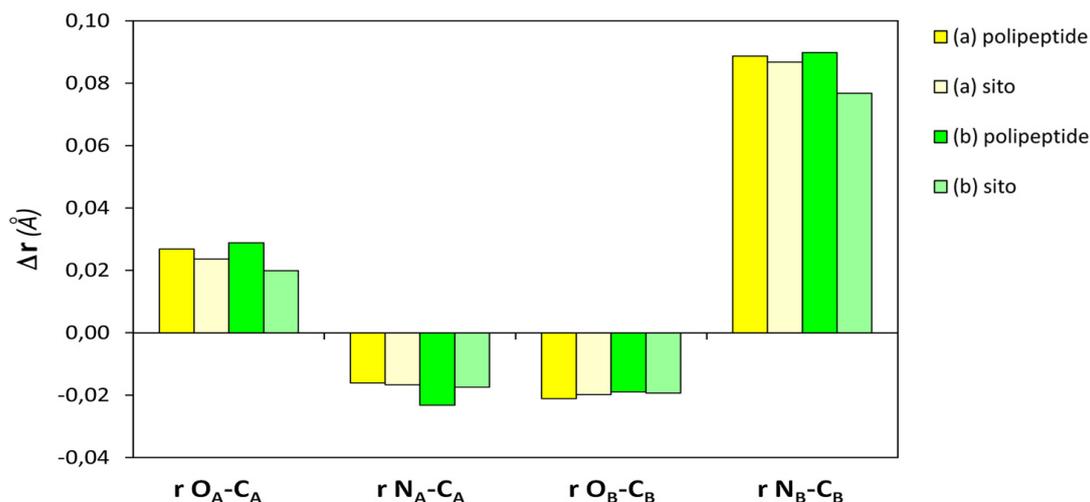
asimmetria nella loro distribuzione che porta ad avere una maggiore densità elettronica sotto il piano di GAFe(II) con relativo incremento delle interazioni. Le distanze di legame relative agli atomi indicati in figura 5.15 sono simili a quelle determinate nei modelli molecolari dei rispettivi siti di interazione dove non si tiene conto dell'intera catena polipeptidica. L'effetto globale quindi distorce lievemente le geometrie molecolari ma non determina significative variazioni nelle distanze di legame. L'effetto potrebbe essere attenuato dal fatto che il resto della catena polipeptidica viene descritta con un set di base molto piccolo che non è in grado di riprodurre gli effetti elettronici in modo altrettanto accurato.

	Gly399 (a)				Gly399 (b)			
	<i>polipeptide</i>		<i>sito</i>		<i>polipeptide</i>		<i>sito</i>	
<b>r FeO<sub>1</sub></b>	1.804		1.764		1.817		1.787	
<b>r FeO<sub>2</sub></b>	1.903		1.910		1.913		1.902	
<b>r Fe-O<sub>A</sub></b>	1.899		1.926		1.882		1.888	
<b>r Fe-N<sub>B</sub></b>	2.139		2.025		2.121		2.130	
<b>r O<sub>A</sub>-C<sub>A</sub></b>	<i>1.227</i>	1.254	<i>1.218</i>	1.242	<i>1.219</i>	1.248	<i>1.224</i>	1.243
<b>r N<sub>A</sub>-C<sub>A</sub></b>	<i>1.343</i>	1.327	<i>1.349</i>	1.333	<i>1.358</i>	1.335	<i>1.356</i>	1.338
<b>r O<sub>B</sub>-C<sub>B</sub></b>	<i>1.215</i>	1.194	<i>1.211</i>	1.191	<i>1.213</i>	1.194	<i>1.216</i>	1.197
<b>r N<sub>B</sub>-C<sub>B</sub></b>	<i>1.358</i>	1.447	<i>1.370</i>	1.457	<i>1.363</i>	1.453	<i>1.361</i>	1.438

**Tabella 5.2:** Distanze di legame (Å) per le strutture GAFe(II)-polipeptide, ottimizzate in vuoto LS a livello di calcolo M06/6-311G(d,p)/3-21G, relative alle interazioni Gly399 (a) e (b) nel polipeptide e nel modello del sito di interazione. In corsivo sono riportati i valori riferiti ai sistemi “liberi”, che non contengono GAFe(II).

Il grafico in figura 5.16 descrive la variazione delle lunghezze di legame tra i sistemi in cui è presente GAFe(II) e quelli in cui il complesso non è presente (sistema “libero”). È interessante osservare che, in seguito all'interazione con il centro metallico, la distanza C<sub>A</sub>-O<sub>A</sub> aumenta di circa 0.02 Å e contemporaneamente quella C<sub>A</sub>-N<sub>A</sub> diminuisce della stessa entità. Questo andamento è compatibile con quanto proposto nella formula di risonanza in figura 5.7. L'atomo di azoto N<sub>B</sub> si trova ad una distanza di circa 2.10 Å dal centro metallico e l'esistenza di una interazione con esso è rivelata dalle variazioni delle distanze di legame tra gli atomi del gruppo ammidico, in particolare la distanza O<sub>B</sub>-C<sub>B</sub> si accorcia di 0.02 Å e quella N<sub>B</sub>-C<sub>B</sub> si allunga di circa 0.08 Å, evidenziando una diminuzione del parziale carattere di doppio legame C=N del gruppo ammidico. Il grafico mostra un andamento simile sia per il sistema GAFe(II)-polipeptide che per il complesso nel modello del sito di interazione, a conferma del fatto che uno studio condotto su un modello molecolare che prende in esame solo la porzione di polipeptide direttamente coinvolta nell'interazione fornisce una buona descrizione del sistema complesso.

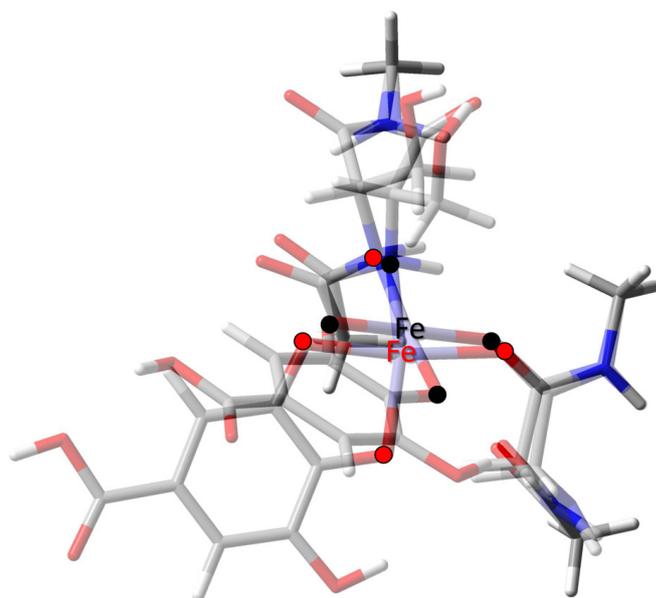
Per quanto riguarda le strutture ad alto spin è stata ottenuta la struttura ottimizzata del sito di interazione Gly399 (a), riportata in figura 5.17, dove si trova sovrapposta alla sua corrispondente struttura LS. L'immagine sovrapposta mette in evidenza le differenze strutturali tra i due isomeri che si riflettono in una diversa posizione del complesso GAFe(II)



**Figura 5.16:** Variazione delle distanze di legame ( $\text{\AA}$ ) più significative tra il sistema “libero” e quello complessato. Le colonne gialle sono relative al sito Gly399 (a), quelle verdi al sito (b). La colorazione più scura si riferisce alle strutture dove si prende in esame l'intero probe polipeptidico mentre la colorazione chiara si riferisce al modello del solo sito di interazione.

all'interno del sito. Un'analisi delle distanze di legame dei due sistemi, riportate in tabella 5.3, mostra valori mediamente più lunghi di  $0.1 \text{ \AA}$  per le distanze di legame Fe-leganti.

Le geometrie ottimizzate del complesso GAFe(II)-polipeptide HS, per entrambi i siti, non sono disponibili a causa dei problemi di convergenza a cui abbiamo precedentemente accennato, pertanto non si hanno a disposizione i dati strutturali.



**Gly399 (a)**

	LS	HS
<b>Fe-O<sub>1</sub></b>	1.764	1.880
<b>Fe-O<sub>2</sub></b>	1.910	1.946
<b>Fe-O<sub>A</sub></b>	1.926	2.025
<b>Fe-N<sub>B</sub></b>	2.025	2.248
<b>O<sub>A</sub>-C<sub>A</sub></b>	1.242	1.243
<b>N<sub>A</sub>-C<sub>A</sub></b>	1.333	1.327
<b>O<sub>B</sub>-C<sub>B</sub></b>	1.191	1.199
<b>N<sub>B</sub>-C<sub>B</sub></b>	1.457	1.434

**Figura 5.17:** Strutture sovrapposte del sito Gly399 (a) ottimizzate a livello di calcolo M06/6-311g(d,p) in vuoto. Sullo sfondo la struttura LS (leganti evidenziati in nero) e in primo piano la struttura HS (leganti in rosso).

**Tabella 5.3:** Distanze di legame ( $\text{\AA}$ ) per il sito Gly399 (a). La numerazione è coerente con quella adottata in figura 5.14.

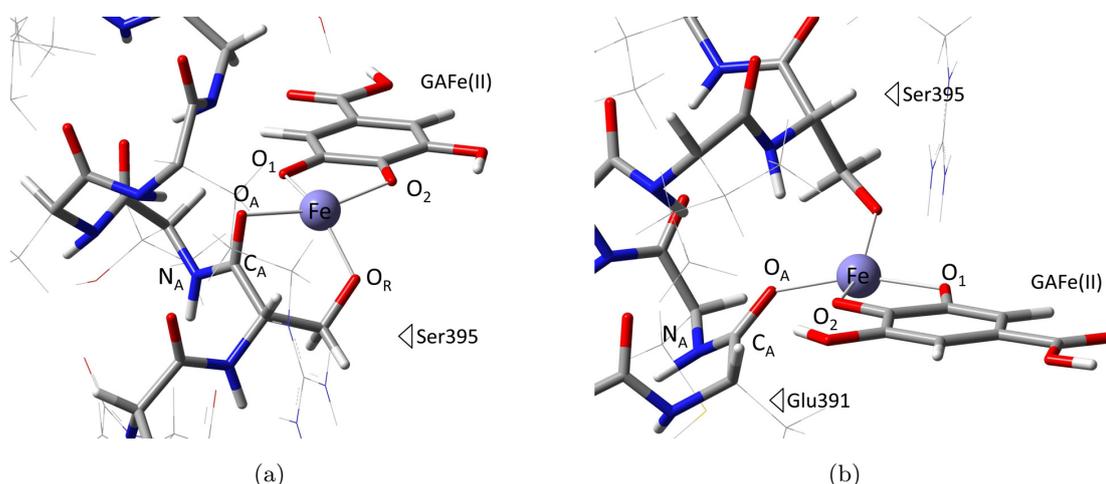
L'analisi delle cariche NBO, effettuata sui modelli molecolari del complesso nei siti di interazione, mostra che la presenza di GAF<sub>e</sub>(II) determina una diminuzione di carica sugli atomi O<sub>A</sub> e C<sub>A</sub> dovuta alla donazione di carica elettronica verso il centro metallico. L'impoverimento di carica negativa si riflette sull'aumento della distanza di legame carbonilico, come già osservato. Anche il gruppo ammidico del residuo di sopra si impoverisce di carica, l'atomo di N<sub>B</sub> non mostra una significativa variazione mentre la carica degli atomi C<sub>B</sub> e O<sub>B</sub> diventa lievemente più positivi. I valori sono riportati in tabella 5.4.

	Gly399 (a)		Gly399(b)	
<b>Fe</b>	0.76	( 0.95 )	0.83	
<b>O<sub>A</sub></b>	<i>-0.88</i>	<i>-0.77</i>	(-0.82)	<i>-0.87</i> <i>-0.77</i>
<b>C<sub>A</sub></b>	<i>0.92</i>	1.00	( 0.97)	<i>0.95</i> 1.03
<b>N<sub>A</sub></b>	<i>-0.64</i>	-0.60	(-0.62)	<i>-0.67</i> -0.64
<b>O<sub>B</sub></b>	<i>-0.85</i>	-0.79	(-0.81)	<i>-0.86</i> -0.80
<b>C<sub>B</sub></b>	<i>0.97</i>	1.10	( 1.10)	<i>0.94</i> 1.11
<b>N<sub>B</sub></b>	<i>-0.71</i>	-0.72	(-0.68)	<i>-0.70</i> -0.72

**Tabella 5.4:** Cariche NBO calcolate sulle strutture dei siti Gly399 (a) e (b) a livello di calcolo M06/6-311G++(2d,p) in vuoto LS. In corsivo sono riportati i valori che si riferiscono ai sistemi senza il complesso GAF<sub>e</sub>(II) mentre quelli tra parentesi si riferiscono all'isomero HS.

### 5.6.2 Interazioni con la catena principale e il gruppo funzionale laterale (tipo II)

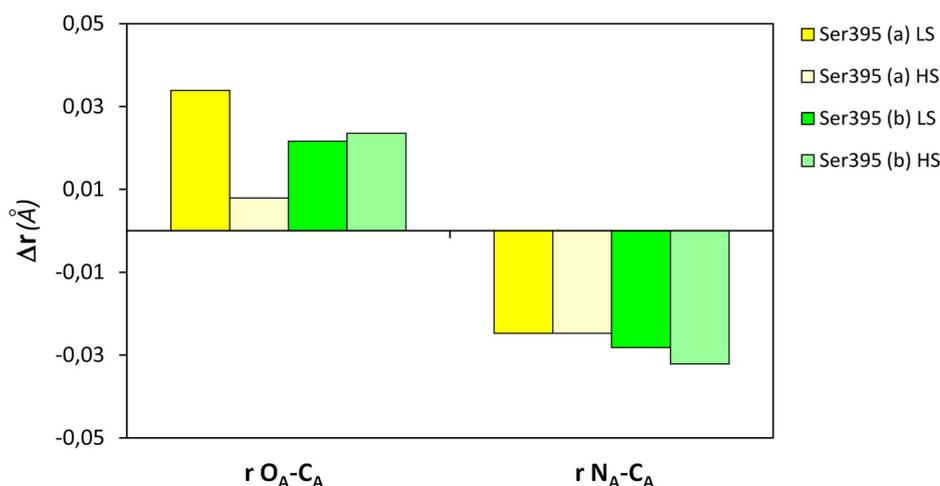
Nei casi in cui la catena laterale permette un'efficace interazione tra centro metallico, ossigeno carbonilico della catena principale e gruppo funzionale della catena laterale stessa, si possono realizzare le interazioni di tipo (II). Di seguito discuteremo in dettaglio le possibili interazioni offerte del residuo Ser395 per il quale sono state ottimizzate le strutture LS e HS di due diversi isomeri. In particolare, abbiamo preso in esame le interazioni di tipo  $\eta^2(\text{O,R})$  dove R rappresenta l'ossigeno appartenente al gruppo ossidrilico di Ser395 e O, a seconda dei casi, rappresenta il gruppo carbonilico dello stesso residuo amminoacidico (sito a) oppure del residuo di Glu392 che si trova in una posizione spazialmente favorevole (sito b). Nella figura 5.18 vengono riportate le strutture ottimizzate dei due isomeri LS. A differenza della Gly399, il processo di ottimizzazione delle strutture HS converge verso una geometria di equilibrio e l'analisi delle energie relative indica che, in entrambi i casi, l'interazione offerta dal sito b è energeticamente favorita rispetto al sito a, con una differenza dell'ordine delle 70 Kcal/mol.



**Figura 5.18:** Strutture GAFe(II)-polipeptide, ottimizzate in vuoto (LS) a livello di calcolo M06/6-311g(d,p)/3-21g, relative all'interazione dei siti Ser395.

In questo tipo di interazioni si considera il gruppo ossidrilico deprotonato e, per mantenere inalterato il numero di atomi e di elettroni dell'intero sistema molecolare, viene protonato il residuo acido di Glu391 secondo la strategia illustrata nella sezione 5.5. La geometria dei complessi HS è simile a quella riscontrata per i rispettivi isomeri LS e solo nel caso del sito Ser395 (a) si osservano variazioni significative degli angoli di legame. La tabella 5.5 riassume le distanze di legame per le interazioni di tipo II e i dati relativi alle strutture HS di Ser395 sono riportati tra parentesi. Le distanze di legame nello stato HS risultano mediamente più lunghe di circa 0.1 Å per il sito (a) e di circa 0.06 Å per il sito (b) rispetto ai corrispondenti sistemi LS. Confrontando i valori con quelli rilevati nei complessi ternari  $[\text{GAFe(II)Ser}]^{2-}$  per il modo di chelazione  $\eta^2(\text{O,R})$ , si nota che le distanze di legame Fe-leganti sono simili per Fe- $\text{O}_n$  e mediamente più corte di circa 0.1 Å per Fe- $\text{O}_A$  e Fe- $\text{O}_R$ . Nel grafico in figura 5.19 si riporta la variazione della distanza di legame degli atomi coinvolti nel legame ammidico tra

i sistemi polipeptidici liberi e complessati con GAF<sub>2</sub>(II).

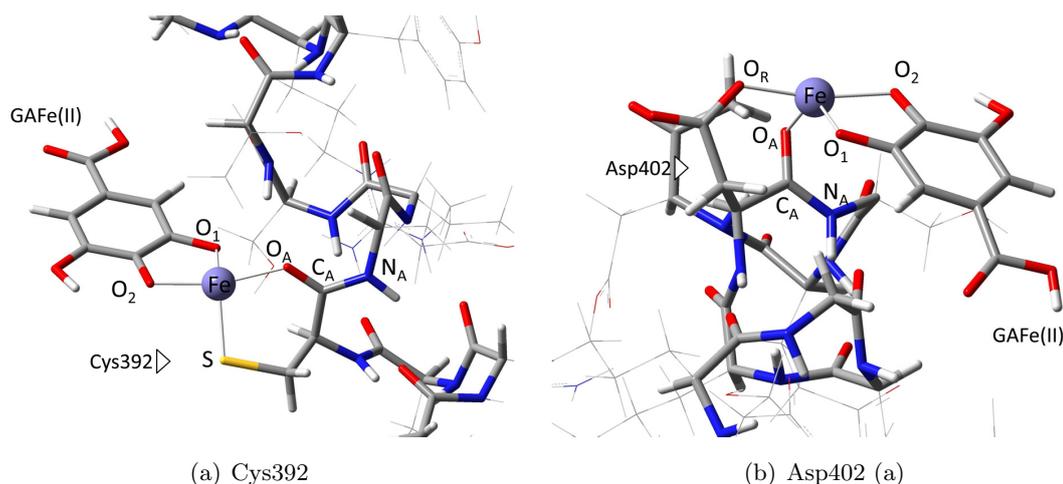


**Figura 5.19:** Variazione delle distanze di legame (Å) più significative tra il sistema polipeptidico “libero” e complessato. Le colonne gialle sono relative al sito Ser395 (a), quelle verdi al sito Ser395 (b). La colorazione più scura si riferisce alle strutture LS mentre la colorazione chiara si riferisce agli isomeri HS.

	Ser395(a)		Ser395(b)		Cys392	Asp402(a)
<b>Fe-O<sub>1</sub></b>	1.830	(1.916)	1.924	(1.961)	1.887	1.856
<b>Fe-O<sub>2</sub></b>	1.903	(1.996)	1.872	(2.032)	1.900	1.966
<b>Fe-O<sub>A</sub></b>	2.037	(2.517)	1.981	(2.110)	1.980	1.974
<b>Fe-O<sub>R</sub></b>	1.830	(1.876)	1.830	(1.867)	2.163 <sup>a</sup>	1.892
<b>C-O<sub>A</sub></b>	1.256	(1.230)	1.238	(1.240)	1.231	1.974
<b>C-N<sub>A</sub></b>	1.340	(1.340)	1.337	(1.333)	1.340	1.324

**Tabella 5.5:** Distanze di legame (Å) nei complessi di tipo II ottimizzati in vuoto (LS) a livello di calcolo M06/6-311g(d,p)/3-21g. Tra parentesi sono riportati i valori relativi alle strutture HS. <sup>a</sup> distanza Fe-S.

L’interazione GAF<sub>2</sub>(II)-polipeptide in corrispondenza dei residui di Cys392 e Asp402, in grado di dar luogo ad interazioni di tipo II analoghe a quelle individuate per Ser395, conduce a geometrie dei leganti molto simili. Le strutture ottimizzate LS sono riportate in figura 5.20 e le distanze di legame più significative sono riassunte in tabella 5.5.



**Figura 5.20:** Strutture GAFe(II)-polipeptide ottimizzate in vuoto LS a livello di calcolo M06/6-311g(d,p)/3-21g relative all'interazione dei siti Cys392 e Asp402 (a).

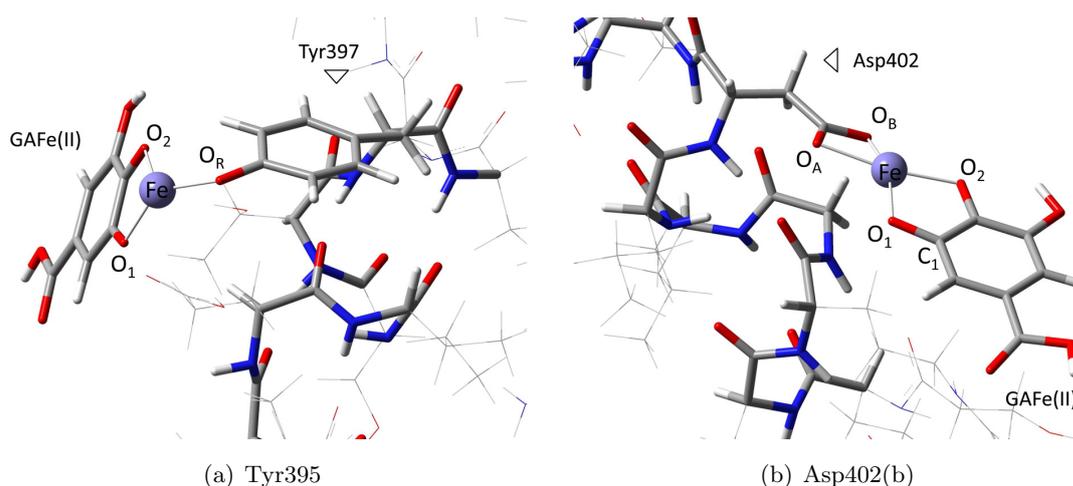
### 5.6.3 Interazioni con il gruppo funzionale dei residui laterali (tipo III)

Gli amminoacidi con catene laterali lunghe, come ad esempio Glu, oppure rigide come Tyr, non possono assumere una conformazione in grado di dar luogo alle interazioni finora descritte. In questi casi possiamo ipotizzare l'esistenza di una semplice interazione in cui è coinvolto solo il gruppo funzionale del residuo amminoacidico, con conseguente riduzione dei problemi connessi all'ingombro sterico delle altre catene laterali che ostacolano l'avvicinamento di GAFe(II) alla catena principale. In particolare abbiamo preso in esame il residuo di Tyr393, ipotizzando la formazione di un legame di tipo  $\eta^1(\text{R})$  attraverso il gruppo fenolico e i residui acidi di Asp402 (b)<sup>2</sup> e Glu393 per i quali si prevede un'interazione di tipo  $\eta^2(\text{R})$  con  $\text{R}=\text{COO}^-$ , in analogia con quanto osservato nella sezione 4.5. Nella figura 5.21 sono riportate le strutture ottimizzate LS per i complessi con i residui di Tyr395 e Asp402 (b), considerati entrambi deprotonati.

È interessante osservare la posizione di GAFe(II) rispetto al polipeptide. Il complesso GAFe(II) tende a mantenere un'elevata planarità e si avvicina al polipeptide mantenendo una distanza minima tra i suoi atomi e quelli dei residui laterali spazialmente vicini compresa tra 2.5 e 3.0 Å. La tendenza ad avvicinarsi verso la catena polipeptidica suggerisce che vi siano delle interazioni tipo Van der Waals, che ad esempio possono coinvolgere l'anello aromatico di GA, in grado di stabilizzare una conformazione in cui il complesso, legato al residuo laterale, si avvicina parallelamente alla catena.

La tabella 5.6 riassume i valori delle distanze di legame più significative delle strutture molecolari relative alle interazioni di tipo III. Per i tre sistemi sono state ottimizzate anche gli isomeri HS e la differenza media tra i valori HS/LS è di circa 0.1 Å. L'ultima riga della tabella contiene un parametro geometrico  $\tau$  che si riferisce all'angolo diedro  $\text{C}_1\text{-O}_1\text{-Fe-O}_A$ , in grado di fornire una stima quantitativa della complanarietà dei leganti con il centro metallico. Si osserva che le strutture HS tendono ad avere una planarità più elevata rispetto alle rispettive

<sup>2</sup>La lettera b identifica un'interazione diversa da quella descritta precedentemente di tipo II.



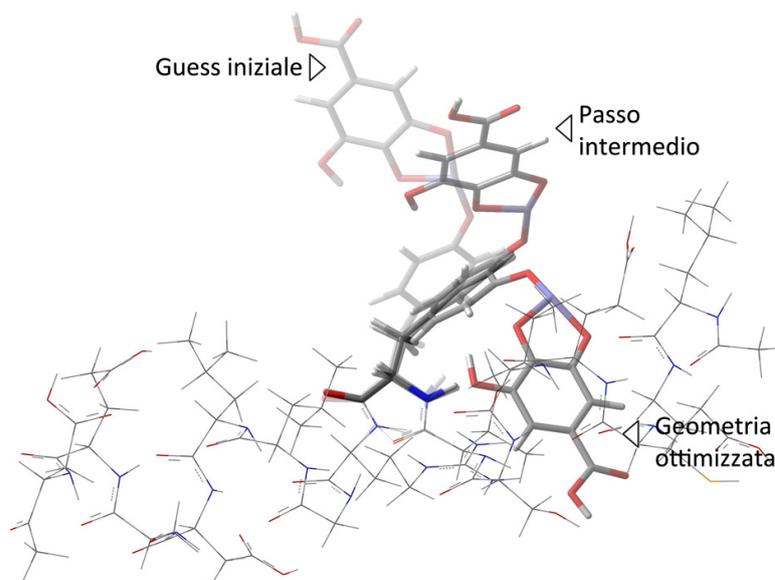
**Figura 5.21:** Strutture GAFe(II)-polipeptide ottimizzate in vuoto LS a livello di calcolo M06/6-311g(d,p)/3-21g relative all'interazione Tyr395 e Asp402 (b).

strutture LS, a conferma del comportamento già osservato nei confronti dei complessi ternari discussi nel capitolo 4.

	<b>Tyr397</b>		<b>Asp402(b)</b>		<b>Glu404</b>	
<b>r Fe-O<sub>1</sub></b>	1.841	(1.932)	1.850	(1.947)	1.867	(1.958)
<b>r Fe-O<sub>2</sub></b>	1.881	(1.952)	1.933	(1.989)	1.899	(1.920)
<b>r Fe-O<sub>R</sub></b>	1.795	(1.872)	2.010	(2.043)	2.034	(2.077)
			1.933	(2.075)	1.972	(2.116)
$\tau$	63	(3)	64	(13)	66	(8)

**Tabella 5.6:** Distanze di legame nei complessi di tipo II (Å) ottimizzati in vuoto (LS) a livello di calcolo M06/6-311g(d,p)/3-21g. Il parametro  $\tau$  indica l'angolo diedro C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub>-Fe-O<sub>A</sub>. Tra parentesi sono riportati i valori riferiti alle strutture HS.

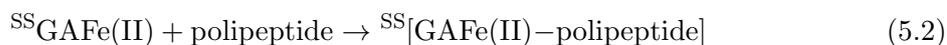
A conferma della presenza di interazioni a lungo raggio, è interessante osservare le variazioni geometriche della posizione degli atomi mobili durante il processo di ottimizzazione di geometria del complesso relativo al sito Tyr397. In questo caso, a partire da un *guess* iniziale basato sulla preventiva ottimizzazione del sito di interazione, il gruppo GAFe(II) subisce lo spostamento riportato in figura 5.22 la quale mostra una sovrapposizione di fotogrammi relativi a tre passi del processo di ottimizzazione di geometria. Questa particolare situazione indica che il complesso GAFe(II) è in grado di interagire con il *probe* polipeptidico anche a grande distanza e la piccola base 3-21g, usata per la descrizione degli atomi LL fissi, riproduce un effetto di interazione globale della catena polipeptidica. La conferma di questo comportamento è data dall'ottimizzazione di geometria degli atomi del sito di interazione, condotta sul sistema polipeptidico senza il complesso GAFe(II). In questo caso, infatti, l'anello aromatico della Tyr compie uno spostamento analogo a quello riportato in figura 5.22 e pertanto il movimento di GAFe(II) non è imputabile ad un'errata conformazione iniziale della catena laterale di Tyr397.



**Figura 5.22:** Strutture sovrapposte relative al processo di ottimizzazione per Tyr397 condotto a livello di calcolo M06/6-311g(d,p)/3-21g LS in vuoto. Si noti come la posizione del complesso GAFe(II) vari notevolmente nel processo di ottimizzazione fino ad assumere una posizione finale “affiancata” al polipeptide.

#### 5.6.4 Analisi delle binding energy

Alla luce delle considerazioni sulla struttura dei diversi complessi GAFe(II)-proteina, si effettua un calcolo della *binding energy* (BE), definita secondo la reazione 5.2<sup>3</sup>. Il valore di BE indica se la formazione dei complessi è energeticamente favorita o meno e, analizzando le differenze di BE tra i diversi isomeri, è possibile verificare se esiste un tipo di struttura molecolare particolarmente più stabile di altre. Dal momento che le diverse strutture sono tra loro isomere, una differenza tra valori di BE fornisce direttamente indicazioni sulla stabilità relativa dei diversi isomeri GAFe(II)-polipeptide.



In riferimento all’equazione 5.2, i termini energetici necessari al calcolo di BE sono le energie dello stato elettronico fondamentale di: (1) complesso GAFe(II), ottenuta nel capitolo 3.4, (2) catena polipeptidica “libera”, calcolata sulla struttura ottenuta dall’*Homology Modelling* riportata in figura 5.5, (3) complesso GAFe(II)-polipeptide, valutata attraverso un calcolo di energia di singolo punto sulla struttura ottimizzata nelle tre sottosezioni precedenti. I calcoli di energia vengono condotti utilizzando lo stesso livello di calcolo per i tre termini e i valori di BE ottenuti sono riportati in tabella 5.7.

Per il modo in cui è stata definita, il valore di BE deriva essenzialmente da tre contributi energetici: (1) la formazione dei legami Fe-leganti, (2) le modifiche strutturali indotte dalla presenza di GAFe(II) sugli atomi descritti a livello HL nei modelli molecolari e le loro inte-

<sup>3</sup>L’apice <sup>SS</sup> indica lo stato di spin della molecola.

razioni con GAF<sub>e</sub>(II) , (3) le interazioni di GAF<sub>e</sub>(II) con il resto della catena polipeptidica che rimane vincolata nei processi di ottimizzazione di geometria.

<i>interazioni</i>		<b>BE</b>		<b>ΔE</b>	
<b>Gly399 (a)</b>	<b>I</b>	-149	-	79	-
<b>Gly399 (b)</b>	<b>I</b>	-123	-	105	-
<b>Ser395 (a)</b>	<b>II</b>	-145	(-145)	84	(88)
<b>Ser395 (b)</b>	<b>II</b>	-217	(-218)	12	(15)
<b>Asp402 (a)</b>	<b>II</b>	-126	-	102	-
<b>Cys392</b>	<b>II</b>	-202	-	27	-
<b>Tyr397</b>	<b>III</b>	-148	(-154)	80	(78)
<b>Asp402 (b)</b>	<b>III</b>	-229	(-232)	0	( 0 )
<b>Glu393</b>	<b>III</b>	-214	(-204)	15	(29)

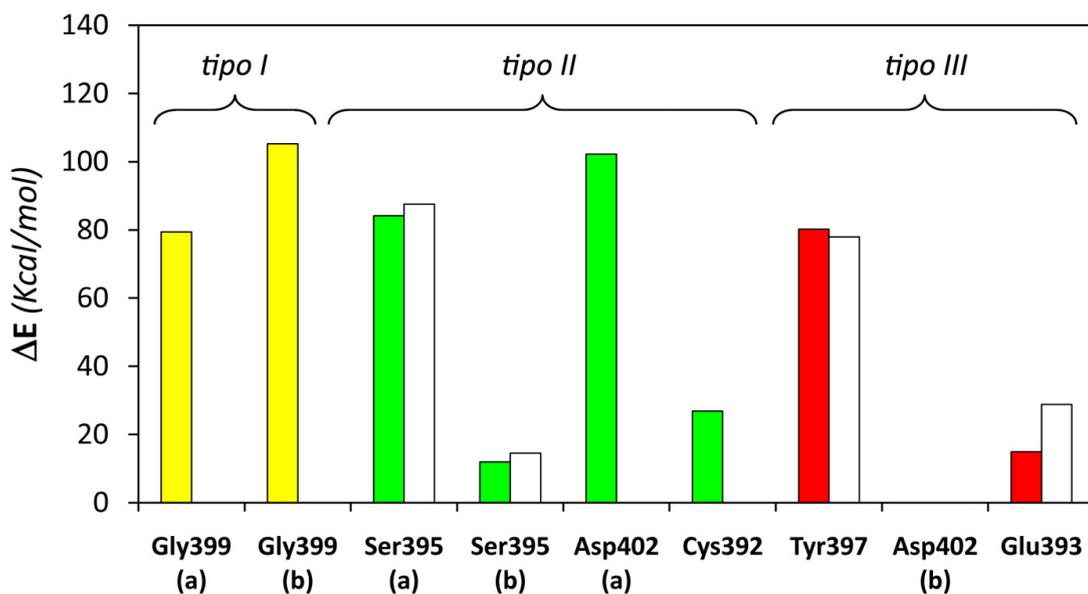
**Tabella 5.7:** Binding energy (Kcal/mol) riferite al processo di formazione dei complessi GAF<sub>e</sub>(II)-polipeptide secondo la reazione 5.2. ΔE indica la differenza di BE (Kcal/mol) tra ogni struttura e quella che presenta il valore di BE più basso, Asp402(b), ed è un indice della stabilità relativa. Tra parentesi sono i valori ad HS.

I valori di BE rientrano nel range  $-229 \div -123$  Kcal/mol, con un valore medio di circa  $-180$  Kcal/mol. Questi dati indicano che la formazione del complesso è un processo energeticamente favorito e, se confrontati con quelli calcolati per gli amminoacidi liberi riportati in tabella 4.9, si nota in media un valore più negativo di circa  $30$  Kcal/mol. Il dato è significativo perché ci saremmo aspettati valori più elevati in quanto i leganti appartenenti ai residui amminoacidici del polipeptide sono dei donatori meno efficienti rispetto ai corrispondenti amminoacidi liberi. Probabilmente l'effetto elettrostatico globale del polipeptide stabilizza le strutture GAF<sub>e</sub>(II)-polipeptide con conseguente diminuzione dei valori di BE.

Il grafico in figura 5.23 riporta il valore di ΔE, calcolato come differenza tra i valori di BE delle diverse strutture rispetto al valore più basso, nei relativi stati di spin.

Dal grafico non è possibile osservare un chiaro andamento che identifichi un tipo di interazione favorita rispetto alle altre. La struttura più stabile risulta quella in cui GAF<sub>e</sub>(II) interagisce con il residuo di Asp402(b) e anche l'interazione con il suo omologo superiore, Glu393, si trova ad un'energia di poco più alta. Come prevedibile, le interazioni di tipo I appaiono energeticamente meno favorite sia per il fatto che l'interazione coinvolge esclusivamente gli atomi appartenenti alla catena principale sia perché permangono problemi di ingombro sterico. Le interazioni di tipo II, a seconda del sito di interazione, mostrano un andamento discordante. I valori di BE per Ser395 (b) sono infatti simili a quelli ottenuti per Glu393 ma quelli di Asp402(a) e Ser395(a) invece si trovano ai livelli più elevati di Gly399. Tali discrepanze possono essere imputate ad una repulsione sterica delle catene laterali dei residui vicini che ostacolano un corretto posizionamento di GAF<sub>e</sub>(II) nel sito di Ser395(a) e Asp402(a).

In generale possiamo dire che le interazioni di tipo III, in cui sono coinvolti i residui acidi, sembrano le più favorite dal punto di vista energetico. Il valore di BE per Tyr397 è ad un'e-



**Figura 5.23:** Differenze di energia  $\Delta E$  tra i diversi isomeri GAF<sub>e</sub>(II)-polipeptide che differiscono per il sito di interazione rispetto alla struttura più stabile, Asp402 (b), calcolate a livello M06/6-311g(d,p)/3-21g. Le colonne non colorate si riferiscono ai complessi HS.

nergia più alta rispetto ad Asp402(b) e Glu393. Questi ultimi infatti interagiscono attraverso una chelazione di tipo  $\eta^2(O,O)$ , mentre nel caso della Tyr397 è presente un solo atomo donatore, l'OH fenolico che dà origine ad una interazione monodentata di tipo  $\eta^1(O)$ . Le energie dei complessi HS, laddove sono disponibili i dati delle strutture ottimizzate, mostrano un andamento del tutto analogo a quelle dei complessi LS.



---

### Conclusioni e sviluppi futuri

---

In molti arazzi e tessuti storici le fibre di lana e seta colorate in nero con tannini naturali e mordente a base di ferro mostrano uno stato di degradazione più avanzato rispetto alle fibre colorate con altre sostanze naturali. La connessione tra i fenomeni di degrado del substrato proteico costituente le fibre e la presenza di complessi Fe-tannino è però, ad oggi, ancora poco indagata e compresa. In questo elaborato di tesi abbiamo svolto uno studio computazionale a livello di teoria DFT, integrato con analisi spettroscopiche, volto alla caratterizzazione delle interazioni chimico-fisiche presenti all'interno del sistema colorante-mordente-fibra di lana. Sono state indagate le distanze di legame, geometrie, cariche atomiche e *binding energy* di diversi complessi molecolari. Lo studio, suddiviso in fasi successive che presentano una complessità modellistica crescente, costituisce una possibile strategia di indagine per la caratterizzazione del sistema in esame e si presta ad essere in futuro ulteriormente sviluppato e integrato.

Nella prima fase del lavoro è stato verificato che l'acido gallico (GA), il principale costituente dei coloranti tannici, è in grado di coordinarsi con il mordente a base di ferro per formare i tipici complessi neri. In particolare, un'accurata analisi della letteratura relativa alle proprietà dei complessi ferro-gallici ha portato ad identificare  $\text{GAFe(II)}$  come il cromoforo principale capace di legarsi al substrato mediante la formazione di legami di coordinazione in cui è coinvolto il centro metallico. Le proprietà chimico-fisiche di  $\text{GAFe(II)}$  sono state approfondite a livello computazionale attraverso una caratterizzazione strutturale e delle proprietà elettroniche in vuoto e in solvente, confrontando i risultati con le informazioni ottenute mediante spettrofotometria UV-Vis.

I risultati ottenuti nella prima fase rivelano l'esistenza di due stati di spin del livello elettronico fondamentale, con una diversa stabilità relativa. Lo stato di quintetto (HS) risulta più stabile rispetto allo stato di singoletto (LS) e, da un punto di vista strutturale, le differenze si rivelano in termini di distanze di legame Fe-leganti. La tipica colorazione scura del

complesso deriva da un assorbimento connesso ad un'eccitazione elettronica che coinvolge un trasferimento di carica intramolecolare dall'anello aromatico al centro metallico.

Lo studio delle interazioni del complesso GAFe(II) con il substrato proteico, in particolare con le proteine costituenti la fibre di lana, richiede l'impiego di modelli computazionali in grado di affrontare il problema a livelli di complessità diversi. In primo luogo sono state studiate le interazioni di GAFe(II) con gli amminoacidi liberi, i quali rappresentano un'approssimazione di ordine zero del polipeptide, prendendo in esame diversi modi di coordinazione. Gli amminoacidi, infatti, possono agire da leganti polidentati in grado di complessare il centro metallico attraverso gli atomi di ossigeno del gruppo carbossilico, l'azoto amminico, e attraverso gli eventuali gruppi donatori presenti nelle loro catene laterali. Analizzando diversi modi di coordinazione per un set di quattro amminoacidi (Gly, Ser, Cys e Asp) emerge che le strutture ternarie di equilibrio GAFe(II)-amminoacido tendono ad assumere geometrie in cui i gruppi donatori degli amminoacidi sono coplanari con il sistema GAFe(II), ad eccezione dei complessi tridentati per i quali si prevedono geometrie pseudo-ottaedriche. La stabilità relativa di diversi isomeri strutturali relativi ad uno stesso complesso ternario cresce con il numero di atomi donatori che si coordina con il metallo. In generale, gli amminoacidi che dispongono di catene laterali di lunghezza tale da poter formare chelati con anelli a 5 o 6 termini sono più stabili rispetto a quelli che possono coordinarsi solo attraverso gli atomi di ossigeno e azoto del gruppo carbossilico e amminico, coerentemente con quanto previsto a livello qualitativo dalla teoria del campo dei leganti. L'analisi prevede anche la possibilità di avere interazioni con il centro metallico che coinvolgono solo i gruppi  $\text{COO}^-$ .

Le informazioni ottenute dallo studio sugli amminoacidi liberi sono quindi sfruttate per formulare ipotesi sulle strutture dei complessi GAFe(II) all'interno di un modello molecolare relativo ad un frammento di catena proteica appartenente alla famiglia delle  $\alpha$ -cheratine. L'analisi strutturale indica che all'interno del sistema polipeptidico sono possibili solo alcune delle interazioni previste nel caso degli amminoacidi liberi, identificando tre possibili tipi di interazioni che coinvolgono rispettivamente: gli atomi di ossigeno e azoto della catena principale, i gruppi funzionali delle catene laterali oppure entrambi i sistemi. In particolare, sono stati presi in esame alcuni potenziali siti di legame offerti dai residui di Gly, Ser, Cys, Tyr, Asp e Glu, gli amminoacidi più abbondanti nella catena delle  $\alpha$ -cheratine. L'analisi strutturale indica che è possibile identificare nel sistema GAFe(II)-polipeptide strutture analoghe a quelle degli amminoacidi liberi per quanto riguarda i modi di coordinazione e le distanze di legame Fe-leganti, ma che si differenziano da esse sia in termini di stabilità relativa che per variazioni geometriche. La presenza della catena polipeptidica infatti influenza la geometria e la stabilità per effetto della struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica e dell'ingombro sterico dovuto alle catene laterali. Rispetto al caso degli amminoacidi liberi, le interazioni più efficaci non dipendono tanto dal numero di leganti che si coordinano con il centro metallico, ma piuttosto dalle repulsioni steriche e dalle interazioni elettroniche tra GAFe(II) e la fibra proteica che tendono a favorire le interazioni in cui sono coinvolti esclusivamente i gruppi laterali dei residui amminoacidi.

In tutti i casi i complessi ad alto spin risultano più stabili dei rispettivi isomeri a basso

---

spin. Le differenze in termini di energia elettronica tra HS e LS sono paragonabili in tutti i sistemi indagati e quindi non sono modificate in modo significativo dall'insieme di leganti preso in esame.

In conclusione, la strategia computazionale seguita in questo studio si è rivelata un approccio efficace per l'analisi delle interazioni che si instaurano nel sistema colorante-mordente-fibra. I risultati preliminari ottenuti in questa fase possono inoltre essere sfruttati in futuro per l'elaborazione di modelli in grado di spiegare i percorsi di reazione che avvengono sulla fibra proteica connessi con la presenza del centro metallico e di GA. L'individuazione di siti preferenziali di interazione, infatti, può suggerire il punto di partenza per la comprensione dei fenomeni chimici connessi al degrado.

Il modello finale elaborato può essere senza dubbio raffinato, includendo l'analisi di ulteriori siti di interazione e aumentando il livello di descrizione teorica del polipeptide. In particolare possono essere considerati gli effetti di solvatazione e l'inclusione nel modello del secondo filamento polipeptidico che, legato al primo attraverso interazioni tra le catene laterali e legami a ponte di zolfo attraverso residui di cisteina, costituisce il reale sistema *coiled-coil* tipico delle  $\alpha$ -cheratine. Dal momento che i processi di invecchiamento per degradazione foto-ossidativa coinvolgono da vicino i residui di cistina (-S-S-), può essere utile approfondire le interazioni di questo sito con il metallo. L'interesse computazionale nello studio del microambiente redox costituito dai legami a ponte di zolfo in sistemi biologici è testimoniato dallo studio recentemente pubblicato di *Keten et al* [65] in cui si propone una strategia computazionale per affrontare l'indagine del sistema disolfuro all'interno di polipeptidi.

È doveroso infine ricordare che la descrizione computazionale fornita in questo lavoro è di tipo statico, basata sull'analisi strutturale delle geometrie di equilibrio dello stato elettronico fondamentale. Ulteriori e importanti informazioni possono derivare da uno studio della dinamica in cui si osserva l'evoluzione temporale del sistema in esame sottoposto alle interazioni determinate dalla struttura polipeptidica ed eventualmente dal solvente. Bisogna però tener conto del fatto che una trattazione dinamica di un sistema di grandi dimensioni presuppone di semplificarne il livello teorico di descrizione, introducendo approssimazioni classiche o semi-classiche, per le quali sorgono problematiche relative alla descrizione di un sistema elettronico a guscio aperto, come quello del ferro.

Dal punto di vista sperimentale, indagare il complesso colorante-mordente-fibra tal quale non è banale, a causa della sua insolubilità in acqua che non permette l'applicazione delle comuni tecniche di indagine spettroscopica. Alcune tecniche permettono però un'indagine del sistema senza sottoporlo a trattamenti che ne alterino la struttura, quali ad esempio: l'analisi morfologica superficiale e la caratterizzazione elementare mediante microscopia FESEM-EDX (vedi sezione 1.3); la spettroscopia FTIR applicata all'analisi delle superfici, che costituisce un utile strumento di indagine nel campo dei tessuti [66]; altre tecniche spettroscopiche avanzate come la spettroscopia Mössbauer, già ampiamente applicata nello studio degli inchiostri ferrogallici nella carta, oppure tecniche NMR allo stato solido.

L'applicazione della spettroscopia UV-Vis, largamente utilizzata nella descrizione dei com-

plessi ferro-gallici in soluzione, non è applicabile allo studio della fibra. Tuttavia la formazione di complessi ternari  $\text{GAFe(II)}$ -amminoacido, trattati a livello teorico nel capitolo 4, può essere confermata da dati sperimentali ottenuti attraverso lo studio sistematico di diversi complessi. A titolo di esempio riportiamo in Appendice C alcuni risultati preliminari ottenuti in laboratorio nello studio del sistema  $\text{GAFe(II)}$ -Tyr. Si è osservato che il valore di assorbanza della banda di assorbimento nel visibile varia in dipendenza dell'aggiunta di quantità crescenti di Tyr. Tali risultati dovranno essere confermati con studi su altri amminoacidi per la messa a punto di uno schema di indagine per determinare differenze di stabilità relativa tra complessi ternari.

Inoltre, sono attualmente in corso - nell'ambito del progetto di ricerca "*La vita breve del tannino*" (VAT), volto allo studio dei processi di degradazione dei tessili ad opera dei coloranti tannici e mordente a base di ferro, e all'interno del quale si inserisce questo elaborato di tesi - campagne di analisi complementari allo studio teorico.

Tra di esse risulta di particolare interesse la possibilità di poter effettuare misure su campioni tessili presso l'*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) partecipando a una selezione di proposte. L'uso della radiazione di sincrotrone altamente energetica ci permetterebbe di sfruttare le tecniche  $\mu$ -XRF,  $\mu$ -XANES e FTIR per lo studio dei nostri sistemi. I risultati attesi da questo tipo di analisi possono essere d'aiuto per chiarire la distribuzione del mordente all'interno della fibra, capire quali gruppi funzionali sono direttamente coinvolti nella coordinazione con il mordente, comparare la morfologia di tessuti sottoposti a diversi processi di tintura e osservare le modifiche dello stato di ossidazione del mordente e dei gruppi funzionali che possono verificarsi durante i processi di invecchiamento. Tutte queste informazioni concorreranno a un miglioramento del modello computazionale proposto in modo da adattarlo ad una descrizione più fedele delle interazioni presenti nei campioni reali.

---

### Condizioni sperimentali nelle analisi UV-Vis

---

#### Materiali utilizzati

Tutte le sostanze impiegate nella preparazione delle soluzioni standard e dei campioni sono state impiegate tal quali, senza ulteriori operazioni di purificazione. I solventi utilizzati, di purezza grado HPLC, sono forniti dalla *Sigma-Aldrich* mentre le soluzioni acquose sono state preparate utilizzando acqua bidistillata.

Sono state preparate soluzioni standard, in acqua e in tampone a pH 4, di: acido 3,4,5-triidrossibenzoico anidro (acido gallico), purezza 99% (*ALFA AESAR*);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , purezza 99.5% (*Carlo Erba*); L-tirosina, purezza  $\geq 99\%$  (*Sigma-Aldrich*). La soluzione tampone  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  è stata preparata utilizzando acido acetico, purezza 99.9 %, e acetato di sodio, purezza 99.5% (*Carlo Erba*). La soluzione di  $\text{FeCl}_3$ , purezza 99% (*Carlo Erba*) è stata preparata in soluzione acquosa a pH 2.5, ottenuta mediante acidificazione con HCl (titolo  $\geq 37\%$ ), purezza 99.9% (*Sigma-Aldrich*).

#### Strumenti e metodi

Le misure spettrofotometriche di assorbimento sono state effettuate utilizzando lo spettrofotometro UV-Vis JASCO V-530 e il software di controllo ed elaborazione dati *Jasco Spectra Manager*. Gli spettri sono stati acquisiti con una larghezza di banda di 2.0 nm, velocità di scansione 1000 nm/min a intervalli di 1 nm, utilizzando celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm. Le misure sui campioni sono state acquisite rispetto ad un bianco costituito dallo stesso solvente impiegato nella preparazione del campione (acqua o soluzione tampone a pH 4).



---

### Riproduzione del bagno di tintura

---

#### Bagno di tintura da estratto di noci di galla

Il bagno di tintura naturale viene preparato estraendo il colorante da noci di galla (*Kremer-Pigmente, Germania*). La procedura di seguito illustrata determina, nel bagno di tintura, una concentrazione di mordente ( $\text{FeSO}_4$ ) pari a 0.01 mol/L e di GA pari a circa 0.5 mmol/L, supponendo che esso costituisca il 20% del peso secco della noce di galla utilizzata nella preparazione.

1. **Lavaggio preliminare.** Immergere 2.0g di lana grezza in 250 ml di acqua contenente 1.0g di Triton X 100. Riscaldare a 40°C per 10 minuti e lasciar riposare per 10 minuti. Sciacquare la lana con acqua fino a completa eliminazione della schiuma.
2. **Mordenzatura.** Scogliere 0.75g di  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in 250 ml di acqua e immergervi il filato di lana pretrattato riscaldando a 90° C per 30 minuti. Risciacquare la lana e lasciar asciugare.
3. **Estrazione del colorante.** Pesare 2.0g di noci di galla finemente suddivise e metterle a bollire in 250 ml di acqua per 1 ora. Lasciar raffreddare e filtrare la miscela con un filtro di carta
4. **Bagno di tintura.** Prelevare 75 ml dell'estratto di noci di galla, diluire a 200 ml con acqua e immergervi 4.0g di lana mordenzata. Scaldare a 90° C per 30 minuti. Lasciar raffreddare, sciacquare la lana con acqua e mettere ad asciugare per una notte.

### Bagno di tintura da acido gallico

Il bagno di tintura preparato impiegando solo GA viene preparato in modo da avere una quantità di GA paragonabile a quella del bagno naturale, secondo la procedura di seguito descritta:

1. Diluire 4.0 ml di GA 0.005 M a 200 ml con tampone  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  0.01M a pH 4. Immergervi 2 g di lana mordenzata, secondo quanto descritto in precedenza e scaldare a  $90^\circ$  per 30 minuti.
2. Lasciar raffreddare, sciacquare la lana e lasciar asciugare per una notte.

La determinazione di GA prima e dopo il processo di tintura, indica che sulla fibra di lana sono rimasti legati circa 2.9 mg di GA pari a circa lo 0.15 % del peso iniziale del campione di lana grezza.

---

### Complesso ternario GAFe(II)-tirosina

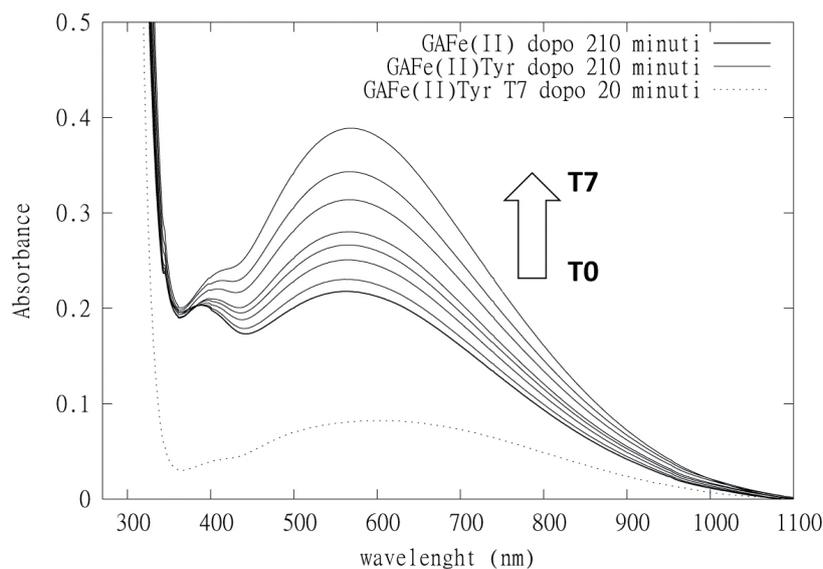
---

Riportiamo in questa sezione i risultati preliminari ottenuti da misure spettrofotometriche sui complessi ternari GAFe(II) con amminoacidi liberi. L'idea è quella di verificare se la spettroscopia UV-Vis, utilizzata finora negli studi dei complessi ferro-gallici binari, possa essere d'aiuto per rivelare la presenza, in soluzione, di interazioni GAFe(II)-amminoacidi attraverso l'osservazione di cambiamenti negli spettri UV-Vis per effetto dell'aggiunta di quantità crescenti di amminoacido.

Di seguito riportiamo i risultati ottenuti per la tirosina (Tyr). Nella figura C.1 sono riportati gli spettri UV-Vis di un set di campioni preparati a partire da quantità equimolari di GA e  $\text{FeSO}_4$  e quantità crescenti di Tyr. La misura è stata condotta in soluzione acquosa tamponata a pH 4 e gli spettri acquisiti in due momenti successivi, rispettivamente dopo 20 e 210 minuti dalla preparazione delle soluzioni.

Gli spettri registrati per diverse quantità di Tyr dopo 20 minuti mostrano la comparsa della banda slargata con il massimo posizionato intorno a 570 nm e intensità pari a circa 0.08 unità di assorbanza; tra i diversi campioni non si notano apprezzabili differenze di assorbanza. Ripetendo la misura dopo 210 minuti, le differenze diventano apprezzabili e il valore di assorbanza varia nel range  $0.2 \div 0.4$  unità. Dal momento che in tutti i campioni la concentrazione iniziale di GA e  $\text{Fe}^{2+}$  è costante, l'incremento di assorbanza può essere messo in relazione con l'aumento di concentrazione della Tyr nei diversi campioni, considerando anche che la Tyr libera ha un solo picco di assorbimento a 275 nm. L'assorbimento della Tyr libera non è visibile nello spettro in quanto si trova coperto dalla banda (I) di GA che, nelle condizioni sperimentali, ha un'assorbanza  $> 3$ , fuori da una scala ragionevole per ottenere dati significativi.

Monitorando l'assorbanza a 570 nm nel tempo, per il campione di Tyr più concentrato, si osserva un andamento analogo a quello riportato in figura 3.19. Come abbiamo già osservato nel caso di GAFe(II), la velocità di formazione del complesso non raggiunge un *plateau*,

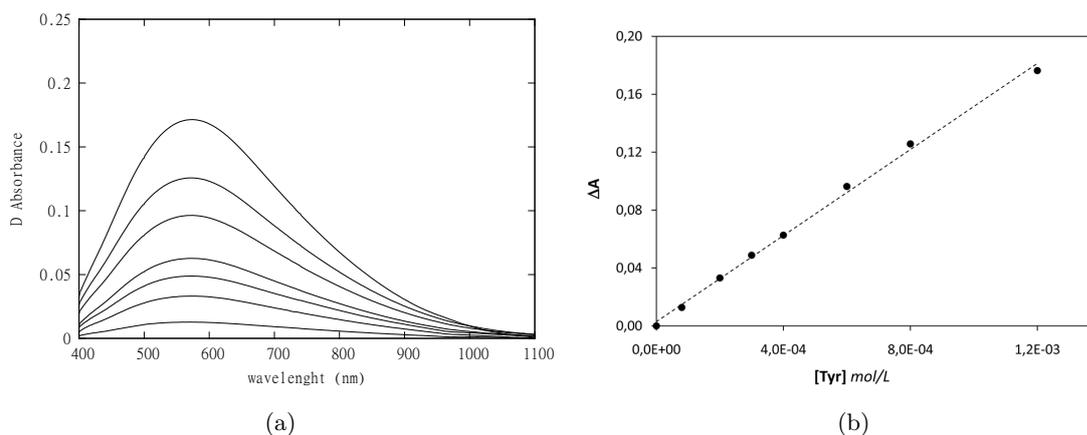


	[Tyr] $10^3$ (mol/L)	$\chi_{Tyr}$
<b>T0</b>	0.00	0.00
<b>T1</b>	0.08	0.07
<b>T2</b>	0.20	0.17
<b>T3</b>	0.30	0.23
<b>T4</b>	0.40	0.29
<b>T5</b>	0.60	0.38
<b>T6</b>	0.80	0.44
<b>T7</b>	1.2	0.55

**Tabella C.1:** Valori di concentrazione di Tyr impiegati nella preparazioni dei campioni T1-T7. Il campione T0 si riferisce a GAFe(II) senza aggiunta di Tyr.

**Figura C.1:** Spettro UV-Vis di GAFe(II)-Tyr,  $[GA]=0.001$  mol/L,  $[Fe^{2+}]=0.001$  mol/L,  $[Tyr]$  variabile secondo quanto indicato in tabella C.1, in soluzione acquosa tamponata  $CH_3COOH/CH_3COONa$  0.01 M a pH=4.

ma l'assorbanza continua a crescere costantemente. Dal momento che gli spettri dei diversi campioni sono stati registrati esattamente allo stesso tempo dal momento del mescolamento dei reagenti, possiamo considerare i dati tra loro confrontabili. La variazione dell'intensità di assorbimento dovuta all'aggiunta di Tyr è messo ben in evidenza in figura C.2 (a) in cui sono riportati gli spettri nel range del visibile dei campioni T1-T7 ottenuti mediante la sottrazione dello spettro GAFe(II). Il grafico in C.2 (b) mostra una correlazione lineare tra la differenza di assorbanza ( $\Delta A$ ) a 570 nm e la concentrazione di Tyr, ad indicare che è plausibile un'interazione GAFe(II)-Tyr di tipo 1:1.



**Figura C.2:** Spettro UV-Vis dei campioni T1-T7 a cui è stato sottratto lo spettro di T0. (b) Andamento di  $\Delta A$  (definita come  $A_{Tn} - A_{T0}$ ) in funzione della concentrazione di Tyr.

Come abbiamo avuto modo di accennare nei capitoli iniziali, la complessità del comporta-

---

mento chimico del complesso  $\text{GAFe(II)}$  in soluzione, dovuta alla presenza di coppie redox, alle cinetiche di reazione non semplici, alla dipendenza delle condizioni sperimentali etc., suggerisce di considerare i dati sperimentali raccolti come uno studio preliminare relativo all'impiego di tecniche spettrofotometriche applicabili alla caratterizzazione di complessi ternari.



---

## Bibliografia

---

- [1] S. Fantacci, A. Amat, and A. Sgamellotti. Computational Chemistry Meets Cultural Heritage: Challenges and Perspectives. *Account of Chemical Research*, 43:802–813, 2010.
- [2] J. H. de Graaf. *The colourful past: origins, chemistry and identification of natural dyestuffs*. Abegg-Stiftung an Archetype Publications Ltd, 2004.
- [3] J. Kolar and M. Strlič. *Iron Gall Inks: on manufacture characterisation degradation and stabilisation*. National and University Library, Ljubljana, 2006.
- [4] A. M. Rita Mussak and T. Bechtold. *Handbook of Natural Colorants*. John Wiley and Sons, 2009.
- [5] I. Degano, E. Ribechini, F. Modugno, and M. P. Colombini. Analytical methods for the characterisation of organic dyes in artworks and in historical textiles. *App. Spect. Rev.*, 44:363–410, 2009.
- [6] A. Onal. Ellagic acid from gallnut (*Quercus infectoria*): Extraction and determination of its dyeing condition for natural fibres. *J. Sci. and Ind. Res.*, 64:491–495, 2005.
- [7] F. Pertegato. *I Tessili, Degrado e Restauro*. Nardini Editore, Firenze, 1993.
- [8] K. R. Millington and J. S. Church. The photodegradation of wool keratin II. Proposed mechanisms involving cystine. *J. Photochem. and Photobio. B*, 39:204–212, 1997.
- [9] M. Andjelković, J. V. Camp, B. De Meulenaer, G. Depaemelaere, C. Socaciu, M. Verloo, and R. Verhe. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem.*, 98:23–31, 2006.
- [10] J. D. Lee. *Concise Inorganic Chemistry*. Chapman & Hall, London, 1996.
- [11] M. Lutui, F. Gilard, and M. Sabilier. Can electrospray ionization help the characterization of iron gall inks? Investigation on the interactions of gallic acid with iron ions in aqueous solution. *J. Mass Spect.*, 43:1123–1131, 2008.

- [12] L. Lu, Y. Li, and X. Lu. Kinetic study of the complexation of gallic acid with Fe(II). *Spect. Acta Part A*, 74:829–834, 2009.
- [13] J. M. Hynes and M. Coinceanainn. The kinetics and mechanism of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *J. Inorg. Biochem.*, 85:131–142, 2001.
- [14] H. Kipton, J. Powell, and M.C. Taylor. Interactions of Iron(II) and Iron(III) with Gallic Acid and its Homologues: a Potentiometric and Spectrophotometric Study. *Aust. J. Chem.*, 35:739–756, 1982.
- [15] A. E. Fazary, M. Taha, and Y. Ju. Iron Complexation Studies of Gallic Acid. *J. Chem. Eng. Data*, 54:35–42, 2009.
- [16] S. Kolayli, M. Ocak, M. Küçük, and R. Abbasoğlu. Does caffeine bind to metal ions? *Food Chem.*, 84:383–388, 2004.
- [17] V. Jančovičová, M. Čeppan, B. Havlinová, M. Rehakova, and Z. Jakubikova. Interactions in Iron Gall Inks. *Chem. Pap.*, 61:391–397, 2007.
- [18] C. Krekel. The chemistry of historical iron gall inks. *Int. J. Forensic Document Examiners*, 5:54–58, 1999.
- [19] V. Rouchon-Quillet, C. Remazeilles, J. Bernard, A. Wattiaux, and L. Fournes. The impact of gallic acid on iron gall ink corrosion. *Appl. Phys. A*, 79:389–392, 2004.
- [20] Frank Jensen. *Introduction to Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, second edition, 2007.
- [21] H. B. Schlegel. Optimization of Equilibrium Geometries and Transition Structures. *J. Comp. Chem.*, 3:214–218, 1982.
- [22] W. H. Press, S. A. Teukolesky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery. *Fortran Numerical Recipes*. Cambridge University Press, 2001.
- [23] A. D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. *Phys. Rev. A*, 38:3098–3100, 1988.
- [24] A. D. Becke. Density-functional thermochemistry III. The role of exact exchange. *J. Phys. Chem.*, 98, 1993.
- [25] Y. Zhao and D. G. Truhlar. Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry. *Acc. Chem. Research*, 41:157–167, 2007.
- [26] A. Sorokin, M. A. Iron, and D. G. Truhlar. Density Functional Theory in Transition-Metal Chemistry: Relative Energies of Low-Lying States of Iron Compounds and the Effects of Spatial Symmetry Breaking. *J. Chem. Theory Comput.*, 4:307–315, 2008.

- [27] Y. Zhao and D. G. Truhlar. The M06 suite of density functional for main group thermochemistry, therrmochemical kinetics, noncovalent interaction, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 ither functionals. *Theor. Chem. Account*, 120:215–241, 2008.
- [28] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox. Gaussian09 Revision A.1. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [29] J. Tomasi and M. Persico. Molecular interaction in solution. An overview of methods based on continuos distributions of te solvent. *Chem. Rev.*, 94:2027–2094, 1994.
- [30] J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.*, 105:2999–3093, 2005.
- [31] B. Mennucci, E. Cancés, and J. Tomasi. Evaluation of solvent effects in isotropic and anisotropic dielectrics and in ionic solution with a unified integral equation method: Theretical bases, computational implementation and numerical application. *J. Am. Chem. Soc.*, 49:10506–10517, 1997.
- [32] S. Bell and T. J. Dines. Computational Chemistry Using Modern Electronic Structure Methods. *J. Chem. Education*, 84(8), 2009.
- [33] Ira N. Levine. *Quantum Chemistry*. Pearson Prentice Hall, 2009.
- [34] T. Yanai, D. Tew, and N. Handy. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.*, 393:51–57, 2004.
- [35] J.P. Foster and F. Weinhold. Natural Bond Orbital. *J. Am. Chem. Soc.*, 102:7211–18, 1980.
- [36] A. E. Fazary and Y. Ju. Non aqueous solution studies on the protonation equilibria of some phenolics acid. *J. Solution Chem.*, 37, 2008.
- [37] C. Cappelli, B. Mennucci, and S. Monti. Enviromental Effects on the Spectroscopic Properties of Gallic Acid: A Combined Classical and Quantum Mechanical Study. *J. Phys. Chem. A*, 109:1933–1943, 2005.

- [38] F. Billes, I. Mohammed-Ziegler, and P. Bombicz. Vibrational spectroscopic study on the quantum chemical model and X-ray structure of gallic acid, solvent effect on the structure and spectra. *Vibrational Spectroscopy*, 43:193–202, 2007.
- [39] M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, and M. Toscano. Iron Chelation by the Powerful Antioxidant Flavonoid Quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, 54:6343–6351, 2006.
- [40] P. Guoa, W. Chen, J. Song, W. Cao, and C. Tian. A DFT study of the interaction between butein anion and metal cations ( $M = Mg^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$ ): Taking an insight into its chelating property. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, 849:33–36, 2008.
- [41] S. Sun, W. Chen, W. Cao, F. Zhang, J. Song, and C. Tian. Research on the chelation between quercetin and Cr(III) ion by Density Functional Theory (DFT) method. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, 860:40–44, 2008.
- [42] J.E. Huheey, E. A. Keiter, and R. L. Keiter. *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*. 1997.
- [43] M. Swart. Accurate Spin-State Energies for Iron Complexes. *J. Chem. Theory Comput.*, 4:2057–2066, 2008.
- [44] A. Hauser. Ligand Field Theoretical Considerations. *Adv. Polym. Sci.*, 233:49–58, 2004.
- [45] H. Paulsen and A.X. Trautwein. Spin Crossover in Transition Metal Compounds II. *Top. Curr. Chem.*, 235:197–219, 2004.
- [46] Z. Rinkevicius, I. Tunell, P. Salek, O. Vahtras, and H. Agren. Restricted density functional theory of linear time-dependent properties in open-shell molecules. *J. Chem. Phys.*, 119:34, 2003.
- [47] E. Broclawik and T. Borowski. Time-dependent DFT study on electronic states of vanadium and molybdenum oxide molecules. *Chem. Phys. Letters*, 339:433–437, 2001.
- [48] D. Voet and J.G. Voet. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, 3rd edition, 2004.
- [49] H. Pesonen, R. Aksela, and K. Laasonen. Density Functional Complexation Study of Metal Ions with Cysteine. *J. Phys. Chem. A*, 114:466–473, 2010.
- [50] A. Hacke. *Investigation into the Nature and Ageing of Tapestry Materials*. PhD thesis, University of Manchester Faculty of Engineering and Physical Sciences, 2004.
- [51] H. Sigel and B. Marin. Coordinating properties of the amide bond. stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem. Rev.*, 82:385–426, 1982.
- [52] T. Marino, M. Toscano, N. Russo, and A. Grand. Structural and Electronic Characterization of the Complexes Obtained by the Interaction between Bare and Hydrated First-Row Transition-Metal Ions ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) and Glycine. *J. Phys. Chem. B*, 110:24666–24673, 2006.

- [53] A. Hongqi, B. Yuxiang, L. Ping, L. Zhiqiang, H. Xiangquan, and Z. Chen. Geometry and binding properties of different multiple-state glycine-Fe<sup>+</sup>/Fe<sup>2+</sup> complexes. *J. Phys. Org. Chem.*, 18:26–34, 2005. Rif. 9 TEOGly01.
- [54] J. Xu. An insight into interaction of Fe<sup>2+</sup> with glycyglycine: A DFT study. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, 757:171–174, 2005. Rif. 10 TeoGly01.
- [55] C. A. Tellez. Fourier transform Raman spectra (in aqueous solution) of serine and tetracqua aluminium(III) cation complex: [Al(Ser)H<sub>2</sub>O]<sub>4</sub><sup>2+</sup>. DFT: B3LYP/3-21G structural and vibrational calculations. *J. Raman Spec.*, 35:19–27, 2004.
- [56] L. Guimaraes, H Avelino de Abreu, and H. A. Duarte. Fe(II) hydrolysis in aqueous solution: A DFT study. *Chem. Phys.*, 333:10–17, 2007.
- [57] T. Kiss, I. Sóvágó, I. Tóth, A. Lakatos, R. Bertani, A. Tappararo, G. Bombi, and R. B. Martin. Complexation of aluminium(III) with several bi- and tri- dentate amino acids. *J Chem. Soc. Dalton Trans.*, pages 1967–1972, 1997.
- [58] R.D. B. Fraser and J. M. Gillespie. Wool structure and biosynthesis. *Nature*, 261:650–655, June 1976.
- [59] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22:195–201, 2006.
- [60] L. Bordoli, F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey, and T. Schwede. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 4:1–13, 2009.
- [61] W.G. Crewther, A. S. Inglis, and N. M. McKern. Amino acid sequences of alpha-helical segments from S-carboxymethylkerateine-A. Complete sequence of a type-II segment. *J. Biochem.*, 173:365–371, 1978.
- [62] James J. P. Stewart. Optimization of parameteres for semiempirical methods V: Modification NDDO approximation and application to 70 elements. *J. Mol. Model*, 13:1173–1213, 2007.
- [63] James J. P. Stewart. Application of the PM6 method to modeling proteins. *J. Mol. Model*, 15:765–805, 2009.
- [64] S. Dapprich, I. Komáromi, K. S. Byun, K. Morokuma, and M. J. Frisch. A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatatives. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, 461-462:1–21, 1999.
- [65] S. Keten, C. Chou, A. C.T. van Duin, and J. M. Buehler. Tunable nanomechanics of protein disulfide bonds in redox microenvironments. *J. Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 5:32–40, 2012.

- [66] M. Odlyha, C. Theodorakopoulos, and R. Campana. Studies on wollen threads from historical tapestries. *AUTEX Res. Journal*, 7:9–18, 2007.

---

## Ringraziamenti

---

Al termine di questo impegnativo tirocinio di tesi vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno seguito e supportato in tutte le fasi del lavoro, sia dal lato scientifico che umano. Un particolare ringraziamento alla Prof.ssa Mennucci, che mi ha permesso di approfondire la conoscenza e l'applicazione delle tecniche computazionali nello studio di sistemi complessi, al Prof. Tani, che ha pazientemente contribuito alla revisione finale dell'elaborato, e alla Dr. Degano, che mi ha avvicinato alle problematiche legate all'impiego dei coloranti naturali e che mi ha seguito durante le misure sperimentali. A tal proposito vorrei ringraziare il gruppo del laboratorio di Chimica dei Beni Culturali per l'ospitalità e il supporto, in particolare Annalaura, coinvolta in prima persona nel progetto "VAT" e la Dr. Ribechini che ha contribuito all'impostazione e alla revisione dell'elaborato.

Un sentito ringraziamento ai ragazzi del gruppo di Chimica Computazionale, con i quali ho trascorso gran parte del periodo di tirocinio; in particolare un grazie a Filippo e ai suoi preziosi consigli tecnici, e alla mia compagna di scrivania Ambra, con la quale ho condiviso questa bella esperienza.

Un pensiero va alla mia famiglia, che ha sempre creduto in me, mi ha incoraggiato e supportato durante tutto il percorso di studi. Ringrazio infine Sara, la persona più importante che mi ha accompagnato in quest'avventura rimanendomi sempre vicino e rappresentando per me un punto di riferimento sul quale poter contare sempre.